



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

FRACCIONAMIENTO GUIADO POR
BIOENSAYO E IDENTIFICACIÓN DE
BLANCOS MOLECULARES DE
POTENCIAL ACCIÓN ANTIPSICÓTICA
DE CUATRO PLANTAS MEDICINALES
PERUANAS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

LUIS FERNANDO TUME FARFÁN

LIMA – PERÚ

2017

Asesor: Abraham Vaisberg Wolach, Ph.D.

Co-Asesor: Carla Gallo López-Aliaga, MSc

AGRADECIMIENTOS

- A mis mentores Abraham J. Vaisberg, Carla Gallo, Giovanni Poletti y Rosario Rojas, que fueron mi guía en cada uno de los objetivos de esta investigación. Por todas sus enseñanzas tanto en lo personal como en lo profesional.
- A FONDECYT por la beca completa que me permitió dedicarme tiempo completo a mis estudios.
- A Abraham J. Vaisberg por permitirme estar en su laboratorio 18/7 y darme todas las facilidades para el desarrollo de esta tesis. Por sus consejos en varias situaciones que se me presentaron.
- A Malena G. Hurtado, Candy J. Ruiz y David Condori por su ayuda en los experimentos.
- A mi madre y hermanos porque a pesar de la distancia siempre están conmigo.
- Para todos los amigos en LID que hicieron que esta etapa de mi vida sea la más divertida hasta ahora. Menciono solo algunos, perdón si olvido a alguien: Malena G. Hurtado, Juan J. Cueva, Alfredo C. Pices, Daniel C. Pariona, Francisco Quispe, Danitza G. Dávila, Anika G. Eca, Josmell Sevillano, Román C. Acevedo, Romina G. Pacheco y Daniel E. Matos.
- A Elias Zimmerman por brindarme ayuda en el software para el análisis estadístico.
- A Edward G. Málaga-Trillo por sus enseñanzas durante mi estancia en su laboratorio y sobre todo por indirectamente ayudarme a identificar mis errores.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACIÓN.....	04
2.1. Planteamiento del problema.....	04
2.2. Marco teórico.....	06
2.3. Justificación del estudio.....	39
2.4. Objetivos.....	40
3. HIPÓTESIS.....	41
4. METODOLOGÍA.....	42
5. RESULTADOS.....	58
6. DISCUSIÓN.....	82
7. CONCLUSIONES.....	99
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
9. ANEXOS	

RESUMEN

El principal síntoma de la esquizofrenia es la psicosis, caracterizada principalmente por la aparición de alucinaciones y delusiones. En esta investigación, se llevó a cabo el fraccionamiento biodirigido de extractos etanólicos (EE) de 4 plantas (6078, 6518, 7158 y 6521) usadas en la medicina tradicional Peruana para el tratamiento de psicosis. Los extractos y fracciones fueron probados en el modelo animal murino de hiperactividad inducida por Dizocilpina o MK-801 (antagonista del receptor de glutamato tipo N-metil D-aspartato). Se utilizó la prueba de campo abierto (OFT) para medir la hiperactividad y la prueba de inhibición del sobresalto por prepulso (PPI) para medir la respuesta de sobresalto. En la prueba de campo abierto, la fracción apolar A del EE 7158 ($p < 0.05$), la fracción D del EE 6078 ($p < 0.001$) y la fracción A ($p < 0.05$) y D ($p < 0.001$) del EE 6518 ($p < 0.001$) suprimieron los efectos del MK-801. En la prueba de PPI fueron activas las fracciones A, C y D (7158); A, B y C (6078); y todas las fracciones del extracto 6518. Adicionalmente, los ensayos de unión a radioligando y ensayos funcionales indican que los cuatro EEs tienen un efecto sobre receptores involucrados en esquizofrenia.

Palabras clave: esquizofrenia, fraccionamiento biodirigido, MK-801, medicina tradicional, psicosis

ABSTRACT

The main symptom of schizophrenia is psychosis, characterized mainly by the appearance of hallucinations and delusions. In this investigation, we carried out the bioassay-guided fractionation of four ethanolic extracts (EE) obtained from plants used in Peruvian traditional medicine for the treatment of psychosis-like symptoms. Extracts and fractions were tested in the murine animal model of hyperactivity induced by Dizocilpine or MK-801 (N-methyl D-aspartate type glutamate receptor antagonist). We used the open field test (OFT) to measure hyperactivity and the prepulse startle inhibition test (PPI) to measure the startle response. In the open field test, fraction A of EE 7158 ($p < 0.05$), fraction D of EE 6078 ($p < 0.001$) and the fraction A ($p < 0.05$) and D ($p < 0.001$) of EE 6518 suppressed the effects of the MK-801. In the PPI test, fractions A, C and D were active (7158); A, B and C (6078); and all fractions from extract 6518. In addition, radioligand binding assays and functional assays indicate that all four EEs have an effect on receptors involved in schizophrenia.

Key words: schizophrenia, bioassay-guided fractionation, MK-801, traditional medicine, psychosis

1. INTRODUCCION

La esquizofrenia es una enfermedad mental severa e incapacitante que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial.^{1,2} En Perú más de 280 mil personas sufren de esquizofrenia, cuyo principal síntoma es la psicosis. Este trastorno suele iniciarse entre los 15 y 25 años de edad en varones, y entre los 25 y 35 años en las mujeres, generando grandes costos humanos y económicos para el país.³ La esquizofrenia se caracteriza por tener tres tipos de síntomas asociados: (1) síntomas positivos, (2) síntomas negativos y (3) síntomas cognitivos.^{2,4,5} Los síntomas positivos comprenden comportamientos de tipo psicótico, como las alucinaciones y las delusiones.^{6,7} Los síntomas negativos consisten principalmente en apatía, respuestas emocionales ausentes o incongruentes, reducción en el habla, aislamiento social y anhedonia. Cuando hay presencia de síntomas cognitivos el paciente pierde la capacidad de interpretar información y tomar decisiones basadas en esa información, hay una memoria de trabajo pobre e incapacidad para mantener la atención.^{2,8}

Los actuales tratamientos para la esquizofrenia con antipsicóticos son parcialmente efectivos y actúan a través del antagonismo de los receptores de dopamina D₂. Existen dos tipos de antipsicóticos, los típicos (de primera generación) y atípicos (de segunda generación). El antipsicótico atípico más efectivo es la Clozapina, que se une a los receptores de serotonina y dopamina (expresión alta en episodios de psicosis) e induce la liberación de glutamato y D-serina (agonista en el sitio de la glicina del receptor N-metil D-Aspartato) y reduce la expresión de

transportadores de glutamato. Sin embargo, la Clozapina y otros antipsicóticos tienen el inconveniente de que causan efectos secundarios tales como ganancia de peso⁹, disfunción sexual, desequilibrio cognitivo, insomnio, etc.¹⁰ originando que algunos pacientes interrumpan el tratamiento.¹¹⁻¹³

La biodiversidad del Perú ha sido fuente de compuestos bioactivos para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades, en el cual hay drogas aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) que se han obtenido a partir de plantas de la Amazonía peruana.¹⁴ En el Perú, desde tiempos ancestrales, la esquizofrenia ha sido considerada por ciertas comunidades nativas y la describen como “posesión de espíritus malignos”, “susto”, “nerviosismo” o “locura”. Para tales síntomas se han utilizado plantas que muestran tener efectos psicotrópicos, produciendo mejoría en los individuos afectados. Dichas plantas constituyen un gran potencial para la búsqueda de nuevas moléculas que tengan un efecto positivo sobre la esquizofrenia y sus síntomas asociados. Este conocimiento de la medicina tradicional en las comunidades peruanas ha sido transmitido a lo largo de muchas generaciones.¹⁵⁻²⁰ Dado el efecto positivo de los remedios botánicos usados por las personas que practican la medicina tradicional, es probable que éstos contengan moléculas antipsicóticas que sean absorbidas eficientemente a nivel intestinal y puedan atravesar la barrera hematoencefálica para ejercer su efecto neuroléptico con mecanismos diferentes a los antipsicóticos existentes actualmente.⁴

En estudios iniciales llevados a cabo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, financiados por el Instituto de Investigación Médica Stanley y el Instituto Nacional de

Salud Mental de EEUU (NIMH), se colectaron 477 muestras de plantas que las comunidades que practican la medicina tradicional usan para el tratamiento de diversos trastornos mentales. Estas muestras fueron secadas, molidas y maceradas en etanol al 95% para obtener de ellas extractos etanólicos. De los 200 extractos probados a la fecha, 95 presentaron actividad psicotrópica.²¹

En el presente estudio, como parte del procedimiento para la búsqueda de drogas potencialmente antipsicóticas, se realizó el fraccionamiento guiado por bioensayo de cuatro extractos seleccionados en base a su eficacia en las pruebas de campo abierto y de inhibición del sobresalto por prepulso inducidas por dizocilpina (MK-801); ambas pruebas son utilizadas para evaluar la eficacia de nuevas drogas con efecto antipsicótico.²²⁻²⁴ Adicionalmente a las fracciones obtenidas, se le realizaron ensayos de citotoxicidad en cinco líneas celulares de mamíferos para calcular el índice de inhibición del crecimiento (IC50). Finalmente, para la identificación de los blancos moleculares en los cuales estarían haciendo efectos los compuestos presentes en los extractos etanólicos, se realizaron ensayos de unión a radioligando y ensayos funcionales sobre receptores de serotonina, dopamina, glutamato, histamina, colinérgico muscarínico y transportadores de neurotransmisores (dopamina, serotonina y norepinefrina), los cuales han sido involucrados en la patogénesis de la psicosis.

2. PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACION

2.1. Planteamiento del problema

La esquizofrenia es un trastorno mental grave que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. En el Perú más de 280 mil personas sufren de esquizofrenia, cuyo principal síntoma es la psicosis y que suele iniciarse entre los 15 y 25 años de edad en varones, y entre los 25 y 35 años en las mujeres generando grandes costos humanos y económicos para el país. La esquizofrenia genera una discapacidad considerable afectando el desempeño educativo, social y laboral. Las personas con esquizofrenia tienen entre 2 y 3 veces más probabilidades de morir a una edad temprana, debido a la alta tasa de suicidio y complicaciones que pueden aparecer durante la enfermedad como: enfermedades cardiovasculares, metabólicas e infecciosas.²⁵

La psicosis es tratada con fármacos antipsicóticos, sin embargo, estas drogas no logran una reversión completa de los síntomas, y además causan efectos secundarios diversos como la acatisia, la distonía muscular aguda, la discinesia tardía y también pueden producir un deterioro cognitivo general y la contracción de los ganglios basales.¹³ Por estas razones, es necesario buscar nuevas drogas con posibles nuevos blancos moleculares y con efectos secundarios menores.

Este trabajo tiene como objetivo dar los primeros pasos para el descubrimiento de nuevas drogas antipsicóticas, utilizando como fuente la medicina tradicional peruana, que durante mucho tiempo ha hecho uso de productos botánicos para aliviar una serie

de trastornos, entre ellos, los síntomas de la esquizofrenia.¹⁵⁻²⁰ Para ello se propone realizar el fraccionamiento de extractos de plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de la esquizofrenia. La actividad de las fracciones será monitorizada mediante modelos animales y pruebas de citotoxicidad. Adicionalmente los extractos serán evaluados en ensayos de unión a radioligando y en ensayos funcionales para un panel de receptores y transportadores de membrana para así identificar los posibles mecanismos moleculares del efecto antipsicótico.

