



Doctorado en Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba



## **TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

# **“ESTUDIO BIOFÍSICO-QUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE COMPUESTOS FENÓLICOS CON POSIBLE ACTIVIDAD ANESTÉSICA Y/O GABAÉRGICA”**

***Biól. Gabriela N. Reiner***

***Director: Dr. Daniel A. García***

LUGAR DE TRABAJO:  
Cátedra de Química Biológica  
Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba

**2013**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Este documento se encuentra disponible en el Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<https://rdu.unc.edu.ar/>

## COMISIÓN ASESORA

Dr. Daniel Asmed GARCIA, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales,  
Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. María Clara GRAVIELLE, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de  
Buenos Aires.

Dra. María Julia CAMBIASSO, Instituto de Inv. Médicas Mercedes y Martin  
Ferreyra, CONICET

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

## TRIBUNAL

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

- 1 - Reiner GN, Labuckas DO and García DA. Lipophilicity of some GABAergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **49**, 686–691 (2009). (ISSN: 0731-7085).
  
- 2 - Reiner GN, Perillo MA and García DA. Effects of propofol and other gabaergic phenols on membrane molecular organization. **Colloids and Surfaces (B)**. **101**, 61– 67 (2013). (ISSN: 0927-7765).
  
- 3 - Reiner GN, Delgado-Marín L, Olgún N., Sánchez-Redondo S, Sánchez-Borzone M, Rodríguez-Farré E, Suñol C and García DA. Gabaergic pharmacological activity of propofol related compounds as possible enhancers of general anesthetics and interaction with membranes. **Cell Biochemistry and Biophysics**. In press. (02/2013). (ISSN: 1085-9195).
  
- 4 - Reiner G.N., Fraceto L.F., De Paula E., Perillo M.A., Garcia D.A. Effects of Gabaergic phenols on phospholipid bilayers as evaluated by <sup>1</sup>H.NMR. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology (JB NB)**. Aceptado (07/05/2013) ID: 3200285

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al director de mi tesis, el Dr. Daniel García, por su apoyo y seguimiento constantes en este trabajo, y por su aporte en mi formación como investigadora.

Agradezco a María Angélica Perillo (Marieca) por haberme integrado a su equipo y por aportar sus conocimientos en varias oportunidades.

Agradezco a Diana Labuckas quien colaboró en el uso de HPLC.

Gracias a a la Dra. Cristina Suñol, directora del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, por recibirme en dicho espacio y por su colaboración en el avance de mi trabajo. Y a Mireia Galofré por su instrucción y acompañamiento en las técnicas de cultivo.

Gracias a Eneida de Paula del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas, por su recibimiento y apoyo, y por brindar sus conocimientos. También agradezco a su grupo por la grata compañía e intercambio, en especial a Irene, Camila y Mario. Y a Leonardo Fraceto por su colaboración en la obtención de datos de RMN y en el análisis posterior de los mismos.

A Gustavo Baiardi por suministrarnos los animales de laboratorio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas otorgadas; al CONICET, SECyT (UNC), y FONCyT por los subsidios otorgados a mi director; a IBRO-Larc, a MinCyT, a Capes por financiar las estancias cortas en Barcelona y Campinas.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Vero Nólán, Pedro Clop, Anahí Turina, Benja Caruso, Mae Sanchez, Chicho Clop, Naty Corvalán, Leticia Delgado, Juli Sanchez, por la buena predisposición, por el intercambio.

A mis amigos: Romi Martelotto, Juli Astegiano, Pau Venier, Andrés Cocca, Titi Scandogliero, Andre Cosacov, Pedro Clop, Mari Occelli, Martín Medina, Anita Ferreras, Benja Carusso, Mari Paolorossi, Enrique Roitter, Carla Coutsiers, Ceci Mlewski, Vale Molinari por los lindos momentos compartidos durante estos años y por su afecto.

Agradezco infinitamente a mi familia, a Juan, y a su familia; ya que sin su cariño esta tesis no hubiera sido posible.

**ÍNDICE GENERAL**

<b>RESUMEN EN ESPAÑOL</b>	i
<b>RESUMEN EN INGLES</b>	iii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<i><b>Anestésicos generales</b></i>	2
<i>Hipótesis de interacción con lípidos de membrana</i>	2
<i>Hipótesis de interacción con proteínas de membrana</i>	6
<i>Efectos conjuntos</i>	7
<i><b>Receptor GABA<sub>A</sub></b></i>	8
<i><b>Interacción droga-membrana</b></i>	16
<i><b>Hipótesis</b></i>	17
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICO-QUÍMICA</b>	21
<b><i>MATERIALES Y MÉTODOS</i></b>	22
1. Reactivos	22
2. Caracterización espectrofotométrica	22
2.1 . <i>Espectros y picos de Absorción</i>	22
2.2 . <i>Curvas de calibración</i>	23
3. Determinación del límite de solubilidad	23
4. Determinación experimental del Coeficiente de Partición octanol/agua (log P <sub>o/w</sub> ).	23
5. Determinación teórica del Coeficiente de Partición octanol/agua (log P <sub>o/w</sub> )	24
6. Cálculo de las constantes de disociación	24
7. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	25
7.1. - <i>Método IAM.HPLC</i>	25
7.2. - <i>Método RP-HPLC</i>	26
7.3. - <i>Cálculo de factor de capacidad (k) y coeficiente de partición (K)</i>	26
8. Coeficiente de Partición liposoma-buffer	27
9. Análisis de Correlación	29
<b><i>RESULTADOS</i></b>	29
<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	36

<b>CAPÍTULO II: EFECTOS SOBRE MODELOS DE MEMBRANAS</b>	38
<b>ARTIFICIALES</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	39
1. Reactivos	39
2. Capas monomoleculares de fosfolípidos en la interfase agua-aire (film de Langmuir)	39
2.1- <i>Equipo de Monocapas para obtención de Isotermas Presión-Area</i>	39
2.2- <i>Isotermas de superficie Presión-Area Molecular (<math>\pi</math>-A)</i>	40
2.3- <i>Velocidad de penetración de los compuestos en monocapas fosfolípicas</i>	41
2.4- <i>Microscopía de epifluorescencia de monocapas de DPPC</i>	42
3. $^1\text{H}$ -RMN (Resonancia Magnética Nuclear de protones)	42
3.1- <i>Coeficientes de partición</i>	42
3.2- <i>Preparación de membranas</i>	43
3.3- <i>Adquisición de espectros <math>^1\text{H}</math>-RMN</i>	43
<b>RESULTADOS</b>	44
1. Isotermas $\pi$ -A	44
2. <i>Velocidad de Penetración en interfase agua-aire de monocapas lipídicas</i>	48
3. <i>Microscopía de Epifluorescencia de monocapas</i>	49
4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	53
<b>DISCUSIÓN</b>	63
<b>CAPITULO III: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y ENSAYOS DE</b>	70
<b>TOXICIDAD</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	71
1. Reactivos	71
2. Cultivos celulares	71
3. Unión de [ $^3\text{H}$ ]-flunitrazepam	72
4. Determinación de la viabilidad celular (ensayo de MTT)	73
5. Ensayo de hemólisis	74
6. Análisis de los datos	74
<b>RESULTADOS</b>	75
<b>DISCUSIÓN</b>	80

<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	85
<i>APENDICE 1</i>	89
<i>APENDICE 2</i>	92
<i>APENDICE 3</i>	93
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	102



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Fig. 1.</b> Receptores ionotrópicos activados por ligando.	8
<b>Fig. 2.</b> Estructura esquemática del receptor GABA <sub>A</sub> .	10
<b>Fig. 3.</b> Dominio extracelular (A) y dominio transmembrana (B) del receptor GABA <sub>A</sub> .	13
<b>Fig. I.1.</b> Estructuras químicas de los compuestos estudiados.	19
<b>Fig. I.2.</b> Detalle de la fase estacionaria de una columna IAM.PC.DD2.	23
<b>Fig. I.3.</b> Determinación espectrofotométrica.	26
<b>Tabla I.1.</b> Datos Obtenidos a partir de ensayos espectrofotométricos.	27
<b>Fig. I.4.</b> Determinación de pK.	28
<b>Tabla I.2.</b> Matriz de datos originales.	29
<b>Tabla I.3.</b> Tabla de correlación simple.	30
<b>Fig. I.5.</b> Factor de capacidad (k) a diferentes temperaturas.	31
<b>Fig. I.6.</b> Correlación de logaritmos de Coeficientes de Partición.	31
<b>Tabla I.4.</b> Contribución de cada componente principal a la variabilidad total entre las muestras.	32
<b>Tabla I.5.</b> Contribución de cada variable individual al componente principal 1.	32
<b>Fig. II.1.</b> Equipo de Monocapas.	36
<b>Fig. II.2.</b> Efecto de la compresión y la concentración bulk de compuestos fenólicos en las propiedades interfaciales de los filmes de Langmuir de dpPC y la concentración de los coeficientes fenólicos en superficie.	43
<b>Fig. II.3.</b> Análisis de la velocidad de penetración.	44
<b>Fig. II.4.</b> Velocidades máximas de penetración de los CFs ( $V_{MAX}$ ).	45
<b>Fig. II.5.</b> Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia.	47
<b>Fig. II.6.</b> Microfotografías de epifluorescencia de monocapas de dpPC.	48
<b>Fig. II.7.</b> Análisis cuantitativo de dominios LC de microfotografías de epifluorescencia.	49
<b>Tabla II.1.</b> Coeficientes de Partición EPC:Buffer.	49
<b>Fig. II.8.</b> Espectros de <sup>1</sup> H-RMN a 600 MHz.	51

---

<b>Fig. II.9.</b> Atribuciones de los hidrogenos asignadas a cada compuesto (letras minúsculas) y al fosfolípido EPC (letras mayúsculas).	52
<b>Tabla II.2.</b> Desplazamiento químico del espectro $^1\text{H}$ -RMN de propofol, EPC y propofol:EPC.	53
<b>Tabla II.3.</b> Desplazamiento químico de los espectros de $^1\text{H}$ -RMN de timol, EPC y timol:EPC.	54
<b>Tabla II.4.</b> Desplazamientos químicos en los espectros de $^1\text{H}$ -RMN de carvacrol, EPC y carvacrol:EPC.	55
<b>Tabla II.5.</b> Desplazamientos químicos en los espectros $^1\text{H}$ -RMN de eugenol, EPC y eugenol:EPC.	56
<b>Tabla II.6.</b> Desplazamientos químicos de espectro $^1\text{H}$ -RMN de clorotimol, EPC y clorotimol:EPC.	57
<b>Fig. II.10.</b> Variaciones en los valores de T1 de los hidrógenos de EPC en ausencia y presencia de los compuestos.	58
<b>Fig. II.11.</b> Hipótesis de interacción de los compuestos fenólicos con vesículas de EPC.	65
<b>Fig. III.1.</b> Curvas concentración-respuesta para la unión de [ $^3\text{H}$ ]-flunitrazepam en presencia de carvacrol, eugenol y clorotimol.	71
<b>Tabla III.1.</b> Efectos de compuestos fenólicos sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]-flunitrazepam en presencia de carvacrol, eugenol y clorotimol.	71
<b>Fig III.2.</b> Efecto de la bicuculina sobre el incremento de la unión de [ $^3\text{H}$ ]-flunitrazepam inducido por carvacrol, eugenol y clorotimol.	72
<b>Fig. III.3.</b> Viabilidad celular (Ensayo de MTT) en presencia de compuestos fenólicos.	73
<b>Tabla III.2.</b> Porcentajes de Hemólisis inducido por los compuestos fenólicos a diferentes concentraciones.	74

## **RESUMEN**

El estudio de compuestos naturales bioactivos ha contribuido significativamente al desarrollo de la farmacología y de la medicina a partir de los resultados del análisis de sus mecanismos de acción. Existen compuestos con actividad anestésica que poseen un efecto modulador positivo del receptor GABA<sub>A</sub> por lo cual muchos autores vinculan ambas características. En la presente Tesis se intenta abordar el estudio de los mecanismos involucrados principalmente en la modulación del receptor GABA<sub>A</sub> mediante un punto de vista que conjugue tanto las características biofísico-químicas de los compuestos y su entorno, como las propiedades farmacológicas de los mismos. Se escogieron como compuestos a estudiar moléculas fenólicas, principalmente de origen natural y estructuralmente similares al ampliamente conocido anestésico general propofol. Para ello, se realizó en una primera parte la determinación de algunas de las principales propiedades fisicoquímicas de los compuestos a estudiar para conocer, entre otras cosas, su grado de lipofilidad y su tendencia a particionarse en fases membranosas. Posteriormente, se analizaron sus efectos sobre modelos artificiales de membranas para finalmente realizar estudios sobre células en cultivo que involucraron tanto ensayos de citotoxicidad como ensayos farmacológicos sobre el receptor GABA<sub>A</sub>.

Los resultados alcanzados permiten abordar las siguientes conclusiones principales:

- Todos los compuestos mostraron una alta lipofilidad en distintos sistemas de ensayo en el siguiente orden creciente: Eugenol < Carvacrol ≤ Timol < Propofol < Clorotimol. Esta lipofilidad pudo ser correlacionada con su capacidad para interactuar con membranas artificiales (liposomas). Dentro de los sistemas de ensayos utilizados para este punto, se validó la utilización de métodos cromatográficos rápidos y simples (IAM-HPLC) para predecir la capacidad de interacción de estos compuestos con membranas de fosfolípidos puros.
- Todos los compuestos fueron capaces de expandir e inestabilizar filmes de Langmuir de dpPC. La interacción de estos compuestos con fases membranosas es favorecida cuando las mismas se encuentran menos compactas.
- Sus características físico-químicas y estructurales hacen que los mismos se intercalen en la zona de las cabezas polares, el glicerol y el comienzo de las cadenas

hidrocarbonadas de las membranas de los fosfolípidos disminuyendo las repulsiones electrostáticas de corto alcance entre los mismos.

- Los ensayos farmacológicos realizados en el presente trabajo, en sistemas de cultivos primarios neuronales, revelan que carvacrol y eugenol ejercerían una modulación positiva del receptor  $GABA_A$ , aunque con menos potencia que la demostrada por propofol y timol. Por su parte, clorotimol indujo una modulación positiva pero sólo hasta concentraciones alrededor de  $100 \mu M$ ,
- Los estudios de citotoxicidad y hemólisis muestran la ausencia de citotoxicidad de los compuestos a concentraciones similares a las farmacológicamente activas sobre el receptor  $GABA_A$ .

Se concluye entonces que los resultados obtenidos en la presente Tesis contribuyen a una comprensión más profunda de los posibles mecanismos de acción involucrados en los efectos moduladores producidos tanto por drogas de consumo masivo como por agentes naturales, a través de una perspectiva que involucra el estudio conjunto de disciplinas diferentes como lo son la biofísica-química y la farmacología, posibilitando así el entendimiento de la modulación del receptor mediante una visión más amplia que contempla no solo los eventos específicos sino también los inespecíficos que tienen lugar principalmente con componentes de las membranas que contienen a dicho receptor.

## **SUMMARY**

The study of natural products bioactivity has significantly contributed to the pharmacology and medicine development from the analysis of their action mechanisms. The fact that there exist compounds with anesthetic activity, which possess positive modulator effects on the GABA<sub>A</sub>-receptor, permits that many authors associate both properties. The present Thesis tries to approach the study of mechanisms involved in the GABA<sub>A</sub>-receptor modulation, through a point of view that includes not only the biophysical properties of the compound and their environment, but also their pharmacological activity. The compounds to be analyzed are phenolic molecules, mainly of natural sources, and structurally similar to the widely known general anesthetic propofol. During the first part of the study, several physicochemical properties were determined to recognize their lipophilicity and tend to partition in membrane phases, between others characteristics. Afterward, their effects on membrane artificial membranes and on cultured cells were also analyzed. Respect to this last point, assays to determine cytotoxicity and pharmacological activity were achieved.

The results obtained permit to consider the following general conclusions:

- All compounds showed a high lipophilicity in different assay systems according the following increasing order: Eugenol < Carvacrol ≤ Thymol < Propofol < Chlorothymol. The correlation results demonstrate that the capacity of the compounds assayed to interact with phospholipid membrane phases can be predicted by simple and quick chromatographic methods such as IAM-HPLC.
- All compounds were able to expand and destabilize dpPC-Langmuir films. The interaction of them with membrane phases was favored by less-packed lipid structures.
- Due to their physicochemical and structural characteristics they interact with the membrane between phospholipid molecules, at the head group and the beginning of the hydrocarbon chains regions, diminishing the short-range repulsion among lipids.
- The pharmacological assays with neuronal cultured cells revealed that carvacrol and eugenol are positive allosteric modulators of this receptor. Chlorothymol showed a bell-type effect, reducing its positive effect until concentrations around 100 μM.

- The cytotoxicity and haemolysis studies showed the absence of cytotoxic effects at concentrations similar to those with pharmacological effects on the GABA<sub>A</sub>-receptor.

Thus, the results obtained in the present Thesis contribute to a more profound comprehension of the possible action mechanisms involved in the modulation effect generated by drugs of massive use or natural agents, by means a perspective which include the assembled study of different disciplines such as biophysics-chemistry and pharmacology, allowing the understanding of the receptor modulation through a wider vision that take into account not only the specific events but also the non-specific ones, which largely happen with membrane components that contain the receptor.

# ***INTRODUCCIÓN***

---

### **Anestésicos generales**

La introducción de los agentes anestésicos durante el siglo XIX ha representado una verdadera revolución en cirugía. Los anestésicos generales son moléculas que inducen un estado reversible de pérdida del conocimiento, caracterizado por amnesia y analgesia. Pueden ser administrados en forma de gases o vapores (anestésicos de inhalación), o como inyecciones (intravenosas o intramusculares). Todos estos agentes comparten la propiedad de ser bastante hidrofóbicos, es decir, en forma de líquidos, no son libremente miscibles en agua, y como gases, se disuelven en fases hidrofóbicas mejor que en agua. Muchos compuestos se han utilizado para la anestesia inhalatoria, pero sólo unos pocos se mantienen para uso generalizado: desflurano, isoflurano y sevoflurano son los anestésicos volátiles más utilizados. Entre los no volátiles más utilizados se encuentran propofol, etomidato, los barbitúricos y las benzodiazepinas (Flower Rod 2007).

Ya sean administrados por inhalación o por vía intravenosa para inducir o mantener la anestesia general, acceden a todas partes del cuerpo e interactúan a nivel molecular con distintos componentes entre los que se encuentran principalmente lípidos y proteínas. Para que estas interacciones produzcan un efecto anestésico deben alcanzar concentraciones clínicamente relevantes que dependen de cada anestésico en particular (Miller 2002).

Pese a la importante utilización de los anestésicos generales, su mecanismo exacto de acción aún no fue completamente dilucidado aunque existe una vasta variedad de trabajos de investigación en el área desde hace más de una centuria. De estos trabajos surgen una serie de teorías que tratan de explicar la acción anestésica general.

#### *Hipótesis de interacción con lípidos de membrana*

En el año 1847 se postula un mecanismo no específico de acción anestésica general, a través de una interacción de los agentes anestésicos con lípidos de membrana (Harless y von Bibra 1847; Meyer 1899), los autores sugieren que los anestésicos generales pueden actuar mediante su disolución en la fracción lipídica de las células del cerebro modificando la actividad de las mismas e induciendo la anestesia. En 1899



Meyer publicó la primera evidencia experimental de que la potencia anestésica se relaciona con la solubilidad en lípidos (Meyer 1899; Meyer 1901), y una teoría similar publica Overton de manera independiente por (Overton 1901).

Meyer comparó la potencia de muchos agentes anestésicos, definida como el recíproco de la concentración molar requerida para inducir anestesia, con su coeficiente de partición en sistema bifásico aceite / agua. Encontró una relación casi lineal entre la potencia y el coeficiente de partición para muchos tipos de anestésicos diferentes (alcoholes , aldehídos , cetonas , éteres y ésteres). Meyer y Overton descubrieron la importante correlación entre las propiedades físicas de los anestésicos generales y su potencia: a mayor solubilidad mayor sería su potencia anestésica (Meyer 1937). Luego, esta correlación se pudo mejorar considerablemente tanto en calidad como en la cantidad de anestésicos, usando otros solventes o fases lipofílicas como octanol (Franks y Lieb 1978) o una bicapa fluida hidratada (Janoff et al. 1981; Taheri et al. 1991; Vaes et al. 1997; Meijer et al. 1999).

Meyer y Overton habían supuesto un mecanismo unitario de anestesia general, donde la solubilización de anestésicos generales lipofílicos en la bicapa lipídica de la neurona causaban un cambio funcional en la misma y un efecto anestésico cuando se alcanzaba la concentración crítica del compuesto. Más tarde, en 1973, Miller y Smith sugirieron la hipótesis del volumen crítico o hipótesis de expansión de la bicapa lipídica (Miller et al. 1973). Ellos demostraron que las moléculas de anestésicos hidrofóbicas y voluminosas se acumulan en el interior hidrofóbico de la membrana provocando su deformación y expansión debido al desplazamiento de volumen. Demostraron que la acumulación de cantidades críticas de anestésico causaba un engrosamiento de la membrana suficiente para alterar reversiblemente la función de los canales iónicos de membrana, proporcionando así el efecto anestésico. Esto sugirió entonces que la estructura química del agente anestésico en sí no era importante y que su volumen molecular desempeña el papel principal: a mayor espacio ocupado por el anestésico dentro de la membrana mayor sería el efecto anestésico. En base a esta idea, Mullins encontró mejoras para la correlación Meyer-Overton con la potencia anestésica, teniendo en cuenta los volúmenes moleculares de las moléculas anestésicas (Mullins 1954).

Luego surgieron más aportes fisicoquímicos teóricos de la acción anestésica que tuvieron en cuenta la naturaleza química diversa de los anestésicos generales, sugiriendo también que el efecto anestésico se ejerce a través de alguna perturbación de la bicapa

lipídica. Dentro de las perturbaciones de bicapa propuestas como causantes de efecto anestésico se encuentran los cambios en la separación de fases, cambios en el espesor de la bicapa, cambios en los parámetros de orden, cambios en la curvatura, etc. (Janoff et al. 1981; Miller 1985; Koblin et al. 1994; Trudell et.al. 1977).

La hipótesis de los lípidos, sin embargo, sufre una serie de debilidades (Mullins 1954; Cameron 2006). Una primera observación sería que mientras estereoisómeros de un fármaco anestésico tienen potencia anestésica muy diferente, sus coeficientes de partición son similares, se sugirió entonces un reconocimiento específico de los mismos por medio de sitios de unión estereo selectivos en proteínas de membrana (Franks y Lieb 1991; Nau y Strichartz 2002). También se encontró que ciertos fármacos muy similares a anestésicos generales potentes y altamente solubles en lípidos, sólo ejercen acción amnésica sin reprimir el movimiento como hacen los anestésicos (Taheri et al. 1993; Koblin et al. 1994; Fang et al. 1996; Kandel et al. 1996). Estos fármacos no inmovilizadores sugieren que los anestésicos pueden actuar sobre diferentes componentes del efecto anestésico al afectar a diferentes dianas moleculares y no sólo a la membrana en general (Eger et al. 1997). Otra debilidad sería que la anestesia general inducida por cambios en la densidad de la membrana y la fluidez son tan pequeñas que aumentos relativamente pequeños de temperatura podrían imitar estos efectos sobre la fluidez y la densidad de la membrana sin causar anestesia. Y por último, que existe un efecto de corte, es decir, que la adición de grupos metileno a una serie homóloga de alcoholes de cadena larga, que aumenta su solubilidad en lípidos y por lo tanto debe producir un aumento correspondiente en la potencia anestésica, sólo se cumple hasta una cierta longitud de la cadena ("efecto de corte"). Sin embargo, el efecto de corte todavía puede ser explicado en el marco de la hipótesis de los lípidos (Eckenhoff et al. 1999; Mohr et al. 2005).

Cantor presenta una actualización de la hipótesis de los lípidos sobre el efecto anestésico, propone que el mismo es causado por redistribución de las presiones laterales de membrana a causa de la solubilización del anestésico general en la bicapa (Cantor 1997; Eckenhoff et al. 1999; Cantor 2001). Esta idea considera el hecho de que cada membrana de la bicapa tiene un perfil distinto de distribución de las presiones laterales en su interior y que la mayoría de las proteínas de membrana, especialmente los canales iónicos, son sensibles a los cambios en este perfil de distribución de presiones laterales. Según la hipótesis moderna de lípidos, un cambio en las presiones laterales entre lípidos de membrana, desplaza el equilibrio conformacional de las proteínas de

membrana, tales como los canales iónicos activados por ligando, que se sabe son afectadas por concentraciones clínicas de anestésicos. Este mecanismo también es inespecífico ya que la potencia del anestésico no está determinada por su estructura química real, sino por la distribución, la posición y la orientación de sus segmentos y enlaces dentro de la bicapa. Sin embargo, todavía no es evidente cual es el mecanismo molecular exacto involucrado.

Un mecanismo detallado de la anestesia general se sugirió utilizando termodinámica estadística. Se ha propuesto que la incorporación de solutos anfifílicos y otros (anestésicos generales) interfacialmente activos en la bicapa, aumenta la presión lateral selectivamente cerca de las interfases acuosas, que es compensado por una disminución en la presión lateral hacia el centro de la bicapa. Cantor propone una primera hipótesis que no sólo proporciona correlaciones de potencia con propiedades estructurales o termodinámicas, si no una detallada teoría mecanicista y la comprensión termodinámica de la anestesia, desde un punto de vista de la interacción de los anestésicos con la membrana (Cantor, 1997).

En síntesis, de acuerdo con la idea moderna de lípidos, los anestésicos no actúan directamente sobre sus sitios de unión en proteínas de membrana, sino que actúan como mediadores a través de perturbaciones en la matriz lipídica especializada en la interfase proteína-lípido. Sugiere un mecanismo diferente de la clásica interacción ligando-receptor donde el ligando afecta a la función de las proteínas de membrana mediante la unión a su sitio específico.

#### *Hipótesis de interacción con proteínas de membrana.*

A principios de 1980 Franks y Lieb demostraron que la correlación descrita por Meyer y Overton podía ser reproducida usando proteínas solubles (Franks y Lieb 1984). Ellos encontraron dos proteínas distintas que eran inactivadas por dosis clínicas de anestésico en ausencia de lípido (Franks et al. 1998; LaBella et al. 1998). La inhibición de las mismas por los anestésicos generales se correlacionó directamente con sus potencias anestésicas.

Las proteínas consideradas las dianas moleculares más probables de los anestésicos son los canales iónicos. Según esta hipótesis, los anestésicos generales son mucho más selectivos que en el marco de la hipótesis de lípidos y se unen directamente sólo a un pequeño número de blancos, en su mayoría receptores del tipo canal iónico activado por ligando. En particular, los receptores Cys-loop (Franks y Lieb 1994) son los

blancos plausibles para anestésicos generales que se unen en la interfase entre las diferentes subunidades. La superfamilia de receptores Cys-loop incluye receptores inhibitorios (GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>, receptores de glicina) y los receptores excitatorios (receptor de acetilcolina y receptores 5-HT<sub>3</sub> de serotonina). Los anestésicos generales pueden inhibir las funciones de los receptores excitatorios o potenciar funciones de los receptores inhibitorios. Aunque los sitios de unión de proteínas para los anestésicos se han identificado en parte, la naturaleza exacta de las interacciones proteína-anestésico general aún no se conoce profundamente.

Se planteó la hipótesis de que inicialmente el anestésico general se une a su canal de iones blanco por un mecanismo de bloqueo, cambiando de la conformación abierta a la cerrada o viceversa. Sin embargo, hay pruebas acumuladas contra la interacción directa de bloqueo de las proteínas de membrana con anestésicos generales (Liu et al. 1995; Johansson et al. 1998; Cui et al. 2008; Ma et al. 2008).

Así mismo, siendo que el concepto de las interacciones específicas entre los receptores y las drogas, estableció que los fármacos actúan sólo cuando están unidos a los receptores, se observó que este concepto no se aplica perfectamente a muchos anestésicos generales debido a que sus estructuras moleculares son muy simples y diversas sin poder confirmarse relaciones estructura-actividad obvias (Cameron 2006). Además, muchos anestésicos generales mostraron una afinidad notablemente débil por sus dianas moleculares actuando a concentraciones mucho más altas que la mayoría de otros fármacos. Debido a estas características, posteriormente se propuso que los anestésicos generales no actúan de una manera específica y se pensó que su acción era global a través de perturbaciones no específicas de los lípidos de membrana afectando indirectamente al receptor, en lugar de actuar directamente sobre sitios específicos en proteínas de membranas.

### *Efectos conjuntos*

Diversos estudios han demostrado que los fármacos de baja afinidad, incluyendo los anestésicos generales por inhalación, no suelen interactuar con sus proteínas diana a través de un mecanismo de unión específico. A través de simulaciones de dinámica molecular, de un canal de gramicidina incerto en membrana, se demostró una clara tendencia de los anestésicos generales de dirigirse hacia los residuos de anclaje del canal en la interfase membrana-agua. Esto resultó en un cambio global en la dinámica del canal

en la escala temporal. Se sugirió que solo los cambios dinámicos con tiempo característico que coincidan con los de la función de las proteínas pueden contribuir potencialmente a la acción de los anestésicos generales (Tang y Xu 2002). Algo similar se publicó utilizando proteínas de cuatro alfa-hélices como modelo de receptor pentamérico Cys-loop (Canlas et al. 2008). Los anestésicos generales por inhalación no modificaron la estructura del canal pero sí la dinámica del mismo, especialmente en los bucles flexibles que conectan las  $\alpha$ -hélices y que están expuestos a la interfaz acuosa de la membrana. Se conoce el hecho de que la dinámica de la proteína en escala temporal de los micro-milisegundos está a menudo acoplada con las funciones de la proteína. Por lo tanto, es lógico proponer que los anestésicos generales no cambian la estructura de las proteínas sino que pueden ejercer su efecto modulando la dinámica de las mismas, en la escala de los micro-milisegundos y / o mediante la interrupción de los modos de movimiento esenciales para la función de esta proteína. Interacciones normales entre residuos de la proteína en la interfase agua-lípido, que desempeñan papeles críticos en funciones de la proteína y unión con el agonista, pueden ser alteradas por anestésicos generales.

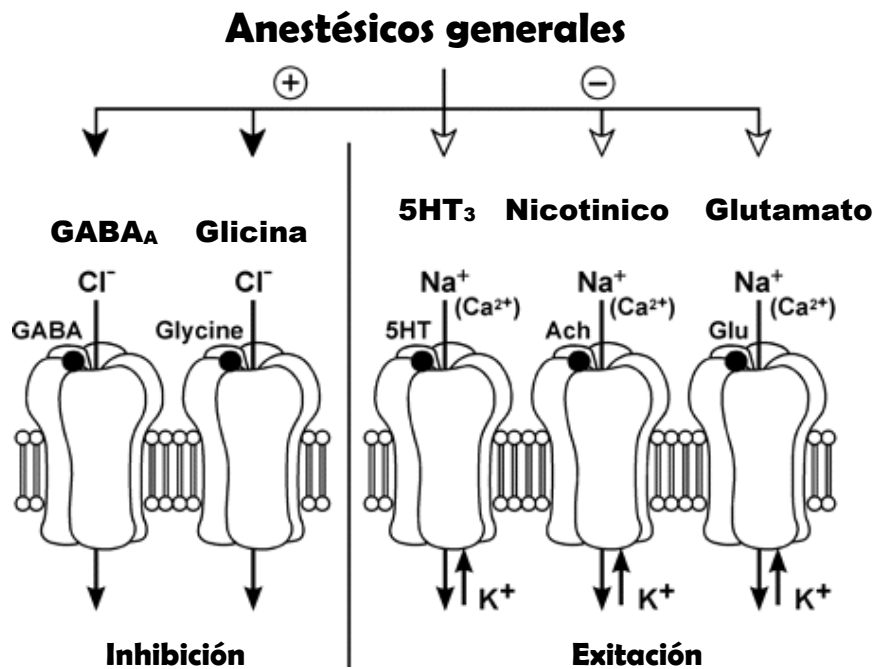
En este sentido, es amplio el número de trabajos actuales que apoyan la idea de una acción sobre los lípidos o sobre la membrana en general, probablemente conjunta con su unión a proteínas (Cantor 2003). Algunos de estos trabajos involucran el hecho de que dominios especializados en la membrana, críticos en diversas funciones de la misma, son particularmente sensibles a los anestésicos (Schroeder et al. 1988; Hitzemann 1989; Janes et al. 1992; Abadji et al. 1993).

Como se mencionó anteriormente, Cantor en 1997 realizó un aporte importante al describir un mecanismo de anestesia general en el que los anestésicos podrían modular la apertura de canales iónicos a través de cambios inducidos sobre la presión lateral molecular de la membrana que los contiene. Por lo tanto, si bien se ha demostrado que existen sitios específicos para anestésicos en el receptor, también hay pruebas de que modifican las propiedades de la membrana que rodea al canal. Es por ello, que la hipótesis conjunta debería ser considerada en el estudio de los mecanismos de acción de los anestésicos generales.

### **Receptor GABA<sub>A</sub>**

El receptor GABA<sub>A</sub> (R-GABA<sub>A</sub>) es el receptor más importante del sistema nervioso central (SNC) que media la respuesta inhibitoria rápida (Jovanovic et al. 2004).

Pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando que también incluye entre otros al receptor de glicina sensible a la estricnina, al receptor nicotínico neuronal de acetilcolina (nACh), al receptor de 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>3</sub>) y a los receptores de glutamato (NMDA/AMPA), nombrando los especialmente sensibles a los anestésicos generales (Fig. 1) (Cameron 2006).