2.2. Marco teórico

2.2.1 Síntomas de la esquizofrenia

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5), la esquizofrenia se define como un desorden mental o grupo de desórdenes, que involucra un conjunto complejo de trastornos del pensamiento, percepción, afecto y comportamiento social.² Se caracteriza por una amplia variedad de síntomas que incluyen:

- a. Síntomas positivos: Denominados “comportamientos psicóticos” que generalmente no se ven en personas sanas. Las personas con síntomas positivos "pierden contacto" con algunos aspectos de la realidad. Los síntomas incluyen a las alucinaciones, las delusiones, los trastornos del pensamiento (formas inusuales o disfuncionales de pensar) y trastornos del movimiento.^{6,7,25}
- b. Síntomas negativos: Se asocian con trastornos del comportamiento y emociones. Se presenta el “efecto aplanado” (expresión reducida de las emociones a través de la expresión facial o tono de voz), anhedonia (reducción de los sentimientos de placer en la vida cotidiana), dificultad para realizar actividades sociales y reducción del habla.^{6,7,25}
- c. Síntomas cognitivos: Para algunos pacientes, los síntomas cognitivos de la esquizofrenia son sutiles, pero para otros, son más severos y los pacientes pueden notar cambios en la memoria u otros aspectos del pensamiento. Los

síntomas incluyen, una pérdida de la capacidad de interpretar información y tomar decisiones, memoria de trabajo pobre e incapacidad para mantener la atención.²⁵

2.2.2 Hipótesis sobre la etiología de la psicosis

La hipótesis que la psicosis es provocada por una desregulación de la actividad dopaminérgica en el cerebro, está estrechamente vinculada al descubrimiento fortuito de los primeros agentes antipsicóticos eficaces a principios de 1950. La dopamina actúa sobre los circuitos neuronales que sirven como un "filtro" para obtener información entrante que compete para su procesamiento en la corteza prefrontal. Una alteración en este mecanismo, conduciría al disparo de la esquizofrenia.^{7,26}

Situaciones sociales adversas que elevan el estrés, incrementan la estimulación de dopamina de la vía mesocortical y conducen a la eliminación de las sinapsis durante la adolescencia. El desarrollo de la corteza prefrontal en la etapa más temprana de gestación y su etapa final en la adolescencia representa dos periodos críticos en que la proliferación de células y eliminación de las sinapsis, respectivamente, podrían ser influenciadas por factores ambientales.⁵

Evidencias a nivel estructural son el hallazgo de un aumento en el volumen ventricular en pacientes con esquizofrenia. Esto sería consistente con la hipótesis de

que a finales del proceso de maduración en la adolescencia, la eliminación sináptica podría estar vinculada al disparo de la esquizofrenia.²⁷

2.2.3 Hipótesis de neurotransmisores alterados en la esquizofrenia

2.2.3.1 Hipótesis glutamatérgica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central de los mamíferos. El glutamato se une a tres tipos principales de receptores, uno de los cuales, el receptor ionotrópico N-metil-D-Aspartato (NMDA), es importante en la hipótesis de la esquizofrenia. El receptor NMDA tiene importancia en el aprendizaje y memoria.²⁸ La hipofunción del receptor NMDA (Figura 01) es muy notoria en la esquizofrenia. En modelos animales, los antagonistas del receptor NMDA: fenciclidina (PCP), dizocilpina (MK-801) y ketamina, inducen alteraciones de comportamiento en ratones que a nivel molecular están relacionadas con los tres tipos de síntomas de la esquizofrenia.²⁹

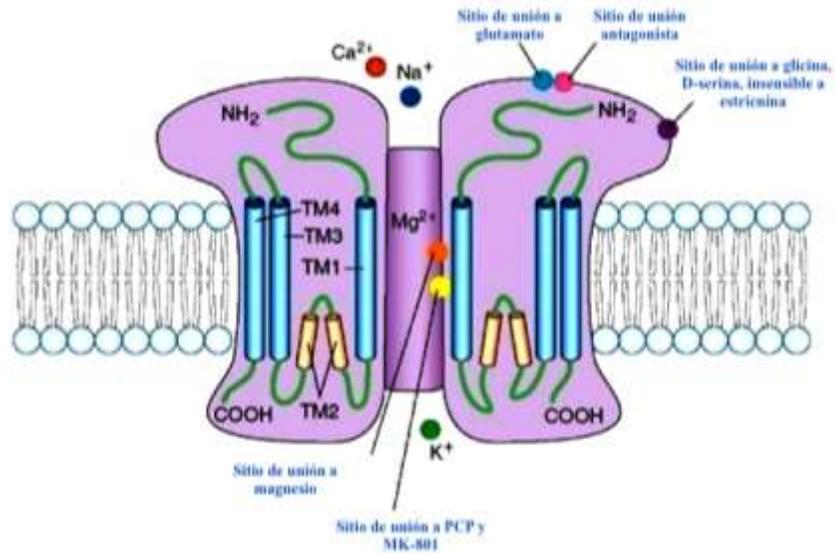


Figura 01. Estructura del receptor NMDA. La hipótesis del glutamato de la esquizofrenia se plantea en parte por el hallazgo de drogas que bloquean los receptores de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) tales como fenciclidina (PCP), dizocilpina (MK-801) y ketamina, las cuales inducen síntomas en individuos sanos que se asemejan a los vistos en pacientes con esquizofrenia (ya sea síntomas positivos, negativos o cognitivos). Además, estas drogas empeoran los síntomas positivos y negativos existentes en los pacientes esquizofrénicos y en modelos animales reproducen un patrón de cambios metabólicos y neuroquímicos similares a los observados en humanos con esquizofrenia.³⁰

2.2.3.2 Hipótesis dopaminérgica

La dopamina se produce en la sustancia negra y en la región tegmental ventral del cerebro. Las proyecciones dopaminérgicas se dividen en los sistemas nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical y tuberoinfundibular (Figura 02). La vía mesocortical es

una vía dopaminérgica que conecta el tegmento ventral a la corteza cerebral en particular los lóbulos frontales. Es una de las cuatro principales vías dopaminérgicas en el cerebro. Es esencial para la función cognitiva normal de la corteza prefrontal dorsolateral, y se piensa que está involucrada en el control cognitivo, la motivación y la respuesta emocional. Esta vía alterada daría origen a conductas psicóticas, tales como las observadas en la esquizofrenia.⁸

Los receptores de dopamina son receptores acoplados a proteína G y se encuentran clasificados en 5 subtipos: D1, D2, D3, D4 y D5. La acción de los agonistas dopaminérgicos está relacionada con la hiperactividad de la dopamina en la psicosis. El aumento de los receptores D2 origina los episodios de psicosis que se correlacionan con la supersensibilidad a la dopamina. Los síntomas positivos de la esquizofrenia incluyen alucinaciones y delirios que son como resultado del aumento de la liberación subcortical de la dopamina, lo que aumenta la activación del receptor D2, y se cree que se debe a una alteración de la vía cortical a través del núcleo accumbens.^{7,31} Los síntomas negativos de la esquizofrenia incluyen la anhedonia, falta de motivación y pobreza del habla, que son el resultado de la reducción de la activación del receptor D1 en la corteza prefrontal y la disminución de la actividad del núcleo caudado. Las alteraciones en los receptores D3 también podrían estar implicadas en los síntomas negativos de la esquizofrenia.³² Esta desregulación de la vía dopaminérgica es el blanco de las drogas antipsicóticas.³³

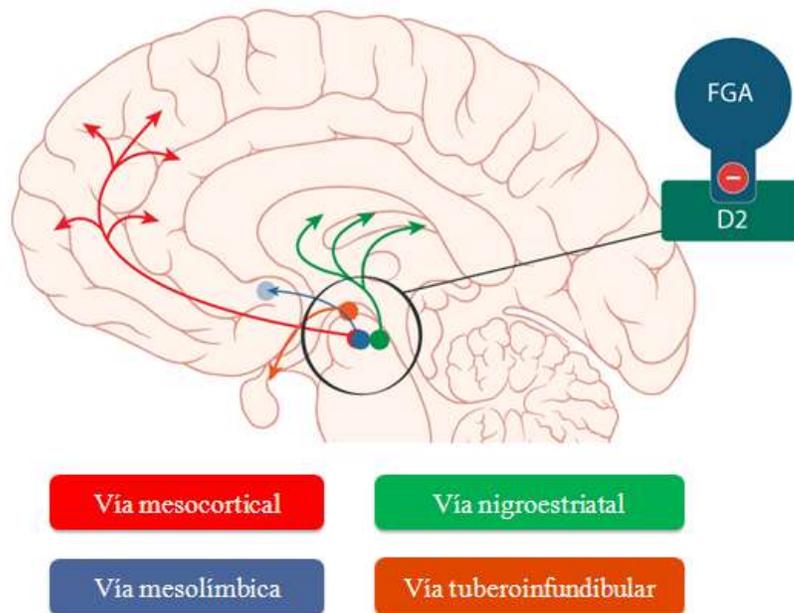


Figura 02. Vías dopaminérgicas alteradas en esquizofrenia. FGA = antipsicóticos de primera generación. Tomado de: Guzman & Farinde 2016.³¹

Las vías del glutamato y las vías dopaminérgicas son dependientes entre sí. Por ejemplo, en las neuronas del núcleo accumbens, la subunidad NR1 del receptor NMDA es coexpresada con los receptores de dopamina D1 y también con receptores opioides. Los receptores NMDA y los receptores D1 en la corteza prefrontal y un exceso de receptores D2 en áreas cerebrales subcorticales tales como el estriado están interconectados entre sí a través de un mecanismo de retroalimentación positiva. Sin embargo, a través de su acción presináptica, la dopamina reduce la liberación de glutamato en las neuronas piramidales de la capa V en la corteza prefrontal. La disfunción del glutamato en la corteza prefrontal y en el hipocampo genera la liberación de dopamina en el estriado.^{32,34}

2.2.3.3 Hipótesis serotoninérgica

La desregulación del neurotransmisor serotonina (5-HT) se ha relacionado a los síntomas negativos en la esquizofrenia. Los antagonistas de 5-HT₂ muestran un efecto antipsicótico, particularmente en el grupo de síntomas negativos. Niveles reducidos de 5-HT en el fluido cerebroespinal se han correlacionado con atrofia cortical o aumento de los espacios ventriculares del cerebro en pacientes con esquizofrenia.^{35,36}

2.2.3.4 Desregulación de transportadores de neurotransmisores

a. Transportador de dopamina (DAT)

Este transportador disminuye en la amígdala de sujetos con esquizofrenia. Esta disminución de DAT puede interrumpir la captación de dopamina, conduciendo a un aumento de la transmisión sináptica dopaminérgica.³⁷

b. Transportador de serotonina (SERT)

El sistema serotoninérgico ejerce efectos moduladores en muchos procesos conductuales/fisiológicos que a menudo se alteran en la esquizofrenia. La terminación de la acción sináptica de la serotonina (5-HT) y su reciclaje son dirigidos por la proteína transportadora de serotonina (SERT). Varios estudios usando radioligandos

específicos que pueden unirse a sitios de captación de 5-HT muestran anomalías regionales en sitios de captación de 5-HT en la esquizofrenia.³⁸

c. Transportador de norepinefrina (NET)

La acción de la norepinefrina está regulada principalmente por su captación en neuronas vía NET. Los genes NET desempeñan un papel importante en la homeostasis monoaminérgica del sistema nervioso central y la variación genética en el NET humano puede influir en la señalización noradrenérgica en el cerebro. NET es un transportador dependiente de NaCl y su actividad de recaptación está regulada por segundos mensajeros y hormonas. Varios estudios han intentado demostrar que los déficits funcionales del gen NET pueden causar enfermedades psiquiátricas; sin embargo, en esquizofrenia no se ha encontrado alguna asociación. Actualmente, ninguna evidencia sugiere que los fármacos relacionados con la recaptación de norepinefrina mejoren los síntomas centrales de la esquizofrenia. Los fármacos antidepresivos que implican la recaptación de norepinefrina no son preferidos debido al riesgo potencial de agravar los síntomas psicóticos.³⁹

2.2.3.5 Desregulación de otros receptores de neurotransmisores alterados en la esquizofrenia

a. *Receptores del glutamato metabotrópicos (mGluR)*

Los mGluRs son receptores acoplados a proteínas G que son ampliamente distribuidos en el sistema nervioso. Ellos son clasificados en receptores tipo I

(mGluR5), II y III, además son expresados en diferentes tipos celulares y cumplen diferentes roles fisiológicos.⁴⁰ La activación de mGluR5 conduce a una actividad mejorada del receptor NMDA (inhibido en esquizofrenia).^{41,42} El receptor mGluR5 es encontrado en las terminales postsinápticas de las neuronas y las células gliales. La activación de mGluR5 glial participa en la gliotransmisión activando la comunicación intracelular entre neuronas y células gliales. Es por eso que alteraciones del mGluR5 glial generan una reducción de la reincorporación de glutamato, dando lugar al desarrollo de desórdenes de comportamiento.⁴³

b. Receptores de histamina

La histamina funciona como un neurotransmisor en el cerebro y juega un rol en el ciclo de sueño, ingesta de alimentos, locomoción, memoria y aprendizaje. La histamina actúa sobre al menos cuatro GPCRs (H1-H4), de los cuales los receptores H1, H2 y H3 son expresados en el sistema nervioso central.⁴⁴ Los GPCRs son una familia de proteínas codificadas en el genoma humano que transducen señales para ligandos de diversas familias de receptores. Los GPCRs son blancos de cerca del 26% de drogas aprobadas por la FDA.⁴⁵ La importancia de este receptor en esquizofrenia radica en estudios de tomografía de emisión de positrones, que muestran que los pacientes con esquizofrenia tienen una reducción de los receptores H1 en la corteza prefrontal y en el giro cingulado.⁴⁶

c. Receptores muscarínicos

Estudios utilizando tejidos post-mortem del sistema nervioso central (SNC) y estudios de neuroimagen han demostrado que hay disminuciones regionales específicas de receptores muscarínicos en pacientes con esquizofrenia, planteando la posibilidad de que los fármacos específicos de los receptores muscarínicos podrían tener efectos beneficiosos sobre los síntomas de la esquizofrenia. Además, ciertas drogas son agonistas parciales de receptores muscarínicos y estas drogas mejoran anomalías en comportamientos modulados por la familia de receptores muscarínicos.⁴⁷

d. Receptor periférico de benzodiazepina (PBR)

Esta es una proteína de 18 kDa que se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial externa y se expresa en distintos tejidos, especialmente en el CNS (glía y células endoteliales). Su expresión en el cerebro ha sido vinculada a condiciones clínicas tales como ansiedad, psicosis, Alzheimer, entre otras.⁴⁸ En pacientes esquizofrénicos con síntomas negativos, hay una reducción del 40–50% de la densidad de PBR en la corteza parietal, área visual primaria y putamen.⁴⁹

2.2.4 Fármacos antipsicóticos

Los fármacos antipsicóticos disminuyen las alucinaciones y el delirio en pacientes con trastornos neuropsiquiátricos, particularmente en la esquizofrenia y el trastorno bipolar, pero varían en eficacia y efectos secundarios, así como en el mecanismo de acción.^{36,50} Para un tratamiento agudo y crónico de los síntomas de la esquizofrenia la

mayoría de psiquiatras elige risperidona, haloperidol, olanzapina y quetiapina cuyos blancos moleculares se muestran en la figura 03. En contraste, para el tratamiento crónico de la sintomatología negativa se utiliza risperidona, aripiprazole, olanzapina, quetiapina y clozapina. Sin embargo, es posible también el uso combinado de antipsicóticos.⁵¹

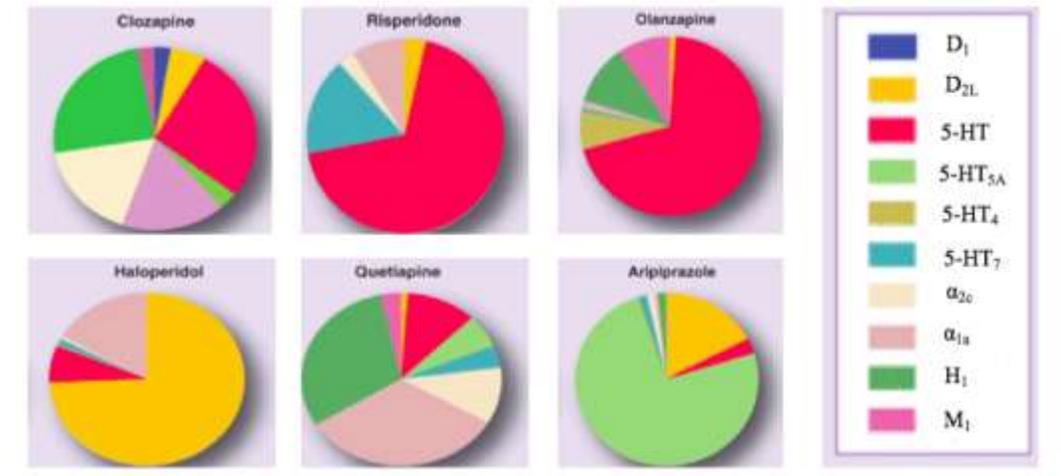


Figura 03. Afinidad de drogas antipsicóticas y sus receptores blancos. (Tomado de Sumiyoshi⁵²).

Antipsicóticos típicos o de primera generación y antipsicóticos atípicos o de segunda generación

El origen de la definición de antipsicóticos típicos y atípicos es debido a que la Clorpromazina, el primer antipsicótico descubierto en 1952, y otros antipsicóticos típicos tienen una acción farmacológica de antagonismo sobre los receptores D₂, produciendo una variedad de efectos extrapiramidales secundarios (EPS), como la discinesia tardía (TD) y el síndrome neuroléptico maligno, debido principalmente al bloqueo de los receptores D₂ en el estriado dorsal.^{36,50}

Un antipsicótico atípico produce menores EPS a dosis clínicamente eficaces. Dos clases de antipsicóticos atípicos están en uso actualmente y varios más están en desarrollo. El grupo más grande de antipsicóticos atípicos, de los cuales la Clozapina es el prototipo, consiste en aquellos que tienen actividad antagonista más potente en los receptores 5-HT_{2A} que en los receptores D₂. A estos se les denomina antagonistas 5-HT_{2A}/D₂. El mecanismo de acción del segundo grupo de antipsicóticos atípicos es el antagonismo del receptor D₂/D₃, pero la mayoría de estos fármacos también tienen efectos serotoninérgicos que pueden contribuir a sus perfiles atípicos. Por ejemplo, la Amisulprida, es también un potente antagonista de 5-HT₇, y la Cariprazina es también un potente antagonista 5-HT_{2B} y un agonista parcial 5-HT_{1A}.³⁶

2.2.5 Modelos animales

2.2.5.1 Uso de los modelos animales

Los modelos animales son una de las herramientas clave para evaluar el efecto de sustancias en la etapa inicial del proceso del descubrimiento de drogas^{12,29} (Figura 04).

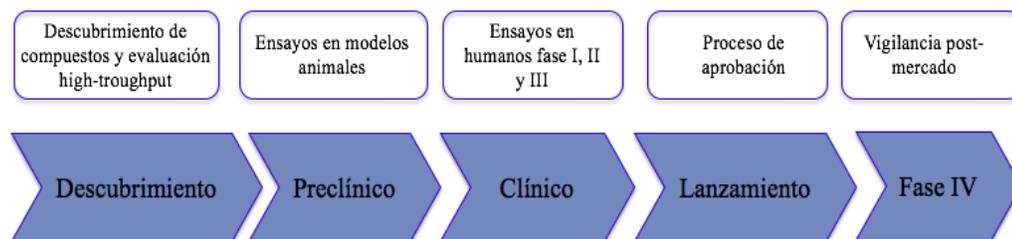


Figura 04. Etapas para el descubrimiento de nuevas drogas.

Los modelos animales son particularmente importantes en el descubrimiento de fármacos con efectos en el comportamiento, ya que modelos de menos complejidad, i.e. células, no darían el mismo tipo de información. Es posible inducir en animales de laboratorio patrones de comportamiento y mecanismos moleculares de respuesta que se asemejan a los observados en determinadas enfermedades mentales de humanos.^{12,51,52}

Así, muchos modelos animales de esquizofrenia han sido desarrollados para el modelamiento de síntomas individuales. Los criterios para la validación, como en todo modelo preclínico son (1) validez aparente, (2) predicción, (3) validez del constructo y (4) validez etiológica, así como (5) reproducibilidad de cada modelo.⁵³⁻⁵⁵

Los modelos animales más utilizados son los inducidos por fármacos que alteran las diferentes vías patofisiopatológicas neuroquímicas, por ejemplo, la administración de agonistas de la dopamina, serotonina, opioides, anticolinérgicos y de antagonistas de los receptores de glutamato.⁵² Uno de los modelos farmacológicos más utilizados es el inducido por MK-801 que afecta la vía glutamatérgica.³³

2.2.5.2 Modelo animal inducido por dizocilpina (MK-801)

La hipofunción de los receptores glutamaérgicos es una de las causas que desencadena algunos síntomas de la esquizofrenia. Como otros antagonistas del receptor NMDA—fenciclidina (PCP) y ketamina, el compuesto MK-801 es el más utilizado en estudios de modelos animales de esquizofrenia.²⁹ MK-801 es un antagonista del receptor NMDA de tipo no-competitivo que en modelos animales

induce comportamientos similares a los observados en la esquizofrenia. MK-801 *in vivo* se une a la subunidad GluN2B del receptor y fármacos como la clozapina inhiben su unión de manera dependiente de dosis.⁵⁶⁻⁵⁸

2.2.5.3 Pruebas de comportamiento para la evaluación de los modelos animales

Las medidas de comportamiento se han utilizado ampliamente para el establecimiento de la validez de los modelos animales de esquizofrenia. Algunas de estas medidas, como la locomoción horizontal, no corresponden a la sintomatología esquizofrénica y han sido principalmente útiles para proporcionar una medida funcional de la actividad antidopaminérgica de los neurolépticos. Otras medidas de comportamiento, como la interrupción de la inhibición del sobresalto por prepulso o deterioro conjunto de atención, se asemejan a ciertas características de la esquizofrenia. Estas medidas son útiles para establecer el constructo y validez predictiva de los modelos animales.^{55,59}

a. Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto (OFT) es una medida común del comportamiento exploratorio y de la actividad general en roedores, donde se puede medir tanto la calidad como la cantidad de la actividad.⁶⁰ Este modelo fue desarrollado en 1934 por Calvin Hall y en la actualidad es uno de los más empleados para estudiar parámetros conductuales animales tales como ansiedad, sedación o valoración de la actividad motora. El campo abierto (OF) es un área cerrada generalmente de forma cuadrada o

rectangular (Figura 05). El resultado de interés es el movimiento locomotor que realiza el animal; sin embargo, esto puede ser influenciado por el sistema motor, el impulso exploratorio, el miedo, presencia de alguna enfermedad, el tiempo relativo en el ciclo circadiano, entre otras variables.^{60,61}

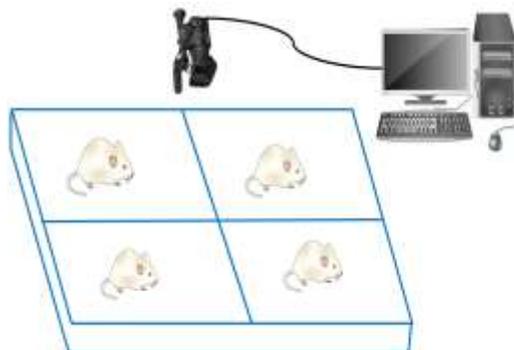


Figura 05. Prueba de campo abierto. Sistema con cuatro campos para evaluación simultánea.

b. Prueba de inhibición del sobresalto por prepulso

El sobresalto es una conducta presente en todos los mamíferos. La respuesta ocurre por una rápida extensión involuntaria y luego una flexión de una serie de músculos.²³ Aunque la respuesta de sobresalto es un reflejo, puede ser modulada por diferentes estímulos. Las reacciones de sobresalto tienden a ser más altas en presencia de amenazas, miedo y dolor. El sobresalto acústico es utilizado como un sistema modelo para estudiar la habituación, la sensibilización, la facilitación del prepulso, la inhibición del condicionamiento clásico, y los efectos de fármacos sobre el comportamiento. Se ha observado que un prepulso acústico produce una inhibición

significativa del reflejo de sobresalto. A este fenómeno se le conoce como inhibición del sobresalto por prepulso (PPI) (Figura 06). Muchos estudios demostraron que la inhibición de la respuesta de sobresalto es modulada por el circuito neural ligado a la corteza límbica, el cuerpo estriado, el pallidum, el tálamo y la formación reticular. El cuerpo estriado y el tronco cerebral están involucrados en la regulación del tono inhibitorio que determina el grado en el que el prepulso inhibe la subsecuente respuesta del sobresalto.⁶² Los pacientes con esquizofrenia presentan incapacidad de inhibir el sobresalto acústico por acción de un prepulso. Se ha sugerido que al menos algunas formas de deficiencia del PPI pueden reflejar síntomas negativos/cognitivos de la esquizofrenia.^{22,23}