**Fig. 1.** Receptores ionotrópicos activados por ligando, sensibles a anestésicos generales que actúan activando o modulando los receptores inhibitorios tales como GABA<sub>A</sub>, o inhibiendo los receptores excitatorios. Extraído de Camerón (2006).

Los miembros de la superfamilia de estos receptores ionotrópicos activados por ligando están evolutivamente relacionados y tienen una estructura común en la que cinco subunidades forman un canal iónico. El R-GABA<sub>A</sub> es una proteína pentamérica transmembrana con una masa molecular total de 230-270 kDa. Cada subunidad se compone de una secuencia polipeptídica de aproximadamente 450-630 aminoácidos (40-60 kDa), con un dominio conservado N-terminal grande de aproximadamente 200 aminoácidos y un dominio C-terminal más pequeño y variable (Fig.2). Las subunidades individuales contienen cuatro dominios transmembrana distintos (TM), los segundos dominios transmembrana (TM2) recubren el lumen del canal (Fig.2B). Un bucle

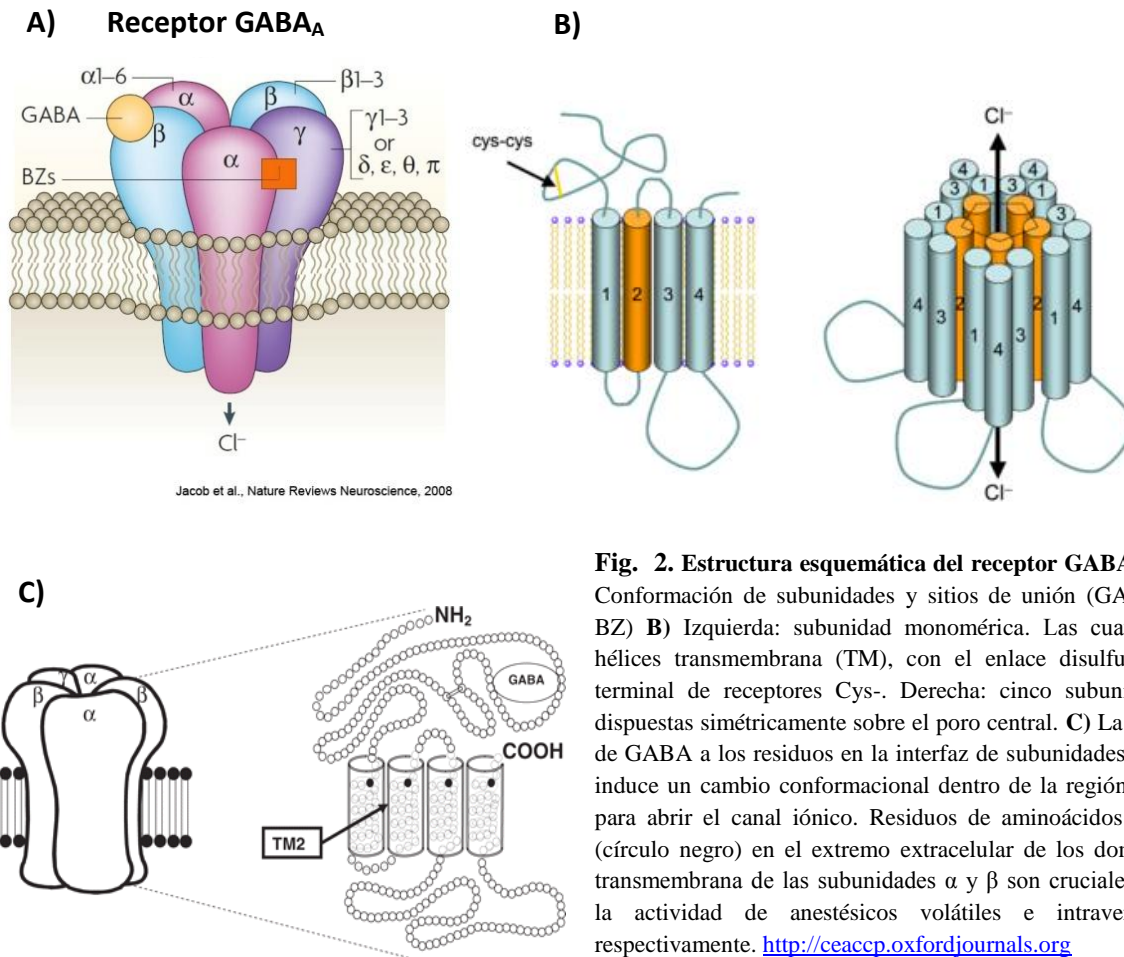
intracelular grueso conecta las regiones TM3 y TM4 proporcionando un sitio de fosforilación por una serie de serina, treonina y tirosina quinasas (Cameron 2006), proponiéndose estas regiones como el dominio intracelular de unión con el citoesqueleto.

La unión del ligando endógeno del R-GABA<sub>A</sub>, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), a sus sitios de unión en la parte extracelular del receptor, desencadena cambios conformacionales que permiten la apertura de un canal selectivo a iones cloruro (Cl<sup>-</sup>). El aumento del Cl<sup>-</sup> intracelular conduce a la hiperpolarización de la neurona inhibiendo el disparo de nuevos potenciales de acción postsinápticos, generando así su efecto inhibitorio sobre la neurotransmisión excitatoria (Olsen et al. 1999; Chen et al. 2005).

Las cinco subunidades que conforman el R-GABA<sub>A</sub> pueden pertenecer a diferentes clases, dando lugar a distintas combinaciones que originan una multiplicidad de subtipos de receptores con diferente composición, farmacología y distribución regional, celular y subcelular (Sieghart 1995; Olsen y Sieghart 2008). Los R-GABA<sub>A</sub> tienen localización principalmente postsináptica, pero algunas isoformas se pueden encontrar extrasinápticamente (Wei et al. 2003). Diecinueve miembros de genes de subunidades se han aislado en mamíferos:  $\alpha$ 1- $\alpha$ 6,  $\beta$ 1- $\beta$ 3,  $\gamma$ 1- $\gamma$ 3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\rho$ 1- $\rho$ 3, y su combinación determina la afinidad del receptor por el agonista, la probabilidad de apertura, la conductancia y otras propiedades (Martin 2002; Cossart et al. 2005). Sin embargo, estudios recientes sobre R-GABA<sub>A</sub> nativos y recombinantes sugieren incluso la existencia de muchos más subtipos de receptores de lo que se pensaba (Sieghart y Sperk 2002; Johnston 2005).

El requisito mínimo para conformar un canal iónico GABA-activo es la inclusión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Connolly et al. 1996). La mayoría de estos receptores están compuestos de dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$  ( $2\alpha$   $2\beta$  y  $1\gamma$ ) (Olsen y Sieghart 2008) conformando así el subtipo de pentámero más común en el cerebro (Baumann et al. 2002; Sieghart y Sperk 2002); también se ha propuesto que el arreglo para definir el canal de cloro sería  $\gamma\beta\alpha\beta\alpha$  y siendo las isoformas  $\alpha_1$   $\beta_2$   $\gamma_2$  las más comunes (Baumann et al. 2001). De esta manera, se conoce que cada una de las diferentes subunidades tiene una acción específica sobre el funcionamiento del canal, pero no todas las subunidades pueden ensamblarse para formar receptores funcionales (Baumann et al. 2001; Boehm et al. 2006). Los tres tipos de subunidades  $\rho$  no co-ensamblan con las demás subunidades formando el clásico receptor GABA<sub>A</sub>, (Enz y Cutting 1998) sino que homoligomerizan formando receptores- $\rho$ , antes denominados receptores GABA<sub>C</sub>, que se encuentran principalmente en neuronas de la retina. Así, el R-GABA<sub>A</sub> difiere del resto de

los receptores ionotrópicos activados por ligandos principalmente por su gran heterogeneidad (Luscher y Keller 2004).



**Fig. 2. Estructura esquemática del receptor GABA<sub>A</sub>.** A) Conformación de subunidades y sitios de unión (GABA y BZ) B) Izquierda: subunidad monomérica. Las cuatro  $\alpha$ -hélices transmembrana (TM), con el enlace disulfuro N-terminal de receptores Cys-. Derecha: cinco subunidades dispuestas simétricamente sobre el poro central. C) La unión de GABA a los residuos en la interfaz de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  induce un cambio conformacional dentro de la región TM2 para abrir el canal iónico. Residuos de aminoácidos clave (círculo negro) en el extremo extracelular de los dominios transmembrana de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son cruciales para la actividad de anestésicos volátiles e intravenosos, respectivamente. <http://ceaccp.oxfordjournals.org>

La diferente ubicación celular y subcelular de los subtipos de receptores individuales sugiere que exhiben funciones específicas en el cerebro que pueden ser selectivamente moduladas por fármacos específicos de cada subtipo. Esta conclusión está apoyada por la reciente demostración de que los diferentes subtipos de R-GABA<sub>A</sub> median diferentes efectos de las benzodiazepinas. Un ejemplo de ello es el actual desarrollo de fármacos con una mayor selectividad para subtipos de receptores que contiene la subunidad  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , o  $\alpha_5$ , que exhibirían efectos clínicos muy selectivos (Sieghart y Sperk 2002).



En cuanto a los sitios de unión en el R-GABA<sub>A</sub>, el ligando endógeno GABA reconoce dos lugares específicos ubicados en las dos interfaces extracelulares entre las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  del receptor (Smith y Olsen 1995; Martin 2002; Colquhoun y Sivilotti 2004). Estos, además de ser los sitios activos de GABA, lo son también de fármacos tales como muscimol (agonista) y bicuculina (antagonista). Asimismo, se han identificado en la proteína varios sitios de unión alostéricos diferentes que modulan la actividad del receptor y que son reconocidos por numerosos fármacos terapéuticamente importantes, capaces de potenciar las corrientes evocadas por GABA, tales como benzodiazepinas, barbitúricos, etanol, esteroides neuroactivos, anestésicos generales como propofol, etc. (Johnston 1996; Santhakumar et al. 2007; Olsen y Sieghart 2008). Los moduladores alostéricos benzodiazepínicos interactúan con la matriz extracelular en la interface entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  a nivel de la membrana (Figura 3A) (Sigel y Buhr 1997; Ernst et al. 2003). Por el contrario, los barbitúricos, los esteroides neuroactivos y otros anestésicos parecen interactuar con bolsillos hidrofóbicos accesibles en el dominio transmembrana.

Así, un amplio espectro de drogas, agentes tóxicos e incluso metales modifican la función de R-GABA<sub>A</sub>, ya sea interactuando directamente con estos sitios de unión o con otros sitios aún no bien descritos (Macdonald y Olsen 1994; Rudolph y Mohler 2004; Sogaard et al. 2006; Campagna-Slater y Weaver 2007) lo que hace al R-GABA<sub>A</sub> único entre los receptores de neurotransmisores en cuanto al número de ligandos alostéricos que modulan su función (Kneussel 2002; Olsen et al. 2004).

Aunque la mayoría de los R-GABA<sub>A</sub> son sensibles a las benzodiazepinas (los que contienen subunidades  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ , o  $\alpha_5$ ) existe una minoría de R-GABA<sub>A</sub> (que contienen las subunidades  $\alpha_4$  o  $\alpha_6$ ) que son insensibles a la clásica 1,4-benzodiazepina (Derry et al. 2004) pero en su lugar reconocen a otras clases de fármacos GABAérgicos tales como los neuroesteroides y el alcohol.

Estas drogas, además de poseer diferentes sitios de unión también actúan de diferente modo (Hanson y Czajkowski 2008). Por ejemplo, las benzodiazepinas inducen mayor flujo de cloruro al aumentar la frecuencia de apertura del canal, mientras que los barbitúricos provocan la apertura por tiempo más prolongado (Twyman et al. 1989). Otro ejemplo está dado por el antagonista competitivo bicuculina que reduce la frecuencia y el tiempo medio del estado abierto del receptor, mientras que el antagonista no competitivo picrotoxina actúa reduciendo el tiempo de apertura de canal (Macdonald et al. 1989).

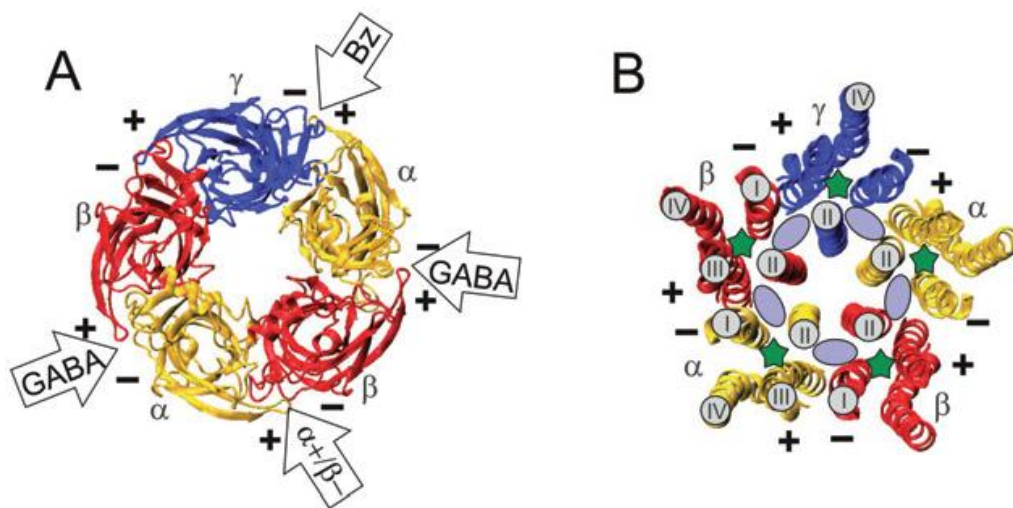
Los ligandos que contribuyen a la activación del receptor provocan generalmente efectos ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos, sedantes, hipnóticos y miorelajantes. Los

ligandos que disminuyen la activación del receptor por lo general tienen efectos opuestos, incluyendo ansiogénesis y convulsiones. Estos efectos también están determinados por el subtipo de receptor además de los sitios de unión diferenciales. Por ejemplo, la subunidad  $\alpha_1$  mediaría los efectos sedantes y amnésicos de las benzodiazepinas, mientras que la subunidad  $\alpha_2$  podría mediar la actividad ansiolítica. Además, la subunidad  $\alpha_5$  jugaría un papel importante en el aprendizaje y la memoria y también pueden estar involucrados en el desarrollo de la tolerancia a las benzodiazepinas (Cameron 2006).

Ha sido descrito, mediante modelado molecular, la posible existencia de múltiples bolsillos dentro del dominio transmembrana (Ernst et al. 2005), presentes dentro del grupo de cuatro hélice de las cinco subunidades del R-GABA<sub>A</sub> así como en las cinco interfaces entre los cuatro paquetes de hélice de dos subunidades vecinas (Figura 3B). Estudios de mutagénesis han indicado que los anestésicos volátiles podrían provocar su acción al unirse a bolsillos hidrofóbicos intrasubunidad (Mihic et al. 1997; Jenkins et al. 2001; Yamakura et al. 2001), mientras que los anestésicos intravenosos podrían interactuar con un bolsillo dentro de la subunidad  $\beta$  (Belelli et al. 1999; Krasowski et al. 2001; Bali y Akabas 2004) o en la interfaz transmembrana entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Olsen y Sieghart 2008; Olsen y Sieghart 2009).

En cuanto a los esteroides neuroactivos, estos podrían tener al menos dos sitios de unión diferentes dentro del dominio transmembrana de los GABA<sub>A</sub>-Rs: un sitio que media la modulación alostérica a bajas concentraciones y otro sitio de activación directa del receptor a altas concentraciones de esteroides (Hosie et al. 2006; Hosie et al. 2009). Para el anestésico por inhalación etomidato, se identificó un solo tipo de bolsillo de unión en la interfaz  $\beta$ - $\alpha$  tanto para la modulación alostérica como para la apertura directa del canal (Li et al. 2006). La fotoincorporación de etomidato, parecería estar alostéricamente inhibida por neuroesteroides, barbitúricos y propofol (Olsen y Li 2011), lo que indica que estas drogas no se unen a la interfaz transmembrana  $\beta$ - $\alpha$ , o al menos se unen a un sitio no solapable con el sitio de unión de etomidato. La interacción alostérica de etomidato y propofol es apoyada por otros estudios llevados a cabo por Richardson y Nury (Richardson et al. 2007; Nury et al. 2011). La evidencia de una vinculación inter-subunidad y bolsillos intra-subunidad (Nury et al. 2011), junto con la alta flexibilidad de TM3, indica que las respectivas estructuras no pueden formar bolsillos bien definidos. Estos bolsillos podrán difundir o incluso fusionarse unos con otros o desaparecer en cierto estados conformacionales de la proteína. Este punto de vista dinámico podría así resolver algunas de las discrepancias sobre los sitios de unión de anestésicos. Los ratones

transgénicos que albergan una mutación de un solo aminoácido dentro de la región TM2 de la subunidad  $\beta_3$  resultaron insensibles a algunos de los efectos de etomidato y propofol. Estos experimentos sugieren que las acciones de ciertos anestésicos intravenosos están mediadas, en parte, por la subunidad  $\beta_3$  del R-GABA<sub>A</sub>. Otros estudios infieren que el propofol puede unirse cerca del final extracelular de la subunidad  $\beta$  en el segmento M3 (Bali y Akabas 2004) mediante la unión a un sitio dentro del mismo canal formado por los dominios TM2 de las cinco subunidades (Olsen 2006; Sedelnikova et al. 2006; Bali y Akabas 2007).



**Fig.3. Dominio extracelular (A) y dominio transmembrana (B) del receptor GABA<sub>A</sub>.** Se indica el lado positivo (+) y negativo (-) de cada subunidad. (A) Los dos sitios de GABA se encuentran en la interface  $\beta^+ \alpha^-$  y los sitios de unión de benzodiazepina (BZ)  $\alpha^+ \gamma^-$ . (B) Espacios accesibles al disolvente contenidos en el dominio transmembrana de modelos de receptor GABA<sub>A</sub>. Los bolsillos intrasubunitarios se encuentran dentro de la cuatro dominios hélice transmembrana (asteriscos verdes) y los bolsillos intersubunitarios se indican con elipses lilas. Extraído de Sieghart 2011.

Esteroides, anestésicos y barbitúricos, en contraste con la modulación alostérica de las benzodiazepinas, presentan dos acciones diferentes: a bajas concentraciones, mejoran las corrientes inducidas por GABA y a mayores concentraciones provocan directamente las corrientes mediadas por el R-GABA<sub>A</sub> en ausencia de GABA (Sieghart 1995). Esto es apoyado por el hallazgo de que algunos agentes anestésicos, a concentraciones supra-clínicas, actúan abriendo directamente el canal iónico sin la necesidad de GABA, lo que indicaría que pueden existir dos o más sitios de unión distinta

en el receptor (un sitio para modulación y otro con actividad directa sobre el canal) para estos agentes (Cameron 2006). Otros autores describieron esta actividad dual para anestésicos intravenosos (Belelli et al. 1999; Yamakura et al. 2001; Garcia et al. 2006). Además, otros experimentos sugieren que a concentraciones aún más altas algunos anestésicos inhiben las corrientes de cloruro (Bali y Akabas 2004). Algunos barbitúricos, como el pentobarbital, actúan sobre el R-GABA<sub>A</sub> por tres mecanismos diferentes: por modulación alostérica positiva, por activación directa y por inhibición. Esos efectos se observan a diferentes concentraciones y son afectadas de manera diferencial por la composición de subunidades del receptor (Drafts y Fisher 2006). Como ejemplo de la actividad dual arriba mencionada tenemos al propofol (2  $\mu$ M y 23  $\mu$ M) y al timol (12  $\mu$ M y 135  $\mu$ M) (entre paréntesis se indican los valores correspondientes a EC<sub>50</sub> para efecto potenciador o efecto directo, respectivamente) (Rho et al. 1996; Krasowski et al. 2002; Garcia et al. 2006). Este comportamiento fue descrito también para el insecticida  $\delta$ -hexaclorociclohexano (Priestley et al. 2003). Todos estos compuestos comparten la característica de ser depresores del sistema nervioso central por lo cual, estos efectos duales, pueden influenciar el espectro de los efectos clínicos observados (Robertson 1989; Franks y Lieb 1994; Sanna et al. 1999). Así, si bien se considera que el mecanismo de acción de numerosos anestésicos involucraría la modulación positiva del R-GABA<sub>A</sub>, a altas concentraciones estos podrían mostrar un efecto directo sobre el receptor tal como se describe más arriba. Ha sido descrito, al menos para propofol, que mutaciones puntuales en el R-GABA<sub>A</sub> producen la pérdida del efecto potenciador/modulador sin alterar su acción directa a altas concentraciones, lo que sugeriría que al menos habría requerimientos estructurales, propios de receptor, diferentes para ambos efectos (Krasowski et al. 1998). Es posible entonces que ambas actividades, potenciadora y agonista directo, puedan activarse a través de sitios diferentes del receptor como se indica también más arriba (Priestley et al. 2003), aunque no puede descartarse la posibilidad de una modulación conjunta inespecífica (no mediada por acción directa sobre el receptor), sobre todo para el segundo efecto.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones planteadas anteriormente, se puede pensar que aunque la regulación farmacológica específica de la función del R-GABA<sub>A</sub> es comúnmente analizada mediante teorías bien descritas de las interacciones ligando-receptor, debería considerarse que muchos de los compuestos que regulan la función del R-GABA<sub>A</sub> son notablemente lipofílicos (benzodiazepinas, barbitúricos, alcoholes de cadena larga, esteroides y anestésicos) (Johnston 1996; Perillo y Garcia 2001; Sánchez

et al. 2004), lo que puede cambiar las propiedades físicas de la bicapa lipídica. Por lo tanto, es posible que la actividad anestésica de fenoles lipofílicos, como el propofol y el timol, podría ser el resultado combinado de la interacción de las moléculas de fenol con proteínas específicas (R-GABA<sub>A</sub>) y con las moléculas de lípidos organizadas en el entorno de dicho receptor (Cantor 2003; Sánchez et al. 2004). Esto último está apoyado no solo por la conocida hidrofobicidad de los anestésicos, sino también por su alta capacidad para interactuar con las membranas (Witt y Nielsen 1994; García et al. 1995; Perillo et al. 1999; Sogaard et al. 2006; Reiner et al. 2009).

### **Interacción droga-membrana**

Numerosos compuestos lipofílicos son capaces de particionarse en membranas y de alterar sus propiedades. En relación a compuestos de estas características y con comprobada actividad sobre el R-GABA<sub>A</sub>, ha sido de especial interés la interacción benzodiazepina-membrana. Estudios previos demuestran que las interacciones inespecíficas benzodiazepina-membrana pueden ser explicadas por un modelo de equilibrio de partición (incorporación ilimitada de moléculas) (Perillo y Arce 1991). La partición de benzodiazepinas hacia la membrana aumenta en cantidad y profundidad a medida que disminuye el orden estructural de la misma (Perillo y Arce 1991; Garcia y Perillo 1997; Garcia y Perillo 1997). Por otra parte, la localización de las benzodiazepinas en la región de grupos polares de la membrana (Garcia y Perillo 1997; Garcia y Perillo 1999), explicaría sus efectos sobre la disminución del tamaño de vesículas de dpPC y sobre la redistribución de lípidos entre las dos lamelas de la bicapa (Garcia y Perillo 1997; Perillo y Garcia 2001). Asimismo, tanto las benzodiazepinas como el anestésico local lidocaina, fueron capaces de modificar la forma de glóbulos rojos incorporándose respectivamente a la lamela externa o interna de los mismos (Garcia et al. 2000). Otros estudios en modelos de membrana demostraron que las benzodiazepinas son capaces de penetrar en monocapas de fosfolípidos a presiones mayores a las existentes en promedio en una membrana biológica, expandiéndolas y disminuyendo la estabilidad de las mismas (Garcia y Perillo 2002). Desde el punto de vista farmacológico, las benzodiazepinas reconocen un sitio de unión específico en el R-GABA<sub>A</sub> como fue mencionado más arriba. Es sabido que esta interacción específica podría ser modulada por medio de fenómenos físico-químicos, bioquímicos y fisiológicos (Perillo et al. 1995). Inclusive, la participación directa de unión a receptores no fue demostrada para el caso de varios efectos de las benzodiazepinas (Garcia et al. 2002). Estas últimas evidencias sugieren la posibilidad de

que estas drogas estén afectando mecanismos de transducción a niveles distintos de la unión al receptor tal como se demostró para otras sustancias lipofílicas (Perillo et al. 1993). Existen numerosas evidencias experimentales de que cambios en el microambiente lipídico de la membrana donde está inserto el R-GABA<sub>A</sub> pueden modificar sus propiedades de unión a ligandos (Guidotti et al. 1983; Witt y Nielsen 1994; Witt y Nielsen 1994; Pytel et al. 2006; Sogaard et al. 2006), como puede ser el caso de los efectos descritos para aceites esenciales (*Tagetes minuta L*) y sus componentes (tagetona) sobre este receptor estudiados por nuestro grupo (Garcia et al. 1995; Perillo et al. 1999).

Si tenemos en cuenta que el R-GABA<sub>A</sub> está inserto en una estructura supramolecular altamente dinámica como la membrana biológica, veremos que podrían subyacer fenómenos inespecíficos como disparadores de la modulación de la organización molecular, la cual, en última instancia, podría ser la responsable al menos en parte de la modulación del receptor. Esto sería cierto aún en los casos donde se observan cambios en el receptor inducidos por fenómenos fisiológicos (Schroeder et al. 1988; Hitzemann 1989; Janes et al. 1992; Abadji et al. 1993; Cantor 2003).

La experiencia acumulada con benzodiazepinas y terpenos, en cuanto a su interacción tanto específica sobre el R-GABA<sub>A</sub> como inespecífica con membranas, sirve de base teórico-práctica para el planteamiento del presente trabajo de Tesis. Este implica el estudio conjunto de los efectos de diferentes compuestos lipofílicos con posible actividad biológica (anestésicos/moduladores del R-GABA<sub>A</sub>) sobre la membrana y sobre el receptor, desde una perspectiva tanto biofísico-química como farmacológica con el fin de tratar de profundizar los conocimientos sobre los posibles mecanismos específicos e inespecíficos implicados en dicha actividad.

Los compuestos a estudiar incluyen agentes fenólicos con comprobada actividad sobre el R-GABA<sub>A</sub> (propofol y timol), además de otros compuestos fenólicos, estructuralmente similares a los anteriores pero cuya actividad sobre el receptor GABA<sub>A</sub> es aún desconocida (eugenol, carvacrol y clorotimol).

## **HIPÓTESIS**

La hipótesis de trabajo contempla la existencia de una alta correlación entre la hidrofobicidad de los compuestos con su capacidad para provocar cambios en distintas propiedades físicas de la membrana. Esta mayor capacidad de interacción y modificación de la membrana está asociada en parte a una mayor capacidad de modulación del receptor por su interacción inespecífica con el mismo (a través de su entorno de membrana) la cual se suma a su interacción específica con su sitio de reconocimiento en el receptor.

## ***OBJETIVOS***

---



**OBJETIVO GENERAL**

- Profundizar el estudio de los mecanismos de acción, tanto a nivel específico como inespecífico, involucrados en la modulación del receptor GABA<sub>A</sub> de compuestos altamente lipofílicos que poseen un probable efecto farmacológico dual (agonista/modulador) sobre dicho receptor, a través del estudio conjunto de sus características biofísico-químicas y de sus efectos sobre membranas y sobre el receptor.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Caracterizar biofísica-químicamente compuestos fenólicos con actividad gabaérgica demostrada y de otros cuya estructura química los enmarque como posibles moduladores/activadores del receptor GABA<sub>A</sub>.
- 2- Analizar la capacidad de interacción de estos compuestos sobre modelos de membranas artificiales y estudiar sus efectos sobre las propiedades de membrana.
- 3- Investigar sus posibles efectos nocivos sobre neuronas en cultivo y sus efectos farmacológicos sobre el receptor GABA<sub>A</sub> nativo en el mismo sistema de ensayo.

***Así planteados los objetivos específicos, el trabajo de Tesis se dividió en los tres siguientes Capítulos para su mayor comprensión:***

**CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICO-QUÍMICA.**

*Determinación de la solubilidad y lipofilicidad de los compuestos fenólicos. Análisis de correlación.*

**CAPÍTULO II: EFECTOS SOBRE MODELOS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES.**

*Interacción de los compuestos fenólicos con capas monomoleculares y con liposomas fosfolipídicos.*

**CAPITULO III: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y ENSAYOS DE TOXICIDAD.**

*Determinación de los efectos de los compuestos fenólicos sobre la unión flunitrazepam al receptor GABA<sub>A</sub> y ensayos de citotoxicidad.*

# ***CAPÍTULO 1***

---

## CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICO-QUÍMICA

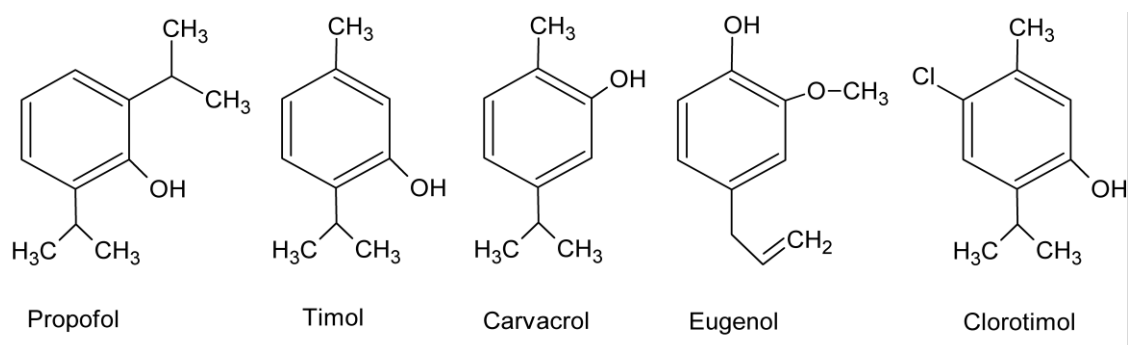
### Determinación de la Solubilidad y Lipofilicidad de los compuestos fenólicos

#### Análisis de correlación

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos

Propofol (2,6-bis (isopropil)-fenol), timol (5-metil-2-isopropil-fenol), carvacrol (2-metil-5-isopropil-fenol), eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enil-fenol) y clorotimol (5-metil-4-cloro-2-isopropil-fenol), se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), y se utilizaron sin purificación adicional. Las estructuras químicas de estos compuestos fenólicos se muestran en la Figura I.1. La lecitina de soja (sPC) utilizada fue de grado comercial y la dipalmitoil fosfatidilcolina (dpPC) fue adquirida en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, EE.UU.). El resto de las drogas y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua utilizada fue bi-distilada en todos los casos.



**Fig. I.1.** Estructuras químicas de los compuestos estudiados.

### 2. Caracterización espectrofotométrica

#### 2.1 Espectros y picos de Absorción

Se prepararon soluciones acuosas de cada compuesto fenólicos, a diferentes concentraciones en el rango entre 0.0625 mM y 3 mM, Se utilizó DMSO para la dilución de los compuestos alcanzando, en todos los casos, una concentración final máxima del solvente de 0.25 % v/v. El pH se ajustó a un valor de 7 con NaOH. Se determinaron los espectros de absorción UV en el rango de longitudes de onda ( $\lambda$ ) comprendido entre 250 y 300 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y un espectrofotómetro de doble haz *Beckman DU 7500 (Fullerton, CA, EE.UU.)*. Una vez obtenidos los espectros se determinaron los picos de absorción de cada compuesto ( $\lambda_{\text{max}}$ ).

## 2.2 Curvas de calibración

A partir de las absorbancias obtenidas a la  $\lambda_{\text{máx}}$  de cada compuesto diluido a diferentes concentraciones se construyeron las correspondientes curvas de calibración (Absorbancia Vs. Concentración), ajustando una regresión lineal a cada grupo de datos experimentales. Con estos datos se calcularon finalmente los Coeficientes de Extinción Molar ( $\epsilon$ ) mediante la ecuación de Lambert y Beer :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

donde  $A$  es la absorbancia del compuesto,  $c$  es su concentración molar y  $l$  es la longitud de paso óptico en cm.

## 3. Determinación del límite de solubilidad

Se midió la absorbancia de los sobrenadantes de disoluciones acuosas (0,25 % v/v DMSO) de cada compuesto a distintas concentraciones (hasta 35 mM), las cuales fueron previamente incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta alcanzar el equilibrio, y luego centrifugadas a 30.000 x  $g$  por 15 min. Las absorbancias fueron determinadas a la  $\lambda_{\text{max}}$  de cada compuesto. El límite de solubilidad fue determinado a la concentración correspondiente al punto donde se pierde la linealidad entre los datos de absorbancia y concentración.

## 4. Determinación experimental del Coeficiente de Partición octanol/agua ( $P_{o/w}$ )

Los coeficientes de partición de los compuestos fenólicos en el sistema octanol/agua ( $P_{o/w}$ ) fueron determinados por el método convencional *shake-flask* e interpretados como una medida de la hidrofobicidad de los mismos. Se disolvió cada

compuesto en *n*-octanol a una concentración 10 mM y se diluyó luego en 9 volúmenes de agua bidestilada alcanzando una concentración final del compuesto de 1 mM. Se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 min., se dejó equilibrar por otros 15 min. y posteriormente se separaron ambas fases por centrifugación durante 10 min. a 3500 x g. Las absorbancias a  $\lambda_{\max}$  de las fases superior e inferior fueron medidas usando como blanco las fases superior e inferior de una mezcla igual de *n*-octanol-agua sin el agregado de compuesto. En el caso de los compuestos más lipofílicos según las referencias (propofol y clorotimol), su concentración en la fase acuosa fue determinada separando sus fases inferiores siendo luego concentradas por extracción con hexano y evaporación del mismo utilizando un evaporador rotatorio con vacío a 45°C (IKA-Labortechnik Staufen, Alemania). Finalmente, se resuspendió el extracto del compuesto en un volumen mínimo de *n*-octanol, para su determinación espectrofotométrica.