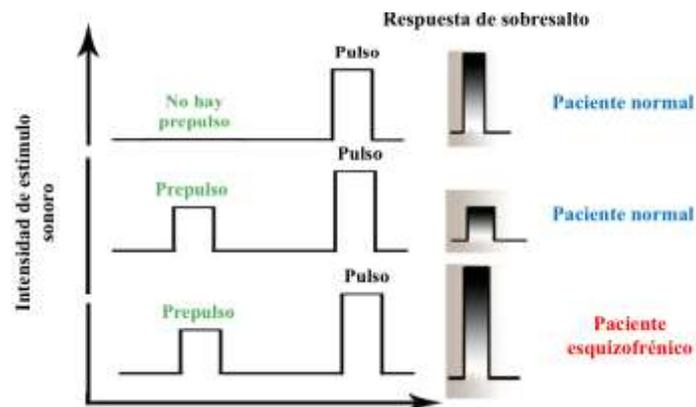


Figura 06. Prueba de inhibición del sobresalto por prepulso. El reflejo de sobresalto es procesado en el tronco del encéfalo en respuesta a una estimulación táctil o auditiva inesperada. Durante el PPI el filtro sensorimotor es evaluado en términos de la reducción en la respuesta de sobresalto. Se muestra que la disminución en la respuesta de sobresalto se debe a la pre-exposición a un estímulo sonoro (prepulso) antes de la presentación un estímulo activador de mayor intensidad (pulso). En la

esquizofrenia, a pesar de existir un prepulso previo, la respuesta a sobresalto se produce igual como si no hubiera prepulso.

2.2.6 Búsqueda de moléculas antipsicóticas a partir de plantas medicinales

El conocimiento tradicional de muchas plantas medicinales usadas en diferentes lugares del mundo para tratar síntomas de enfermedades mentales ha conducido a investigar por medio de modelos animales sus efectos terapéuticos (Tabla 01).

La estrategia inicial en la búsqueda de fármacos a partir de plantas medicinales consiste en obtener un extracto etanólico de la parte involucrada en el efecto medicinal. Posteriormente, si muestra actividad en los modelos experimentales, utilizando diferentes técnicas para la evaluación de productos naturales es posible obtener grupos de compuestos denominados fracciones a partir de un extracto. Este procedimiento de fraccionamiento continúa hasta separar el principio activo para la elucidación de la estructura por métodos como la resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, etc.⁶³

Tabla 01. Ejemplo de extractos o fracciones de plantas probados en modelos animales de psicosis.

Planta	Extracto o fracción	Animal	Inductor	Referencia
<i>Tinospora cordifolia</i>	Hidroalcohólico	Ratones	Anfetamina	Jain <i>et al.</i> ⁶⁴
<i>Cnestis ferruginea</i>	Acuoso	Ratas	Ketamina	Ebuehi & Aleshinloye. ⁶⁵
<i>Rauwolfia vomitoria</i>	Etanólico	Ratas	Ketamina	Ebuehi & Aleshinloye. ⁶⁵
<i>Morinda citrifolia</i>	Metanólico	Ratones	Metanfetamina	Pandy <i>et al.</i> ⁶⁶
<i>Crassocephalum bauchiense</i>	Acuoso y fracción alcaloide	Ratones	Apomorfina	Sotoing <i>et al.</i> ⁶⁷
<i>Lonchocarpus cyanescens</i>	Fracción n-hexano y acetato de etilo	Ratones	Apomorfina	Arowona <i>et al.</i> ⁶⁸
<i>Alstonia scholaris</i>	Etanólico	Ratas	Anfetamina	Jash & Chowdary. ⁶⁹
<i>Bacopa monniera</i>	Etanólico	Ratones	Ketamina	Chaterjee <i>et al.</i> ³³
		Ratas	Anfetamina	Jash & Chowdary. ⁶⁹
<i>Securinega virosa</i>	Fracción acuosa	Ratones	Apomorfina	Magaji <i>et al.</i> ⁷⁰

El Perú es un país diverso en especies vegetales y con un conocimiento tradicional que ha perdurado por siglos en las comunidades indígenas.¹⁵⁻²⁰ Previamente se ha recolectado información de los “curanderos”, “chamanes”, “brujos”, etc. que utilizan plantas medicinales para el tratamiento de muchas enfermedades en donde luego se procedió a la colecta y la obtención de los extractos etanólicos para ser probados en

modelos animales. Las encuestas a personas que practican la medicina tradicional ha permitido hacer una selección de plantas con efecto antipsicótico.²¹

2.2.7 Evaluación química de productos naturales

Las plantas son matrices complejas que sintetizan gran variedad de metabolitos con diferentes propiedades físicas y químicas. Es por eso que el proceso de extracción involucra una serie de procedimientos para convertir el material vegetal en un extracto apropiado tanto para el análisis químico como para la realización de los ensayos biológicos.⁶³

El procedimiento más común para llevar a cabo en un proceso de investigación de productos naturales es la extracción con solventes adecuados. Los disolventes utilizados en un proceso extractivo deben presentar ciertas características, como: solubilizar bien al soluto por extraer; ser selectivos; ser volátiles o de fácil recuperación; tener alto grado de pureza; poseer alta tensión superficial para evitar la formación de espuma; no tóxicos para el ser humano y el medio ambiente. Para conocer la capacidad de extracción o arrastre de cada disolvente existen tablas que los ordenan de acuerdo con su constante dieléctrica, polaridad o fuerza.⁶³

Cuando el disolvente entra en contacto con el material vegetal induce un momento dipolar en las moléculas por ser extraídas y es así como estas interactúan con las moléculas del solvente. La constante dieléctrica permite medir la capacidad de asociación soluto-disolvente y es un valor ligado con la polaridad del mismo. Cuanto más polar sea un disolvente mayor será su constante dieléctrica.⁶³

Tabla 02. Constante dieléctrica de algunos solventes utilizados en la investigación de productos naturales.

Solvente	Formula química	Constante dieléctrica a 25°C
Hexano	C ₆ H ₁₄	1.89
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	9.1
Cloroformo	CHCl ₃	4.87
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	6.02
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	3.88
Etanol	C ₂ H ₆ O	24.3
Metanol	CH ₃ OH	33.6
Agua	H ₂ O	78.3

a. Cromatografía líquida de presión media (MPLC)

La MPLC es una de las diversas técnicas de cromatografía en columna preparativa. La separación bajo presión hace posible el uso de diferentes fases estacionarias. MPLC es una técnica eficiente para la separación preparativa de compuestos orgánicos. La separación cromatográfica de 0.1-100 g de muestra dentro de pocas horas requiere velocidades de flujo entre 5-200 mL min⁻¹ con una presión máxima de 40 bares. La columna es primordial cuando se optimiza una separación cromatográfica preparativa y se deben considerar: la cantidad de muestra a purificar, la cantidad de material de relleno y la longitud de la columna con respecto al diámetro de la columna. Las columnas para MPLC están generalmente hechas de

vidrio grueso recubierto con plástico protector y pueden soportar presiones de hasta 50 bares. La fase estacionaria más frecuentemente utilizada es el gel de sílice, debido a que permite un amplio rango de solventes como eluentes y la elución con velocidades de flujo altas. Para separaciones óptimas que generan una buena resolución es recomendable un tamaño de partícula de 20 μm . La recolección automática de fracciones se puede realizar conectando un colector de fracciones a la columna o por recolecta manual (Figura 07).⁷¹

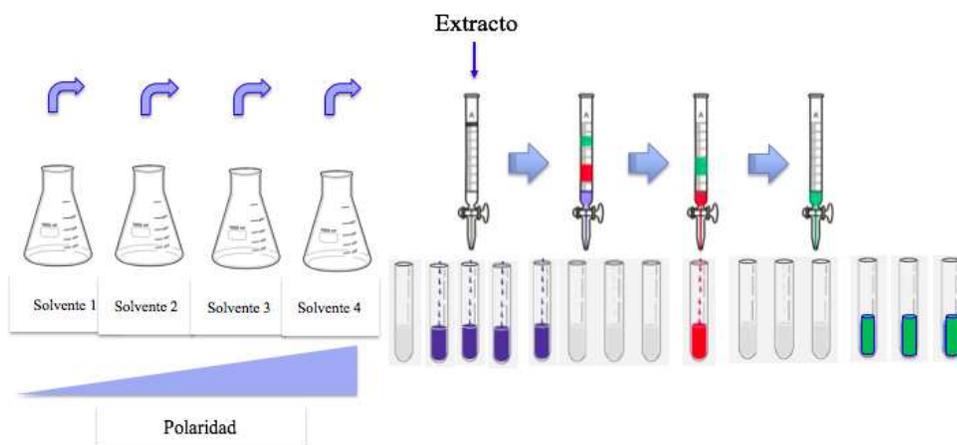


Figura 07. Fraccionamiento de los extractos por MPLC.

b. Cromatografía en capa fina (TLC)

La TLC es una técnica ampliamente utilizada para la identificación de compuestos provenientes de productos naturales. La muestra se aplica sobre una capa delgada de sílica (fase estacionaria). Posteriormente, ésta se coloca en un recipiente con un volumen adecuado de disolvente (fase móvil). Por medio de capilaridad el disolvente migra hacia la parte superior (Figura 08). La detección de compuestos se logra por la

aplicación de químicos reveladores tales como vanilina o por métodos físicos como luz UV. La TLC se realiza como un procedimiento preliminar a la MPLC, ya que permite una evaluación rápida de los solventes que se utilizarán luego en el gradiente de elución de cromatografía líquida. También la TLC se realiza luego de la separación por MPLC, para explorar el grado de pureza de las fracciones.^{63,72}

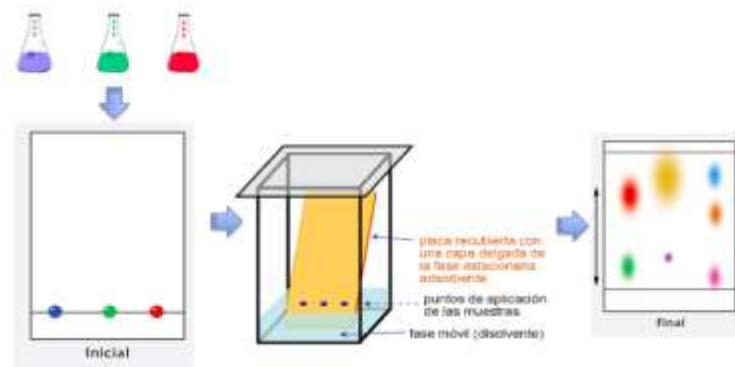


Figura 08. Cromatografía de capa fina de las fracciones de los extractos obtenidas por MPLC. Adaptado de: Biomodel.⁷³

2.2.8 Programa de tamizaje de drogas psicoactivas (Psychoactive Drug Screening Program, PDSP)

Este programa, financiado por el Instituto Nacional de Salud Mental de EE.UU, a cargo de Bryan Roth (University of North Carolina, Chapel Hill), es una plataforma de apoyo para el descubrimiento de nuevas sustancias psicoactivas, mediante pruebas que incluyen ensayos de unión a radioligando y ensayos funcionales en un panel de receptores y transportadores que han sido involucrados en la psicosis.⁷³

2.2.8.1 Ensayo de unión a radioligando

En los ensayos propuestos por Roth para el PDSP,⁷⁴ primero se utilizan experimentos de saturación para determinar la afinidad del ligando marcado para un receptor (constante de disociación de equilibrio, K_d), densidad del receptor (B_{max}) y pendiente de Hill (nH).

La K_d se define como la concentración de un radioligando que ocupa la mitad de una población de un receptor particular. La K_d es determinada experimentalmente y es una medida de la afinidad de una droga a un receptor (interacción ligando-receptor).⁷⁵

Para determinar la K_d , se incuba una masa fija de membranas (con receptor) con concentraciones crecientes de un radioligando hasta llegar a saturación. El punto de saturación, sirve para determinar la B_{max} y la mitad de este valor es la K_d (Figura 09). La unión de alta afinidad se produce a bajas concentraciones de fármaco; y a la inversa, se produce una unión de baja afinidad a una alta concentración de fármaco.⁷⁵

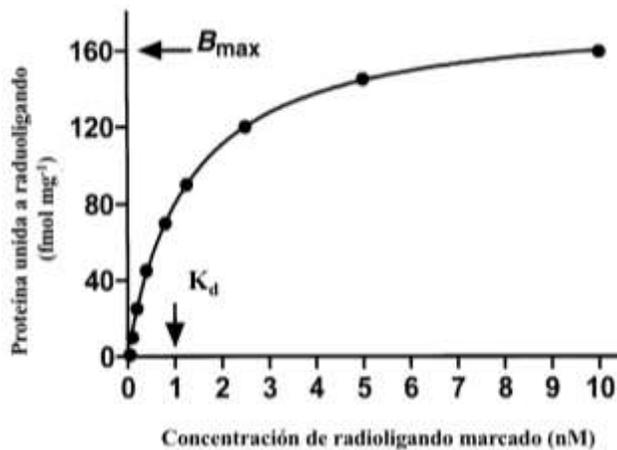


Figura 09. Experimento de unión de saturación. A medida que la concentración del

radioligando incrementa la cantidad unida incrementa hasta llegar a la saturación (B_{max}). A partir de la mitad de la B_{max} , la K_d es extrapolada. La hipérbola rectangular mostrada, es a menudo convertida en un gráfico semilogarítmico. En el ejemplo, la K_d es estimada a $1nM$ ($1 \times 10^{-9} M$). Tomado de: Lambert.⁷⁵

Después de obtener los parámetros anteriores para cada receptor, la afinidad y selectividad de un ligando no marcado para competir por la unión de una concentración fija de un ligando radiomarcado a un receptor se determinan usando un ensayo de unión competitiva (Figura 10).⁷⁶⁻⁷⁸

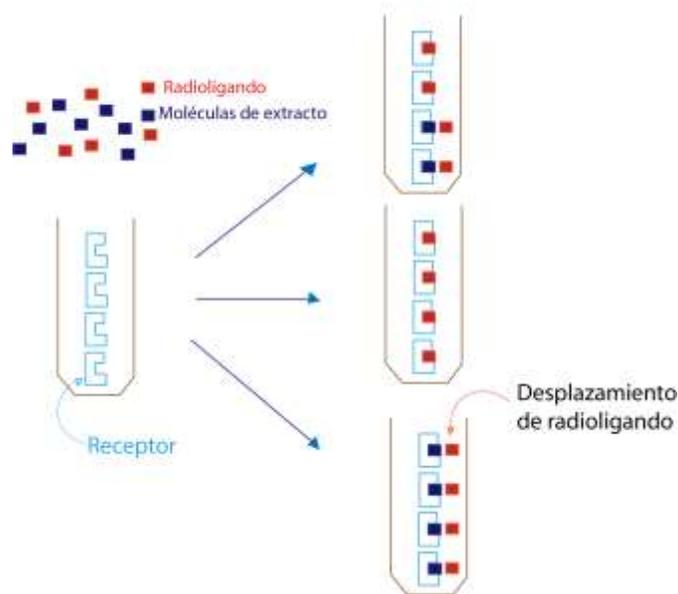


Figura 10. Ensayo de unión competitiva. Se colocan el radioligando específico para cada receptor y si las moléculas contenidas en los extractos tienen afinidad por el receptor competirán con el radioligando, desplazándolo de su sitio de unión.

2.2.8.2 Ensayos funcionales

Los fármacos psicoactivos generalmente ejercen sus efectos uniéndose a un sitio de reconocimiento específico, ya sea que esté asociado con un receptor, un transportador o una enzima alterando su función.⁷⁹

El efecto de interés en la búsqueda de drogas es el agonismo o antagonismo de receptores. Un agonista es un (e.g., fármaco, hormona, metabolito, etc) que se une a un receptor y activa el receptor para producir una respuesta biológica, mientras que un antagonista, es un tipo de ligando del receptor que bloquea o amortigua una respuesta biológica por unión a un receptor.^{22,79}

Dentro de los objetivos de interés para los fármacos psicoactivos se encuentran los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y los receptores que son canales iónicos. Un fármaco que actúa en un GPCR o un receptor de tipo canal iónico puede bloquear el efecto de un agonista endógeno (actuando como un antagonista), imitar el efecto del activador endógeno (actuando como un agonista) o inhibir espontáneamente la activación del receptor. Además, un fármaco puede unirse a un sitio de reconocimiento que es físicamente distinto del sitio de unión al agonista y como resultado, producir cambios alostéricos en la estructura del receptor que aumentan o reducen los efectos del agonista endógeno.⁷⁹

En esta investigación utilizamos los siguientes ensayos funcionales *high throughput* o de alto rendimiento elaborados por el PSDP, descritos por Roth.⁷⁴

a. Ensayo de movilización de calcio con FLIPR TETRA

El lector de placa de imagen fluorescente (FLIPR™) es un método de detección de la activación de GPCR a través de cambios en la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}). El acoplamiento de receptores a la proteína Gq tras la unión estimula el flujo de calcio intracelular, una respuesta funcional que puede ser medida usando colorantes sensibles y un lector de placas con fluorescencia. El instrumento FLIPR™ tiene un sistema de imagen de cámara tipo “dispositivo acoplado a carga” (CCD) que colecta la señal de cada pocillo de una microplaca simultáneamente y puede leer en intervalos de tiempo, lo que permite determinar la cinética y además tiene un pipeteador integrado que puede ser programado para adiciones sucesivas de componentes. El pipeteador integrado brinda la oportunidad para detectar agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos de los GPCRs, todos en un solo ensayo.⁸⁰

En la primera adición, se añaden compuestos de interés de detección. La temporización puede ajustarse para permitir un período de pre incubación con los compuestos y la actividad agonista se detecta mediante el control de la respuesta del flujo de calcio en esta etapa. En la segunda adición, se añade una pequeña cantidad de un agonista conocido que da como resultado un ~ 10% de la respuesta máxima para detectar la actividad potenciadora. La tercera adición consiste en una concentración máxima de agonista conocido (~ 90% de la respuesta máxima) para analizar el antagonismo. Este diseño experimental puede abarcar dos o tres adiciones dependiendo de las respuestas específicas a detectar.⁸⁰

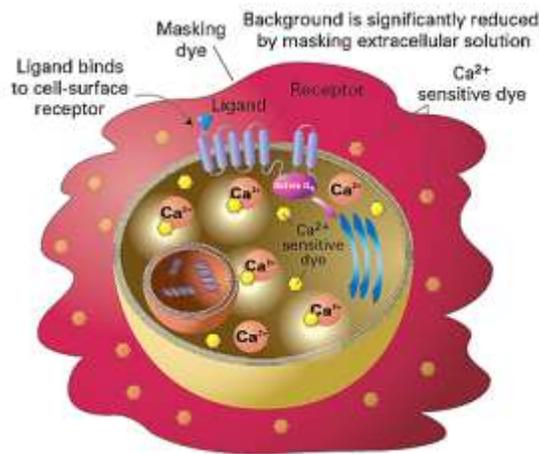


Figura 11. Ensayo de movilización de calcio con FLIPR TETRA para Gq acopladas a GPCRs. El incremento en el calcio citosólico Ca²⁺ puede ser detectado por lectoras de microplacas FLIPR o FlexStation usando colorantes indicadores sensibles a calcio. Obtenido de: Molecular DEVICES.⁸¹

b. Ensayo de biosensor de Adenosina monofosfato cíclico (cAMP) basado en la división de la luciferasa

El ensayo GloSensor™ cAMP presenta un nuevo enfoque para medir los niveles de cAMP en células vivas. El cAMP es un segundo mensajero clave implicado en la transducción de señales de GPCRs que actúan a través de las proteínas G α -s y G α -i. El nuevo ensayo se basa en la Tecnología GloSensor™, una forma genéticamente modificada de luciferasa de luciérnaga en la que se ha insertado una fracción de proteína de unión a AMPc. Tras la unión de cAMP, se induce un cambio conformacional que conduce a un aumento de la emisión de luz. Este ensayo de células vivas sobresale en los estudios de cinética y modulación de la señalización a través de AMPc.⁸²

El ensayo GloSensor™ cAMP se puede utilizar en receptores de interés expresados de modo transitorio o estable en líneas celulares de elección. El protocolo consiste: 1) las células son pre-equilibradas con el reactivo GloSensor™ cAMP durante aproximadamente 2 horas; luego las células se tratan con agonistas/antagonistas o compuestos específicos y la luminiscencia se mide después de 10-30 minutos. No se requieren otras adiciones o manipulaciones de reactivos. Se puede utilizar la mayoría de los luminómetros comunes con inyectores para leer el ensayo.⁸³

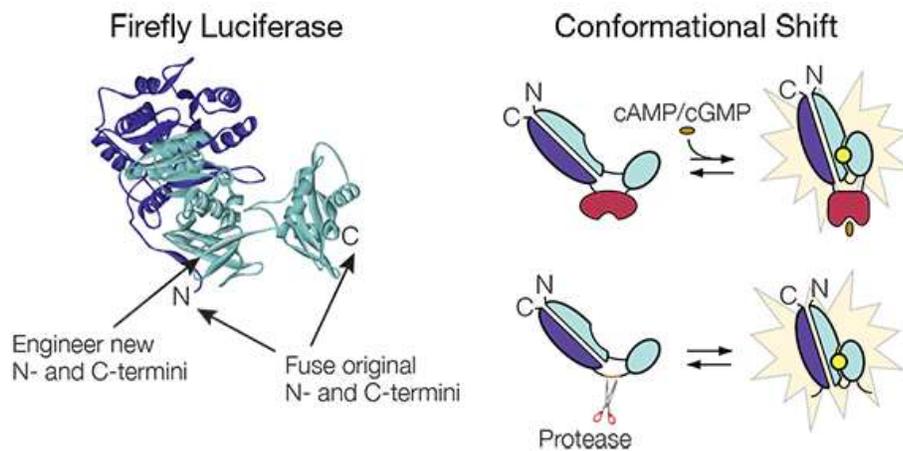


Figura 12. Ensayo de biosensor de cAMP basado en la división de la luciferasa. La luciferasa GloSensor™ se permuta circularmente, uniendo los extremos N y C nativos con un dominio de polipéptido o proteína y creando terminales modificados en otra parte dentro de la estructura. La unión al analito o la escisión por proteasa conduce a un cambio conformacional en el biosensor que promueve aumentos importantes en la actividad de luminiscencia. La magnitud del aumento de la

luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de analito o actividad de proteasa. Obtenido de: Roth.⁷⁴

c. Ensayo GPCR Tango: reclutamiento de beta-arrestina independiente de proteína G

Las β -arrestinas son proteínas citosólicas que se unen a GPCRs, desacoplan a los receptores de las proteínas G y dirigen a los receptores a vesículas endocíticas cubiertas con clatrina. El reclutamiento de β -arrestina es un mecanismo ubicuo de regulación negativa de la señalización GPCRs.⁸⁴

El ensayo Tango™ GPCR de Invitrogen es una plataforma basada en un gen reportero activado por proteasa. La β -arrestina está fusionada a la proteasa TEV, mientras que el GPCR se extiende en su C-terminal con un sitio de escisión de proteasa seguido por el factor de transcripción Gal-VP16. Tras la activación de GPCR, la arrestina marcada con proteasa recluta al receptor y el Gal-VP16 fusionado al receptor se escinde y entra en el núcleo para regular la transcripción de un gen reportero de β -lactamasa. La β -lactamasa cataliza la escisión de un sustrato modificado etiquetado con dos fluoróforos, y puede monitorizarse el cambio en la señal de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre estos dos fluoróforos. Los ensayos Tango™ GPCR han sido validados para una diversidad de GPCRs, incluyendo receptores acoplados a diversas proteínas G y activados por una variedad de tipos de ligandos.⁸⁴