El coeficiente de partición se calculó a partir de la relación entre las concentraciones molares de cada compuesto en las fases orgánica y acuosa respectivamente:

$$P = [\text{compuesto}]_{\text{octanol}} / [\text{compuesto}]_{\text{agua}}$$

Todos los coeficientes de partición se muestran en su forma logarítmica (Log P) por simplicidad.

## 5. Determinación teórica del Coeficiente de Partición octanol/agua ( $P_{o/w}$ )

Los valores de Log  $P_{o/w}$  se calcularon también por medio del software Osiris Property Explorer (disponible libremente en [www.chemexper.com](http://www.chemexper.com); ChemExper sprl, Court-st-Etienne, Belgium). El método de cálculo de log  $P_{o/w}$  se implementa como un sistema de incremento añadiendo contribuciones de cada uno de los átomos en función del tipo de átomo. En total, el predictor de log  $P_{o/w}$ , distingue entre 368 tipos diferentes de átomos compuestos por diversas propiedades del propio átomo (el número atómico y el tipo de anillo), así como de sus vecinos directos (tipo de enlaces, estado de aromaticidad y número atómico codificado).

## 6. Cálculo de las constantes de disociación

Se prepararon soluciones acuosas de cada uno de los compuestos fenólicos (concentración final 100  $\mu\text{M}$ ) a diferentes valores de pH (entre 6.5 y 12.5). El pH fue verificado con un pH-metro Cole Parmer 59003 equipado con un electrodo de vidrio y un sensor para la compensación automática de la temperatura.

Se obtuvieron los espectros de absorción de cada compuesto contra un blanco conteniendo la misma solución de pH usada para disolver los compuestos. El pK correspondió al punto de inflexión resultante del ajuste de los puntos a una función sigmoidea según las consideraciones teóricas detalladas en el Apéndice 1. El pH se ajustó mediante la adición de HCl or NaOH y fue controlado nuevamente luego de la medición espectrofotométrica.

## **7. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)**

Todas las determinaciones de los tiempos de retención por HPLC se realizaron con un equipo Perkin Elmer Serie 200 (New Haven, CT, EE.UU.) equipado con un sistema de control de la temperatura de la columna y un detector de UV calibrado a 280 nm. Se utilizó un inyector con un volumen de inyección de 20 µl de muestra.

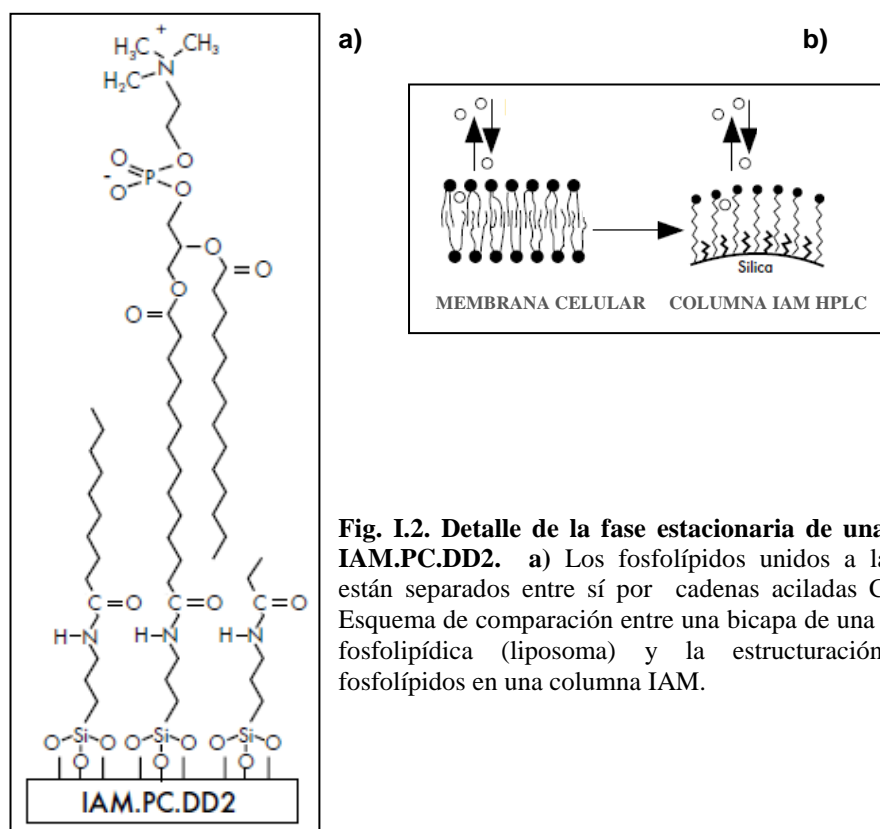
### *7.1- Método IAM.HPLC*

Se prepararon soluciones en metanol a una concentración 10 mM de cada compuesto y luego se diluyeron en una relación 1/10 con el disolvente utilizado como fase móvil. Esta dilución final fue inyectada en el HPLC equipado con una columna IAM-DD2 Fast Screen Mini Column (30 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro, Regis Technology, Morton Grove, IL, EE.UU.). Estas columnas, cuyas siglas corresponden a Immobilized Artificial Membranes, contienen como fase inmobilizada a moléculas de PC unidas covalentemente a partículas de aminopropil-silano a través de un enlace amida terminal (Fig. I.2).

Los experimentos se realizaron con dos fases móviles diferentes: agua pura o acetonitrilo (ACN) al 10% v/v, y la velocidad de flujo fue de 0,2 ml/min. Todos los compuestos se analizaron a temperaturas de 30° y 45° C. El sistema de cromatografía se dejó equilibrar a cada temperatura al menos durante 15 minutos previos a cada experimento.

### *7.2- Método RP-HPLC*

Para estos experimentos se diluyeron las muestras como se describe para el método de IAM-HPLC. En este caso se utilizó una columna de HPLC de fase reversa (RP) C18 (120 mm de longitud y 4 mm de diámetro, Nucleosil ET250/8/4, Macherey-Nagel, Duren, Alemania).



**Fig. I.2. Detalle de la fase estacionaria de una columna IAM.PC.DD2.** a) Los fosfolípidos unidos a la columna están separados entre sí por cadenas aciladas C10/C3. b) Esquema de comparación entre una bicapa de una membrana fosfolipídica (liposoma) y la estructuración de los fosfolípidos en una columna IAM.

Los tiempos de retención también fueron obtenidos a temperaturas de 30 y 45°C. En este caso la fase móvil utilizada fue de ACN 50% (v/v) en agua bidestilada y la velocidad de flujo fue de 0.5 ml/min.

### 7.3 - Cálculo de factor de capacidad ( $k$ ) y coeficiente de partición por HPLC ( $K$ ).

Una vez determinados los tiempos de retención en los dos diferentes tipos de columnas de HPLC (IAM y RP-C18), en condiciones isocráticas, para todos los compuestos, fueron calculados los factores de capacidad ( $k$ ) de la siguiente manera:

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

donde  $t_r$  es el tiempo de retención del compuesto y  $t_0$  es el tiempo muerto de la columna, que es igual al tiempo de retención de una sustancia que no queda retenida, como por ejemplo el ácido cítrico utilizado en el presente trabajo (Ottiger y Wunderli-Allenspach 1999).



Se ha confirmado en estudios previos que el factor de capacidad ( $k$ ) está directamente relacionado con el coeficiente de partición de una sustancia ( $K$ ) (Taillardat-Bertschinger et al. 2002). Por lo tanto, también se calcularon los coeficientes de

partición de equilibrio ( $K$ ) que relaciona la partición del compuesto entre la fase móvil y la fase estacionaria según:

$$k = (V_m/V_s).K$$

donde  $V_m$  es el volumen de la fase móvil correspondiente al volumen total del solvente que queda atrapado en la columna y se calcula como:  $V_m = f_r \cdot t_0$ , siendo  $f_r$  la velocidad de flujo, mientras que  $V_s$  es el volumen de la fase estacionaria, o sea el volumen de la interfase que ocupan los fosfolípidos inmovilizados y que fue calculada de acuerdo a datos obtenidos de trabajos previos (Taillardat-Bertschinger et al. 2002).

## 8. Coeficiente de Partición liposoma-buffer

Para determinar los Coeficientes de Partición liposoma-buffer se prepararon liposomas a partir de la evaporación de una solución clorofórmica de lípido (sPC o dpPC). Para ello se obtuvo una película de lípido mediante el secado con nitrógeno de la solución y la colocación posterior en una campana con bomba de vacío a 4°C para la extracción del cloroformo residual. El lípido se resuspendió luego en buffer Tris HCL 50mM pH7,4. Para obtener los liposomas se realizaron 5 ciclos consecutivos de calentamiento a 50°C por 2 min y agitación por 1 min. Se agregó cada compuesto a una concentración final entre 0.5 y 1 mM según su lipofilicidad. Se agitaron las muestras durante 5 min. y se centrifugaron a 30.000 x g por 15 min., para luego separar el sobrenadante del pellet. Se calculó la cantidad de compuesto de cada fase a partir de los valores de absorbancia registrados a  $\lambda_{max}$  (longitud de onda máxima).

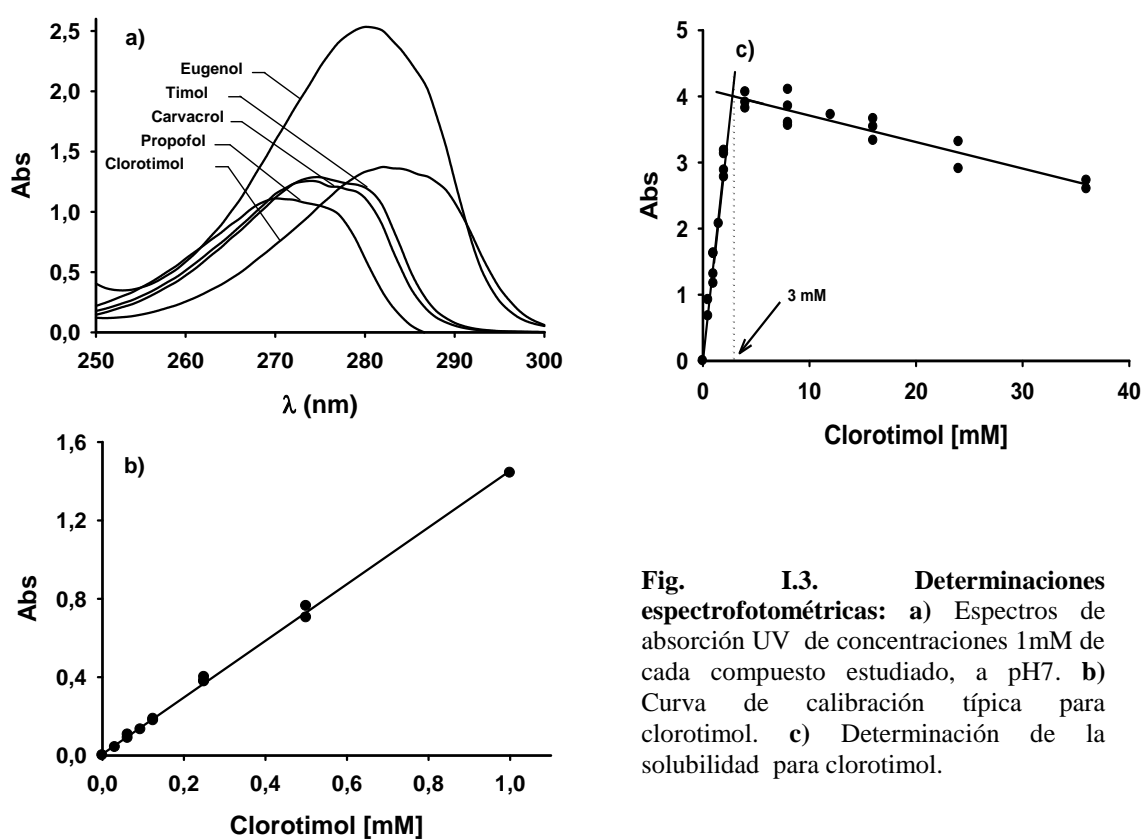
## 9. Análisis de Correlación

El Análisis de Componente Principal (ACP) fue utilizado para obtener la matriz de correlación de todos los pares de variables y para conocer si la variabilidad entre los compuestos es explicada por uno o más factores (componentes principales). De esta manera, este análisis nos permitirá evaluar el uso de sistemas diferentes para predecir la interacción de los compuestos estudiados con la membrana.

El ACP fue realizado como se reportó previamente (Rohlf 1984; Perillo et al. 1995) utilizando el programa StatistiXL software ([www.statistixl.com](http://www.statistixl.com), Nedlands, Australia). Para más detalles y consideraciones teóricas acerca del ACP ver apéndice 2.

## RESULTADOS

En la figura I.3a se pueden ver los espectros de absorción registrados a una concentración de 1 mM para cada fenol a pH 7. Si bien los espectros inicialmente se midieron a  $\lambda$  entre 200 y 500 nm, en la figura se muestra el espectro de absorción entre 250 y 300 nm, ya que a las demás  $\lambda$  la absorbancia es mínima o casi nula. En el gráfico pueden también observarse los picos de absorción ( $\lambda_{\max}$ ) de cada compuesto, cuyos valores se muestran con mayor precisión en la Tabla I.1.



**Fig. I.3. Determinaciones espectrofotométricas:** a) Espectros de absorción UV de concentraciones 1mM de cada compuesto estudiado, a pH7. b) Curva de calibración típica para clorotimol. c) Determinación de la solubilidad para clorotimol.

En la Figura I.3b se muestra una curva de calibración típica (clorotimol). A partir de este tipo de curvas, correspondientes a cada compuesto ensayado, se determinaron los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) ajustando una regresión lineal a los datos experimentales (dichos valores se muestran en la Tabla I.1). El intervalo de concentraciones utilizado para cada compuesto dependió de sus límites de solubilidad los cuales se obtuvieron a partir del un gráfico de Absorbancia vs. Concentración tal

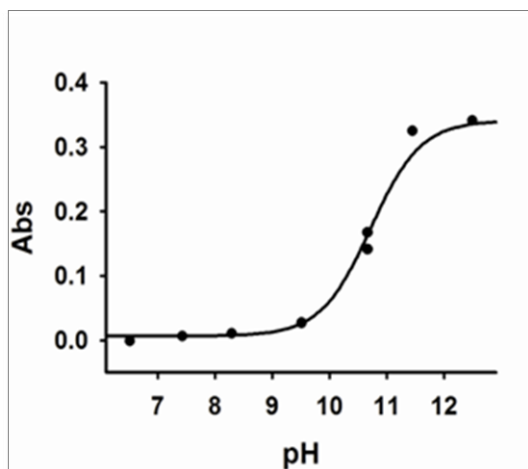
como fue explicado en Materiales y Métodos (Fig. I.3c). En esta figura típica (de clorotimol) puede observarse una línea punteada llevada hacia el eje de las abscisas a partir de la intersección de las dos rectas trazadas para los valores de absorbancia y que corresponde a la pérdida de linealidad de la relación directamente proporcional esperada entre absorbancia y concentración, representando al punto límite de solubilidad del compuesto. Cabe destacar que si bien los datos de solubilidad no fueron utilizados luego para el análisis de correlación, los mismos mostraron una alta correlación negativa con los parámetros de lipofilidad mostrados más adelante (Log P) con un  $r > -0.9$ . Dicho comportamiento puede ser claramente comprendido considerando que la solubilidad en agua es una medida inversa a la hidrofobicidad de los compuestos. Así, las solubilidades en agua mostraron valores en el rango 2,5-16 mM siendo mayores para los compuestos menos lipofílicos y viceversa.

En la Tabla I.1 se reúnen los valores de  $\lambda_{\max}$ , de coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), de solubilidad (mM) y las constantes de equilibrio de disociación (pK) para cada uno de los compuestos fenólicos estudiados. La figura I.4 muestra una curva de titulación típica (clorotimol) en agua utilizada para el cálculo de la constante de equilibrio de disociación (pK). Los puntos corresponden a los valores experimentales de absorbancia observados ( $A_{\text{obs}}$ ) vs pH y la línea continua representa el ajuste de estos datos a una función sigmoide tal como se explica en el Apéndice 1. A partir de este ajuste se calcularon los valores de pK que oscilan entre 10,7 y 11,6 de acuerdo con cada compuesto (Tabla I.1). Con respecto a los datos de lipofilidad obtenidos mediante experimentos de partición octanol/agua que se muestran en la Tabla I.2 en forma de valores logarítmicos, los mismos mostraron una alta lipofilidad de todos los compuestos (LogP) en el siguiente orden creciente: eugenol < carvacrol  $\leq$  timol < propofol  $\leq$  clorotimol.

**TABLA I.1. Datos Obtenidos a partir de ensayos espectrofotométricos.**

Compuesto	$\lambda_{\max}$	$\epsilon$	Sol (mM)	pK
Eugenol	280	2667	16.0	10.72
Carvacrol	274	1204	10.0	11.02
Propofol	270	1100	2.5	11.59
Timol	275	1212	10.0	11.11
Clorotimol	282	1404	3.0	10.71

Se indican la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ), el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), la solubilidad (Sol) y el pK de cada compuesto.



**Fig. I.4. Determinación de pK.** Se muestra una curva típica de absorbancia en función al pH correspondiente a clorotimol. La línea continua representa el ajuste de los datos a una función sigmoidea como se indica en Materiales y Métodos.

Para simplificar, en la tabla I.2 se reúnen todos los datos relacionados con la lipofilicidad de los compuestos obtenidos en el presente estudio y se muestran en forma de valores logarítmicos dispuestos en una matriz de datos. Todos estos datos fueron sometidos a análisis de correlación como se explica en la sección Materiales y Métodos. Particularmente, los  $\text{Log } P_{o/w}$ , determinados experimentalmente a través de la cuantificación espectrofotométrica de cada uno de los compuestos en ambas fases, mostraron una alta correlación con  $\text{log } P_{o/w}$  obtenidos con programas de cálculo y extraídos de bases de datos (coeficiente de correlación,  $r > 0,9$  en todos los casos) (Tabla I.3). Ambos datos mostraron también una alta correlación negativa con las solubilidades en agua determinadas experimentalmente ( $r > -0,98$ , correlación no incluida en el ACP como fue descrito más arriba) resultando el siguiente orden de hidrofobicidad creciente para los compuestos estudiados: eugenol < timol  $\approx$  carvacrol < propofol < clorotimol.

Los resultados de lipofilicidad obtenidos por el método de cromatografía líquida se detallan de la siguiente manera: los valores de  $\text{Log } k$  conseguidos mediante el uso de columnas IAM ( $\text{log } k_{IAM}$ ) para los cinco compuestos, usando dos fases móviles y dos temperaturas diferentes, muestran el siguiente orden creciente de afinidad con los fosfolípidos inmovilizados: eugenol < timol  $\approx$  carvacrol < propofol < clorotimol (Tabla I.2.). Los valores de  $\text{Log } k_{IAM}$  correspondientes a ACN 10% y los tiempos de retención usando la misma fase móvil, mostraron valores menores que los obtenidos en agua pura, como era de esperarse debido al uso de un solvente menos polar y a la elevada hidrofobicidad de los compuestos ensayados (Rohlf 1984; Ong et al. 1995; Perillo et al.

1995; Garcia y Perillo 1999; Ottiger y Wunderli-Allenspach 1999; Osterberg et al. 2001; Perillo y Garcia 2001; Taillardat-Bertschinger et al. 2002; Hamedá et al. 2005; Darrouzain et al. 2006). Las mezclas de agua con metanol o ACN en diferentes proporciones son las más utilizadas como fase móvil en cromatografía líquida (Alvarez-Zepeda et al. 1992; Taillardat-Bertschinger et al. 2003). En este trabajo elegimos la mezcla agua-ACN teniendo en cuenta por un lado que no hay diferencia significativa entre ellas como fue observado previamente entre los valores de  $k$  extrapolados tanto para metanol como para ACN y por otro lado, que metanol como cosolvente causa más daño en los lípidos de las columnas IAM (Taillardat-Bertschinger et al. 2003; Li et al. 2007).

**Tabla I.2. Matriz de datos originales.**

	Eugenol	Carvacrol	Propofol	Timol	Clorotimol
$\log k_{IAM-W} (30^{\circ}C)$	0.297	0.797	1.052	0.780	1.193
$\log k_{IAM-W} (45^{\circ}C)$	0.463	0.942	1.293	0.995	1.437
$\log k_{IAM-A10} (30^{\circ}C)$	-0.896	-0.292	-0.035	-0.327	0.092
$\log k_{IAM-A10} (45^{\circ}C)$	-0.856	-0.207	0.093	-0.191	0.240
$\log k_{C18} (30^{\circ}C)$	0.291	0.461	0.733	0.486	0.735
$\log k_{C18} (45^{\circ}C)$	0.232	0.399	0.807	0.518	0.722
$\log P_{o/w} \text{ exp}$	2.297	3.140	3.810	3.210	3.820
$\log P_{o/w} \text{ calc}$	2.420	3.090	3.870	3.090	3.710
$\log K_w (30^{\circ}C)$	1.791	2.291	2.546	2.274	2.687
$\log P_{lec-b}$	2.203	2.760	2.895	2.902	3.171
$\log P_{dpPC-b}$	1.890	2.480	3.062	2.637	3.539

Para las variables obtenidas por IAM-HPLC se indica la fase móvil utilizada: agua (W) o ACN 10% (A10). Los Log  $P$  indican los coeficientes de partición en diferentes sistemas: *n*-octanol/agua (o/w), liposomas de lecitina/buffer (lec-b) y liposomas de dpPC/buffer (dpPC-b). Exp y calc corresponden a los datos experimentales y calculados, respectivamente.

La Fig. I.5 muestra que los valores  $k_{IAM}$  observados a 45°C fueron mayores que los correspondientes a 30°C. Este comportamiento sugiere que la interacción soluto-fosfolípido inmovilizado es favorecida por el incremento de temperatura indicando que la interacción se favorece cuando la fase está más desordenada coincidiendo con conclusiones anteriores de nuestro grupo (García D.A. 1997; García y Perillo 1997). Todos los valores de  $\log k_{IAM}$  de los compuestos estudiados presentaron una alta correlación con todos los otros parámetros de lipofilicidad, incluyendo los datos de RP-HPLC y con los coeficientes de partición en los diferentes sistemas, como se muestra en la matriz de correlación (Tabla I.3.).

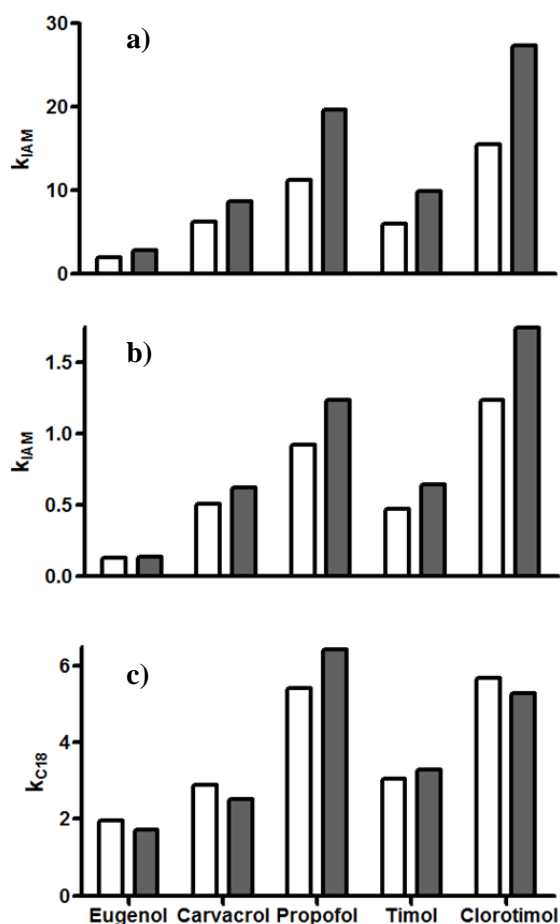
Los valores de Log  $k$  de los compuestos fenólicos determinados mediante la columna RP-C18 ( $\log k_{C18}$ ) muestran una secuencia de lipofilicidad relativa similar a la

descrita anteriormente pero, comparando con los obtenidos usando la columna IAM, los valores de  $\log k_{C18}$  para propofol y clorotimol fueron más parecidos entre sí. Este orden de lipofilicidad se mantuvo a ambas temperaturas y no se encontró un efecto claro de la temperatura sobre los  $\log k_{C18}$  (el incremento de la temperatura produce una pequeña disminución del  $\log k_{C18}$  de eugenol, carvacrol y clorotimol, pero aumenta los valores correspondientes a propofol y timol) (Fig. I.4.). Sintetizando, podemos decir que los valores de  $\log k_{C18}$  mostraron una buena correlación con todos los valores de  $\log k_{IAM}$  y con los coeficientes de partición de todos los sistemas, incluyendo los  $\log P_{o/w}$ .

**Tabla I.3. Tabla de correlación simple.**

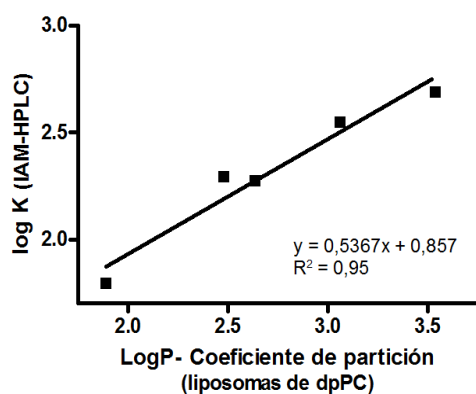
Variables	$\log k_{IAM-W}$ (30°C)	$\log k_{IAM-W}$ (45°C)	$\log k_{IAM-A10}$ (30°C)	$\log k_{IAM-A10}$ (45°C)	$\log k_{C18}$ (30°C)	$\log k_{C18}$ (45°C)	$\log P_{o/w}$ exp	$\log P_{o/w}$ calc <sup>a</sup>	$\log K_w$ (30°C)	$\log P_{lec-b}$	$\log P_{dpPC-b}$
$\log k_{IAM-W}$ (30°C)	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\log k_{IAM-W}$ (45°C)	0.997	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\log k_{IAM-A10}$ (30°C)	0.998	0.992	1.000	-	-	-	-	-	-	-	-
$\log k_{IAM-A10}$ (45°C)	0.997	0.993	0.999	1.000	-	-	-	-	-	-	-
$\log k_{C18}$ (30°C)	0.963	0.976	0.951	0.950	1.000	-	-	-	-	-	-
$\log k_{C18}$ (45°C)	0.920	0.943	0.912	0.916	0.977	1.000	-	-	-	-	-
$\log P_{o/w}$ exp	0.988	0.991	0.988	0.989	0.975	0.962	1.000	-	-	-	-
$\log P_{o/w}$ calc <sup>a</sup>	0.961	0.967	0.958	0.955	0.985	0.980	0.987	1.000	-	-	-
$\log K_w$ (30°C)	1.000	0.997	0.998	0.997	0.963	0.920	0.988	0.961	1.000	-	-
$\log P_{lec-b}$	0.957	0.953	0.960	0.969	0.868	0.833	0.931	0.862	0.957	1.000	-
$\log P_{dpPC-b}$	0.974	0.984	0.959	0.963	0.967	0.914	0.954	0.927	0.974	0.936	1.000

Los valores representan los resultados de una correlación simple entre todos los pares de valores y corresponden a los coeficientes de correlación (r). Los valores de la diagonal iguales a 1 se deben a que cada variable correlaciona perfectamente con si misma. El triángulo superior está vacío pues es la imagen refleja del triángulo inferior. Los nombres de las variables se indican en la Tabla I.2.



**Fig. I.5. Factor de capacidad ( $k$ ) a diferentes temperaturas.** 30°C (barras blancas), 45°C (barras grises). a) columna IAM, agua; b) columna IAM, 10% ACN; c) columna C18, 50% ACN.

Los valores de  $K$ , si bien fueron ligeramente menores que los coeficientes de partición en liposomas, siendo esta diferencia más notable para los compuestos más lipofílicos, mostraron una alta correlación entre sí (Log  $K$  vs. coeficientes de partición en liposomas) (Tabla I.2., Fig. I.6.).



**Fig. I.6. Correlación entre diferentes Coeficientes de Partición.**  $\text{Log}K_{IAM}$  vs.  $\text{Log}P_{dpPC}$  (coeficientes de partición calculados por HPLC utilizando columnas IAM vs coeficientes de partición en liposomas de dpPC, para los cinco compuestos estudiados).



Finalmente, considerando que el primer componente principal explica más del 96% del total de la variabilidad (Tabla 4) y que todas las variables medidas contribuyen casi exclusivamente a este componente (Tabla 5), queda demostrado que solo un factor es responsable del total de la variabilidad entre los compuestos utilizados. Este factor es la hidrofobicidad o la lipofilicidad de cada compuesto, cuantificada por el valor de las variables medidas o calculadas en este estudio.

**Tabla I.4. Contribución de cada componente principal a la variabilidad total entre las muestras.**

Valores	PC1	PC2	PC3
<b>Eigen-valores</b>	10.61	0.27	0.07
<b>% de Variabilidad</b>	96.46	2.47	0.68
<b>% Acumulado</b>	96.46	98.93	99.61

Se muestran los eigen-valores para cada componente principal (PC), los porcentajes de variabilidad total explicada por cada PC y el porcentaje acumulado. Los cálculos se realizaron como se describe en el Apéndice 2.

**Tabla I.5. Contribución de cada variable individual al componente principal 1.**

Variables	Eigen-vectores
<b>log <math>k_{IAM-W}</math> (30°C)</b>	0.996
<b>log <math>k_{IAM-W}</math> (45°C)</b>	0.999
<b>log <math>k_{IAM-A10}</math> (30°C)</b>	0.992
<b>log <math>k_{IAM-A10}</math> (45°C)</b>	0.993
<b>log <math>k_{C18}</math> (30°C)</b>	0.979
<b>log <math>k_{C18}</math> (45°C)</b>	0.951
<b>log <math>P_{o/w}</math> exp</b>	0.996
<b>log <math>P_{o/w}</math> calc</b>	0.976
<b>log <math>K_w</math> (30°C)</b>	0.996
<b>log <math>P_{lec-b}</math></b>	0.947
<b>log <math>P_{dpPC-b}</math></b>	0.977

Se muestran sólo las contribuciones al componente principal con el mayor eigen-valor. Los elementos eigen-vectores (mostrados en columnas) se redujeron de tal manera que el elemento más grande de cada eigen-vector fuera igual a la unidad. Los cálculos se realizaron según se describe en el Apéndice 1.

## DISCUSIÓN

Todos los compuestos mostraron una alta capacidad de interacción con liposomas, tanto de lecitina de soja como de dpPC, como lo demuestran los coeficientes de partición obtenidos en ambos sistemas (entre 150 y 1500 en sistema lecitina-buffer y entre 80 y 3500 en sistema dpPC-buffer), siendo los más hidrofóbicos los que mostraron los mayores coeficientes en ambos sistemas. La comparación de estos coeficientes de partición experimentales con los parámetros calculados por HPLC demuestra que los resultados obtenidos por ambas columnas (IAM o C18) pueden ser utilizados para predecir los coeficientes de partición en sistemas de liposomas-buffer, resultando mejor la correlación obtenida para el sistema dpPC-buffer. Esta última diferencia puede ser debido al hecho de que ambos tipos de liposomas son diferentes en su composición ya que, mientras los liposomas de dpPC están formados por un fosfolípido puro, los liposomas de lecitina están constituidos por una mezcla de fosfolípidos (mayoritariamente PC asociada a diferentes ácidos grasos) además de ciertos ácidos grasos libres, lo que determina importantes diferencias físico-estructurales entre ellos.

Teniendo en cuenta los resultados de todos los parámetros obtenidos, eugenol muestra la menor lipofilicidad mientras timol y carvacrol presentan valores intermedios. Comparando los dos compuestos más lipofílicos, clorotimol y propofol, el primero muestra valores elevados de  $\log k_{IAM}$  y de coeficiente de partición en liposomas, mientras ambos muestran valores de  $\log k_{C18}$  y  $\log P_{o/w}$  muy similares. Este comportamiento diferente de clorotimol frente a propofol en sistemas que involucran la presencia de fosfatidilcolina, puede deberse a una mejor capacidad del primero para establecer interacciones electrostáticas intermoleculares favorables del tipo carga-dipolo con la carga eléctrica positiva del átomo de N de la fosfatidilcolina. Este argumento se apoya en el hecho de que si bien ambos compuestos presentan dipolos permanentes, el momento dipolar de clorotimol posee una magnitud mayor (2,096 vs. 1,357 debyes para propofol).

Los resultados de lipofilicidad mostrados en la Tabla I.2 demuestran un grado relativo de lipofilicidad comparable entre ambas columnas utilizadas e incluso comparables con los  $\log P_{o/w}$ , con la excepción de clorotimol que muestra una mayor interacción con la columna IAM. Las diferentes temperaturas y las diferentes fases móviles no mostraron cambios significativos en cuanto a la lipofilicidad relativa entre los diferentes compuestos.

Según los resultados obtenidos, todos los compuestos mostraron una alta

---

capacidad de interactuar con liposomas, tanto de lecitina de soja como de dpPC siendo los más hidrofóbicos los que mostraron mayores coeficientes de partición (Tabla I.2). Si bien los valores de coeficientes de partición en liposomas mostraron valores relativos comparables a los sistemas antes estudiados, su correlación fue mayor con los obtenidos por IAM-HPLC (Tabla I.3.).