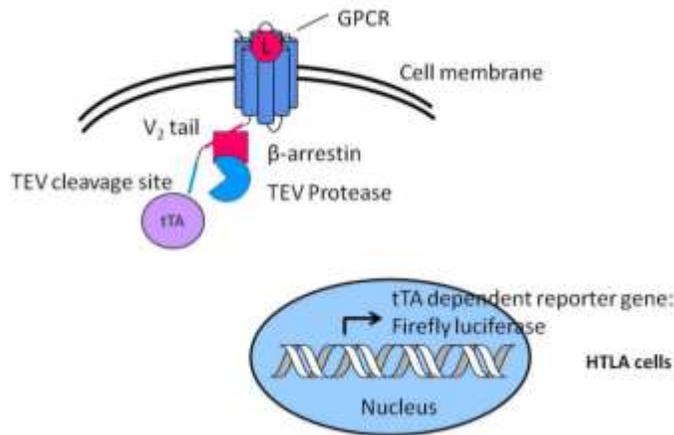


Figura 13. Ensayo GPCR Tango: reclutamiento de beta-arrestina independiente de proteína G. Tomado de: Roth.⁷⁴

d. Ensayo funcional de transportadores de neurotransmisores

El ensayo del transportador de captación de neurotransmisores utiliza un sustrato fluorescente que imita a los neurotransmisores de aminas biogénicas y se introduce en la célula a través de esos transportadores específicos, dando como resultado un aumento de la intensidad de fluorescencia intracelular que se monitorea en tiempo real usando un lector de microplacas.⁸⁵

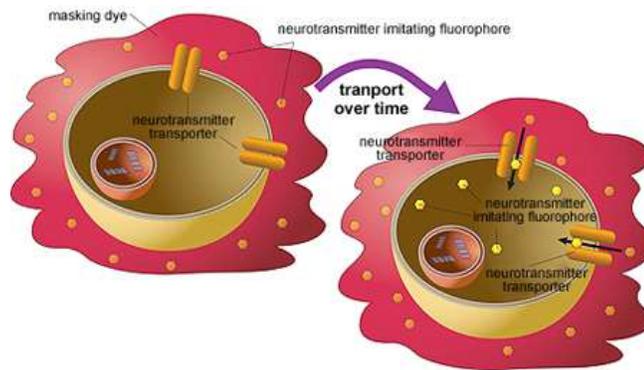


Figura 14. Ensayo funcional de transportadores de neurotransmisores. Obtenido de:

Molecular DEVICES.⁸⁵

e. Ensayo funcional de ERG: ensayo de flujo de talio (Tl⁺) (FluxOR)

Los iones de talio se usan como iones sustitutivos en este ensayo para medir la actividad del canal de potasio de hERG. Esto es posible debido a la permeabilidad selectiva de todos los canales iónicos de potasio para el talio y la fuerte fuerza motriz para la entrada de talio en las células cuando se abren los canales. En resumen, el colorante FluxOR se carga en las células antes del experimento (Figura 15). El colorante FluxOR contiene grupos éster aminometil (AM) que hacen a la molécula permeable a la membrana del medio extracelular. Una vez en el citosol, los grupos éster de AM son cortados por esterasas intracelulares, dando como resultado una especie de colorante cargado que permanece atrapado dentro de las células durante la duración del experimento. El colorante ligado al talio fluoresce sólo cuando se desesterifica y se excita con luz verde. El complejo colorante FluxOR-Tl⁺ tiene un pico de excitación a 495 nm y un pico de emisión a 525 nm. El aumento de la señal de fluorescencia intracelular crece en proporción al número de canales abiertos, por lo tanto la cuantificación de la actividad del canal es posible gracias a la medición cinética de la intensidad de fluorescencia. La señal de fluorescencia intracelular se inhibe en presencia de un bloqueador de los canales hERG y se pueden observar activadores o agonistas con aumentos de la señal por encima de la activación basal.⁸⁶

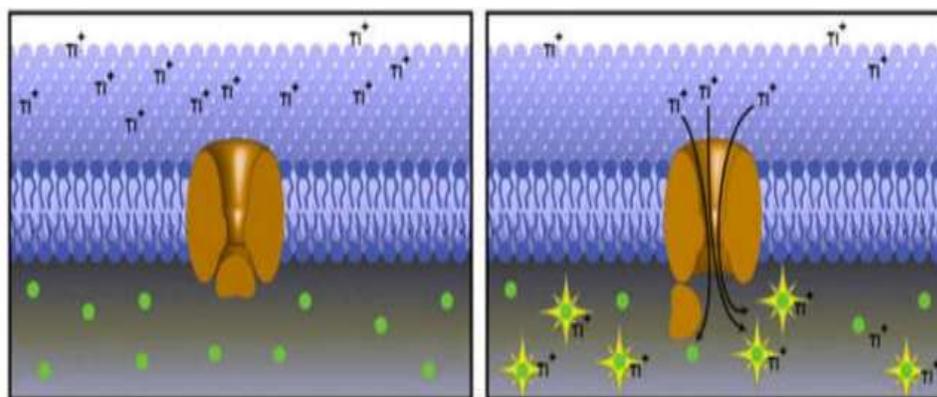


Figura 15. Ensayo Talio FluxOR para la medición de la actividad del canal hERG. Las células que expresan canales de hERG se cargan con colorante del kit de ensayo de talio FluxOR y luego se lavan para eliminar el colorante del medio. Cuando las células son estimuladas, los iones de talio entran en las células a través de los canales hERG abiertos y se unen al colorante, produciendo un aumento de la fluorescencia verde (530 nm) sobre la excitación a 480 nm. Tomado de Titus *et al.*⁸⁶

2.2.9 Evaluación de la citotoxicidad-Ensayo de sulforodamina B

El ensayo de sulforodamina B (SRB) se desarrolló para su uso en el programa de descubrimiento de fármacos anticancerosos a gran escala del National Cancer Institute (NCI). Este ensayo se basa en la capacidad del colorante SRB para unirse electrostáticamente y depender del pH de los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas. Bajo condiciones ácidas suaves, SRB se une a los residuos de aminoácidos básicos de proteínas de las células fijadas con ácido tricloroacético (TCA). Puede ser extraído cuantitativamente de las células y solubilizado para la medición de la densidad óptica (DO) por Tris pH 10.5.^{87,88}

La inhibición del crecimiento (IC50) es una medida de la citotoxicidad in vitro. Esto se define como la concentración que reduce un 50% el crecimiento celular en comparación con el control sin fármaco. En el NCI, se definió el IC50 (concentración que causa la inhibición del crecimiento del 50%). El IC50 se corrige para el recuento de células en el tiempo cero (comienzo de la exposición al fármaco) y sigue la siguiente ecuación:

$$IC=100 \times (T - T_0) / (C - T_0)$$

En la que T es la DO después de la exposición a una cierta concentración de un fármaco, T₀ es la DO al inicio de la exposición al fármaco y C es la DO del control (DMSO). Para determinar la respuesta de un fármaco en un panel de líneas celulares, se utiliza una regresión lineal a partir de una serie de diluciones.⁸⁷

3.3 Justificación del estudio

Existe la necesidad de encontrar nuevos fármacos para el tratamiento de la psicosis, que se presenta principalmente en pacientes con esquizofrenia. Se busca descubrir compuestos que, a diferencia de los fármacos antipsicóticos típicos y atípicos, actúen bajo diferentes mecanismos moleculares para reducir la psicosis con menores efectos secundarios. Las moléculas contenidas en las fracciones obtenidas en este estudio podrían generar patentes, dándole un valor agregado a los productos naturales nativos de la biodiversidad peruana.

3.4 Objetivos

3.4.1 General

Fraccionamiento guiado por bioensayo (campo abierto e inhibición por prepulso) e identificación de blancos moleculares alterados en la psicosis de cuatro extractos obtenidos a partir de plantas usadas en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de los síntomas de la esquizofrenia.

3.4.2 Específicos

- i.** Realizar el fraccionamiento guiado por los bioensayos (prueba de campo abierto e inhibición del prepulso), de cuatro extractos con actividad antipsicótica.
- ii.** Identificar la inhibición de unión a radioligando y actividad funcional que originan los cuatro extractos sobre receptores alterados en la psicosis.
- iii.** Evaluar la citotoxicidad in vitro de los extractos y fracciones activas.

3. HIPOTESIS

Los extractos etanólicos y las fracciones obtenidas por fraccionamiento biodirigido por su efecto antipsicótico de plantas usadas en medicina tradicional peruana para el tratamiento de psicosis contienen compuestos potencialmente antipsicóticos, con acción sobre receptores relacionados a la patogénesis de la psicosis.

4. METODOLOGÍA

4.1. Extractos de Plantas

Se utilizaron cuatro plantas que de acuerdo a su uso en la medicina tradicional Peruana tienen actividad psicotrópica (Tabla 03), cuyos extractos etanólicos son activos en las pruebas de campo abierto y de inhibición del sobresalto por prepulso, más no en otras pruebas que podrían indicar actividades psicotrópicas diferentes, tal como actividad antidepresiva o actividad ansiolítica. Se trabajó con las plantas identificadas con los códigos 7158, 6078, 6518 y 6521. Se utilizó una cantidad de planta seca molida (Tabla 04) y se maceró en etanol al 95% en donde durante 1 semana en intervalo de dos días se filtró el solvente y se recolectó en un balón de 500 ml. El solvente contenido del balón fue evaporado en un rotavapor (Buchi™) y luego el extracto crudo fue colocado en una estufa a 40°C para evaporar completamente las trazas de solvente. Posteriormente, los extractos fueron pesados para calcular su rendimiento (Tabla 03) y almacenados a -20°C para su uso posterior.

Tabla 03. Uso tradicional de las plantas seleccionadas

Extracto	Usos tradicionales	Descripción de la preparación tradicional	Parte de la planta utilizada
7158	Nervios	Infusión	Toda la planta
6078	Acompañante de preparados para tratar enfermedades mentales	Se hierven y se bebe antes de las comidas.	tallos y hojas
6518	Pena, corazón, nervios	Infusión	Flores
6521	Mal del corazón, nervios, susto	Infusión	Fruto

Tabla 04. Extractos obtenidos por maceración con etanol al 95%

Código de la planta	Planta procesada (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
7158	150	45.6	30.4
6078	100	8.9	8.9
6518	100	8.0	8.0
6521	100	14.6	14.6

4.2. Animales

Se utilizaron ratones albinos machos Swiss de aproximadamente 25-35 g obtenidos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Se mantuvo 8 animales por caja de acrílico con cama de viruta en condiciones de humedad (40-70%) y temperatura constante (25 °C), con fotoperiodo controlado de luz/oscuridad 12/12 h y con alimentación *ad libitum*. Los animales fueron aclimatados por 7 días antes de comenzar los ensayos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la UPCH (Código 66774). Todas las pruebas fueron llevadas a cabo de 6:30 am a 4:00 pm evitando ruido dentro y en los exteriores del área de trabajo. Después de cada prueba las superficies de los sistemas de ensayo fueron limpiadas con etanol al 70% cinco minutos antes de la entrada del segundo animal.

4.3. Fraccionamiento de los extractos y evaluación química de los extractos

Previamente a la selección de la polaridad de la columna y tipo de solventes a utilizar para el fraccionamiento, se realizó una cromatografía en capa fina de cada extracto. Para el fraccionamiento de los extractos se utilizó la técnica de cromatografía líquida

a presión media (MPLC). Se utilizó gel de sílice con un tamaño de partícula de 15-40 μm , una velocidad de flujo de 20 ml/min, presión de 8 bar y una cantidad de muestra de 1 gramo. Se utilizaron diferentes sistemas de solventes para dar lugar a un gradiente de polaridad.⁷³ Para ello, las fracciones se colectaron en tubos de 20 ml y seguidamente de ello se hicieron cromatografías en capa fina para poder agrupar los tubos con los mismos componentes y obtener fracciones. Posteriormente las fracciones se concentraron en el rotavapor a presión reducida que dependió del solvente. Finalmente se pesó lo contenido en el balón y se calculó el rendimiento de cada fracción.