Concluyendo, podemos decir que en el presente trabajo, además de obtener importante cantidad de datos fisicoquímicos de los compuestos los cuales nos aportan información acerca de su comportamiento hidrofóbico y su afinidad por membranas, hemos encontrado que las relaciones y comparaciones realizadas entre los diferentes resultados obtenidos nos permiten validar la utilización de métodos cromatográficos rápidos y simples (ej: IAM-HPLC) para predecir la capacidad de interacción de estos compuestos con membranas de fosfolípidos puros. Considerando que las altas correlaciones obtenidas fueron alcanzadas principalmente por el estado no-cargado de todos los compuestos estudiados bajo las condiciones utilizadas en presente trabajo ( $\text{pH} \ll \text{pK}$ ), es posible sugerir que estas circunstancias deberían ser tenidas en cuenta para corregir futuros modelos predictivos. En este sentido, sería también interesante aumentar el número de compuestos ensayados para generalizar aún más estos resultados a otras moléculas similares. Los valores obtenidos por HPLC utilizando columnas IAM del tipo *fast screening* fueron cuantitativamente los más cercanos a los coeficientes de partición determinados utilizando liposomas, debido a su capacidad para establecer interacciones moleculares similares a aquellas encontradas en membranas fosfolipídicas. Finalmente, y teniendo en cuenta que según los resultados obtenidos todos los compuestos evaluados fueron capaces de interactuar con membranas, se podría sugerir una eventual participación de los mismos, a través de la modificación del microambiente lipídico del receptor GABA<sub>A</sub>, en la modulación de la actividad de este canal iónico.

## ***CAPÍTULO 2***

---

## EFFECTOS SOBRE MODELOS DE MEMBRANAS ARTIFICIALES

### Interacción de los compuestos fenólicos con capas monomoleculares y con liposomas fosfolipídicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos

Los compuestos fenólicos utilizados fueron detallados en el Capítulo I. Estos compuestos se disolvieron en primer lugar en DMSO a una concentración 400x, con lo que la concentración final de DMSO en la solución de prueba fue de 0,25% v / v. Los controles contenían la misma concentración de DMSO, cuando así se requirió. La fosfatidilcolina de huevo (EPC) y la dpPC fueron adquiridas en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, EE.UU.). La sonda fluorescente 1,1'-dioctadecil-3, 3,3', 3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato (DiIC18) se obtuvo de Molecular Probes (Invitrogen, Argentina). El resto de las drogas y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua utilizada fue bidestilada en todos los casos. Para los experimentos de  $H^1$ -RMN se utilizó agua deuterada ( $D_2O$ , 99.9%) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

### 2. Capas monomoleculares de fosfolipidos en la interfase agua-aire (film de Langmuir)

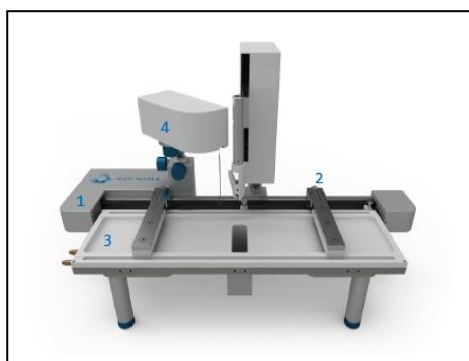
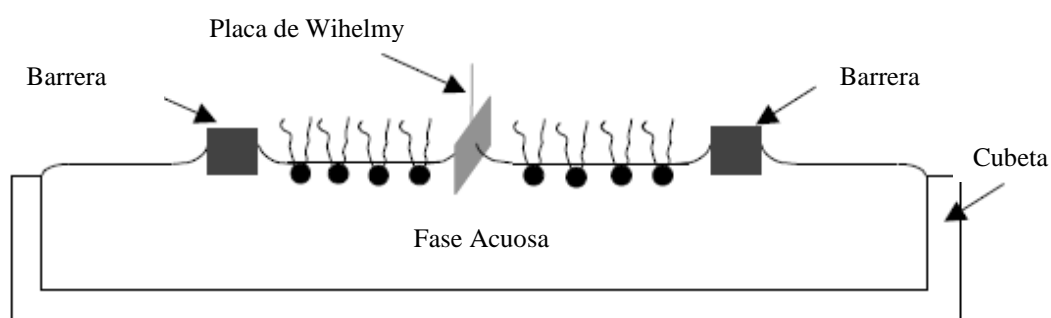
#### 2.1- Equipo de Monocapas para obtención de Isotermas Presión-Area Molecular.

El aparato utilizado fue un Minitrough II (KSV, Finlandia) (Fig.II.1). Este equipo permite estudios de caracterización de propiedades de moléculas anfipáticas dispuestas en un sistema de capas monomoleculares utilizadas como modelos de membrana. Esta metodología permite, entre otras cosas, la obtención de isotermas de compresión de presión lateral de superficie ( $\pi$ ) vs. área molecular (A). Para ello el equipo cuenta con un sistema compuesto por las siguientes partes principales: una cubeta de material hidrofóbico (teflón) de 247,5 cm<sup>2</sup> de superficie, una placa de Wihelmy de Pt, una balanza y dos barreras que se mueven por la superficie de la

bandeja de manera controlada (Fig.II.1). La técnica implica la formación de una monocapa de lípidos anfifílicos sobre una subfase acuosa. Esta monocapa, una vez organizada en la interfase agua-aire y ya estabilizada, puede ser comprimida por el movimiento de las barreras. Los cambios en la presión de superficie ( $\pi$ ) durante la compresión (disminución del área superficial), se calculan automáticamente a partir del cambio de peso de la placa de Wihelmy detectado por la balanza y analizado por un transductor de presión superficial según la siguiente ecuación:

$$\pi = \gamma_w - \gamma_{lip} \quad (1)$$

donde  $\gamma_w$  es la tensión superficial del agua de la subfase y  $\gamma_{lip}$  es la tensión superficial en presencia del anfifilo en la superficie. Así se registran estos cambios en forma de isothermas  $\pi$ -A.



**Fig. II.1. Equipo de Monocapas.** El esquema muestra las partes principales de un equipo y la fotografía corresponde al Minitrough II (KSV, Finlandia) utilizado en el presente trabajo. 1- Base o pie. 2- Barreras. 3- Cubeta de teflón. 4- Balanza.

## 2.2 - Isothermas de superficie Presión-Área Molecular ( $\pi$ -A).

Las capas monomoleculares fueron preparadas y monitoreadas esencialmente de acuerdo con García y Perillo (García y Perillo 2002). Se controló la ausencia de compuestos tensioactivos en los solventes puros y en la solución de la subfase. La monocapa de lípido se formó a partir del agregado de 5-30  $\mu$ l de una solución clorofórmica de dpPC (1 mg/ml) sobre la superficie acuosa. Se dejó alrededor de cinco minutos para permitir la evaporación del solvente y luego se comprimió la monocapa a

una velocidad constante de 7.5 cm<sup>2</sup>/min a 22 ± 1°C. Los valores de A y de π se determinaron con una precisión de ± 0.001 nm<sup>2</sup> y ± 0.001 mN/m, respectivamente. Las isothermas fueron realizadas en ausencia (control) o presencia de cada fenol a diferentes concentraciones en la subfase.

Los puntos de transición de fase y de colapso (π<sub>c</sub>) se identificaron mediante la determinación de los valores del módulo de compresibilidad (K) como una función de la isoterma π-área mediante la siguiente ecuación:

$$K = -\left(A_{\pi}\right) \cdot \left(\frac{\partial \pi}{\partial A}\right)_{\pi} \quad (2)$$

donde A<sub>π</sub> es el área molecular a la presión indicada. Este parámetro refleja el estado físico y la transición de fase bi-dimensional de la monocapa. Valores altos de K indican una disminución de la elasticidad interfacial. Un cambio abrupto del valor K indica el comienzo de la transición de fase.

De las isothermas π-A, la cantidad de fenol por unidad de área (Γ) se calculó según la siguiente ecuación derivada de la ecuación de tensión superficial de Gibbs (Gaines 1966):

$$\Gamma = \frac{c}{RT} \cdot \frac{\partial \gamma_{ip}}{\partial c} \quad (3)$$

donde c es la concentración de fenol en la subfase y γ<sub>ip</sub> es la tensión superficial de la monocapa de dpPC (calculado a partir de: γ<sub>ip</sub> = γ<sub>w</sub> - π, siendo γ<sub>w</sub> la tensión superficial del agua a 25°C) a un área molecular particular. Se supone un comportamiento ideal de la solución de la droga, por lo que el coeficiente de actividad en presencia de fenoles se igualó a la unidad. La concentración de cada compuesto en la subfase varió entre 0 y 500 μM.

### 2.3- Velocidad de penetración de los compuestos en monocapas fosfolipídicas.

Para los experimentos de penetración se utilizó una cubeta de Teflón circular (15,9 cm<sup>2</sup> de superficie). La subfase (8,5 ml de volumen) se mantuvo bajo agitación continua con una varilla miniatura recubierta de teflón girando a 150-250 rpm. A diferencia del experimento de determinación de isothermas π-A, durante esta experiencia se mantuvo constante el área de superficie, es decir que no se realizó la compresión de la monocapa. En este caso se utilizaron presiones iniciales diferentes (π<sub>i</sub>) con el fin de medir el incremento de π inducida por la penetración de los compuestos en la monocapa de dpPC en función del tiempo, luego de la inyección de 100 μM de cada compuesto en la subfase. En consecuencia, la velocidad de

penetración de cada compuesto a cada  $\pi_i$  se determinó como el valor máximo de la primera derivada calculada a partir de curvas de  $\pi$  vs tiempo (t). En todos los experimentos de penetración, la inyección de cada fenol en la subfase se hizo después de la estabilización de la  $\pi_i$  (entre cinco y diez minutos aproximadamente).

#### 2.4 - Microscopía de epifluorescencia de monocapas de dpPC.

A una solución de dpPC (1 mg/ml) en cloroformo-metanol 2:1 se le añadió un pequeño volumen de una solución concentrada de diI18 en metanol hasta obtener una concentración final de 1% (mol sonda/mol dpPC). La mezcla de lípido y sonda se sembró para su dispersión superficial sobre una subfase acuosa, se comprimió bajo las mismas condiciones que se detallan en el punto 2.2 y se observó su comportamiento con un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Tokio, Japón) equipado con un objetivo de 20X de distancia óptica de trabajo y con un filtro de fluorescencia (rango de excitación: 520-553 nm, y rango de emisión: 578-633 nm). Un equipo de monocapas Minisystem (KSV, Finlandia) fue montado en la región de la platina del microscopio. Este equipo cuenta con una cubeta de teflón con una ventana de cuarzo en su centro de 35 mm de diámetro que permite la observación de la monocapa a través de la cubeta. Cada compuesto se inyectó en la subfase a 100 mM de concentración final, y las imágenes fueron tomadas a diferentes  $\pi$  con una cámara de video a color Nikon de DS-5M con una resolución de 2560x1920 pixeles. Las imágenes fueron analizadas usando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, EE.UU.).

### 3. $H^1$ -RMN (Resonancia Magnética Nuclear de protones)

La resonancia magnética nuclear es una poderosa técnica utilizada para investigar la estructura y dinámica de diferentes moléculas. Se basa en la medida de las propiedades físicas del núcleo de una molécula en un campo magnético definido, este método es altamente sensible y permite detectar cambios en el ambiente molecular en torno a dicho núcleo.

#### 3.1 - Coeficientes de partición.

Se calcularon los coeficientes de partición de todos los compuestos en liposomas de EPC (fosfatidilcolina de huevo) para calcular posteriormente la relación compuesto/lípido a utilizar en los experimentos de  $H^1$ -RMN (de Paula y Schreier 1995).



Para ello, se disolvió el lípido en cloroformo, luego se eliminó la mayor parte de este solvente por una corriente de nitrógeno y finalmente se secó definitivamente con vacío durante 2 horas. Se obtuvo así una fina película de lípido que se resuspendió en solución tampón pH 7,4 para formar los liposomas, para lo cual se vortereó vigorosamente durante 5 minutos y se colocó luego en un sonicador de baño a 40°C durante 3 minutos. A los liposomas ya formados se le agregó cada compuesto a estudiar a una relación molar 2:1 (lipido:compuesto), se agitó la muestra y se dejó reposar a 4°C durante 12 hs. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 horas y se realizaron las lecturas de los sobrenadantes en el espectrofotómetro a la  $\lambda_{\max}$  determinada para cada compuesto.

### 3.2 - Preparación de membranas para $^1\text{H}$ -RMN.

Los liposomas se obtuvieron por evaporación de soluciones clorofórmicas de EPC como se indicó más arriba, resuspendiendo esta vez el lípido en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y agitando vigorosamente por 3 min. Así, los liposomas se formaron como vesículas multilaminares grandes (MLVs), a partir de los cuales, luego de ser liofilizadas y resuspendidas nuevamente en  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 7,4), se obtuvieron vesículas unilaminares pequeñas (SUVs). Las muestras se sometieron a ultrasonido hasta verse translúcidas (aprox. 15 min) en un equipo Sonics and Materials (Newtown, CT, EEUU). Durante la sonicación la temperatura se mantuvo entre 0 y 4°C con ciclos intermitentes de agitación (1 min), en un baño de agua con hielo.

### 3.3 - Adquisición de espectros $^1\text{H}$ -RMN.

Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN se adquirieron con un equipo Varian Inova 600 MHz (LNBio, Campinas, Brasil), y a partir de ellos se obtuvieron tanto los desplazamientos químicos como así también los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) de los hidrógenos del fosfolípido en agua, de cada compuesto en agua y de ambos incubados conjuntamente (fosfolípido y compuesto).

Para estos experimentos se utilizó un pulso de 90° de típicamente 10-15  $\mu\text{s}$  de duración, con un tiempo de espera entre pulsos establecido a una relación de 5 veces el mayor  $T_1$  (correspondiente a los protones de los grupos aromáticos). Los  $T_1$  se calcularon por el método convencional de inversión-recuperación, a 37 °C.

Las muestras se degasificaron para evitar la interferencia del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) disuelto con las mediciones  $T_1$ . A las vesículas sonicadas se le agregaron los compuestos fenólicos a una relación molar 3:1 (65 mM de lípido: 21,5 mM de

compuesto) considerando los valores de coeficientes de partición calculados previamente.

Los espectros fueron analizados con el programa SpinWorks 3.1.8 beta 4 (Kirk Marat, University of Manitoba, Canadá).

## RESULTADOS

### 1- Isotermas $\pi$ -A.

Es importante destacar que ninguno de los fenoles fue capaz de formar capas monomoleculares estables por sí mismo (resultados no mostrados), en consecuencia los cambios en las monocapas de dpPC inducidos por todos los compuestos se interpretaron directamente como su interacción con la monocapa de fosfolípidos.

La figura. II.2A-E muestra las isotermas de compresión  $\pi$ -A de dpPC en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones (20, 100 y 500  $\mu$ M) de cada compuesto en la subfase acuosa. Las isotermas control realizadas en presencia de DMSO 0,25% v/v no mostraron diferencias con las realizadas a 0% de DMSO.

Todos los compuestos fueron capaces de expandir las isotermas de dpPC de manera concentración dependiente, además de modificar la bien conocida transición de fase bidimensional de dpPC entre los estados líquido expandido (LE) y líquido condensado (LC), la cual, por otro lado, estuvo presente en todas las isotermas.

En la figura II.2F-J se representan las curvas de los módulos de compresibilidad (K) en función de A, calculados a partir de las isotermas mostradas en los paneles A-E de la misma figura. Este parámetro refleja el estado físico de la monocapa y ayuda a localizar el estado de transición de fase. A mayor valor de K, menor es la elasticidad interfacial. Mientras que en monocapas en estado expandido (LE) el valor de K es de la misma magnitud que la presión de superficie, en fases LC varía entre 12,5 y 250 mN/m (Gaines 1966; Carrer y Maggio 1999; Garcia y Perillo 2002). Un valor máximo en la curva de K vs. A indica el inicio de la transición de fase. La aparición de la fase LC en monocapas de dpPC control a áreas moleculares por debajo de 50  $\text{\AA}^2$ , como era esperado, se puso de manifiesto por el marcado incremento en los valores de K (líneas continuas en la figura II.2F-J). En presencia de propofol, clorotimol, carvacrol y timol, la transición de fase bidimensional se produjo a A más bajas en relación al control, mientras que, en presencia de eugenol, los cambios tuvieron lugar a áreas mayores.

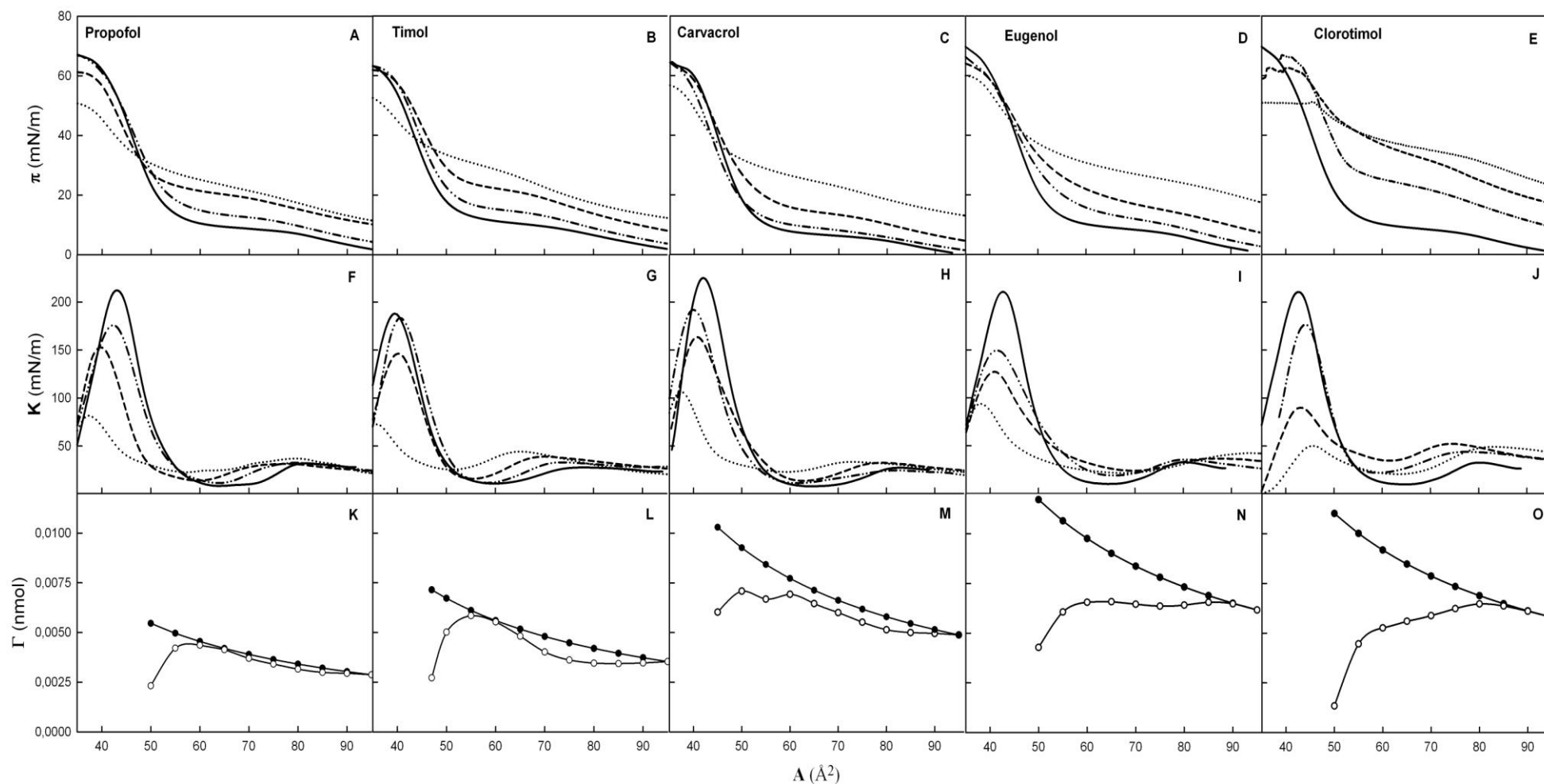
Los valores correspondientes a la cantidad de compuesto por unidad de área ( $\Gamma$ ), calculados a partir de isotermas de compresión  $\pi$ -A de acuerdo con la ecuación (3), se representan en función a A (Fig. II.2K-O, círculos vacíos). Los círculos rellenos representan un comportamiento teórico-ideal considerando que la cantidad total de cada compuesto por unidad de A al comienzo de la compresión (superficie máxima) permanece en la monocapa durante todo el proceso de compresión, sin ser expulsadas ni incorporadas moléculas nuevas desde la monocapa hacia o desde la

subfase, respectivamente. Como todas las concentraciones ensayadas presentaron resultados similares, para simplificar se muestran sólo los puntos correspondientes a una concentración de compuesto de 500  $\mu\text{M}$  en la subfase. Aunque todos los compuestos demostraron que el número de moléculas por unidad de área alcanzada en la monocapa fue bastante similar, con valores máximos en torno a 5-8  $\text{pmol}/\text{mm}^2$ , comparando las curvas teóricas con los datos experimentales se observaron dos comportamientos diferentes durante la compresión:

*i-* Para propofol, timol y carvacrol la concentración en la monocapa se mantuvo bastante similar a los valores ideales a  $A$  mayores (al comienzo de la compresión), pero sufrió una disminución importante (expulsión de la monocapa) en las zonas de  $A$  más bajas correspondientes a la fase LC.

*ii-* la concentración de eugenol y de clorotimol en la monocapa se mantuvo también similar a la ideal pero sólo a  $A$  muy altas, para luego sufrir un decaimiento por expulsión del compuesto a medida que el  $A$  disminuye.

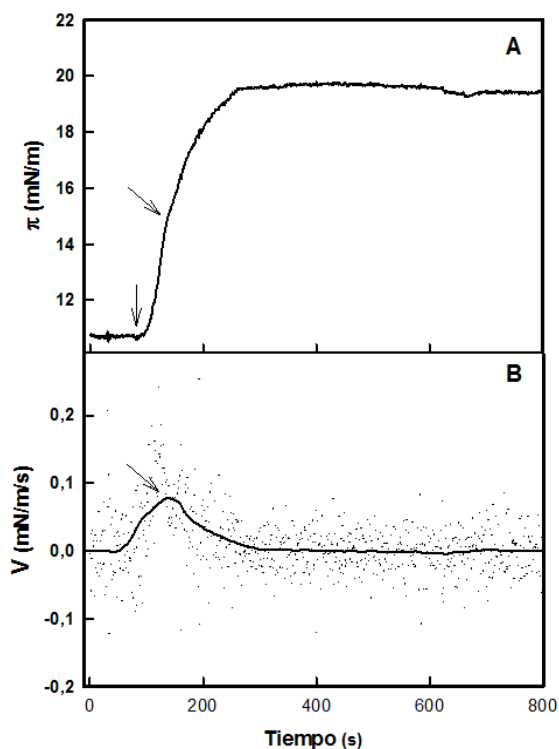
Este comportamiento de expulsión de los compuestos de la monocapa, fue más notable aproximadamente en las zonas correspondientes a la región de transición de fase, donde aumentan los defectos de empaquetamiento entre los fosfolípidos. Así, mientras que los tres primeros compuestos fueron expulsados de la monocapa de dpPC sólo a  $\pi$  correspondientes a la fase LC, los últimos fueron liberados en ambas fases (LE y LC) durante la compresión. Es interesante observar que, a pesar del tipo de comportamiento mostrado en cada caso, la disminución más marcada en los valores de  $\Gamma$  (Fig. II.2K–O) coincide con el valor mínimo del módulo de compresibilidad (Fig. II.2F–J) y con la región de coexistencia de las dos fases (LE-LC) (Fig. II.2A–E).



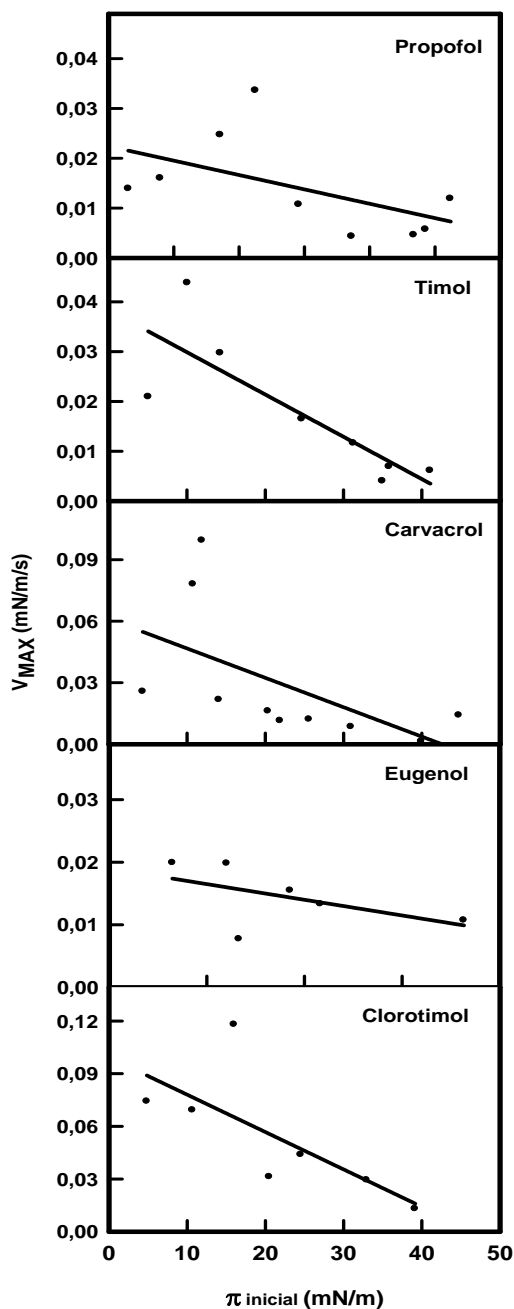
**Fig. II.2. Efecto de la compresión y la concentración de cada compuesto fenólico sobre las propiedades interfaciales de los filmes de Langmuir de dpPC.** Las curvas se obtuvieron en ausencia (control, línea continua) o en presencia de cada compuesto a diferentes concentraciones finales (20  $\mu\text{M}$ , guión largo; 100  $\mu\text{M}$ , guión corto; y 500  $\mu\text{M}$ , línea punteada). Paneles superiores (A-E), las isotermas de compresión  $\pi$ -A. Paneles Medios (F-J), los valores de K calculado a partir de las curvas en los paneles superiores según lo indicado en Materiales y Métodos. Paneles inferiores (K-O):  $\circ$ ,  $\Gamma$  valores calculados a partir de datos experimentales (isotermas  $\pi$ -A) utilizando la ecuación indicada en Materiales y Métodos;  $\bullet$ , Cantidad teórica de compuesto por unidad de área, suponiendo una cantidad constante de compuesto en la monocapa a lo largo de todo el proceso de compresión (valores ideales).

## 2- Velocidad de Penetración en interfase agua-aire de monocapas lipídicas.

La penetración de todos los compuestos fenólicos en la monocapas de dpPC se puede evidenciar a través de la variación de  $\pi$  dependiente del tiempo, manteniendo constante el área molecular superficial (A) y partiendo de diferentes grados de empaquetamiento molecular (presión de la superficie inicial,  $\pi_i$ ). Una curva típica se representa en la Figura. II.3A, que muestra la variación de  $\pi$  en función del tiempo a una  $\pi_i = 10,7$  mN/m, después de la inyección de  $100 \mu\text{M}$  de carvacrol en la subfase. Los valores de  $\pi$  experimentaron un aumento abrupto, por la penetración del compuesto en la monocapa desde la subfase, que luego evolucionó hacia una meseta. La velocidad de penetración (V) se calculó a diferentes  $\pi_i$  y para todos los compuestos fenólicos, a partir de la primera derivada de la curva  $\pi$ -tiempo (fig. II.3.B). El pico obtenido en esta segunda curva representa la velocidad máxima ( $V_{\text{MAX}}$ ) (ver flecha oblicua). Una vez obtenidos estos datos se construyó un gráfico de  $V_{\text{MAX}}$  en función de  $\pi_i$  para cada compuesto (Fig. II.4), observándose en todos los casos una tendencia decreciente de la  $V_{\text{MAX}}$  a medida que aumenta  $\pi_i$ .



**Fig. II.3. Análisis de la velocidad de penetración.** Curvas típicas de variación de la presión lateral ( $\pi$ ) en función del tiempo (A) y su primera derivada (B), después de la inyección de  $100 \mu\text{M}$  de carvacrol en la subfase. Antes de la inyección del compuesto, la monocapa se estabilizó a una  $\pi$  constante ( $\pi_i$ : presión inicial) (flecha vertical en el panel A). El máximo índice de penetración ( $V_{\text{max}}$ ) está indicado por las flechas oblicuas en ambos paneles.



**Fig. II.4. Velocidades máximas de penetración de los compuestos ( $V_{\text{MAX}}$ ).** Los valores de  $V_{\text{MAX}}$  se determinaron como se muestra en la Fig. II.2 en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de cada uno de los compuestos ensayados en la subfase, y a diferentes  $\pi_i$ . Las líneas rectas corresponden a un ajuste lineal de los datos para observar la tendencia seguida por  $V_{\text{MAX}}$  en función de diferentes  $\pi_i$ .

### 3- Microscopía de Epifluorescencia de monocapas.

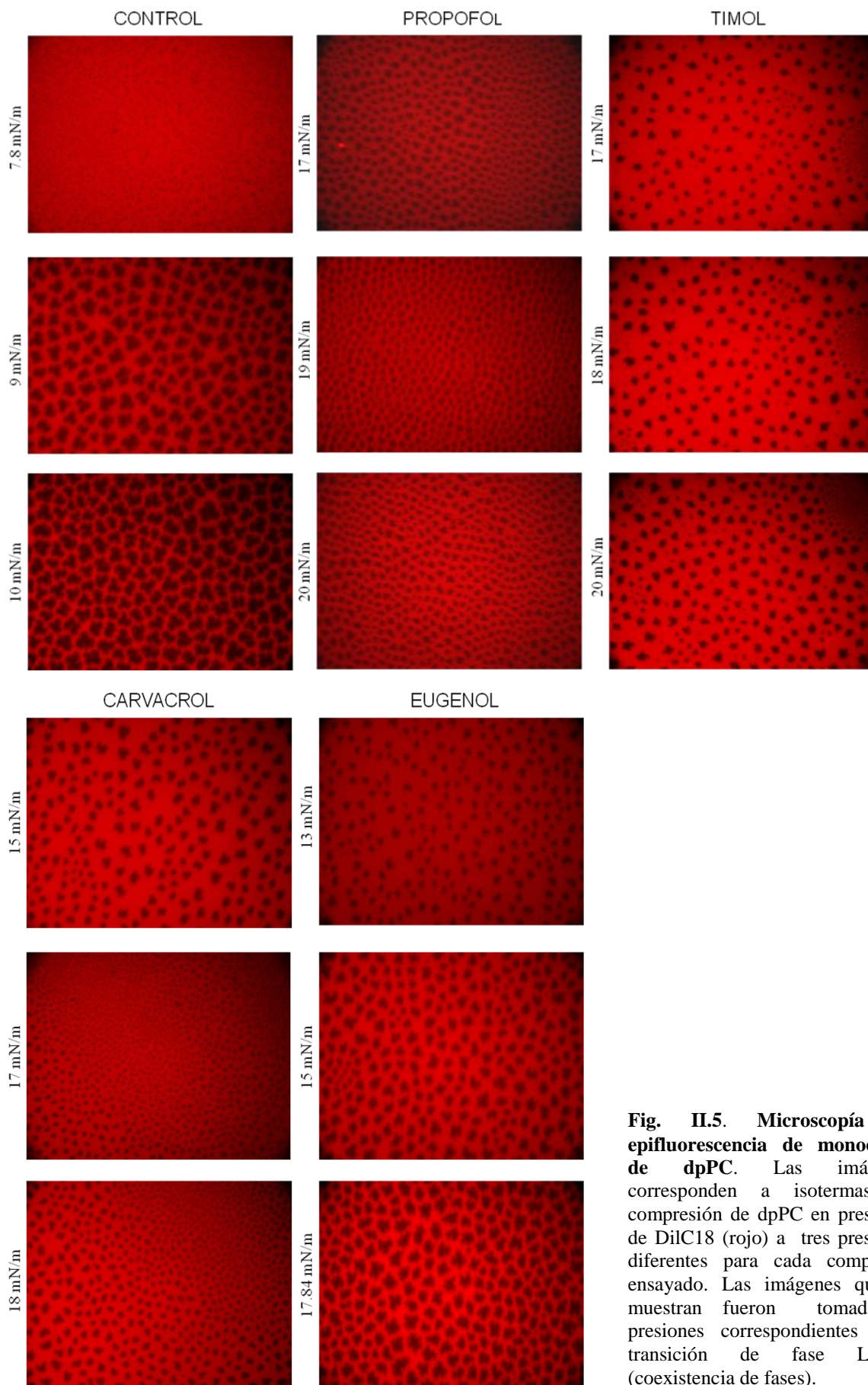
La microscopía de epifluorescencia permite visualizar el comportamiento de fase de una monocapa durante la compresión, permitiendo la observación de los efectos que tienen los compuestos ensayados sobre la formación de los dominios LC de esta monocapa. La sonda fluorescente lipófila DiI18 muestra una partición preferencial en la fase LE de la monocapa de lípidos (Busto et al. 2009). En

consecuencia, las fases lipídicas LE y LC están representadas por los dominios brillantes (DilC18-enriquecido) y oscuros (DilC18-empobrecido), respectivamente.