Para la cromatografía en capa fina se emplearon placas de gel de sílice (cromatofolios Merck® de aluminio gel de sílice 60 F254 o RP18), usando sistemas de elución de acuerdo a las características de las fracciones que se obtengan por MPLC. Para el revelado de los compuestos presentes en las muestras se empleó luz UV (254 y 365 nm) y vanilina-ácido sulfúrico (15 g de vanilina en 250 ml de etanol + ácido sulfúrico concentrado 2.5 ml).

a. Fraccionamiento del extracto 7158

Al fraccionar por medio de MPLC al extracto etanólico 7158, se comenzó con 200 ml del sistema éter de petróleo: acetato de etilo (AcOEt) (9:1), luego 300 ml de éter de petróleo: AcOEt (8:2), 600 ml de éter de petróleo: AcOEt (7:3), 500 ml de éter de petróleo: AcOEt (1:1), 200 ml de AcOEt y 200 ml de metanol (MeOH). La elución fue colectada en tubos de 20 ml. Se realizó una cromatografía de capa fina (fase

normal) del contenido de cada tubo de 20 ml recolectado en orden de elución. De acuerdo a la similitud en el factor de retención (R_f) de los componentes observados en el TLC los tubos fueron agrupados como A (desde el tubo 1-12), B (desde el tubo 13-29), C (desde el tubo 30-49) y D (desde el tubo 50-92).

b. Fraccionamiento del extracto 6078

El fraccionamiento del extracto 6078 requirió el uso de una fase estacionaria reversa. Por lo tanto, para la MPLC se comenzó utilizando 200 ml de H_2O , 380 de ml H_2O : MeOH (1:1), 250 ml de MeOH, 200 ml de MeOH: acetonitrilo (CH_3CN) (7:3), 200 ml MeOH: CH_3CN (3:7) y 300 ml CH_3CN . La elución fue colectada en tubos de 20 ml. Se realizó una cromatografía de capa fina (fase reversa) del contenido de cada tubo de 20 ml recolectado en orden de elución. De acuerdo a la similitud en el factor de retención (R_f) de los componentes observados en el TLC los tubos fueron agrupados como A (desde el tubo 1-17), B (desde el tubo 18-36), C (desde el tubo 37-42) y D (desde el tubo 43-68).

c. Fraccionamiento del extracto 6518

Al fraccionar por medio de MPLC el extracto etanólico 6518, se comenzó con 400 ml de éter de petróleo: diclorometano (CH_2Cl_2) (1:1), 200 ml de éter de petróleo: CH_2Cl_2 (3:7), 200 ml de CH_2Cl_2 : AcOEt (7:3), 200 ml de CH_2Cl_2 : AcOEt (3:7), 200 ml de CH_2Cl_2 : AcOEt (1:9), 200 ml de AcOEt: MeOH (9:1), 450 ml de AcOEt: MeOH (5:5), 450 ml de MeOH. La elución fue colectada en tubos de 20 ml. Se realizó una

cromatografía de capa fina (fase normal) del contenido de cada tubo de 20 ml recolectado en orden de elución. De acuerdo a la similitud en el factor de retención (Rf) de los componentes observados en el TLC los tubos fueron agrupados como A (desde el tubo 1-30), B (desde el tubo 31-48), C (desde el tubo 49-56) y D (desde el tubo 57-72).

d. Fraccionamiento del extracto 6521

Para fraccionar el extracto etanólico 6521, se comenzó con 400 ml de éter de petróleo: CH₂Cl₂ (2:8), 200 ml de CH₂Cl₂, 200 ml de CH₂Cl₂: AcOEt (8:2), 200 ml de CH₂Cl₂: AcOEt (5:5), 200 ml de AcOEt: MeOH (7:3), 300 ml de AcOEt: MeOH (2:8) y 200 ml de MeOH. La elución fue colectada en tubos de 20 ml. Se realizó una cromatografía de capa fina (fase normal) del contenido de cada tubo de 20 ml recolectado en orden de elución. De acuerdo a la similitud en el factor de retención (Rf) de los componentes observados en el TLC los tubos fueron agrupados como A (desde el tubo 1-7), B (desde el tubo 8-18), C (desde el tubo 19-24) y D (desde el tubo 25-38).

e. Dosificación de fracciones y drogas

La preparación de las fracciones, extractos, MK-801, Clozapina, vehículo y solución salina fue llevada a cabo un día antes de su uso. Los ratones que fueron utilizados en el experimento fueron asignados al azar con el programa “Random Number Generator” (random.org) en donde cada grupo para la prueba de campo abierto

contenía 6 individuos y 4 individuos para la prueba de inhibición del sobresalto por prepulso. El número de individuos fue calculado según lo propuesto por Festing *et al.*⁸⁹ y Charan *et al.*⁹⁰ Para los experimentos de campo abierto e inhibición del sobresalto por prepulso se utilizaron tres grupos como control (Grupo 01: inoculación vía oral del vehículo que consiste en 100 mg/kg de DMSO + Agua ultrapura; Grupo 02: inoculación vía oral del vehículo + el inductor 10mg/kg MK-801 vía intraperitoneal; y Grupo 03: Inoculación vía oral del antipsicótico control 10 mg/kg clozapina (Sigma Aldrich®) + 10mg/kg MK-801 vía intraperitoneal. Además de estos tres grupos se utilizaron 6 grupos adicionales (Grupo 04: Extracto (150mg/kg) + MK-801 (10mg/kg); Grupo 05: reconstituido de extracto (agrupación de las cuatro fracciones para llegar a las dosis de 150 mg/kg) + MK-801 (10mg/kg); Grupo 06: Fracción A + MK-801 (10mg/kg); Grupo 07: Fracción B + MK-801 (10mg/kg); Grupo 08: Fracción C + MK-801 (10mg/kg) y Grupo 09: Fracción D + MK-801 (10mg/kg). El vehículo, clozapina, extracto, sumatoria de fracciones y fracciones fueron administradas por vía oral con una sonda gástrica. La concentración de cada fracción dependió del rendimiento y por medio de regla de tres se calculó el peso para llegar a la dosis proporcional (Figura 16).

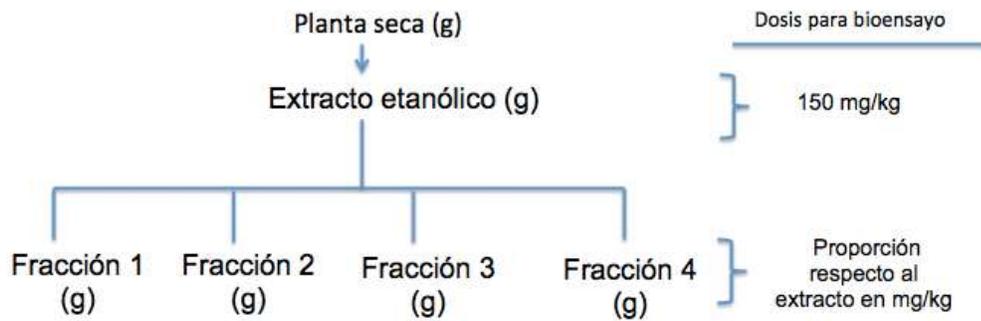


Figura 16. Representación de dosificación para las fracciones obtenidas de cada extracto. La proporción se calcula por medio de regla de tres, dependiendo del rendimiento obtenido para cada fracción.

4.4. Pruebas de comportamiento

Para evitar utilizar muchos animales, los ratones pasaron por la prueba menos estresante (campo abierto) y dos semanas después fueron utilizados con la prueba de inhibición del sobresalto por prepulso.^{56,91,92}

a) Prueba de campo abierto

Para esta prueba se utilizó un campo abierto de madera con cuatro divisiones de igual medida. (San Diego Instruments). Se inocularon a los ratones por vía oral ya sea vehículo, clozapina, extracto o fracciones una hora antes de iniciar la prueba y por vía intraperitoneal MK-801 o solución salina 5 minutos antes de ingresar al campo para ser evaluados. Cada individuo fue colocado en el centro de cada una de las cuatro divisiones y durante treinta minutos se les permitió moverse libremente, monitoreando la actividad mediante el sistema de video Smart versión 2.5.14 (San Diego Instruments) que capturó y registró la distancia total recorrida en los 30

minutos en intervalos de 5 minutos. Los datos fueron reportados en formato Excel para su análisis estadístico con GraphPad Prism 7.0a.

b) Prueba de sobresalto por prepulso

Se utilizaron ratones con una edad entre 8-12 semanas (edad promedio ideal 10 semanas) dos semanas después de su uso en campo abierto.⁶² Se utilizó el equipo SR-LAB (San Diego Instruments) que consistió en una cabina que aísla el ruido exterior de 5 x 10 cm transparente que se coloca dentro de la cámara iluminada y con ventilación propia, en la parte superior se encuentran los dispositivos que emiten los estímulos acústicos, mientras que en la parte inferior se encuentran los sensores de movimiento. Para esta prueba los ratones fueron inoculados vía oral con el medicamento una hora antes de iniciar la prueba y quince minutos antes vía intraperitoneal con el inductor antes de ingresar al instrumento. Los ratones tuvieron cinco minutos de aclimatación con un sonido constante en el fondo y posteriormente fueron evaluados durante 15 minutos en los cuales sus reacciones fueron monitoreadas mediante un sistema automático. Se utilizaron tres niveles diferentes de prepulso: 79, 82 o 88 decibeles, en una secuencia preestablecida y para el pulso se utilizarán 120 decibeles.

El % de inhibición del sobresalto por prepulso se determina con la siguiente fórmula:

$$\%PPI = 100 - \left(\frac{\text{Respuesta al prepulso (79, 82 o 88)}}{\text{Respuesta al pulso (120 dB)}} \right) \times 100$$

4.5. Identificación de blancos moleculares-Programa de Tamizaje de Drogas Psicoactivas del NIMH (PDSP).

Los ensayos para la identificación de blancos moleculares fueron realizados por el Dr. Bryan Roth en la universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill (EE. UU), los cuales consistieron en ensayos de unión a radioligando y ensayos funcionales en el panel de receptores especificados en las tablas 05 y 06.⁷⁴

a. Ensayo de unión a radioligando

Para este ensayo se utilizaron cultivos de células que han sido transfectadas con receptores específicos. En la tabla 05 se especifican las líneas celulares, ligandos de referencia, tipo de transfección. Los protocolos de preparación de buffers, preparación de membranas y condiciones experimentales se describen en el libro de protocolos establecido por el Dr. Bryan L. Roth.⁷⁴

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	a	c	e	g	i	k	m	o	q	s	●
B	●	a	c	e	g	i	k	m	o	q	s	●
C	●	a	c	e	g	i	k	m	o	q	s	●
D	●	a	c	e	g	i	k	m	o	q	s	●
E	●	b	d	f	h	j	l	n	p	r	t	●
F	●	b	d	f	h	j	l	n	p	r	t	●
G	●	b	d	f	h	j	l	n	p	r	t	●
H	●	b	d	f	h	j	l	n	p	r	t	●

Figura 17. Ensayos de unión a radioligando. La placa de 96 pocillos es diseñada para 20 compuestos (compuestos de “a” hacia “t” en las columnas 2 a 11, cada uno en cuádruplicado) y un compuesto de referencia (columna 12). 25 µl por pocillo a 5x de

la concentración final de 10 µg/ml. La columna 1 contiene solo buffer y es designada como “unión total” (0% de inhibición). La columna 12 contiene un compuesto de referencia y es designada como unión no específica (100% de inhibición). Obtenida de: Roth.⁷⁴

La unión no específica en presencia de 10 µM del radioligando para cada receptor (tabla 05) se estableció como 100% de inhibición; la unión total en la ausencia de los extractos o el compuesto de referencia es establecida como 0% de inhibición. La radioactividad en presencia del extracto se calculó con la siguiente ecuación y expresada como porcentaje de inhibición.

Para los cálculos de los ensayos de unión se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{Unión total} - \text{Unión no específica}}{\text{Unión total del control} - \text{Unión no específica del control}} \right) \times 100$$

Consideraremos una actividad positiva si muestra un porcentaje de inhibición mayor al 30%.