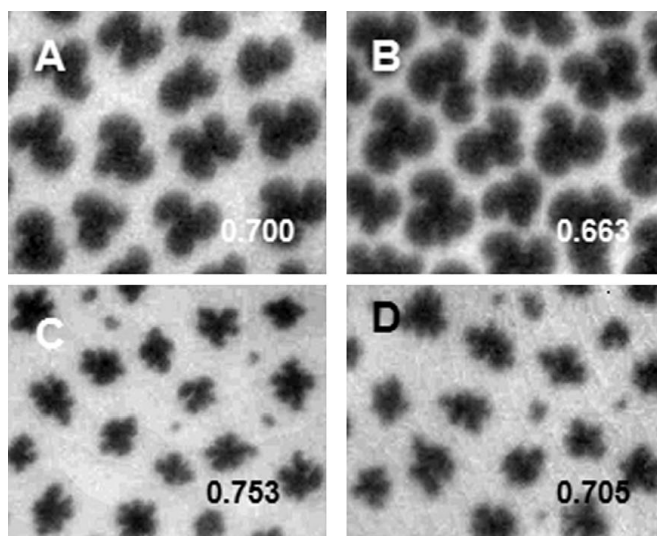
Es necesario aclarar que en los experimentos de epifluorescencia los fenoles se añadieron a la subfase a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . A esta concentración final clorotimol no permitiría el desarrollo de una fase condensada muy definida (sus valores de compresibilidad son menores que los mostrados para los otros compuestos) (ver Fig. II.2J). De acuerdo con esto, los típicos dominios LC oscuros no se visualizan en presencia de clorotimol 100  $\mu\text{M}$ , tal vez debido a la partición uniforme de la sonda fluorescente en toda la monocapa incluyendo los dominios LC que, en este caso, son más elásticos. Por esta razón, en los párrafos siguientes se analizan sólo las imágenes de epifluorescencia de las monocapas en presencia del resto de los compuestos ensayados.

La Fig. II.5 muestra las imágenes de epifluorescencia correspondientes a etapas de compresión sucesivas de la región de coexistencia LE-LC para monocapas de dpPC en ausencia (control) o presencia de fenoles en la subfase. La Fig. II.6 muestra campos típicos de microfotografías similares a las mostradas en la Fig. II.5, utilizados para el análisis de imágenes. Las microfotografías de fluorescencia de las muestras control (Fig. II.5a-c y Fig.II.6a-b) muestran la formación de dominios LC en el inicio de la transición de fase y durante la compresión de la monocapa, los cuales exhiben la típica estructura triskelion con curvatura en sentido antihorario correspondiente a la forma L-dpPC (Kruger y Losche 2000). Estos dominios LC se observan en la presencia de cualquiera de los compuestos ensayados aunque, en la región de coexistencia de fases, se observaron generalmente más pequeños y más ramificados (sin la presencia de estructuras triskelion) que los observados en monocapas control (Fig. II.5.d-l y Fig. II.6c-d). Todas las microfotografías analizadas fueron capturadas a A cuyos valores correspondían aproximadamente al 70% del valor del A al inicio de la transición de fase.



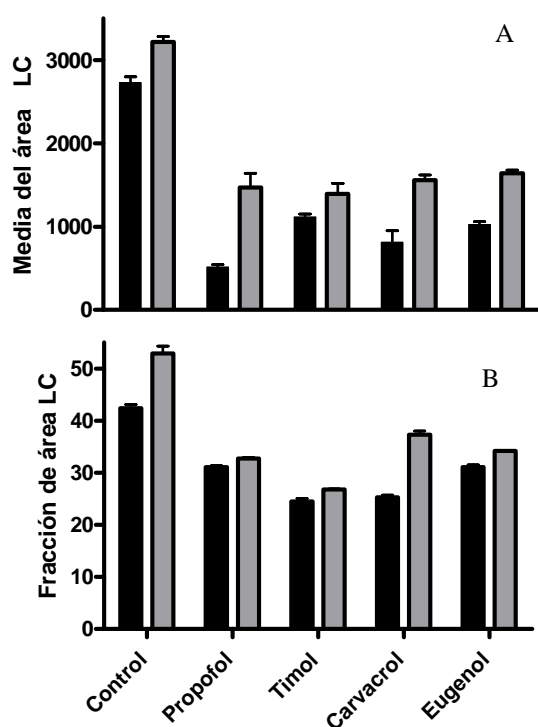


**Fig. II.5. Microscopía de epifluorescencia de monocapas de dpPC.** Las imágenes corresponden a isothermas de compresión de dpPC en presencia de DilC18 (rojo) a tres presiones diferentes para cada compuesto ensayado. Las imágenes que se muestran fueron tomadas a presiones correspondientes a la transición de fase LE-LC (coexistencia de fases).



**Fig. II.6. Microfotografías de epifluorescencia de monocapas de dpPC (campos).** Las microfotografías representan los campos típicos de imágenes tomadas en dos etapas de compresión sucesivas de la región de coexistencia de fases LE-LC, en ausencia (control) (A y B) o en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de timol (C y D). Los números en el cuadro se refieren a las relaciones de áreas moleculares (área molecular correspondiente a cada etapa dividida por el área molecular en el inicio de la coexistencia de fases LC-LE) e indican que son monocapas comparadas en etapas de compresión similares.

La Fig. II-7 muestra los resultados del análisis cuantitativo de diferentes campos de imágenes (ver Fig. II.6), tomadas dentro del rango de coexistencia de fases en presencia de los diferentes compuestos estudiados, y a dos estados de compresión sucesivos. Los resultados muestran que, tanto la fracción de superficie de la monocapa ocupada por dominios LC como el tamaño medio de estos dominios, aumentan a medida que avanza la compresión de la monocapa. Sin embargo, en presencia de cualquiera de los compuestos estudiados, ambos parámetros (fracción de área de dominios LC y tamaño promedio de dominios LC) fueron siempre menores a los observados para la muestra Control.



**Fig. II.7. Análisis cuantitativo de dominios LC de microfotografías de epifluorescencia.** Los valores corresponden al análisis de imágenes realizado en ausencia (control) y en presencia de cada compuesto (ver Fig II.6). (A) Media del área de dominios LC y (B) Fracción de área LC, en diferentes estados de compresión sucesivos en la región de coexistencia LE-LC. Cada valor corresponde a la media  $\pm$  sem de 3-4 campos diferentes tomados a áreas moleculares relativas similares (entre 0.630 y 0.830) correspondiente al primero (barras negras) y al segundo estado de compresión (barras grises).

#### 4.- Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN).

Previo a realizar las medidas de RMN, se realizaron los cálculos correspondientes de los coeficiente de partición para cada compuesto en el sistema liposomas de EPC:tampón como se describe en la sección Materiales y Métodos, para calcular la relación lípido:compuesto a utilizar. Los resultados obtenidos para los coeficientes de partición se muestran en la Tabla II.1, y siguen la misma tendencia que los coeficientes de partición calculados en sistemas similares ya mostrados en el Cap. I.

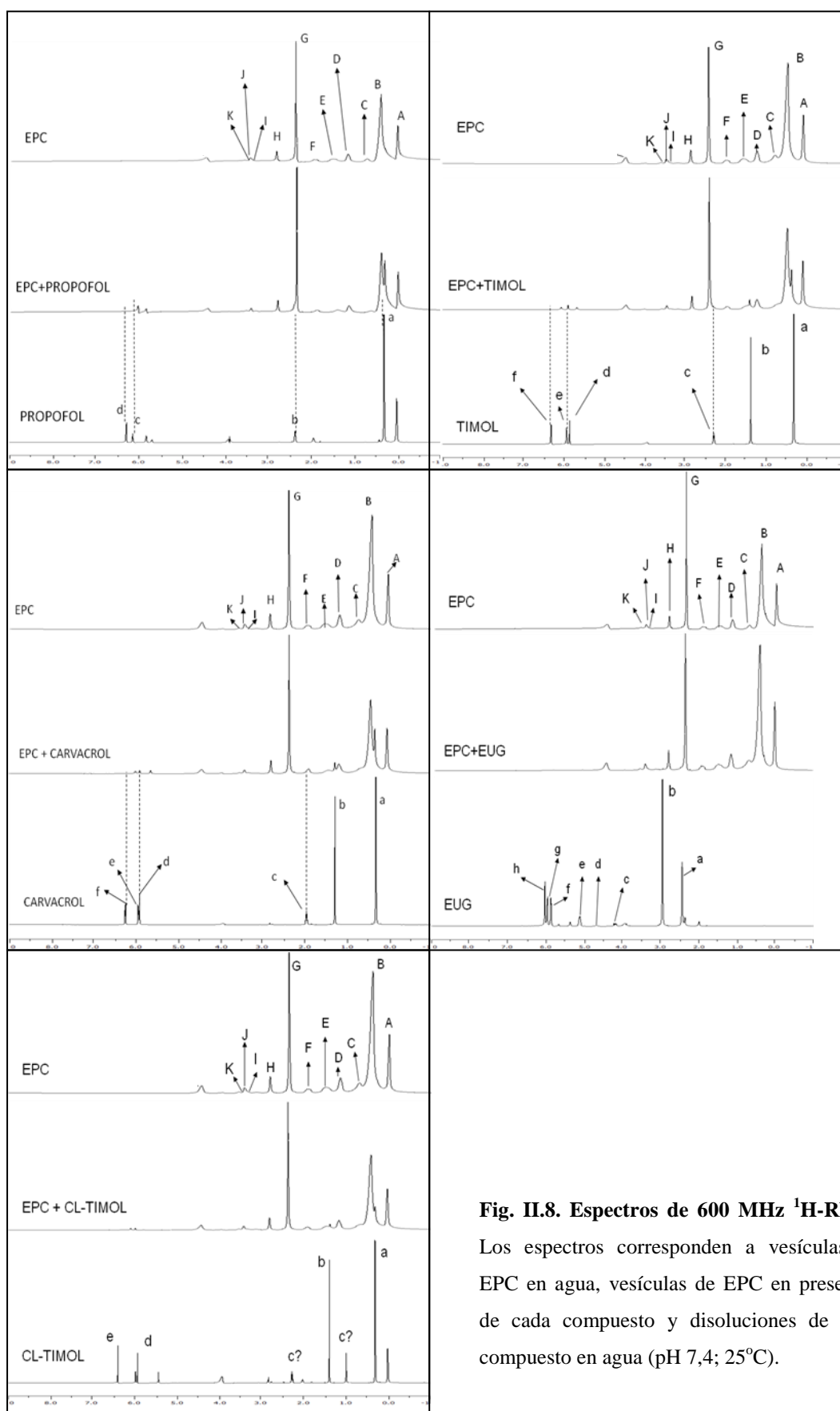
**Tabla II.1. Coeficientes de Partición EPC:Buffer.**

Compuesto	Propofol	Timol	Carvacrol	Eugenol	Clorotimol
Coef. Partición	1111	466	505	386	1314

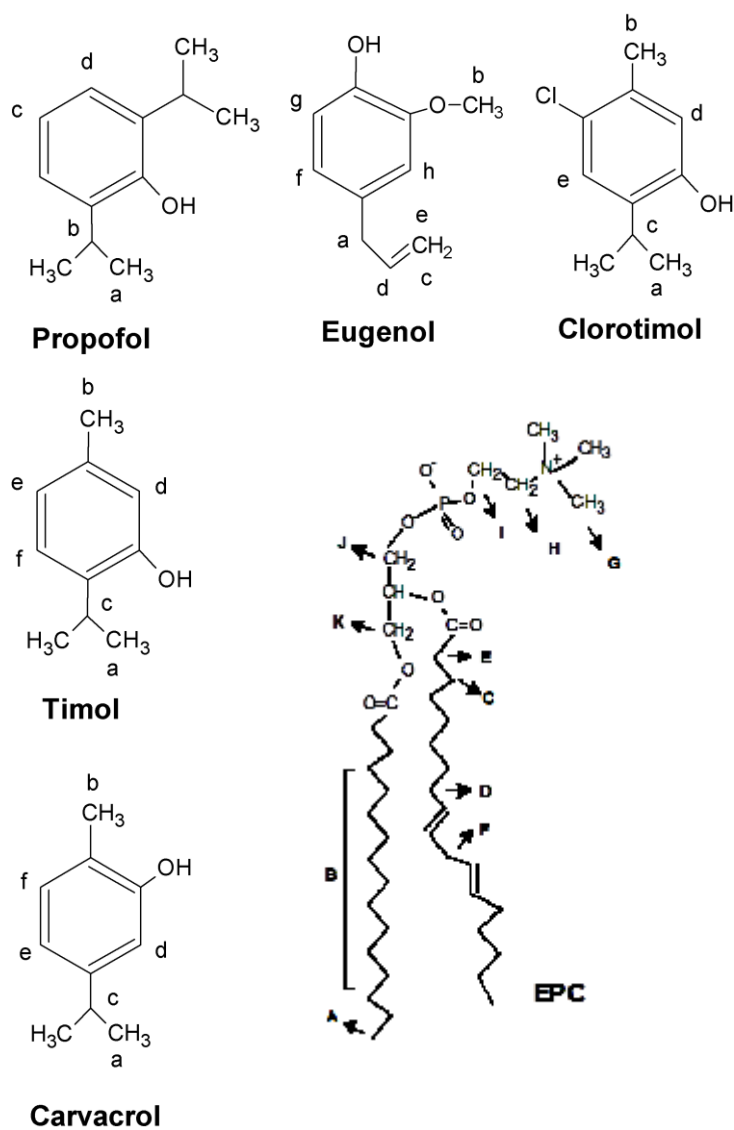
Los valores corresponden a los coeficientes de partición liposomas de EPC-tampón calculados como se indica en Materiales y Métodos. Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada compuesto.

Una vez definidos los coeficientes de partición en liposomas de EPC, fueron colectados los espectros  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz) de los compuestos puros, de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y de muestras conteniendo cada compuesto más EPC en una relación 3:1 (lipido:compuesto) (Fig. II.8).

A partir de los espectros obtenidos fueron realizadas las atribuciones de cada pico según el átomo de hidrógeno correspondiente, tanto para EPC (letras mayúsculas) como para cada compuesto (letras minúsculas) (Figura II.9.). Estas atribuciones fueron obtenidas y comparadas con las existentes en la bibliografía para EPC (Fraceto et al. 2002; Fraceto et al. 2005) y para los compuestos (Fujisawa et al. 1988; Locci et al. 2004).



**Fig. II.8.** Espectros de 600 MHz  $^1\text{H-RMN}$ . Los espectros corresponden a vesículas de EPC en agua, vesículas de EPC en presencia de cada compuesto y disoluciones de cada compuesto en agua (pH 7,4; 25°C).



**Fig. II.9.** Atribuciones de los hidrogenos asignadas a cada compuesto (letras minúsculas) y a la molécula de EPC (letras mayúsculas).

Teniendo los datos de los desplazamientos químicos (C.S.) correspondientes a los hidrógenos de los compuestos en agua o en EPC, fueron determinadas las variaciones en los mismos ( $\Delta$ C.S.), siendo realizado también este procedimiento para los hidrógenos de EPC (Tablas II.2 a II.6). Alteraciones en los desplazamientos químicos de los hidrógenos ( $\Delta$ C.S. $\neq$ 0) indicarían variaciones en el ambiente químico de los núcleos, considerándose como más significativas alteraciones mayores a 0.05 ppm (Fraceto et al. 2002). Todos los compuestos ensayados mostraron  $\Delta$ C.S. significativas en muchos de sus hidrógenos indicando que los mismos, cuando están en presencia de vesículas de EPC, se encuentran en un ambiente químico diferente, dejando en evidencia su interacción con estas vesículas. Particularmente, en presencia de timol, las alteraciones en la molécula de EPC fueron observadas en los hidrogenos H, E y C. En presencia de propofol, fue observada una alteración significativa en el hidrógeno E y en una menor medida en los hidrógenos I y K. En presencia carvacrol y clortimol, fueron observadas alteraciones importantes en los hidrógenos E y C. El análisis de la molécula de EPC en presencia de eugenol indica que solo los hidrógenos del grupo  $O_3PO-CH_2$  (colina) (I) presentaron alteraciones mayores a 0.05 ppm.

**Tabla II.2. Desplazamientos químicos (C.S.) de los espectros  $^1H$ -RMN de propofol, EPC y propofol-EPC.**

Pico	Atribución	Desplazamiento Químico (ppm)			$\Delta$ C.S. (ppm)
		propofol/D <sub>2</sub> O	EPC	prop-EPC	
A	$\omega-CH_3$		0,000	-0,0078	-0,0078
<b>a</b>	<b><math>-(CH_3)_4</math></b>	<b>0,309</b>		*	*
B	$(CH_2)_n$		0,3864	0,3818	-0,0046
C	$\beta-CH_2$		0,7074	0,703	-0,0044
D	$CH_2C=C$		1,1575	1,1418	-0,0157
E	$\alpha-CH_2$		1,503	1,4109	-0,0921
F	$=C-CH_2-C=$		1,9	1,8793	-0,0207
G	$N^+(CH_3)_3$		2,37	2,3495	-0,0205
<b>b</b>	<b><math>((CH_3)_2-CH)_2</math></b>	<b>2,38</b>		*	*
H	$CH_2-N^+$		2,8151	2,7919	-0,0232
I	$O_3PO-CH_2$ (colina)		3,3441	3,3037	-0,0404
J	$O_3PO-CH_2$ (glicerol)		3,426	3,413	-0,0131
K	$CH_2-OCO$		3,5611	3,5253	-0,0358
<b>c</b>	<b><math>=CH-</math></b>	<b>6,155</b>		5,8462	<b>-0,309</b>
<b>d</b>	<b><math>-CH=</math></b>	<b>6,31</b>		6,0351	<b>-0,275</b>

\* no determinado

Tabla II.3. Desplazamientos químicos (C.S.) de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de timol, EPC y timol-EPC.

Pico	Atribución	Desplazamiento Químico (ppm)			$\Delta$ C.S. (ppm)
		timol/D <sub>2</sub> O	EPC	tim-EPC	
A	$\omega$ -CH <sub>3</sub>		0	-0,0077	-0,0077
<b>a</b>	<b>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>0,291</b>		<b>0,270</b>	<b>-0,021</b>
B	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>		0,3852	0,3777	-0,0075
C	$\beta$ -CH <sub>2</sub>		0,704	0,589	-0,115
D	CH <sub>2</sub> C=C		1,1545	1,1359	-0,0186
<b>b</b>	<b>-CH<sub>3</sub> (5')</b>	<b>1,360</b>		<b>1,313</b>	<b>-0,047</b>
E	$\alpha$ -CH <sub>2</sub>		1,5008	1,32	-0,1808
F	=C-CH <sub>2</sub> -C=		1,8948	1,8694	-0,0254
<b>c</b>	<b>CH-(2')</b>	<b>2,276</b>		*	*
G	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		2,3673	2,3253	-0,042
H	CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup>		2,8071	2,7565	-0,0506
I	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> (colina)		3,1343	3,1019	-0,0324
J	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> (glicerol)		3,4200	3,384	-0,0364
K	CH <sub>2</sub> -OCO		3,5492	3,5055	-0,0437
<b>d</b>	<b>=CH-(6)</b>	<b>5,868</b>		<b>5,619</b>	<b>-0,249</b>
<b>e</b>	<b>=C-CH<sub>2</sub>=C(4)</b>	<b>5,941</b>		<b>5,837</b>	<b>-0,104</b>
<b>f</b>	<b>-C=CH<sub>2</sub>-C=(3)</b>	<b>6,329</b>		<b>6,011</b>	<b>-0,318</b>



**Tabla II.4. Desplazamientos químicos (C.S.) de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de carvacrol, EPC y carvacrol-EPC.**

Pico	Atribución	Desplazamiento químico (ppm)			$\Delta$ C.S. (ppm)
		carvacrol/D <sub>2</sub> O	EPC	carv-EPC	
A	$\omega$ -CH <sub>3</sub>		0	0,0019	0,0019
<b>a</b>	<b>(-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>0,305</b>		<b>0,292</b>	<b>-0,013</b>
B	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>		0,3845	0,3901	0,0056
C	$\beta$ -CH <sub>2</sub>		0,701	0,6	-0,101
D	CH <sub>2</sub> C=C		1,153	1,147	-0,006
<b>b</b>	<b>-CH<sub>3</sub></b>	<b>1,282</b>		<b>1,242</b>	<b>-0,04</b>
E	$\alpha$ -CH <sub>2</sub>		1,5009	1,4048	-0,0961
F	=C-CH <sub>2</sub> -C=		1,895	1,866	-0,029
<b>c</b>	<b>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-</b>	<b>1,956</b>		<b>1,867</b>	<b>-0,089</b>
G	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		2,3658	2,33	-0,0358
H	CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup>		2,8092	2,7633	-0,0459
I	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> (colina)		3,1292	3,1076	-0,0216
J	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> (glicerol)		3,418	3,3926	-0,0254
K	CH <sub>2</sub> -OCO		3,5481	3,509	-0,0391
<b>d</b>	<b>-CH=C-OH (2)</b>	<b>5,928</b>		<b>5,624</b>	<b>-0,304</b>
<b>e</b>	<b>=CH- (4)</b>	<b>5,957</b>		<b>5,884</b>	<b>-0,073</b>
<b>f</b>	<b>-CH= (5)</b>	<b>6,264</b>		<b>5,985</b>	<b>-0,280</b>

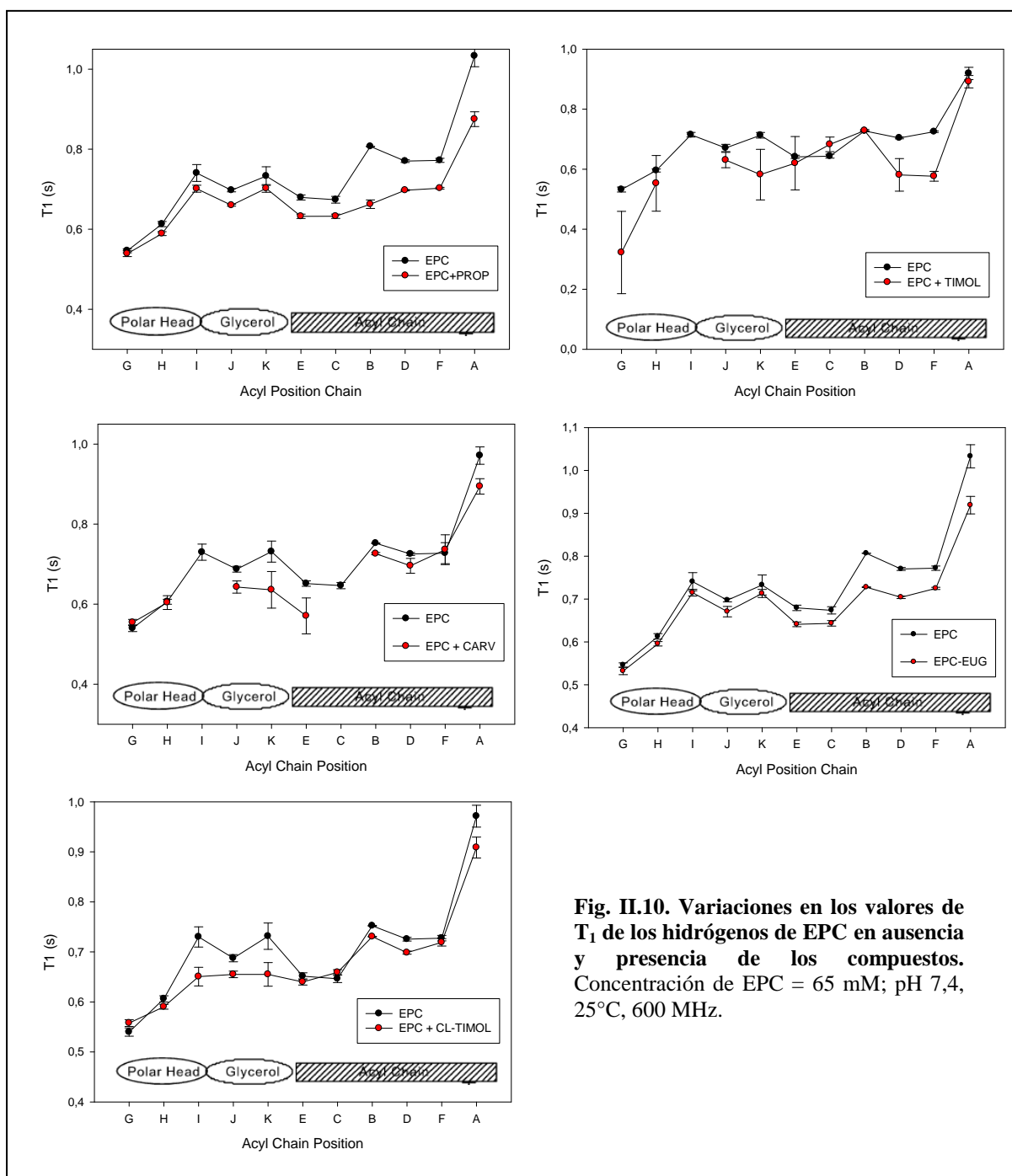
Tabla II.5. Desplazamientos químicos en el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de eugenol, EPC y eugenol-EPC.

Pico	Atribución	Desplazamiento químico (ppm)			$\Delta\text{C.S.}$ (ppm)
		eugenol/D <sub>2</sub> O	EPC	eug-EPC	
A	$\omega\text{-CH}_3$		0,000	0,001	0,001
B	$(\text{CH}_2)_n$		0,395	0,385	-0,01
C	$\beta\text{-CH}_2$		0,679	0,703	0,024
D	$\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$		1,145	1,157	0,012
E	$\alpha\text{-CH}_2$		1,462	1,486	0,024
F	$=\text{C-CH}_2\text{-C}=\text{C}$		1,894	1,906	0,012
G	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$		2,359	2,371	0,012
<b>a</b>	<b><math>-\text{CH}_2\text{-(7)}</math></b>	<b>2,432</b>		<b>2,461</b>	<b>0,029</b>
H	$\text{CH}_2\text{-N}^+$		2,795	2,814	0,019
<b>b</b>	<b><math>\text{CH}_3\text{-O-}</math></b>	<b>2,940</b>		<b>2,938</b>	<b>-0,002</b>
I	$\text{O}_3\text{PO-CH}_2$ (colina)		3,332	3,387	0,055
J	$\text{O}_3\text{PO-CH}_2$ (glicerol)		3,400	3,424	0,024
K	$\text{CH}_2\text{-OCO}$		3,533	3,556	0,023
<b>c</b>	<b><math>=\text{CH}_2\text{(9)}</math></b>	<b>4,172</b>		<b>4,139</b>	<b>-0,033</b>
<b>d</b>	<b><math>=\text{CH-(8)}</math></b>	<b>4,673</b>		*	*
<b>e</b>	<b><math>=\text{CH}_2\text{(9')}</math></b>	<b>5,112</b>		<b>5,050</b>	<b>-0,062</b>
<b>f</b>	<b><math>=\text{CH-(5)}</math></b>	<b>5,864</b>		<b>5,702</b>	<b>-0,162</b>
<b>g</b>	<b><math>-\text{CH}=\text{C-OH(6)}</math></b>	<b>5,963</b>		<b>5,809</b>	<b>-0,154</b>
<b>h</b>	<b><math>-\text{CH}=\text{C-O (3)}</math></b>	<b>6,026</b>		<b>5,943</b>	<b>-0,083</b>

**Tabla II.6. Desplazamientos químicos (C.S.) de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de clorotimol, EPC and clorotimol-EPC.**

Pico	Atribución	Desplazamiento químico (ppm)			$\Delta$ C.S. (ppm)
		clorotimol/D <sub>2</sub> O	EPC	clor-EPC	
A	$\omega$ -CH <sub>3</sub>		0	0,0051	0,0051
<b>a</b>	<b>(-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>0,292</b>		*	*
B	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>		0,3845	0,3909	0,0064
C	$\beta$ -CH <sub>2</sub>		0,701	0,6284	-0,0726
D	CH <sub>2</sub> C=C		1,153	1,152	-0,001
<b>b</b>	<b>CH<sub>3</sub>-</b>	<b>1,382</b>		<b>1,359</b>	<b>-0,023</b>
E	$\alpha$ -CH <sub>2</sub>		1,5009	1,4431	-0,0578
F	=C-CH <sub>2</sub> -C=		1,895	1,883	-0,012
<b>c</b>	<b>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>2,267</b>		*	*
G	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		2,3658	2,3618	-0,004
H	CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup>		2,8092	2,8021	-0,0071
I	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> (colina)		3,1292	3,1228	-0,0064
J	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> (glicerol)		3,418	3,4143	-0,0037
K	CH <sub>2</sub> -OCO		3,5481	3,5317	-0,0164
<b>d</b>	<b>-CH=C-OH</b>	<b>5,944</b>		<b>5,779</b>	<b>-0,165</b>
<b>e</b>	<b>=CH-C-Cl</b>	<b>6,412</b>		<b>6,091</b>	<b>-0,321</b>
<b>f</b>	<b>(-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>0,292</b>		*	*

También fueron determinados los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) como medida de la interacción de los compuestos con las vesículas de EPC, de acuerdo a lo descrito en la literatura (Fraceto et al. 2002; Fraceto et al. 2005), donde a partir de las mismas es posible determinar el grado de movilidad de un compuesto al interaccionar con los componentes de la membrana y viceversa. Los resultados muestran que cuando los compuestos estuvieron en presencia de vesículas de EPC, muchos de los hidrógenos (tanto de los compuestos como de la molécula de EPC), sufrieron una disminución de sus  $T_1$  lo que indicaría una importante interacción compuesto/EPC (Fig. II.10 y Apéndice 3). Un análisis detallado de los hidrógenos y de las zonas de la membrana afectadas se muestra en la Discusión del presente Capítulo.



**Fig. II.10. Variaciones en los valores de  $T_1$  de los hidrógenos de EPC en ausencia y presencia de los compuestos. Concentración de EPC = 65 mM; pH 7,4, 25°C, 600 MHz.**

## DISCUSIÓN

Los resultados previos presentados en el Cap. I ( $\log P_{o/w}$ , tiempos de retención en HPLC y coeficientes de partición en liposomas) demostraron la alta capacidad de todos los compuestos ensayados para interactuar con fases membranosas, lo cual podría sugerir la posible participación de alguna modificación en medio ambiente lipídico donde está inserto el R-GABA<sub>A</sub>, como parte de la modulación del receptor ejercida por este tipo de compuestos (García et al. 2006).

La interacción entre compuestos activos de superficie y los fosfolípidos se ha estudiado extensamente en varios sistemas modelo de membranas como liposomas o filmes de Langmuir (Dynałowicz-Latka et al. 2001; Peetla et al. 2009). En esta etapa del trabajo de Tesis, en principio, se analizó comparativamente el efecto de los compuestos fenólicos sobre las propiedades de la membrana mediante el uso de monocapas de dpPC en la interfase agua-aire (filmes de Langmuir). Esta técnica constituye un modelo de membrana informativo y práctico, ya que permite un control sutil del empaquetamiento molecular de la membrana. Los resultados aquí presentados fueron abordados por medio de tres tipos de experimentos realizados con filmes de Langmuir:

- i*- Isotermas de compresión  $\pi$ -A.
- ii*- Capacidad de penetración en la monocapa.
- iii*- Microscopía de epifluorescencia de la monocapa.

Por otra parte, a fin de profundizar el estudio de la interacción de los compuestos fenólicos con membranas fosfolipídicas utilizando liposomas como modelo de membrana, se realizaron ensayos de Resonancia Magnética Nuclear de protones ( $H^1$ -RMN) determinando los siguientes parámetros:

- i*- Desplazamiento químico (C.S) y diferencias de desplazamiento químico ( $\Delta$ C.S.), como indicadores de variaciones en el ambiente químico de los H de los compuestos y del fosfolípido que forma el liposoma (EPC).
- ii*- Tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ), como medida de la interacción entre los compuestos y los liposomas de EPC.

Las áreas moleculares mínimas (A correspondientes a  $\pi_c$ ), observadas en las isotermas  $\pi$ -A realizadas en presencia de los fenoles, fueron similares a la

correspondiente a la isoterma control. La presión de colapso de la isoterma control ( $\pi_C$ ) casi no se ve afectada a 100  $\mu\text{M}$  de compuesto. Sin embargo, considerando la disminución de la  $\pi_C$  a 500  $\mu\text{M}$ , se puede concluir que la monocapa fue desestabilizada por todos los fenoles a altas concentraciones, siendo este efecto más significativo para los compuestos más lipofílicos (propofol y clorotimol).

El hecho que ningún compuesto fuera capaz de incrementar su concentración en la monocapa, mediante la incorporación de nuevas moléculas desde la subfase durante la compresión, significa que la cantidad de compuesto que se incorpora a áreas moleculares máximas satura la monocapa, y luego la compresión no permite la inclusión de nuevas moléculas de compuesto. Asimismo, la observación de que las áreas moleculares mínimas no fueran significativamente afectadas (Fig. II.2A–E) sugiere fuertemente que son moléculas de los compuestos fenólicos y no de dpPC las que son expulsadas de la monocapa a medida que transcurre la compresión. Así, en todas las condiciones de empaquetamiento molecular de dpPC, los compuestos estudiados alcanzaron concentraciones interfaciales de saturación que estarían en equilibrio con sus concentraciones en la subfase.

La tendencia decreciente de la  $V_{\text{MAX}}$  observada a medida que aumenta la  $\pi_i$  en experimentos conducidos a evaluar la capacidad de penetración de los compuestos, indica que la velocidad de entrada de estos compuestos en la monocapa se vio favorecida por estructuras menos empaquetadas de la membrana. Es necesario notar que la  $V_{\text{MAX}}$  también podría interpretarse como una tasa de deformación máxima de la monocapa. Esto podría estar asociado con una disminución de la viscosidad de la monocapa con la incorporación de los compuestos, lo que facilitaría su incorporación adicional. Este comportamiento podría considerarse como una retroalimentación positiva que operaría principalmente en el comienzo de la incorporación de las drogas y que se vería compensado por una tendencia a la disminución de las fuerzas cohesivas que perjudicaban la retención de los compuestos en la monocapa. La combinación de estos dos fenómenos se convertiría en óptima en un momento dado, lo que llevaría a una  $V_{\text{MAX}}$ . La magnitud de los cambios de  $\pi$  ( $\Delta\pi$ ) inducidos por la penetración de los compuestos en la monocapa disminuyó a medida que la membrana mostró un estado más empaquetado. Puesto que estos valores ( $\Delta\pi$ ) analizados en función de la concentración de los compuestos no pudieron ser ajustados en una función lineal simple, la máxima  $\pi$  a la cual puede penetrar la droga ( $\pi$  cut-off) (García y Perillo 2002) no se pudo determinar. Sin embargo, todos los fenoles fueron capaces de ser incorporados en la monocapa a presiones superiores a 35 mN/m (presión estimada en el interior de la bicapa de una membrana biológica).

Ha sido ampliamente descripto que el tamaño y la forma de dominios de coexistencia de fase de las monocapas de fosfolípidos son controlados por la competencia de las interacciones moleculares entre la energía de la tensión de línea entre los dominios (fase LC) y el fluido circundante (fase LE), y la repulsión electrostática entre el exceso de momentos dipolares en la fase condensada (Kruger y Losche 2000). Asimismo, puesto que estos lípidos son quirales, la estructura mesoscópica se ve también influenciada por la isomería óptica de las moléculas constituyentes (Kruger y Losche 2000; Mohammadi et al. 2001).

La quiralidad de los compuestos enantioméricos dentro de los dominios compactos puede ser evidente en las curvaturas con sentido horario o antihorario de esos dominios. Los estudios de microscopía de epifluorescencia de *triskelions* de dpPC han establecido que el sentido de los brazos de los dominios altamente ordenados está directamente relacionado con la configuración absoluta del enantiómero. Por lo tanto, la quiralidad mesoscópica es disparada por la presente quiralidad microscópica a nivel molecular (Nandi y Vollhardt 2003). Para los fosfolípidos, el impacto de la quiralidad en el nivel microscópico y mesoscópico se determina por el tamaño de grupo de la cabeza polar en relación a la sección transversal de las cadenas alifáticas. El ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina (fosfolípidos que se caracterizan por pequeños tamaños de grupo de cabeza polar) conforman dominios circulares (Yau et al. 1998; Kruger y Losche 2000; Perillo y García 2001; Fraceto et al. 2005), mientras que dpPC con su grupo de cabeza polar más grande, muestra una estructura quiral en la forma de dominio mesoscópico. La eliminación de formas quirales en los dominios LC inducidos por la presencia de cada uno de los compuestos ensayados indicaría su presencia entre las moléculas de fosfolípidos, probablemente en la región del grupo polar, cambiando la orientación molecular dentro del dominio. Teniendo en cuenta el análisis de las microfotografías, todos los compuestos indujeron dominios LC de menor tamaño respecto al control, con un efecto más marcado para el propofol. A pesar de que el número de dominios se incrementó en presencia de los fenoles, la fracción de área LC disminuyó como consecuencia del menor tamaño de los dominios. Este comportamiento podría estar de acuerdo con el hecho de que, durante la compresión, la fase condensada no sólo forma dominios moleculares más pequeños sino que además presenta valores más bajos de compresibilidad indicando una fase líquido-condensada más elástica en las monocapas de dpPC en la presencia de los fenoles, como ha sido explicado anteriormente.

El rol de las interacciones electrostáticas, principalmente en forma de interacción dipolar, es sujeto de intensos estudios. Se sabe que los pequeños cambios en la distribución de las cargas del grupo polar (cabeza) de los fosfolípidos pueden conducir a variaciones importantes en la forma de los dominios. Este tipo de estudios confirma la contribución decisiva en el plano (normal a la interfase) y fuera de plano (perpendicular a la interfase) de los momentos dipolares sobre la forma de dominio (Nandi y Vollhardt 2003; Thirumorthy et al. 2007). El momento dipolar en el plano de dpPC es relativamente alto con respecto a otros fosfolípidos con pequeñas cabezas polares (por ejemplo dpPE) debido principalmente a su inclinación molecular mayor en los dominios LC (Thirumorthy et al. 2007). Esta repulsión dipolar más grande es la fuerza principal que permite que los dominios de dpPC desarrollen brazos alargados (*triskelion*). Sin embargo, la presencia de fenoles entre las moléculas de dpPC reduciría esta repulsión dipolar en la dirección de inclinación lo cual permitiría el crecimiento del dominio en direcciones diferentes, donde la repulsión dipolar no puede prevalecer sobre la tensión de línea. Así, se esperaría que la interacción de todos los fenoles ensayados con monocapas de dpPC se pueda explicar como una interdigitación de los fenoles entre las moléculas de dpPC disminuyendo la repulsión molecular entre ellas. Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados descritos por Kane y Floyd (Kane y Floyd 2000) donde la incorporación de un anestésico local dentro de la monocapa dpPC disminuyó el promedio de momento dipolar eléctrico debido a la inclusión de partículas eléctricamente neutras entre las moléculas de dpPC. Finalmente, es interesante observar que las formas típicas de los dominios correspondientes a los controles (*triskelion*) se pierden totalmente en presencia de los fenoles, aún a bajas  $\pi$ . Esto sugiere que las moléculas fenólicas se localizarían distribuidas uniformemente sobre toda la monocapa en lugar de acumularse en regiones específicas.

En literatura de RMN se describe que grupos aromáticos o electronegativos pueden alterar el desplazamiento químico de lípidos debido a efectos de corriente del anillo (Yau et al. 1998; Fraceto et al. 2005). Alteraciones de desplazamiento químico hacia valores de menor frecuencia indican que algún grupo está ocasionando el blindaje de los espines de esos núcleos, lo cual puede deberse a efectos de corriente del anillo, pudiendo indicar una proximidad del anillo aromático de estos grupos hacia esta región, lo que podría interpretarse como una posible localización del compuesto en esa zona (Fraceto et al. 2005).

Existen referencias en las cuales se asocia la localización preferencial de los compuestos anfífilos con vesículas uni (Fraceto et al. 2002; Fraceto et al. 2005) o



multilamelares (de Paula et al. 2008). En el presente estudio se determinaron los valores de  $T_1$  de los hidrogenos de los compuestos y de los lípidos (en ausencia y presencia de compuesto). Los valores de  $T_1$  están presentados en las Tablas del Apéndice 3.

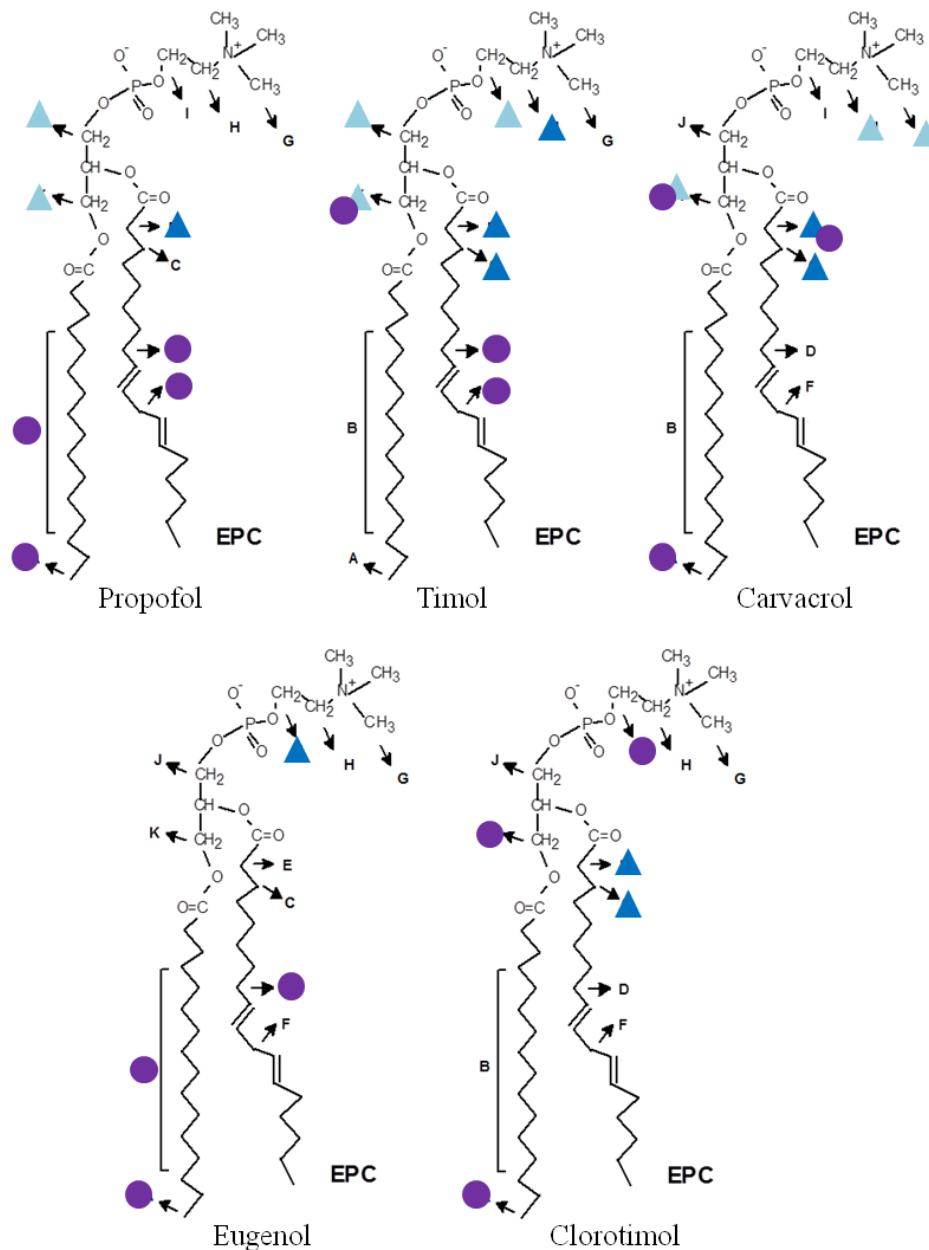
A partir del análisis de los valores de  $T_1$  de los hidrógenos de los compuestos se observa que, cuando se encuentran insertos en las vesículas unilamelares de EPC, los valores de  $T_1$  disminuyen indicando que la partición de estos compuestos provoca una inmovilización en los grados de libertad de la molécula de fosfolípido generando un ambiente más anisotrópico.

Los valores de  $T_1$  correspondientes a los hidrógenos de EPC, en presencia y ausencia de las drogas, se presentan en la Figura II.10. Específicamente para eugenol, se observa que los  $T_1$  de los hidrogenos de las moléculas de EPC muestran una disminución importante en los valores de los hidrogenos A, B y D del fosfolípido, indicando que la inserción de las moléculas de eugenol provocó un mayor grado de inmovilización de estos hidrógenos, posiblemente por algún aumento en el orden de este sistema. En presencia de clorotimol, se observa que la inserción de esta molécula indujo que los valores de  $T_1$  tuvieran una disminución más pronunciada en una región específica (hidrógenos I, K y A) indicando que posiblemente su grupo aromático voluminoso se inserte en esta región de la bicapa lipídica (I y K) provocando, desde esta ubicación, los cambios observados en los deslizamientos químicos ( $\Delta C.S.$ ) los cuales puedan deberse a efectos de corriente del anillo causando una alteración en el ambiente químico de los hidrógenos un poco más abajo del glicerol (hidrógenos E y C). Resultados semejantes se muestran en la literatura para anestésicos locales (Fraceto et al. 2002). Propofol indujo la reducción de los valores de  $T_1$  principalmente en la zona de las cadenas hidrocarbonadas (hidrógenos D, F, B y A) mostrando alteraciones en  $C.S.$  a nivel del glicerol y principalmente al comienzo de la cadena acilada. En cuanto a los efectos causados por timol, puede observarse que las principales alteraciones (disminución de  $T_1$ ) fueron observadas en los hidrógenos de la región del glicerol (K), extendiéndose hasta los carbonos de la cadena acilada (D y F). Sin embargo, hubo una alteración en el ambiente ( $\Delta C.S.$ ) de los hidrógenos C, E y H, pudiendo indicar una posible localización de este compuesto en esta región. En presencia de carvacrol, se puede observar que algunos valores de  $T_1$  de los hidrógenos del lípido presentaron sus valores disminuidos en regiones del glicerol (K) y a diferentes profundidades de las cadenas aciladas (E y A), mostrando alteraciones en el ambiente químico de los hidrógenos C y E indicando su posible localización en esta zona.

Algunas conclusiones parciales indicarían que el análisis de los datos mostró que los hidrógenos de los compuestos, en general, presentan variaciones significativas en los valores de C.S. cuando están en presencia de vesículas fosfolípicas, demostrando que interactúan con las mismas. A partir de los valores de  $T_1$  es posible determinar el grado de movilidad de las distintas partes del compuesto cuando interaccionan con los componentes de la membrana y viceversa. Los resultados mostraron una disminución en los  $T_1$  de la mayoría de los hidrógenos de los compuestos fenólicos lo que revela su interacción con la bicapa lipídica.

En cuanto a la ubicación de los compuestos, si tenemos en cuenta que el efecto de corto alcance de corriente del anillo, capaz de modificar los C.S., nos estaría dando información precisa de la localización de los mismos, podemos pensar que todos los fenoles se ubicarían entre el glicerol y la molécula de colina (alcanzando incluso los primeros átomos de las cadenas hidrocarbonadas), ocupando clorotimol y propofol posiciones más profundas en esta misma región. Del mismo modo, los cambios encontrados en  $T_1$  para EPC nos indicarían que existen variaciones en la dinámica molecular de la membrana (menos movilidad) en presencia de estos compuestos, principalmente en la zona de las cadenas hidrocarbonadas y glicerol (ver hipótesis representada en la Fig II.11).

En síntesis, los resultados descriptos indican que todos los compuestos se insertan en las vesículas fosfolípicas de EPC, ubicándose preferentemente en la zona comprendida entre la cabeza polar (colina), el glicerol y los primeros átomos de las cadenas aciladas, ocupando los compuestos más lipofílicos (propofol y clorotimol) posiciones más profundas en esta región. Esta localización de los fenoles induciría la reducción de la repulsión entre cabezas polares permitiendo un mayor acercamiento intermolecular y disminuyendo finalmente el grado de movilidad de las cadenas hidrocarbonadas. Este resultado concuerda con lo descripto más arriba utilizando capas monomoleculares fosfolípicas y epifluorescencia.



**Fig. II.11. Hipótesis de interacción de los compuestos fenólicos con vesículas de EPC.** Mediante el uso de  $^1\text{H}$ -RMN se detectaron cambios en el desplazamiento químico ( $\Delta\text{C.S.}$ ) (triángulos oscuros:  $>0,5$  ppm; triángulos claros:  $0,3-0,5$  ppm) y en los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) (círculos:  $>0,6\text{s}$ ) de los hidrógenos de EPC en presencia de los compuestos fenólicos. El efecto de corto alcance causado por el anillo aromático de los compuestos en el C.S. de EPC nos daría información directa acerca de su ubicación preferente en el interior de la membrana. De la misma manera, luego de la adición de los compuestos, cambios en  $T_1$  de los hidrógenos del lípido nos daría a conocer detalles sobre la dinámica de la bicapa en presencia de estas moléculas, como se informó previamente (Yau et al. 1998; Fraceto et al. 2005).

## ***CAPÍTULO 3***

---

## ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y ENSAYOS DE TOXICIDAD

### Determinación de los efectos de los compuestos fenólicos sobre la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam al receptor GABA<sub>A</sub> y ensayos de citotoxicidad

#### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **1. Reactivos.**

Lo referido acerca de los compuestos fenólicos utilizados y de sus diluciones de trabajo fue detallado en los Capítulos I y II. En el presente capítulo no se utilizó propofol ni timol ya que han sido ampliamente estudiados en lo que respecta a su farmacología sobre el R-GABA<sub>A</sub> y a su toxicidad. El suero fetal bovino utilizado fue de PAA (Cód. A-15101) (Linz, Austria). El medio de cultivo DMEM (medio Dulbecco modificado), la tripsina, el inhibidor de tripsina (de soja), la DNAsa, el ácido p-aminobenzoico, la glutamina, la albúmina bovina, la citosina-arabinofuranósido, la penicilina, la insulina, la poli-L-lisina y el MTT (1 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -3,5-difenilformazam) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). El [<sup>3</sup>H]- flunitrazepam (NET-567) (88 Ci/mmol) fue adquirido en New England Nuclear (Boston, MA, EE.UU.). El resto de las drogas y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua utilizada fue bidestilada en todos los casos.

##### **2. Cultivos celulares.**

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon a partir de las cortezas cerebrales de fetos de ratas Wistar de 17-18 días de gestación, como ha sido descrito previamente [18]. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los fetos fueron extraídos con ayuda de pinzas por corte en región abdominal y depositados en cápsulas de vidrio colocadas sobre hielo para conservar los mismos.

Luego de separar los embriones se disecaron las cortezas cerebrales de cada embrión las cuales fueron cortadas en finos trozos con un bisturí sobre una bandeja de teflón estéril. Posteriormente se recogió el material y se homogeneizó suavemente con pipeta pasteur de vidrio (por succión y expulsión, 10 veces aproximadamente). A continuación, las células fueron disociadas por tripsinización leve (Tripsina 0,02% p/v) a 37 ° C durante 10 minutos seguido por trituración en una solución conteniendo DNAsa 0,004% p/v e inhibidor de tripsina 0,05% p/v. Las células se resuspendieron en medio DMEM (adicionado con 5 mM de KCl, 31 mM de glucosa y 0,2 mM de glutamina) suplementado con insulina, penicilina y 10% de suero fetal bovino. La células en suspensión se sembraron, a una densidad de  $1,6 \times 10^6$  células/ml, en placas multipocillo 24X o 96X pre-tratadas con poli-L-lisina, y se incubaron durante 6-7 días en un incubador con atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. A las 36-48 hs de realizado el cultivo se añadió citosina arabinofuranósido (concentración final 20 µM) para prevenir la proliferación glial.

Durante todo el proceso se mantuvieron estrictas medidas de esterilidad. El vidrio fue lavado aisladamente y esterilizado en un autoclave húmedo (134°C, 15 min.). El material quirúrgico se esterilizó con calor seco en una estufa a 160°C durante 1 hr. Todas las soluciones, siempre que no contuvieran elementos termosensibles, fueron autoclavadas. Los medios, polilisina y demás aditivos fueron esterilizados mediante filtración (filtros estériles comerciales con tamaño de poro de 0,22 µM). El agua utilizada para preparar las soluciones tamponadas o reconstituir los medios de cultivo en polvo fue agua bidestilada de alta calidad. Todo el material de plástico utilizado incluyendo placas de cultivo, tubos con tapa, material volumétrico y frascos, fue estéril y descartable. Las puntas de pipetas, las pipetas Pasteur de vidrio, y otros materiales de plástico reutilizables fueron autoclavados. Por último todas las manipulaciones fueron realizadas en el interior de una campana de flujo vertical equipada con un filtro HEPA.

### **3. Unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam.**

Estos estudios se llevaron a cabo principalmente durante una pasantía en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC, Barcelona, España).

La unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam fue determinada en neuronas en cultivo in vitro de 6-7 días de incubación, momento en el cual las células expresan el receptor GABA<sub>A</sub> funcional, tal como fue descrito previamente [6]. Antes de la incubación con el

radioligando, y luego de confirmar el buen estado de las células, se lavaron tres veces las placas (24X) con 0,5 ml/pocillo de tampón HEPES (136 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 1,2 mM de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 1,4 mM, 1,0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HEPES 10 mM, y glucosa 9 mM, ajustado a pH 7,3) termostatzado a 37°C. El ensayo de unión se llevó a cabo en cada pocillo de cultivo en presencia de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (concentración final 2,5-4 nM) y del compuesto a evaluar o su vehículo solamente en caso del control o basal, conteniendo siempre tampón HEPES. Para determinar la unión inespecífica se añadió además a algunos pocillos 20 µM de diazepam. También se destinaron en cada ensayo algunos pocillos para realizar un control positivo en presencia de 100 µM de GABA. Una vez agregado el [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam se incubaron las placas durante 30 minutos a 25°C. Luego se retiró la solución de cada pozo por succión con bomba de vacío y se lavó tres veces con 200 µl/pocillo de solución tampón HEPES fría, siempre descartando rápidamente por succión. Finalmente, las células se desagregaron en NaOH 0,2 M durante una noche, y se determinó la radiactividad por agregado de líquido de centelleo Optifase Hisafe2 (Perkin-Elmer, Salem, MA, EE.UU.). En algunos experimentos se utilizó bicuculina (100 µM) como un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>. Los datos se expresaron como el porcentaje de unión específica respecto a la unión basal.

#### **4. Determinación de la viabilidad celular (ensayo de MTT).**

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico basado en la incubación de las células con MTT, el cual es captado por las mismas mediante endocitosis y reducido por las mitocondrias de las células vitales a una sal de formazán insoluble que es acumulada en los lisosomas. El ensayo de MTT es utilizado ampliamente como indicador de viabilidad celular (Gerlier y Thomasset 1986).

La determinación de la viabilidad neuronal mediante el ensayo de MTT se realizó según el protocolo descrito por García et al. (García et al. 2006). A los 6-7 días *in vitro* las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de cada compuesto durante 30 min. o 24 horas. Los compuestos se añadieron después de su solubilización en 0,2 ml de medio de cultivo previamente extraído de cada pocillo para asegurar su homogeneización. Una vez finalizado el tiempo de exposición a cada compuesto, los cultivos se lavaron y se incubaron a 37°C durante 15 min. con una solución de MTT (250 µg/ml) disuelto en tampón HEPES termostatzada a 37°C. Luego de descartar y lavar el exceso de MTT, se agregaron 200 µl de SDS 5% p/v

para desagregar las membranas celulares y liberar el MTT reducido (formazan) durante toda una noche para medir entonces su absorbancia a 560 nm en un lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia). Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia respecto al control (células no expuestas a ningún compuesto).

## 5. Ensayo de hemólisis.

Se siguió principalmente la técnica descrita por Malheiros (Malheiros et al. 1998). Estos ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biomembranas, Unicamp (Brasil) y la sangre fresca fue suministrada por el banco de sangre del Hemocentro de Campinas (Brasil). Los eritrocitos fueron obtenidos mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min. previo agregado de 150 mM de solución salina (PBS) a pH 7.4. Luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante. Se repitió este proceso tres veces. Posteriormente, los eritrocitos fueron diluidos hasta un valor de absorbancia cercano a 0,9 ( $\lambda$ : 412 nm) (correspondiente a un hematocrito aproximado del 0,15%). Luego se prepararon las muestras con el agregado de los correspondientes compuestos fenólicos y se dejó incubar durante 15 min a 37°C. Finalmente, se centrifugó cada muestra a 10.000 rpm por 10 min., se separó el sobrenadante y se midió la concentración de hemoglobina liberada a 412 nm para realizar el cálculo del porcentaje de hemólisis (%H) como se describe a continuación:

$$\%H = \frac{A_m - A_{PBS}}{A_{agua} - A_{PBS}} \cdot 100$$

donde  $A_m$ ,  $A_{PBS}$ , and  $A_{agua}$  son las absorbancias de la muestra, del control (eritrocitos en PBS, representaría la hemólisis mecánica) y de los eritrocitos en agua (100% hemólisis), respectivamente. Cada experimento fue realizado por triplicado.

## 6. Análisis de los datos.

Los datos mostrados representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Las curvas concentración-respuesta se ajustaron a una función sigmoidea. Estos ajustes y los demás análisis estadísticos, mencionados en los diferentes experimentos, se



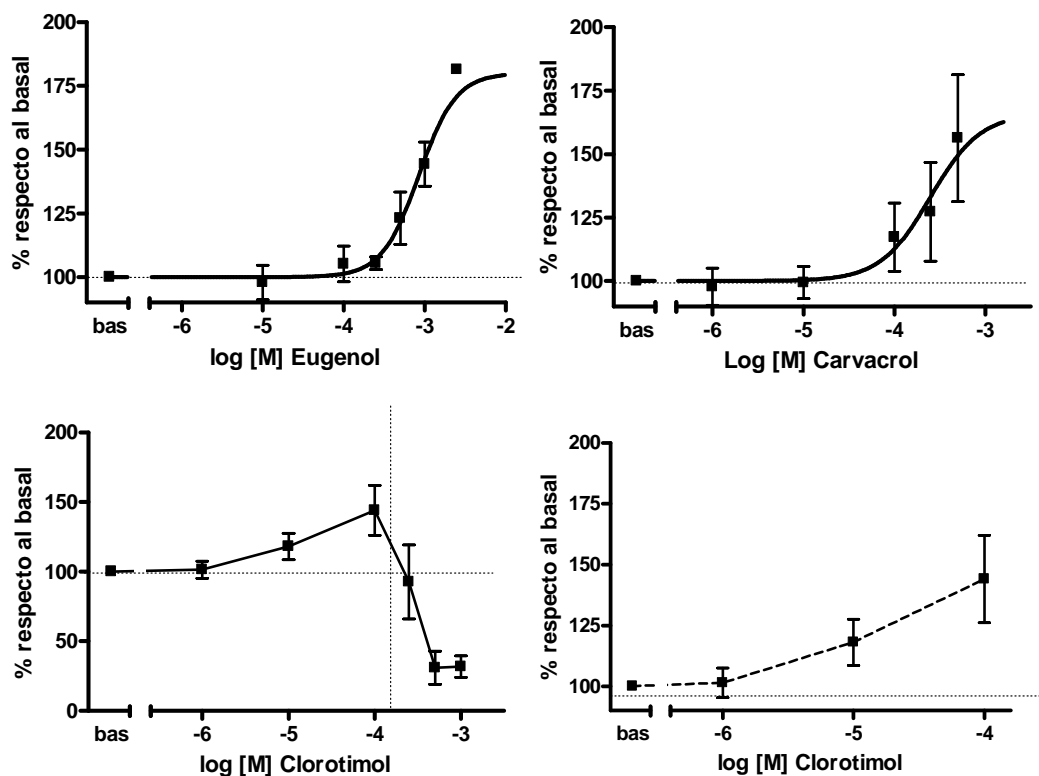
realizaron con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.).

## **RESULTADOS.**

Ha sido descrito anteriormente que un aumento de la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam se corresponde con un mecanismo de activación y/o potenciación del R-GABA<sub>A</sub> de manera alostérica (Hawkinson et al. 1998; Garcia et al. 2006; Suñol et al. 2006). La figura III.1 muestra las curvas concentración-respuesta de la unión específica de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam en presencia de los diferentes compuestos fenólicos determinadas en cultivos primarios de neuronas corticales. Carvacrol y eugenol indujeron un aumento de la unión de este ligando de manera concentración dependiente, con valores de EC<sub>50</sub> de 235 μM y 532 μM y de respuestas máximas (E<sub>max</sub>) de 195% y 166% con respecto al estado basal, respectivamente (Tabla III.1). La presencia de clorotimol provocó también un aumento de la unión específica pero sólo hasta alrededor de 100 mM, mostrando un incremento del 144% con respecto al basal. Mayores concentraciones de clorotimol redujeron la unión a valores inferiores a la unión basal. Por lo tanto, el cálculo del valor EC<sub>50</sub> (19 μM) fue calculado teniendo en cuenta solo concentraciones hasta 100 μM (Tabla III.1).

Los incrementos en la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam inducidos por concentraciones estimulantes de cada uno de los fenoles fueron completamente inhibidos por el antagonista competitivo del R-GABA<sub>A</sub> la bicuculina (Fig. III.2). La disminución de aproximadamente 25 % inducida por bicuculina respecto al control fue coherente con las respuestas a este antagonista informadas anteriormente (Fonfria et al. 2001; Sánchez et al. 2004).

La Fig. III.3 muestra los efectos de los compuestos sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas, determinada por la capacidad de las células para reducir al MTT. Las concentraciones ensayadas para cada compuesto fueron seleccionadas teniendo en cuenta rangos que incluyeran concentraciones farmacológicamente relevantes en estos cultivos, particularmente se eligieron puntos por debajo y por encima de los valores de EC<sub>50</sub> para la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam obtenidos en este trabajo. Así, los intervalos utilizados fueron 100-1000 mM para carvacrol, 400-2000 mM para eugenol y 10-200 μM de clorotimol.

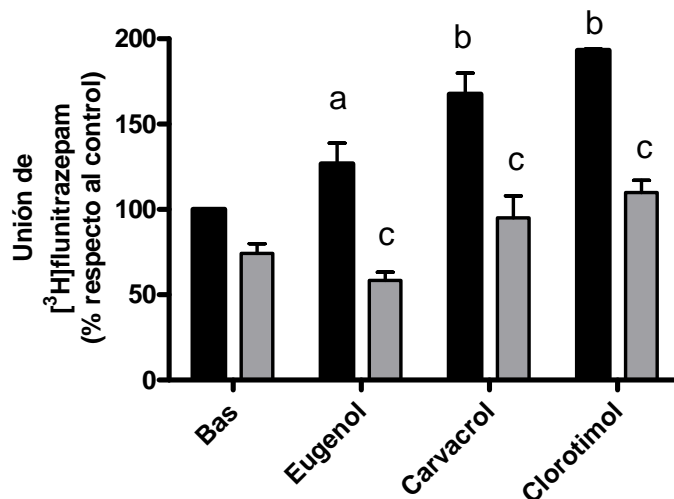


**Fig. III.1.** Curvas concentración-respuesta para la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam en presencia de carvacrol, eugenol y clorotimol. La unión de [<sup>3</sup>H]-Flunitrazepam se determinó en neuronas corticales cultivadas intactas a 25 ° C durante 30 min. Los resultados se expresan como el porcentaje de unión respecto del basal (bas: en ausencia del compuesto a evaluar). Cada punto representa la media  $\pm$  S.E.M de 3-4 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

**Tabla III.1.** Efectos de compuestos fenólicos sobre la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam en cultivos primarios de neuronas corticales.

	Log EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	E <sub>max</sub> (%)
Eugenol	-3,291 $\pm$ 0,071	532 $\pm$ 77	166 $\pm$ 14
Carvacrol	-3.760 $\pm$ 0,271	235 $\pm$ 98	195 $\pm$ 36
Clorotimol*	-5,128 $\pm$ 0,365	19 $\pm$ 13	146 $\pm$ 17

Los valores corresponden a la media  $\pm$  S.E.M. de 3-4 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Un mínimo de 6 concentraciones se utilizaron para cada curva. Los valores de EC<sub>50</sub> se calcularon como se explica en el apartado de Material y Métodos. E<sub>max</sub> corresponde al porcentaje de incremento con respecto a la unión basal. \* Para clorotimol los datos se ajustaron a una curva sigmoideal hasta 100  $\mu$ M.

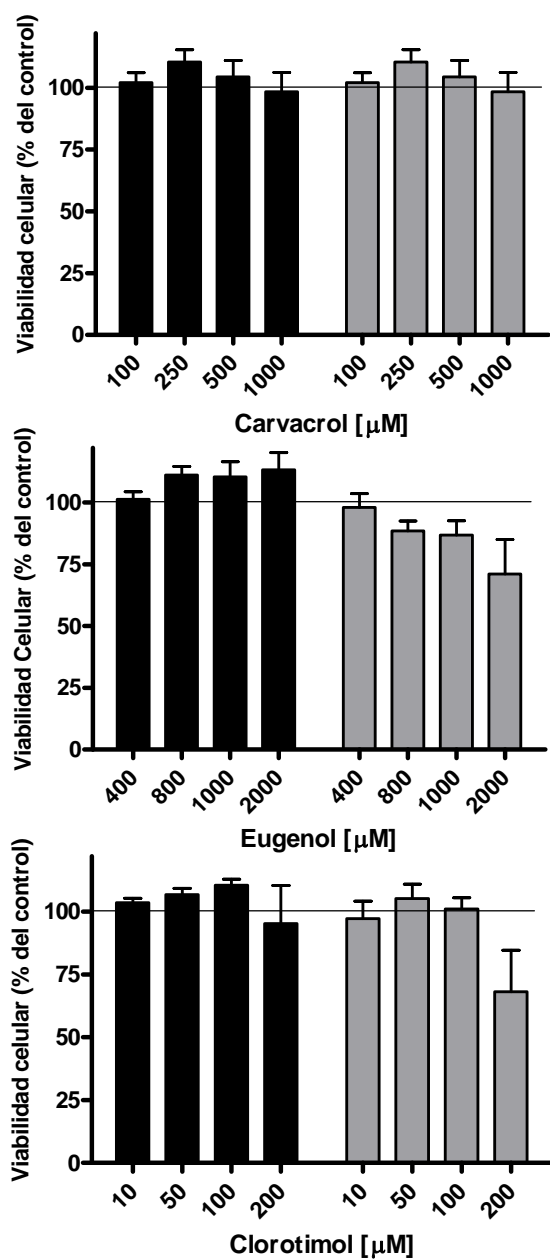


**Fig. III.2. Efecto de la bicuculina sobre el incremento de la unión de [<sup>3</sup>H] flunitrazepam inducido por carvacrol (500 μM), eugenol (900 μM) y clorotimol (100 μM).** Bas: basal (en ausencia de compuestos fenólicos).. Las barras corresponden a la media ± S.E.M. de 2 – 3 experimentos realizados por triplicado en ausencia (barras negras) o en presencia de 100 μM de bicuculina (barras grises), y representa el porcentaje respecto al basal (100 %). a y b:  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente, vs basal en ausencia de bicuculina; c)  $p < 0.001$  vs el mismo tratamiento en ausencia de bicuculina (ANOVA de doble entrada).

Los resultados muestran que los compuestos fenólicos ensayados no redujeron la viabilidad celular después de la exposición de neuronas corticales durante 30 min. (período de tiempo similar a la exposición durante el ensayo de unión del ligando).

Con el aumento del tiempo de exposición a 24 horas, carvacrol no afectó la viabilidad celular, mientras que eugenol y clorotimol mostraron efectos negativos (aunque no estadísticamente significativos con respecto al control) a las más altas concentraciones ensayadas (1000 y 200 mM, respectivamente).

En cuanto a los resultados de hemólisis, los mismos mostraron que ninguno de los productos ensayados, a las mismas concentraciones utilizadas para los ensayos de MTT, indujo la rotura de los eritrocitos como consecuencia de su actividad sobre la membrana de los mismos, ya que los porcentajes de hemólisis no fueron significativamente diferentes a los de la muestra control (eritrocitos en solución isotónica en ausencia de los compuestos) (Tabla III.2).



**Fig. III.3. Viabilidad celular (Ensayo de MTT) en presencia de compuestos fenólicos.** Los valores son el promedio S.E.M. de 3 a 6 experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control en ausencia de fenol (100%) luego de 30 minutos (barras negras) o 24 h (barras grises) de exposición a cada compuesto.

**Tabla III.2 Porcentajes de hemólisis inducido por los compuestos fenólicos a diferentes concentraciones.**

<b>Compuesto</b>	<b>[ <math>\mu</math>M ]</b>	<b>% Hemolisis</b>	<b>SEM</b>
<b>Eugenol</b>	<b>100</b>	0,027 (n=2)	2,92
	<b>200</b>	-1,734(n=2)	2,01
	<b>400</b>	-0,580 (n=2)	2,97
	<b>800</b>	0,135 (n=3)	1,52
	<b>1000</b>	-0,260 (n=3)	1,95
	<b>2000</b>	2,186 (n=3)	2,64
<b>Carvacrol</b>	<b>100</b>	1,740 (n=2)	0,54
	<b>250</b>	0,770 (n=2)	0,08
	<b>500</b>	2,670 (n=4)	1,79
	<b>1000</b>	0,670 (n=4)	0,42
	<b>2000</b>	2,425 (n=4)	1,48
<b>Clorotimol</b>	<b>50</b>	-0,680 (n=2)	2,45
	<b>100</b>	0,135 (n=2)	2,49
	<b>200</b>	1,015 (n=4)	1,40
	<b>400</b>	0,850 (n=4)	0,47
	<b>1000</b>	1,850 (n=4)	0,85
<b>Propofol</b>	<b>10</b>	1,400 (n=2)	0,28
	<b>50</b>	1,660 (n=2)	0,47
	<b>100</b>	-0,140 (n=3)	0,85
	<b>500</b>	0,178 (n=3)	0,56
	<b>1000</b>	1,064 (n=3)	0,81
<b>Timol</b>	<b>10</b>	-0,840 (n=3)	0,23
	<b>50</b>	-0,590 (n=3)	0,02
	<b>100</b>	0,920 (n=4)	0,84
	<b>500</b>	-0,875 (n=4)	0,23
	<b>1000</b>	-1,400 (n=4)	0,65

Los %H fueron calculados como se indica en Materiales y Métodos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los valores corresponden a la medias  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes.

## **DISCUSIÓN**

Mediante estudios de modulación de la unión de ligandos alostéricos al R-GABA<sub>A</sub> o de estudios vinculados a la funcionalidad del mismo (electrofisiología o captación de <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>), quedó demostrado con anterioridad que timol y propofol poseen una importante actividad como moduladores positivos del receptor y agonistas de GABA (Cupp 2000; Garcia et al. 2008), actuando a través de la interacción con sitios específicos del receptor. En la presente Tesis, se analizaron los eventuales efectos sobre el receptor GABA<sub>A</sub> ejercidos por los otros tres compuestos fenólicos incluidos en este trabajo, los cuales poseen características estructurales similares a propofol y timol.

La actividad farmacológica de estos compuestos a estudiar sobre el R-GABA<sub>A</sub> se evaluó mediante su capacidad de modulación del mismo a través de cambios ejercidos a nivel de un sitio alostérico, como es el sitio de unión de benzodiazepinas, para lo cual se analizaron sus efectos sobre la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam en sistemas de neuronas en cultivo.

Los compuestos fenólicos estudiados potenciaron la unión específica de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam, de manera saturable alcanzando un valor máximo de estimulación (E<sub>max</sub>). La bicuculina, un antagonista del R-GABA<sub>A</sub>, mostró un bloqueo de este efecto estimulante. Así, los agentes fenólicos producirían sus efectos en un sitio del receptor diferente al de flunitrazepam, modificando la unión del receptor con este ligando. Estos compuestos, por lo tanto, actuarían como activadores alostéricos de las benzodiazepinas en puntos de unión al R-GABA<sub>A</sub> que, indirectamente, serían capaces de modular la actividad del receptor (Garcia et al. 2008; Sancar y Czajkowski 2011; Sigel y Luscher 2011). Cabe señalar que estos sitios alostéricos son los objetivos de muchas drogas neuroactivas incluyendo benzodiazepinas, propofol, barbitúricos, anestésicos volátiles y etanol, entre otros. Ha sido informado anteriormente que la liberación de GABA endógeno en cultivos de neuronas corticales, expuestos a condiciones basales similares a la utilizadas en este trabajo, resultó en una concentración de GABA en el medio de alrededor de 34 nM (Garcia et al. 2006). Esta concentración no provoca ninguna respuesta mediada por el R-GABA<sub>A</sub> (Vale et al. 1997; Vale et al. 1999; Bali y Akabas 2004). Por esta razón, las estimulaciones

obtenidas en nuestros experimentos se consideran que son ejercidas por cada compuesto ensayado y no por efecto del GABA endógeno.

Los valores de  $EC_{50}$  de unión de [ $^3H$ ]-flunitrazepam obtenidos en la presente Tesis para los tres compuestos evaluados, son mayores a los mostrados en otros trabajos anteriores para propofol y timol (9 y 12  $\mu M$  respectivamente) (Bruner y Reynolds 1998; Garcia et al. 2006) lo que indica una menor capacidad estimulante de los primeros frente a estos dos últimos.

Carvacrol es un producto fenólico monoterpénico de numerosas plantas aromáticas, como el orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y la bergamota silvestre (*Monarda fistulosa*) (De Vincenzi et al. 2004). Se usa a gran escala en las industrias de alimentos y cosméticos, y es un ingrediente común de la dieta humana (Ipek et al. 2003). Se ha informado que carvacrol tiene acción analgésica (Baser 2008), actividad anti-acetilcolinesterasa (AChE) (Jukic et al. 2007; Baser 2008) y posee efecto ansiolítico (Melo et al. 2010). Este último informe sugiere la participación del sistema GABAérgico en el efecto ansiolítico, lo cual es demostrado solamente por medio de pruebas de comportamiento. Los resultados aquí mostrados apoyan esta hipótesis ya que el carvacrol, al igual que el eugenol, fue capaz de inducir un aumento en la unión del flunitrazepam, siendo este efecto obstaculizado por el antagonista bicuculina. Además, la  $EC_{50}$  obtenida para este efecto estimulante del carvacrol (235  $\mu M$ ) es comparable a las dosis utilizadas por Melo (Melo et al. 2010) en los experimentos in vivo que indujeron un efecto ansiolítico (25-50 mg/kg  $\approx$  167-333  $\mu M$ ). Asimismo, podemos sugerir que carvacrol es más potente como modulador del R-GABA<sub>A</sub> ( $EC_{50}$ = 235  $\mu M$ , este trabajo) que como un inhibidor de la AChE ( $IC_{50}$ = 400  $\mu M$ ; (Jukic et al. 2007).

El eugenol es un compuesto aromático que comúnmente contienen varios tipos de plantas, especialmente especias y hierbas medicinales (clavo de olor, nuez moscada, canela, etc.). Es ampliamente utilizado en los procedimientos dentales como analgésico y antiséptico (Ohkubo y Shibata 1997; Kim et al. 2003). Sus efectos sobre el sistema nervioso han sido ampliamente estudiados (véanse las referencias en (Cho et al. 2008). El eugenol es neuroprotector contra la excitotoxicidad, la isquemia y el péptido  $\beta$ -amiloide (Wie et al. 1997; Won et al. 1998; Irie y Keung 2003), induce anestesia en ratas (Guenette et al. 2006), restringe los potenciales de campo epileptiformes y la difusión de la depresión en el hipocampo y neocórtex (Müller et al. 2006), inhibe corrientes de  $Na^+$  como un mecanismo de analgesia (Cho et al. 2008), inhibe receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y potencia el R-GABA<sub>A</sub> en

mamíferos (Wie et al. 1997; Aoshima y Hamamoto 1999). En el presente trabajo, demostramos además que el eugenol es un modulador positivo del R-GABA<sub>A</sub>. El valor de EC<sub>50</sub> obtenido en este trabajo por este efecto positivo (532 µM) está muy cerca de la concentración de eugenol utilizada por Aoshima y Hamamoto (Wie et al. 1997; Aoshima y Hamamoto 1999) (650 mM) para potenciar respuestas de este receptor. El hecho de que el aumento de la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam inducida por el eugenol fue inhibido por la bicuculina, corrobora su modulación positiva del R-GABA<sub>A</sub>.

En comparación con la actividad bactericida conocida de carvacrol y eugenol a concentraciones en el rango de 1 a 10 mM (Ultee et al. 1999; Gill y Holley 2006; Gill y Holley 2006), nuestros resultados demuestran que sus concentraciones activas en el R-GABA<sub>A</sub> para la estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (EC<sub>50</sub> 235 y 532 µM, respectivamente) son inferiores a las que demostraron actividad contra bacterias.

La inclusión de clorotimol en el presente estudio se justifica por su estructura fenólica, similar a la de timol que mostró una actividad GABAérgica importante (Garcia et al. 2006; Garcia et al. 2008), con un átomo de halógeno (Cl) unido al anillo fenólico. Se utiliza en cosméticos y productos de cuidado personal. No tenemos conocimiento hasta ahora de estudios de clorotimol destinados a conocer sus efectos sobre el sistema nervioso. Por lo tanto, su efecto sobre el R-GABA<sub>A</sub> informado aquí sería la primera descripción de una posible actividad farmacológica en el sistema nervioso central (SNC). No obstante, la forma de la curva de concentración-respuesta y la disminución de la actividad a altas concentraciones puede ser explicada por la introducción de un átomo de cloro en la molécula y por ende el aumento de la toxicidad de este compuesto.

Los resultados anteriores también tienen implicancias para la seguridad de los medicamentos farmacológicos en la práctica clínica. El uso generalizado de productos a base de hierbas y fitomedicamentos que contienen los compuestos fenólicos que aquí se consideran plantea el tema de los posibles efectos que se derivan de su uso concomitante con medicamentos comúnmente recetados con efectos sobre el SNC.

Productos que contienen carvacrol son en su mayoría comprados en tiendas de fitoterapia y de alimentos naturales o a través de Internet (Wong et al. 2009). Hoy en día los más comúnmente anunciados, los llamados medicamentos naturales, son preparados de aceites esenciales de orégano con concentraciones de carvacrol en el intervalo de 75-85%. Estos aceites se comercializan ya sea como líquido o en forma de cápsulas para administración oral, y puede calcularse que la dosis usual que se recomienda corresponde a una concentración de carvacrol que oscila entre 100-200



mg/día. La extrapolación de los datos experimentales a estas dosis indica que carvacrol puede producir efectos GABAérgicos. La interacción de carvacrol con psicofármacos prescritos que actúan sobre el R-GABA<sub>A</sub> podría aumentar la actividad inhibitoria de las benzodiazepinas, los barbitúricos, el propofol, etc. La interacción de este agente con lo suministrado normalmente en la atención al paciente preoperatorio puede ser de especial importancia, como se ha informado con otros medicamentos herbarios (Ang-Lee et al. 2001; Carrasco et al. 2009; Vasiliadis y Tempier 2011). Así, por ejemplo, la interacción con propofol, el anestésico más comúnmente utilizado en anestesia parenteral, aumentaría el tiempo de sedación y el manejo del paciente quirúrgico, dado que el propofol actúa principalmente a través del aumento de la función del R-GABA<sub>A</sub>, como parece hacer el carvacrol. Por otra parte, una de las principales preocupaciones con estas interacciones hierba-droga es que los pacientes no suelen informar a sus médicos de que están tomando los medicamentos herbarios (Ang-Lee et al. 2001; Chen et al. 2005; Kennedy y Seely 2010).

En cuanto a eugenol, aunque los aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y otras especias son comúnmente comercializados, están principalmente destinados para uso tópico. Sin embargo, hay una gran población (en millones de personas) expuesta a eugenol a través del humo de cigarrillos específicos. Este es el caso de los cigarrillos de clavo de olor de Indonesia *kreteks*, que contienen niveles de eugenol en el humo que van desde 2,4 hasta 38 mg/cigarrillo (Polzin et al. 2007). Un caso similar es el de los cigarrillos *bidí* de la India, que consisten en plantas de tabaco envueltas en hoja de tendu (*Diospyros malanoxylon*). *Kreteks* y *bidis* están ya ganando popularidad entre los jóvenes de los países occidentales (Stanfill et al. 2006).

En un trabajo previo, fue mostrado un modelo farmacofórico para el sitio de unión al R-GABA<sub>A</sub> de compuestos fenólicos análogos a propofol (García et al. 2006). Esta hipótesis incluye tres grupos alifáticos hidrofóbicos, un grupo donador de hidrógeno, un volumen de exclusión y un anillo aromático. En dicho trabajo ha sido demostrado las posibles alineaciones de propofol y el timol con esa hipótesis farmacofórica. Carvacrol, el compuesto que logra la mayor estimulación de acuerdo con los presentes resultados ( $E_{max}=195\%$ ), claramente podría acomodar la mayor parte de las funciones descritas en la hipótesis planteada. Sin embargo, eugenol y clorotimol no se ajustarían completamente al modelo, debido a la presencia del grupo metoxi en posición 2 en el primero y a la presencia del átomo de cloro en la posición 6 en el último. De esta manera, y sin dejar de reconocer que más compuestos deberían

ser evaluados para mejorar el modelo citado, los resultados aquí presentados apoyan esta hipótesis farmacofórica ya que el compuesto que lograría un mejor ajuste demostró poseer una mayor potencia de modulación del R-GABA<sub>A</sub> considerando la estimulación máxima alcanzada.

En conclusión, hemos encontrado que carvacrol, eugenol y clorotimol fueron capaces de mejorar la unión del [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam en el R-GABA<sub>A</sub>, siendo este efecto inhibido por la bicuculina, un antagonista del receptor. Estos resultados sugieren fuertemente que los fenoles estudiados son moduladores alostéricos positivos de este receptor. Las concentraciones necesarias para inducir esta modulación alostérica positiva no serían neurotóxicas. Así, es posible sugerir que estos compuestos podrían ejercer una actividad depresora en el SNC pudiendo también aumentar la potencia anestésica de los anestésicos generales.

# ***CONCLUSIONES***

---

- Los análisis físico-químicos mostraron una alta lipofilicidad de todos los compuestos (Log P) en el siguiente orden creciente: eugenol < carvacrol  $\approx$  timol < propofol  $\leq$  clorotimol, y solubilidades en agua en el rango 2,5-16 mM con valores mayores para los compuestos menos lipofílicos y viceversa.
- La lipofilicidad relativa, determinada entre todos los compuestos estudiados, muestra una alta correlación con su capacidad para interactuar con membranas artificiales (liposomas).
- La relación y comparación de los datos obtenidos permite validar la utilización de métodos cromatográficos rápidos y simples (IAM-HPLC) para predecir la capacidad de interacción de estos compuestos con membranas de fosfolípidos puros.
- Todos los compuestos fueron capaces de expandir los filmes de Langmuir de dpPC de manera concentración-dependiente y de inducir fases *líquido cristalinas* más elásticas. El efecto desestabilizante fue más significativo a altas concentraciones y en presencia de los compuestos más lipofílicos.
- La interacción y penetración de estos compuestos con fases membranosas es favorecida cuando las mismas se encuentran menos compactas, lo cual es confirmado tanto por el aumento de la partición en columnas IAM-HPLC cuando se utilizan temperaturas mayores, como por la mayor velocidad de penetración en capas monomoleculares de dpPC cuando estas fueron empaquetadas a bajas presiones laterales. Además, todos los compuestos fueron capaces de ser incorporados a la monocapa a presiones incluso mayores a las presiones de equilibrio estimadas para membranas naturales.
- Las características físico-químicas y estructurales de los compuestos estudiados hacen que los mismos se intercalen preferentemente en la zona de

las cabezas polares, el glicerol y el comienzo de las cadenas hidrocarbonadas de las membranas, ocupando los compuestos más lipofílicos (propofol y clorotimol) posiciones más profundas en estas regiones, cambiando probablemente las orientaciones moleculares y reduciendo las repulsiones electrostáticas de corto alcance, permitiendo así un mayor acercamiento intermolecular y disminuyendo finalmente el grado de movilidad de las cadenas hidrocarbonadas.

- Los ensayos farmacológicos realizados en el presente trabajo, en sistemas de cultivos primarios neuronales, revelan que carvacrol y eugenol ejercerían una modulación positiva del receptor GABA<sub>A</sub>, aunque con menos potencia que la demostrada por propofol y timol. Por su parte, clorotimol indujo una modulación positiva pero sólo hasta concentraciones alrededor de 100 µM,
- Los estudios de citotoxicidad y hemólisis muestran por un lado, la ausencia de citotoxicidad de los compuestos a concentraciones similares a las farmacológicamente activas sobre el receptor GABA<sub>A</sub> y, por otro lado, que ningún compuesto poseería capacidad hemolítica.

# ***APÉNDICES***

---

## APÉNDICE 1

### **Cálculo de la constante de equilibrio de disociación de los fenoles**

En este apéndice se muestran los pasos seguidos y la deducción de las fórmulas para la determinación de la constante de equilibrio de disociación ( $pK$ ).

Dada la siguiente reacción química (ver esquema A1):



Siendo  $C_0$  la concentración total de la droga:

$$C_0 = [\text{Fenol-H}] + [\text{Fenol}] \quad (2A)$$

donde los valores entre corchetes corresponden a las concentraciones molares de las especies asociada  $[\text{Fenol-H}]$  o disociada  $[\text{Fenol}]$  del fenol la constante de equilibrio de disociación de la reacción ( $K$ ) será:

$$K = \frac{[\text{Fenol}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{Fenol-H}]} \quad (3A)$$

La absorbancia del fenol determinada por espectrofotometría UV ( $A_{obs}$ ) es igual a la suma de todas las especies absorbentes:

$$A_{obs} = \sum A_{ij}$$

$$A_{ij} = \varepsilon_{ij} \cdot b \cdot c_j$$

donde  $A_{ij}$  es el valor de la absorbancia de la especie química  $j$  a la longitud de onda ( $\lambda$ )  $i$ ;  $\varepsilon_{ij}$ : coeficiente de extinción molar de la especies absorbentes  $j$  a determinadas  $\lambda_i$ ;  $b$ : paso óptico (1 cm) y  $c$ : concentración molar de la especie  $j$ .

Para un fenol, la absorbancia leída contra un blanco consistente en el mismo solvente utilizado para su disolución será:

$$A_{obs} = \varepsilon_{Fenol^-} \cdot b \cdot [Fenol^-] + \varepsilon_{Fenol-H} \cdot b \cdot [Fenol-H] \quad (4A)$$

Los valores de  $\varepsilon_{Fenol^-}$  y  $\varepsilon_{Fenol-H}$  pueden ser calculados a partir de los valores de  $A_{obs}$ , a la misma  $\lambda_i$ , en los extremos de la curva de titulación de cada BZD o sea, en medio extremadamente alcalino ( $pH \gg pK$ ) donde la especie predominante es  $[Fenol^-]$  (en este caso  $C_o = [Fenol^-]$ ) o en medio ácido ( $pH \ll pK$ ) donde todo el fenol está en la forma  $[Fenol-H]$  ( $C_o = [Fenol-H]$ ). Entonces:

$$\varepsilon_{Fenol^-} = \frac{A_{obs1}}{C_o \cdot b} \quad \varepsilon_{Fenol-H} = \frac{A_{obs2}}{C_o \cdot b} \quad (5A)$$

Sustituyendo cada  $\varepsilon$  en la ec. 4A por las ecs. 5A, resolviendo para  $[BZD]$  en ec. 2A y sustituyendo por esta expresión en la ec. 4A:

$$A_{obs} = \frac{A_{obs1}}{C_o} \cdot (C_o - [FenolH^+]) + \frac{A_{obs2}}{C_o} \cdot [FenolH^+] \quad (6A)$$



Despejando  $[BZDH^+]$  de ec.3A y reemplazando en ec.6A:

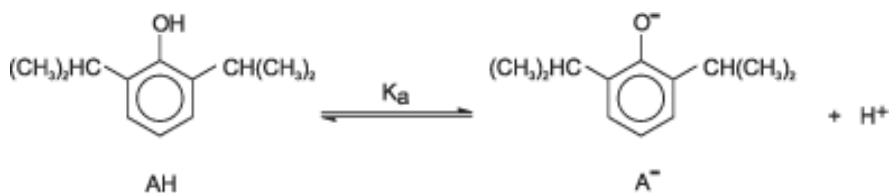
$$A_{obs} = \frac{[H^+] \cdot A_{obs1} + K \cdot A_{obs2}}{[H^+] + K} \quad (7A)$$

Así,  $K$  puede ser calculada midiendo la absorbancia de los fenoles en función del pH y ajustando los datos experimentales a la ec.7A.

Los valores de  $pK$  pueden ser calculados de acuerdo a:

$$pK = -\log K$$

**Esquema A.1. Equilibrio ácido-base de propofol.**



**Esquema  
A1**

## APÉNDICE 2

### ***Análisis de Componente Principal.***

El ACP se realizó de acuerdo a lo descripto por (Crisci y López-Armengol 1983; Pielou y D'Arcy 1984; Rohlf 1984). Una nube de puntos multidimensional y por lo tanto invisible, puede ser visualizada si se proyecta sobre un espacio de pocas dimensiones. Esto se puede lograr por medio de una rotación rígida de los ejes originales alrededor del origen. Las nuevas coordenadas son calculadas a partir de la ecuación:  $Y = U \cdot X$ , donde  $X$  es la matriz de datos original que puede haber sido previamente centrada y/o estandarizada,  $U$  es una matriz ortogonal cuyas filas son los "eigen-vectores" de  $R = X_R \cdot X'_R$ , ( $X'_R$  es la transpuesta de  $X_R$ ) e  $Y$  es la matriz de las nuevas coordenadas de los puntos, medidos en relación a los nuevos ejes, conocidas como valores de los componentes principales. Los nuevos ejes son conocidos como ejes principales o componentes principales.

El ordenamiento es exitoso si una gran proporción del total de la dispersión de los datos es paralela al primer, segundo o tercer eje principal. El primer eje principal es orientado de tal manera que la varianza de  $n$  del puntaje del primer componente principal sea lo más grande posible. Luego del ACP cada punto tiene como coordenadas no al valor de cada variable medida para cada BZD sino a la suma de las diferentes contribuciones de todas las variables para cada BZD. Los elementos de la matriz  $U$  son las contribuciones y, según sus valores, es posible determinar cuales propiedades tienen más alta influencia en cada componente principal.

Nuestros datos requirieron estandarización ya que las diferentes propiedades fueron medidas en unidades no comparables entre sí. A tal fin, los datos originales ( $x_{ij}$ ) fueron centrados (calculando su desviación a partir de la respectiva media de los valores de cada propiedad  $i$  para los compuestos  $j$  ( $\bar{x}_i$ )) y luego estandarizados (dividiendo los datos centrados por la desviación estándar de los valores de la correspondiente propiedad  $i$  para los compuestos  $j$  ( $\sigma_i$ )) aplicando los siguientes cálculos para cada elemento de la matriz de datos original:  $(x_{ij} - \bar{x}_i) / \sigma_i$ .

### APÉNDICE 3

#### **Consideraciones teóricas de algunos parámetros utilizados en experimentos de H<sup>1</sup>-RMN y Tablas de Tiempos de Relajación Longitudinal (T<sub>1</sub>).**

El desplazamiento químico (C.S.) describe la dependencia de los niveles de energía magnética del núcleo con el ambiente electrónico de la molécula. El núcleo de un átomo puede poseer un momento magnético (espín nuclear), el que entrega diferentes niveles de energía. El desplazamiento químico se genera cuando una variación en los niveles de energía es producida por algún campo magnético exterior. El campo magnético total sentido por un núcleo es la superposición del campo exterior y del campo local inducido por el movimiento de los electrones en los orbitales moleculares (por otra parte, los electrones poseen un momento magnético propio).

La distribución de los electrones para un mismo tipo de núcleo (en este caso H<sup>1</sup>) varía según la geometría local (átomos ligados, longitudes y ángulos de enlace) y con el campo magnético local de cada núcleo. Esto trae un impacto sobre los niveles de energía (y las frecuencias de resonancia). Las variaciones de las frecuencias de resonancia magnética nuclear de un mismo tipo de núcleo, a causa de las variaciones de distribuciones electrónicas, son llamadas “desplazamientos químicos”.

El desplazamiento químico está dado con respecto a una frecuencia de referencia o a una muestra de referencia, comúnmente una molécula con una distribución electrónica poco deformada, en este caso se utiliza el agua.

---

 TABLAS DE VALORES DE T<sub>1</sub> OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS DE H<sup>1</sup>-RMN
 

---

**Tabla A3.1. Valores de T<sub>1</sub> de hidrógenos de propofol en presencia y ausencia de vesículas de EPC.**

Picos	T <sub>1</sub>		
	Propofol	EPC-propofol	Δ T <sub>1</sub>
<b>a</b>	3,438±0,008	*	*
<b>b</b>	2,803±0,055	*	*
<b>c</b>	4,422±0,072	0,889±0,48	1,913
<b>d</b>	2,552±0,039	0,736±0,037	1,815

\* no determinado

**Tabla A3.2. Valores de  $T_1$  de hidrógenos del timol en presencia y ausencia de vesículas de EPC.**

Picos	T1		
	Timol	EPC-timol	$\Delta T1$
<b>a</b>	1,109±0,050	0,64070,014	0,468
<b>b</b>	1,709±1,709	0,846±0,026	0,862
<b>c</b>	3,414±0,042	0,566±0,008	2,848
<b>d</b>	4,657±0,056	0,767±0,242	3,890
<b>e</b>	3,304±0,037	0,967±0,067	2,337
<b>f</b>	2,429±0,015	0,483±0,214	1,946

**Tabla A3.3. Valores de  $T_1$  de hidrógenos de carvacrol en presencia y ausencia de vesículas de EPC.**

Picos	T1		
	Carvacrol	EPC-carvacrol	$\Delta T1$
<b>a</b>	3,438±0,008	*	*
<b>b</b>	2,802±0,055	0,889±0,48	1,913
<b>c</b>	4,422±0,072	*	*
<b>d</b>	2,551±0,039	0,736±0,037	1,815
<b>e</b>	1,788±0,033	0,879±0,019	0,908
<b>f</b>	1,439±0,012	0,656±0,11	0,782

\* no determinado

**Tabla A3.4. Valores de  $T_1$  de hidrógenos de eugenol en presencia y en ausencia de vesículas de EPC.**

Picos	T1		
	Eugenol	EPC-eugenol	$\Delta T1$
<b>a</b>	1,528	0,906	0,6222
<b>b</b>	3,596	1,066	2,5305
<b>c</b>	3,020	*	
<b>d</b>	2,578	1,262	1,316
<b>e</b>	0,577	0,522	0,0551
<b>f</b>	4,198	*	*
<b>g</b>	6,515	5,779	0,7364
<b>h</b>	1,636	*	*

\* no determinado

**Tabla A3.5. Valores de  $T_1$  de hidrógenos de clorotimol en presencia y ausencia de vesículas de EPC.**

Picos	T1		
	Clorotimol	EPC-clorotimol	$\Delta T1$
<b>a</b>	0,353±0,0498	0,909±0,021	-0,555
<b>b</b>	1,002±0,0198	0,662±0,013	0,339
<b>c</b>	1,635±0,0297	0,858±0,015	0,776
<b>d</b>	4,764±0,0389	1,000±0,058	3,764
<b>e</b>	3,214±0,0512	0,670±0,016	2,544

**Tabla A3.6. Valores de  $T_1$  de hidrógenos de EPC en ausencia y presencia de propofol.**

Picos	$T_1$	
	EPC <sub>SUV</sub>	EPC-propofol
G	0,546±0,005	0,539±0,007
H	0,613±0,064	0,589±0,005
I	0,740±0,021	0,701±0,008
J	0,697±0,004	0,660±0,002
K	0,733±0,023	0,702±0,009
E	0,679±0,006	0,632±0,005
C	0,674±0,008	0,632±0,005
B	0,807±0,0002	0,663±0,010
D	0,770±0,003	0,697±0,001
L	0,891±0,015	0,764±0,012
F	0,772±0,005	0,703±0,002
A	1,033±0,027	0,875±0,018

Tabla A3.7. Valores de  $T_1$  de hidrógenos de EPC en presencia y ausencia de timol.

Picos	$T_1$	
	EPC <sub>SUV</sub>	EPC-timol
G	0,532±0,008	0,322±0,137
H	0,596±0,005	0,553±0,092
I	0,715±0,008	*
J	0,671±0,012	0,630±0,025
K	0,713±0,009	0,582±0,084
E	0,641±0,005	0,620±0,089
C	0,643±0,006	0,683±0,034
B	0,728±±0,001	0,729±0,038
D	0,704±0,003	0,581±0,054
L	0,796±0,014	0,759±0,023
F	0,725±0,002	0,576±0,016
A	0,919±0,02	0,892±0,021



Tabla A3.8. Valores de  $T_1$  de hidrógenos EPC en presencia y ausencia de carvacrol.

Picos	$T_1$	
	EPC <sub>SUV</sub>	EPC-carvacrol
G	0,540±0,008	0,554±0,007
H	0,606±0,006	0,605±0,017
I	0,730±0,02	*
J	0,687±0,007	0,643±0,015
K	0,731±0,026	0,636±0,045
E	0,651±0,006	0,571±0,045
C	0,646±0,007	*
B	0,752±0,001	0,726±0,003
D	0,725±0,003	0,699±0,018
L	0,832±0,015	0,757±0,018
F	0,727±0,026	0,736±0,037
A	0,971±0,022	0,894±0,019

\* no determinado

**Tabla A3.9.: Valores de  $T_1$  de hidrógenos de EPC en presencia y ausencia de eugenol.**

Picos	$T_1$	
	EPC <sub>SUV</sub>	EPC-eugenol
G	0,546±0,005	0,532±0,008
H	0,613±0,006	0,596±0,005
I	0,740±0,021	0,715±0,008
J	0,697±0,004	0,671±0,012
K	0,733±0,023	0,713±0,009
E	0,679±0,006	0,641±0,005
C	0,674±0,008	0,643±0,006
B	0,807±0,0002	0,728±0,0008
D	0,770±0,003	0,704±0,003
L	0,891±0,015	0,796±0,014
F	0,772±0,005	0,725±0,002
A	1,033±0,027	0,919±0,020

**Tabla A3.10. Valores de  $T_1$  de hidrógenos de EPC en presencia y ausencia de clorotimol.**

Picos	$T_1$	
	EPC <sub>SUV</sub>	EPC-clorotimol
G	0,534±0,008	0,556±0,007
H	0,606±0,006	0,590±0,005
I	0,730±0,0202	0,651±0,019
J	0,687±0,007	0,655±0,006
K	0,731±0,026	0,655±0,024
E	0,651±0,007	0,641±0,006
C	0,646±0,007	0,659±0,005
B	0,752±0,001	0,730±0,0005
D	0,725±0,003	0,698±0,003
L	0,832±0,015	0,795±0,014
F	0,727±0,005	0,719±0,007
A	0,971±0,021	0,909±0,029

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

- Abadji, V. C., Raines, D. E., Watts, A. and Miller, K. W. (1993). The effect of general anesthetics on the dynamics of phosphatidylcholine-acetylcholine receptor interactions in reconstituted vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1147(1): 143-53.
- Alvarez-Zepeda, A., Barman, B. N. and Martire, D. E. (1992). *Anal. Chem.* 64: 1978-1984.
- Ang-Lee, M., Moss, J. and Yuan, C. (2001). Herbal medicines and perioperative care. *JAMA* 286(2): 208-16.
- Aoshima, H. and Hamamoto, K. (1999). Potentiation of GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(4): 743-8.
- Bali, M. and Akabas, M. (2004). Defining the propofol binding site location on the GABA<sub>A</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 65(1): 68-76.
- Bali, M. and Akabas, M. H. (2007). The location of a closed channel gate in the GABA<sub>A</sub> receptor channel. *J Gen Physiol* 129(2): 145-59.
- Bangham, A., Hill, M. and Miller, N. G. (1974). *Methods in Membrane Biology*. New York, Plenum Press.
- Baser, K. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.* 14(29): 3106-19.
- Baumann, S. W., Baur, R. and Sigel, E. (2001). Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 276(39): 36275-80.
- Baumann, S. W., Baur, R. and Sigel, E. (2002). Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABA<sub>A</sub> receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem* 277(48): 46020-5.
- Belelli, D., Pau, D., Cabras, G., Peters, J. and Lambert, J. (1999). A single amino acid confers barbiturate sensitivity upon the GABA rho 1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 127(3): 601-4.
- Boehm, S. L., 2nd, Homanics, G. E., Blednov, Y. A. and Harris, R. A. (2006). delta-Subunit containing GABA<sub>A</sub> receptor knockout mice are less sensitive to the actions of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo-[5,4-c]pyridin-3-ol. *Eur J Pharmacol* 541(3): 158-62.
- Bruner, K. R. and Reynolds, J. N. (1998). Propofol modulation of [3H]flunitrazepam binding to GABA<sub>A</sub> receptors in guinea pig cerebral cortex. *Brain Res* 806(1): 122-5.
- Busto, J. V., Fanani, M. L., De Tullio, L., Sot, J., Maggio, B., Goni, F. M. and Alonso, A. (2009). Coexistence of immiscible mixtures of palmitoylsphingomyelin and palmitoylceramide in monolayers and bilayers. *Biophys J* 97(10): 2717-26.
- Cameron, J. (2006). The molecular mechanisms of general anaesthesia: dissecting the GABA<sub>A</sub> receptor. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 6(2): 49-53.
- Campagna-Slater, V. and Weaver, D. (2007). Anaesthetic binding sites for etomidate and propofol on a GABA<sub>A</sub> receptor model. *Neurosci. Lett.* 418(1): 28-33.
- Canlas, C. G., Cui, T., Li, L., Xu, Y. and Tang, P. (2008). Anesthetic modulation of protein dynamics: insight from an NMR study. *J Phys Chem B* 112(45): 14312-8.
- Cantor, R. (2003). Receptor desensitization by neurotransmitters in membranes: are neurotransmitters the endogenous anesthetics? *Biochemistry* 42(41): 11891-7.
- Cantor, R. S. (1997). The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry* 36(9): 2339-44.
- Cantor, R. S. (2001). Breaking the Meyer-Overton rule: predicted effects of varying

- stiffness and interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics. *Biophys J* 80(5): 2284-97.
- Carrasco, M., Vallejo, J., Pardo-de-Santayana, M., Peral, D., Martin, M. and Altimiras, J. (2009). Interactions of *Valeriana officinalis* L. and *Passiflora incarnata* L. in a patient treated with lorazepam. *Phytother. Res.* 23(12): 1795-6.
- Carrer, D. C. and Maggio, B. (1999). Phase behavior and molecular interactions in mixtures of ceramide with dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Lipid Res* 40(11): 1978-89.
- Chen, K., Li, H. Z., Ye, N., Zhang, J. and Wang, J. J. (2005). Role of GABAB receptors in GABA and baclofen-induced inhibition of adult rat cerebellar interpositus nucleus neurons in vitro. *Brain Res Bull* 67(4): 310-8.
- Chen, X., Serag, E., Sneed, K., Liang, J., Chew, H., Pan, S. and Zhou, S. (2011). Clinical Herbal Interactions with Conventional Drugs: From Molecules to Maladies. *Curr. Med. Chem.* 18(31): 4836-4850.
- Cheng, Z., Moore, J. and Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *J Agric Food Chem* 54(20): 7429-36.
- Christina Grobin, A., Inglefield, J. R., Schwartz-Bloom, R. D., Devaud, L. L. and Morrow, A. L. (1999). Fluorescence imaging of GABAA receptor-mediated intracellular [Cl<sup>-</sup>] in P19-N cells reveals unique pharmacological properties. *Brain Res* 827(1-2): 1-11.
- Cho, J., Kim, T., Lim, J. and Song, J. (2008). Effects of eugenol on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1243: 53-62.
- Colquhoun, D. and Sivilotti, L. G. (2004). Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends Neurosci* 27(6): 337-44.
- Connolly, C. N., Krishek, B. J., McDonald, B. J., Smart, T. G. and Moss, S. J. (1996). Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 271(1): 89-96.
- Cossart, R., Bernard, C. and Ben-Ari, Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28(2): 108-15.
- Costa, E. (1998). From GABA<sub>A</sub> receptor diversity emerges a unified vision of GABAergic inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 321-50.
- Crisci, J., López-Armengol, F.M., 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica.*, OEA, Washington.
- Cui, T., Bondarenko, V., Ma, D., Canlas, C., Brandon, N. R., Johansson, J. S., Xu, Y. and Tang, P. (2008). Four-alpha-helix bundle with designed anesthetic binding pockets. Part II: halothane effects on structure and dynamics. *Biophys J* 94(11): 4464-72.
- Cupp, M. (2000). *Toxicology and Clinical Pharmacology of Herbal Products.* New Jersey, Humana Press.
- Darrouzain, F., Dallet, P., Dubost, J. P., Ismaili, L., Pehourcq, F., Bannwarth, B., Matoga, M. and Guillaume, Y. C. (2006). Molecular lipophilicity determination of a huperzine series by HPLC: comparison of C18 and IAM stationary phases. *J Pharm Biomed Anal* 41(1): 228-32.
- de Paula, E. and Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim Biophys Acta* 1240(1): 25-33.

- de Paula, E., Schreier, S., Jarrell, H.C. and Fraceto, L.F. (2008). Preferential location of lidocaine and etidocaine in lecithin bilayers as determined by EPR, fluorescence and <sup>2</sup>H NMR. *Biophys Chem* 132, 47-54.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A. and Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* 75(7-8): 801-4.
- Derry, J. M., Dunn, S. M. and Davies, M. (2004). Identification of a residue in the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunit that differentially affects diazepam-sensitive and -insensitive benzodiazepine site binding. *J Neurochem* 88(6): 1431-8.
- Drafts, B. C. and Fisher, J. L. (2006). Identification of structures within GABAA receptor alpha subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *J Pharmacol Exp Ther* 318(3): 1094-101.
- Dynarowicz-Latka, P., Dhanabalan, A. and Oliveira, O. N., Jr. (2001). Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Adv Colloid Interface Sci* 91(2): 221-93.
- Eckenhoff, R. G., Tanner, J. W. and Johansson, J. S. (1999). Steric hindrance is not required for n-alkanol cutoff in soluble proteins. *Mol Pharmacol* 56(2): 414-8.
- Eger, E. I., 2nd, Koblin, D. D., Harris, R. A., Kendig, J. J., Pohorille, A., Halsey, M. J. and Trudell, J. R. (1997). Hypothesis: inhaled anesthetics produce immobility and amnesia by different mechanisms at different sites. *Anesth Analg* 84(4): 915-8.
- Enz, R. and Cutting, G. R. (1998). Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38(10): 1431-41.
- Ernst, M., Brauchart, D., Boresch, S. and Sieghart, W. (2003). Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* 119(4): 933-43.
- Ernst, M., Bruckner, S., Boresch, S. and Sieghart, W. (2005). Comparative models of GABAA receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. *Mol Pharmacol* 68(5): 1291-300.
- Fang, Z., Sonner, J., Laster, M. J., Ionescu, P., Kandel, L., Koblin, D. D., Eger, E. I., 2nd and Halsey, M. J. (1996). Anesthetic and convulsant properties of aromatic compounds and cycloalkanes: implications for mechanisms of narcosis. *Anesth Analg* 83(5): 1097-104.
- Flower Rod, H. P. R., Maureen M. Dale, Ritter, James M. (2007). Rang & Dale's pharmacology.
- Fonfria, E., Rodriguez-Farre, E. and Suñol, C. (2001). Mercury interaction with the GABA<sub>A</sub> receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 41(7): 819-33.
- Fraceto, L. F., Pinto Lde, M., Franzoni, L., Braga, A. A., Spisni, A., Schreier, S. and de Paula, E. (2002). Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem* 99(3): 229-43.
- Fraceto, L. F. S., A.; Schreiere, S.; de Paula E. (2005). Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by <sup>1</sup>H-NMR measurements. *Biophys Chem* 115: 11-18.
- Frandsen, A. and Schousboe, A. (1990). Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8(2): 209-16.
- Frankel, E. (1984). Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *J Am Oil Chem Soc* 61(12): 1908-1917.
- Franks, N. P., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W. R. and Brick, P. (1998). Structural basis for

- the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophys J* 75(5): 2205-11.
- Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1978). Where do general anaesthetics act? *Nature* 274(5669): 339-42.
- Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1982). Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 300(5892): 487-93.
- Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1984). Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310(5978): 599-601.
- Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1991). Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* 254(5030): 427-30.
- Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367(6464): 607-14.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y. and Komoda, Y. (1988).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res* 67(11): 1438-41.
- Gaines, G. L. (1966). *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces* New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Galofre, M., Babot, Z., Garcia, D., Iraola, S., Rodriguez-Farre, E., Forsby, A. and Suñol, C. (2010). GABA<sub>A</sub> receptor and cell membrane potential as functional endpoints in cultured neurons to evaluate chemicals for human acute toxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 32(1): 52-61.
- García, D., Perillo, M., Zygadlo, J. and Martijena, I. (1995). The essential oil from *Tagetes minuta* L. modulates the binding of [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam to crude membranes from chick brain. *Lipids* 30(12): 1105-10.
- García, D., Vendrell, I., Galofre, M. and Suñol, C. (2008). GABA released from cultured cortical neurons influences the modulation of t-[ $^{35}\text{S}$ ]butylbicyclophosphorothionate binding at the GABA<sub>A</sub> receptor Effects of thymol. *Eur. J. Pharmacol.* 600(1-3): 26-31.
- Garcia, D. A., Bujons, J., Vale, C. and Suñol, C. (2006). Allosteric positive interaction of thymol with the GABA<sub>A</sub> receptor in primary cultures of mouse cortical neurons. *Neuropharmacology* 50(1): 25-35.
- Garcia, D. A., Marin, R. H. and Perillo, M. A. (2002). Stress-induced decrement in the plasticity of the physical properties of chick brain membranes. *Mol Membr Biol* 19(3): 221-30.
- Garcia, D. A. and Perillo, M. A. (1997) a. Localization of flunitrazepam in artificial membranes. A spectrophotometric study about the effect the polarity of the medium exerts on flunitrazepam acid-base equilibrium. *Biochim Biophys Acta* 1324(1): 76-84.
- Garcia, D. A. and Perillo, M. A. (1997) b. Partitioning of flunitrazepam into model membranes studied by temperature controlled gel filtration chromatography. *Biomed Chromatogr* 11(6): 343-7.
- Garcia, D. A. and Perillo, M. A. (1999). Benzodiazepine localisation at the lipid-water interface: effect of membrane composition and drug chemical structure. *Biochim Biophys Acta* 1418(1): 221-31.
- Garcia, D. A. and Perillo, M. A. (2002). Flunitrazepam-membrane non-specific binding and unbinding: two pathways with different energy barriers. *Biophys Chem* 95(2): 157-



- 64.
- Garcia, D. A. and Perillo, M. A. (2004). Effects of flunitrazepam on the Lalpha-H(II) phase transition of phosphatidylethanolamine using merocyanine 540 as a fluorescent indicator. *Colloids Surf B Biointerfaces* 37(1-2): 61-9.
- Garcia, D. A., Quiroga, S. and Perillo, M. A. (2000). Flunitrazepam partitioning into natural membranes increases surface curvature and alters cellular morphology. *Chem Biol Interact* 129(3): 263-77.
- Garcia, D. A., Vendrell, I., Galofre, M. and Suñol, C. (2008). GABA released from cultured cortical neurons influences the modulation of t-[(35)S]butylbicyclophosphorothionate binding at the GABA<sub>A</sub> receptor. Effects of thymol. *Eur J Pharmacol* 600(1-3): 26-31.
- Gerlier, D. and Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94(1-2): 57-63.
- Gill, A. and Holley, R. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food. Microbiol.* 108(1): 1-9.
- Gill, A. and Holley, R. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food. Microbiol.* 111(2): 170-4.
- Griffin, S., Wyllie, S. G. and Markham, J. (1999). Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 864(2): 221-8.
- Guenette, S., Beaudry, F., Marier, J. and Vachon, P. (2006). Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29(4): 265-70.
- Guenette, S., Helie, P., Beaudry, F. and Vachon, P. (2007). Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet. Anaesth. Analg.* 34(3): 164-70.
- Guidotti, A., Corda, M. G., Wise, B. C., Vaccarino, F. and Costa, E. (1983). GABAergic synapses. Supramolecular organization and biochemical regulation. *Neuropharmacology* 22(12B): 1471-9.
- Hameda, A. B., Elostá, S. and Havel, J. (2005). Optimization of the capillary zone electrophoresis method for Huperzine A determination using experimental design and artificial neural networks. *J Chromatogr A* 1084(1-2): 7-12.
- Hanson, S. M. and Czajkowski, C. (2008). Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. *J Neurosci* 28(13): 3490-9.
- Harless, E. and von Bibra, E. (1847). *Die Ergebnisse der Versuche über die Wirkung des Schwefeläthers*. Erlangen.
- Hawkinson, J., Acosta-Burrue, M., Yang, K., Hogenkamp, D., Chen, J., Lan, N., Drewe, J., Whittemore, E., Woodward, R., Carter, R. and Upasani, R. (1998). Substituted 3beta-phenylethynyl derivatives of 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one: remarkably potent neuroactive steroid modulators of gamma-aminobutyric acidA receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287(1): 198-207.
- Hemmings, H. C., Jr. and Adamo, A. I. (1994). Effects of halothane and propofol on purified brain protein kinase C activation. *Anesthesiology* 81(1): 147-55.
- Hitzemann, R. J. (1989). Effects of non-electrolyte molecules with anesthetic activity on the physical properties of DMPC multilamellar liposomes. *Biochim Biophys Acta* 983(2): 205-11.

- Hosie, A. M., Clarke, L., da Silva, H. and Smart, T. G. (2009). Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacology* 56(1): 149-54.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M. and Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444(7118): 486-9.
- Ipek, E., Tuylu, B. and Zeytinoglu, H. (2003). Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology* 43(1-3): 145-8.
- Irie, Y. and Keung, W. (2003). Rhizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide. *Brain Res.* 963(1-2): 282-9.
- Janes, N., Hsu, J. W., Rubin, E. and Taraschi, T. F. (1992). Nature of alcohol and anesthetic action on cooperative membrane equilibria. *Biochemistry* 31(39): 9467-72.
- Janoff, A. S., Pringle, M. J. and Miller, K. W. (1981). Correlation of general anesthetic potency with solubility in membranes. *Biochim Biophys Acta* 649(1): 125-8.
- Jenkins, A., Greenblatt, E. P., Faulkner, H. J., Bertaccini, E., Light, A., Lin, A., Andreasen, A., Viner, A., Trudell, J. R. and Harrison, N. L. (2001). Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within the GABAA receptor. *J Neurosci* 21(6): RC136.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F. and Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82(2): 503-68.
- Johansson, J. S., Gibney, B. R., Rabanal, F., Reddy, K. S. and Dutton, P. L. (1998). A designed cavity in the hydrophobic core of a four-alpha-helix bundle improves volatile anesthetic binding affinity. *Biochemistry* 37(5): 1421-9.
- Johnston, G. A. (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 69(3): 173-98.
- Johnston, G. A. (2005). GABA(A) receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des* 11(15): 1867-85.
- Jovanovic, J. N., Thomas, P., Kittler, J. T., Smart, T. G. and Moss, S. J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci* 24(2): 522-30.
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M. and Milos, M. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother. Res.* 21(3): 259-61.
- Kandel, L., Chortkoff, B. S., Sonner, J., Laster, M. J. and Eger, E. I., 2nd (1996). Nonanesthetics can suppress learning. *Anesth Analg* 82(2): 321-6.
- Kane, S. A. and Floyd, S. D. (2000). Interaction of local anesthetics with phospholipids in Langmuir monolayers. *Phys Rev E* 62(6): 8400-8408.
- Kennedy, D. and Seely, D. (2010). Clinically based evidence of drug-herb interactions: a systematic review. *Expert. Opin. Drug Saf.* 9(1): 79-124.
- Kim, S., Oh, O., Min, H., Park, E., Kim, Y., Park, H., Nam Han, Y. and Lee, S. (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci.* 73(3): 337-48.
- Kneussel, M. (2002). Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain Res Brain Res Rev* 39(1): 74-83.
- Koblin, D. D., Chortkoff, B. S., Laster, M. J., Eger, E. I., 2nd, Halsey, M. J. and Ionescu, P. (1994). Polyhalogenated and perfluorinated compounds that disobey the Meyer-Overton hypothesis. *Anesth Analg* 79(6): 1043-8.

- Krasowski, M., Hong, X., Hopfinger, A. and Harrison, N. (2002). 4D-QSAR analysis of a set of propofol analogues: mapping binding sites for an anesthetic phenol on the GABA<sub>A</sub> receptor. *J. Med. Chem.* 45(15): 3210-21.
- Krasowski, M. D., Koltchine, V. V., Rick, C. E., Ye, Q., Finn, S. E. and Harrison, N. L. (1998). Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the gamma-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol Pharmacol* 53(3): 530-8.
- Krasowski, M. D., Nishikawa, K., Nikolaeva, N., Lin, A. and Harrison, N. L. (2001). Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABAA receptor beta subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology* 41(8): 952-64.
- Kruger, P. and Losche, M. (2000). Molecular chirality and domain shapes in lipid monolayers on aqueous surfaces. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62(5 Pt B): 7031-43.
- LaBella, F. S., Stein, D. and Queen, G. (1998). Occupation of the cytochrome P450 substrate pocket by diverse compounds at general anesthesia concentrations. *Eur J Pharmacol* 358(2): 177-85.
- Lerner, R. A. (1997). A hypothesis about the endogenous analogue of general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13375-7.
- Li, G. D., Chiara, D. C., Sawyer, G. W., Husain, S. S., Olsen, R. W. and Cohen, J. B. (2006). Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J Neurosci* 26(45): 11599-605.
- Li, J., Sun, J. and He, Z. (2007). Quantitative structure-retention relationship studies with immobilized artificial membrane chromatography II: partial least squares regression. *J Chromatogr A* 1140(1-2): 174-9.
- Liu, H., Ong, S., Glunz, L. and Pidgeon, C. (1995). Predicting drug-membrane interactions by HPLC: structural requirements of chromatographic surfaces. *Anal Chem* 67(19): 3550-7.
- Locci, E., Lai, S., Piras, A., Marongiu, B. and Lai, A. (2004). <sup>13</sup>C-CPMAS and <sup>1</sup>H-NMR study of the inclusion complexes of beta-cyclodextrin with carvacrol, thymol, and eugenol prepared in supercritical carbon dioxide. *Chem Biodivers* 1(9): 1354-66.
- Luscher, B. and Keller, C. A. (2004). Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102(3): 195-221.
- Ma, D., Brandon, N. R., Cui, T., Bondarenko, V., Canlas, C., Johansson, J. S., Tang, P. and Xu, Y. (2008). Four-alpha-helix bundle with designed anesthetic binding pockets. Part I: structural and dynamical analyses. *Biophys J* 94(11): 4454-63.
- Macdonald, R. L. and Olsen, R. W. (1994). GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17: 569-602.
- Macdonald, R. L., Rogers, C. J. and Twyman, R. E. (1989). Kinetic properties of the GABAA receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture. *J Physiol* 410: 479-99.
- MacPherson, R. D. (2001). Pharmaceuticals for the anaesthetist. *Anaesthesia* 56(10): 965-79.
- Malheiros, S. V., de Paula, E. and Meirelles, N. C. (1998). Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim Biophys Acta*

- 1373(2): 332-40.
- Martin, I. (2002). GABA receptors A review of GABA and the receptors to which it binds. P. D. Samantha Manley, Natalie Barker, B.Sc. and Champness, D. a. P. J. Bristol, UK, Tocris Cookson.
- Meijer, L. A., Leermakers, F. A. M. and Lyklema, J. (1999). Self-consistent-field modeling of complex molecules with united atom detail in inhomogeneous systems. Cyclic and branched foreign molecules in dimyristoylphosphatidylcholine membranes. *Journal of Chemical Physics* 110 (13): 6560-6579
- Melo, F., Venancio, E., de Sousa, D., de Franca Fonteles, M., de Vasconcelos, S., Viana, G. and de Sousa, F. (2010). Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24(4): 437-43.
- Meyer, H. (1899). Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 42(2): 109-118.
- Meyer, H. (1901). Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 46(5): 338-346.
- Meyer, K. H. (1937). "Contributions to the theory of narcosis." *Transactions of the Faraday Society* 33(0): 1062-1064.
- Miller, K. W. (1985). The nature of the site of general anesthesia. *Int Rev Neurobiol* 27: 1-61.
- Miller, K. W. (2002). The nature of sites of general anaesthetic action. *Br J Anaesth* 89(1): 17-31.
- Miller, K. W., Paton, W. D., Smith, R. A. and Smith, E. B. (1973). The pressure reversal of general anesthesia and the critical volume hypothesis. *Mol Pharmacol* 9(2): 131-43.
- Mohammadi, B., Haeseler, G., Leuwer, M., Dengler, R., Krampfl, K. and Bufler, J. (2001). Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* 421(2): 85-91.
- Mohr, J. T., Gribble, G. W., Lin, S. S., Eckenhoff, R. G. and Cantor, R. S. (2005). Anesthetic potency of two novel synthetic polyhydric alkanols longer than the n-alkanol cutoff: evidence for a bilayer-mediated mechanism of anesthesia? *J Med Chem* 48(12): 4172-6.
- Müller, M., Pape, H. C., Speckmann, E. J. and Gorji, A. (2006). Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neuroscience* 140(2): 743-51.
- Mullins, L. (1954). Some physical mechanisms in narcosis. *Chem. Rev.* 54(2): 289-323.
- Nandi, N. and Vollhardt, D. (2003). Effect of molecular chirality on the morphology of biomimetic langmuir monolayers. *Chem Rev* 103(10): 4033-76.
- Nau, C. and Strichartz, G. R. (2002). Drug chirality in anesthesia. *Anesthesiology* 97(2): 497-502..
- Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J. P., Sonner, J. M., Delarue, M. and Corringer, P. J. (2011). X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469(7330): 428-31.
- Ohkubo, T. and Shibata, M. (1997). The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J. Dent. Res.* 76(4): 848-51.

- Olsen, R. W. (2006). Picrotoxin-like channel blockers of GABA<sub>A</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6081-2.
- Olsen, R. W., Chang, C. S., Li, G., Hancher, H. J. and Wallner, M. (2004). Fishing for allosteric sites on GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol* 68(8): 1675-84.
- Olsen, R. W., DeLorey, T. M., Gordey, M. and Kang, M. H. (1999). GABA receptor function and epilepsy. *Adv Neurol* 79: 499-510.
- Olsen, R. W. and Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60(3): 243-60.
- Olsen, R. W. and Sieghart, W. (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56(1): 141-8.
- Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Bhat, G. and Pidgeon, C. (1995). Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces. *Anal Chem* 67(4): 755-62.
- Osterberg, T., Svensson, M. and Lundahl, P. (2001). Chromatographic retention of drug molecules on immobilised liposomes prepared from egg phospholipids and from chemically pure phospholipids. *Eur J Pharm Sci* 12(4): 427-39.
- Ottiger, C. and Wunderli-Allenspach, H. (1999). Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC for partition studies of neutral and ionized acids and bases in comparison with the liposomal partition system. *Pharm Res* 16(5): 643-50.
- Overton, C. (1901). Studies on the same time a contribution to the general anesthetic pharmacology. Jena, Switzerland., Gustav Fischer.
- Peetla, C., Stine, A. and Labhasetwar, V. (2009). Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm* 6(5): 1264-76.
- Perillo, M. and García, D. (2001). Flunitrazepam induces geometrical changes at the lipid-water interface. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 20(1): 63-72.
- Perillo, M., García, D., Marin, R. and Zygadlo, J. (1999). Tagetone modulates the coupling of flunitrazepam and GABA binding sites at GABA<sub>A</sub> receptor from chick brain membranes. *Mol. Membr. Biol.* 16(2): 189-94.
- Perillo, M. A. and Arce, A. (1991). Determination of the membrane-buffer partition coefficient of flunitrazepam, a lipophilic drug. *J Neurosci Methods* 36(2-3): 203-8.
- Perillo, M. A. and Garcia, D. A. (1992). Non-labelled benzodiazepines partitioned into synaptosomal membranes: their extraction and quantification by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 6(4): 183-90.
- Perillo, M. A., Garcia, D. A. and Arce, A. (1995). Partitioning of 1,4-benzodiazepines into natural membranes. *Mol Membr Biol* 12(2): 217-24.
- Perillo, M. A., Polo, A., Guidotti, A., Costa, E. and Maggio, B. (1993). Molecular parameters of semisynthetic derivatives of gangliosides and sphingosine in monolayers at the air-water interface. *Chem Phys Lipids* 65(3): 225-38.
- Pidgeon, C., Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Pidgeon, M., Dantzig, A. H., Munroe, J., Hornback, W. J., Kasher, J. S., Glunz, L. and et al. (1995). IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J Med Chem* 38(4): 590-4.
- Pielou, L., D'Arcy, P., 1984. Computers in pharmacy: just what was ordered. *Health Soc Serv J* 94, 72-75.
- Polzin, G. M., Stanfill, S. B., Brown, C. R., Ashley, D. L. and Watson, C. H. (2007).

- Determination of eugenol, anethole, and coumarin in the mainstream cigarette smoke of Indonesian clove cigarettes. *Food. Chem. Toxicol.* 45(10): 1948-53.
- Pomes, A., Rodriguez-Farre, E. and Suñol, C. (1994). Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271(3): 1616-23.
- Prendergast, F. G., Haugland, R. P. and Callahan, P. J. (1981). 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. *Biochemistry* 20(26): 7333-8.
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A. and Sattelle, D. B. (2003). Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* 140(8): 1363-72.
- Pytel, M., Mercik, K. and Mozrzymas, J. W. (2006). Interaction between cyclodextrin and neuronal membrane results in modulation of GABA(A) receptor conformational transitions. *Br J Pharmacol* 148(4): 413-22.
- Rang, H. P., Dale, Maureen M., Ritter, J. M. (2007). RANG AND DALE'S PHARMACOLOGY- 6TH EDITION.
- Reiner, G. N., Labuckas, D. O. and Garcia, D. A. (2009). Lipophilicity of some GABAergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. *J Pharm Biomed Anal* 49(3): 686-91.
- Rho, J. M., Donevan, S. D. and Rogawski, M. A. (1996). Direct activation of GABA<sub>A</sub> receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 497 ( Pt 2): 509-22.
- Richardson, J. E., Garcia, P. S., O'Toole, K. K., Derry, J. M., Bell, S. V. and Jenkins, A. (2007). A conserved tyrosine in the beta2 subunit M4 segment is a determinant of gamma-aminobutyric acid type A receptor sensitivity to propofol. *Anesthesiology* 107(3): 412-8.
- Robertson, B. (1989). Actions of anaesthetics and avermectin on GABA<sub>A</sub> chloride channels in mammalian dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* 98(1): 167-76.
- Rohlf, F. J., Ed. (1984). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Publishing, New York.
- Rudolph, U. and Mohler, H. (2004). Analysis of GABA<sub>A</sub> receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 475-98.
- Sancar, F. and Czajkowski, C. (2011). Allosteric modulators induce distinct movements at the GABA-binding site interface of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Neuropharmacology* 60(2-3): 520-8.
- Sánchez, M. E., Turina, A. V., Garcia, D. A., Nolan, M. V. and Perillo, M. A. (2004). Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 34(2): 77-86.
- Sanna, E., Motzo, C., Usala, M., Serra, M., Dazzi, L., Maciocco, E., Trapani, G., Latrofa, A., Liso, G. and Biggio, G. (1999). Characterization of the electrophysiological and pharmacological effects of 4-iodo-2,6-diisopropylphenol, a propofol analogue devoid of sedative-anaesthetic properties. *Br J Pharmacol* 126(6): 1444-54.
- Santhakumar, V., Wallner, M. and Otis, T. S. (2007). Ethanol acts directly on extrasynaptic

- subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol* 41(3): 211-21.
- Schroeder, F., Morrison, W. J., Gorka, C. and Wood, W. G. (1988). Transbilayer effects of ethanol on fluidity of brain membrane leaflets. *Biochim Biophys Acta* 946(1): 85-94.
- Sedelnikova, A., Erkkila, B. E., Harris, H., Zakharkin, S. O. and Weiss, D. S. (2006). Stoichiometry of a pore mutation that abolishes picrotoxin-mediated antagonism of the GABAA receptor. *J Physiol* 577(Pt 2): 569-77.
- Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 47(2): 181-234.
- Sieghart, W. and Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2(8): 795-816.
- Sigel, E. and Buhr, A. (1997). The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18(11): 425-9.
- Sigel, E. and Luscher, B. (2011). A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABA<sub>A</sub> receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 11(2): 241-6.
- Smith, G. B. and Olsen, R. W. (1995). Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16(5): 162-8.
- Sogaard, R., Werge, T., Bertelsen, C., Lundbye, C., Madsen, K., Nielsen, C. and Lundbaek, J. (2006). GABA<sub>A</sub> receptor function is regulated by lipid bilayer elasticity. *Biochemistry* 45(43): 13118-29.
- Suñol, C., Garcia, D. A., Bujons, J., Kristofikova, Z., Matyas, L., Babot, Z. and Kasal, A. (2006). Activity of B-nor analogues of neurosteroids on the GABA<sub>A</sub> receptor in primary neuronal cultures. *J. Med. Chem.* 49(11): 3225-34.
- Taheri, S., Halsey, M. J., Liu, J., Eger, E. I., 2nd, Koblin, D. D. and Laster, M. J. (1991). What solvent best represents the site of action of inhaled anesthetics in humans, rats, and dogs? *Anesth Analg* 72(5): 627-34.
- Taheri, S., Laster, M. J., Liu, J., Eger, E. I., 2nd, Halsey, M. J. and Koblin, D. D. (1993). Anesthesia by n-alkanes not consistent with the Meyer-Overton hypothesis: determinations of the solubilities of alkanes in saline and various lipids. *Anesth Analg* 77(1): 7-11.
- Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P. A., Barbato, F. and Testa, B. (2003). Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. *J Med Chem* 46(5): 655-65.
- Taillardat-Bertschinger, A., Martinet, C. A., Carrupt, P. A., Reist, M., Caron, G., Fruttero, R. and Testa, B. (2002). Molecular factors influencing retention on immobilized artificial membranes (IAM) compared to partitioning in liposomes and n-octanol. *Pharm Res* 19(6): 729-37.
- Tang, P. and Xu, Y. (2002). Large-scale molecular dynamics simulations of general anesthetic effects on the ion channel in the fully hydrated membrane: the implication of molecular mechanisms of general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16035-40.
- Thirumoorthy, K., Nandi, N. and Vollhardt, D. (2007). Role of dipolar interaction in the mesoscopic domains of phospholipid monolayers: dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylethanolamine. *Langmuir* 23(13): 6991-6.
- Trudell, J. R. (1977). A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. *Anesthesiology* 46(1): 5-10.
- Twyman, R. E., Rogers, C. J. and Macdonald, R. L. (1989). Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol* 25(3): 213-20.

- Ultee, A., Kets, E. P. and Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4606-10.
- Vaes, W. H., Ramos, E. U., Hamwijk, C., van Holsteijn, I., Blaauboer, B. J., Seinen, W., Verhaar, H. J. and Hermens, J. L. (1997). Solid phase microextraction as a tool to determine membrane/water partition coefficients and bioavailable concentrations in vitro systems. *Chem Res Toxicol* 10(10): 1067-72.
- Vale, C., Fonfria, E., Bujons, J., Messeguer, A., Rodriguez-Farre, E. and Sunol, C. (2003). The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclohexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* 117(2): 397-403.
- Vale, C., Pomes, A., Rodriguez-Farre, E. and Suñol, C. (1997). Allosteric interactions between gamma-aminobutyric acid, benzodiazepine and picrotoxinin binding sites in primary cultures of cerebellar granule cells. Differential effects induced by gamma- and delta-hexachlorocyclohexane. *Eur. J. Pharmacol.* 319(2-3): 343-53.
- Vale, C., Vilaro, M. T., Rodriguez-Farre, E. and Suñol, C. (1999). Effects of the conformationally restricted GABA analogues, cis- and trans-4-aminocrotonic acid, on GABA neurotransmission in primary neuronal cultures. *J Neurosci. Res.* 57(1): 95-105.
- Vasiliadis, H. M. and Tempier, R. (2011). Reporting on the prevalence of drug and alternative health product use for mental health reasons: results from a national population survey. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* 18(1): e33-43.
- Wei, W., Zhang, N., Peng, Z., Houser, C. R. and Mody, I. (2003). Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23(33): 10650-61.
- Wie, M. B., Won, M. H., Lee, K. H., Shin, J. H., Lee, J. C., Suh, H. W., Song, D. K. and Kim, Y. H. (1997). Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neurosci. Lett.* 225(2): 93-6.
- Witt, M. R. and Nielsen, M. (1994). Characterization of the influence of unsaturated free fatty acids on brain GABA/benzodiazepine receptor binding in vitro. *J Neurochem* 62(4): 1432-9.
- Witt, M. R. and Nielsen, M. (1994). Differential modulation of brain benzodiazepine receptor subtypes by ricinelaidic acid in vitro. *Biochem Pharmacol* 47(4): 742-4.
- Won, M. H., Lee, J. C., Kim, Y. H., Song, D. K., Suh, H. W., Oh, Y. S., Kim, J. H., Shin, T. K., Lee, Y. J. and Wie, M. B. (1998). Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 254(2): 101-4.
- Wong, F. W., Lin, L. and Lim, D. C. (2009). Drug and herb interactions: searching the web. *Aust. Fam. Physician.* 38(8): 627-33.
- Yamakura, T., Bertaccini, E., Trudell, J. R. and Harris, R. A. (2001). Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 23-51.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K. and White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37(42): 14713-8.