Tabla 05. Lista de receptores, ligandos y líneas celulares usados por el PDSP para hacer pellets de membrana para ensayos de unión a radioligando. Todos los clones son líneas celulares estables. Las células transfectados transitoriamente están marcadas con “*”.⁷⁴

RECEPTOR	LIGANDO	LINEA CELULAR	MEDIO
Serotoninérgicos			
5-HT2B	[3H]LSD	HEK estable	2 µg/ml Puromicina
5-HT2C	[3H]Mesulergina	Flp-IN HEK	DMEM 100 µg/ml Higromicina B
5-HT1A	[3H]8-OH-DPAT	CHO estable	500G418
5-HT6	[3H]LSD	HEK estable	500 G418
5-HT7	[3H]LSD	HEK estable	2 µg/ml Puromicina
5-HT1D	[3H]GR125743	HEKT*	COS/HEK
Dopamina			
D1	[3H]SCH23390	HEKT*	COS/HEK
D2	[3H]N-Metilspiperona	Fibroblastos estables	COS/HEK
Transportadores de neurotransmisores			
DAT	[3H]WIN35428	HEKT estable	500 G418
NET	[3H]Nisoxetina	HEKT estable	hNET (250 G418)
SERT	[3H]Citalopram	HEKT estable	hNET (250 G418)
Histamina			
H1	[3H]Pirilamina	HEK estable	500 G418
H2	[3H]Tiotidina	HEK estable	500 G418
Acetilcolina muscarínico			
M3	[3H]QNB	CHO estable	502 G418
mGluR			
mGluR5		CHO	2 µg/ml Puromicina
Otros			
PBR	[3H]Oxitocina	-	-
hERG	[3H]Dofetilida	HEK	500µg/ml G418

b. Ensayo funcional

Todos los ensayos funcionales fueron realizados sobre líneas celulares transfectadas.⁷⁴ Detalles del tipo de receptor, referencia, línea celular, E max (veces), pEC50 (algoritmo negativo de EC50) y pendiente de Hill se describen en la Tabla 06. Los ensayos fueron realizados por triplicado a la concentración final de 10 µg/ml. Los resultados fueron normalizados y transformados a valores de porcentajes.

Para agonistas, la actividad antagónica de referencia a 10 µM fue establecida como 100% y la actividad basal con buffer como 0%. Para receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) sin un agonista conocido como referencia (receptores “huérfanos”), se consideró la actividad como un valor de porcentaje del basal (con buffer). Los cálculos fueron realizados con la siguiente fórmula:

$$\text{Respuesta} = \text{Actividad basal} + \left(\frac{\text{Respuesta máxima} - \text{actividad basal}}{1 + 10^{(\text{LogEC50} - X)n}} \right) \times 100$$

En la cual X es la concentración agonista y n es la pendiente de Hill; EC50 es la concentración que genera un 50% del nivel de actividad (concentración media efectiva máxima).

Para antagonistas, la actividad basal con buffer fue establecida como 100% de inhibición y la actividad de la EC80 del agonista de referencia como 0% de inhibición. Los cálculos fueron realizados con la siguiente fórmula:

$$\text{Respuesta} = \text{Actividad basal} + \left(\frac{\text{Respuesta máxima} - \text{actividad basal}}{1 + 10^{(\text{LogIC50} - X)n}} \right) \times 100$$

Al igual que en el ensayo de unión a radioligando, consideraremos una actividad positiva si muestra un porcentaje de actividad funcional mayor al 30%.⁷⁴

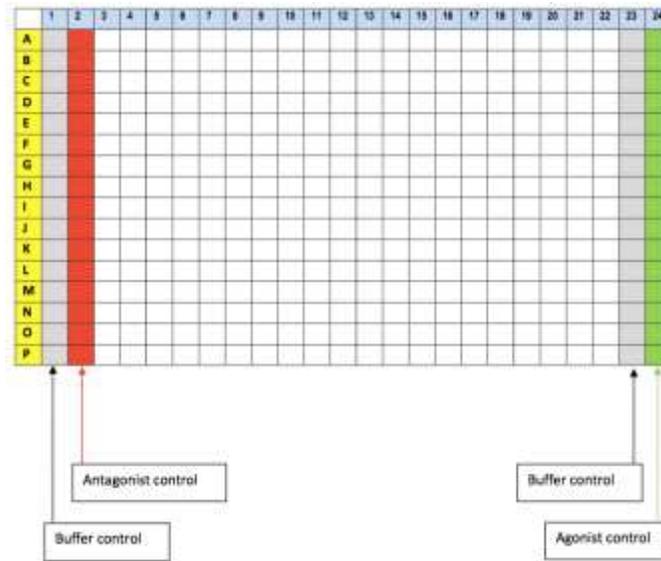


Figura 18. Diseño de la placa de 384 pocillos para los ensayos funcionales. Las columnas 1, 2, 23, y 24 son usadas para los controles positivos y negativos. Los pocillos del 3-22 son utilizados para probar los extractos. Para cada receptor se utiliza una placa similar con su agonista y antagonista de referencia correspondiente. Obtenido de: Roth.⁷⁴

Tabla 06: Receptores y sus parámetros considerados para los ensayos funcionales. ⁷⁴

RECEPTOR	REFERENCIA	LINEA CELULAR	E MAX (Veces)	pEC50	PENDIENTE DE HILL
Serotoninérgicos					
5-HT2B (A)	5-HT	Flp-In HEK	4.8	8.85	1.25
5-HT2C (A)	5-HT	Flp-In HEK	3.3	10.11	1.92
5-HT5A (C)	5-HT	HEK293 T	12	NA	NA
5-HT6 (B)	5-HT	Flp-In HEK	24.5	8.07	NA
5-HT7A (B)	5-HT	Flp-In HEK	60.1	8.6	1.58
Dopamina					
D2 (C)	LSD	HEK293 T	149.9	9.3	NA
Transportadores de neurotransmisores					
DAT uptake (D)	NA	HEK293	NA	NA	NA
NET uptake (D)	NA	HEK293	NA	NA	NA
SERT Uptake (D)	NA	HEK293	NA	NA	NA
Canal de potasio					
hERG (E)	NA	HEK293	NA	NA	NA

(A) Ensayo funcional de movilización de calcio (con FLIPRTETRA) y ensayo de acumulación de IP intracelular para Gq acoplados a GPCRs; (B) Ensayo funcional para Gi o Gs acoplados a GPCRs - Ensayos de cAMP biosensor de luciferasa dividida; (C) Ensayos GPCR Tango: reclutamiento de beta-arrestina independiente de proteína G; (D) Ensayo funcional de transportadores de neurotransmisores ;(E) Ensayo funcional de ERG: ensayo de flujo de talio (TI+) (FluxOR) y NA: No aplica

4.6. Evaluación de la citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad se utilizó el ensayo de sulforodamina B (SRB) descrito por Vicha & Kirtikara⁸⁸ que se basa en la determinación del contenido de proteína celular. Se utilizaron las líneas celulares: H9C2 (mioblastos de corazón de rata, 3000 células/pocillo), 3T3 (células de fibroblasto de ratón, 3000 células/pocillo), BJ (fibroblastos de prepucio humanas, 3000 células/pocillo), R22 (células de melanoma

humano, 3000 células/pocillo) y VERO (células epiteliales de riñón de mono, 1500 células/pocillo).

Las células fueron inoculadas en placas de cultivo de células de 96 pozos e incubadas a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95 % de aire por 24 h para permitir que las células se fijen a las placas. Cada placa que contenía cada una de las líneas celulares fue fijada in situ con ácido tricloroacético (TCA) para obtener luego los valores de las células a tiempo cero, antes de añadir los extractos y fracciones.

Para la preparación, se mezcló 5mg de c/extracto y fracciones con 40µl de DMSO. Para la concentración inicial de 0.250mg/ml se mezcló 6.4 µl del stock (12.5mg/100µl) con 640 µl de medio. Para la fracción B-6078, debido a su poca cantidad, se utilizó 1mg + 16µl de DMSO (concentración inicial fue de 0.125 mg/ml). El control positivo, 5 Fluorouracilo (5 FU) en concentración stock de 50 mg/ml, fue diluido 1:8 en HANKS y se usó 4.0 µl para la primera dilución fue de 15. 625 µg/ml. Para la clozapina se comenzó con una concentración de 62.5 µg/ml (aproximadamente 190.6 µM). Para las siguientes tres diluciones seriadas (1:4), se mezcló 160 µl de la anterior con 480 µl de medio (clozapina y fracción B-6078 se utilizaron seis diluciones 1:2). Cada pocillo recibió 40 µl de cada dilución. Después de 72 horas adicionales. Al final del experimento cada pocillo recibió 100µl de ácido tricloroacético al 20% y fue teñido por 30 minutos con sulforodamina al 0.4%, luego el exceso de colorante no unido a proteína fue removido por lavado repetido con ácido acético 1% (vol/vol). El colorante unido a la proteína fue solubilizado en una

solución de Tris 10 mM (pH 10.5) para la determinación de absorbancia a 510 nm usando un lector de microplacas. El valor de IC50 (concentración del extracto que inhibe en un 50% el crecimiento de las células) fue determinado a partir del análisis de la regresión lineal.

4.7. Análisis estadístico

Los valores de distancia recorrida en centímetros por cada 30 minutos de cada individuo, obtenidos de la prueba de campo abierto, fueron analizados empleando el análisis de varianza ANOVA “one way” de comparaciones múltiples y fue realizado usando el software GraphPad Prism 7.0a y los tratamientos se consideraron estadísticamente significativos si es que el valor p fue menor que 0.05^{66,70}

5. RESULTADOS

5.1. Obtención de fracciones de los extractos por cromatografía líquida de presión media (MPLC).

a. Fraccionamiento del 7158

El fraccionamiento del extracto 7158 (Tabla 07, Figura 19) requirió el uso de una fase estacionaria normal con el uso de una gradiente desde menor polaridad a una con mayor polaridad. Para ello se utilizó éter de petróleo en mayor proporción para extraer los compuestos más apolares primero y luego se fue aumentando la polaridad con los sistemas de solventes, éter de petróleo: AcOEt, AcOEt: MeOH y finalmente MeOH. El análisis por cromatografía en capa fina (TLC) permitió agrupar el contenido de los tubos que presentaron manchas similares y en una determinada fracción de acuerdo a su orden de elución (Figura 20). Las fracciones con mayor rendimiento fueron las fracciones C y D (33.4 y 32.34 %) y la de menor rendimiento fue la fracción A (2.34%). Durante el fraccionamiento se obtuvo una pérdida de extracto de 21.55%.

Tabla 07. Resumen de rendimiento de las fracciones y su actividad en los ensayos de comportamiento. +++ indica actividad similar a la del extracto, ++ actividad intermedia, mientras que + indica una actividad mínima. ND, no determinado.

Extracto	Fracción	Peso de la Fracción (mg)	Rendimiento (%)	Dosis (mg/kg)	Bioensayos	
					OFT	PPI
7158 (1g)	Extracto	-	-	150		ND
	Reconstituido	-	-	150	+	ND
	A	23.4	2.32	4.47	+	++
	B	10.3	10.26	19.82	-	-
	C	334	33.05	63.86	-	+++
	D	323.4	32	61.83	-	+++
6078 (0.9g)	Extracto	-	-	150	+++	ND
	Reconstituido	-	-	150	-	ND
	A	427.8	47.54	91.98	-	++
	B	59.1	6.57	12.7	-	++
	C	69	7.67	14.84	-	+++
	D	141.7	15.8	30.465	+++	+
6518 (1g)	Extracto	-	-	150	++	ND
	Reconstituido	-	-	150	++	ND
	A	204.5	17.04	28.51	++	+++
	B	65	5.42	9.06	-	+++
	C	159.2	13.27	22.2	-	+++
	D	646.9	53.91	90.21	+++	+++
6521 (1g)	Extracto	-	-	150	-	ND
	Reconstituido	-	-	150	-	ND
	A	198.2	19.07	38.75	-	ND
	B	2.8	0.27	0.54	-	ND
	C	40.3	3.87	7.875	-	ND
	D	525.8	50.6	102.81	-	ND



Figura 19. Peso y rendimiento de las fracciones por MPLC del extracto 7158.

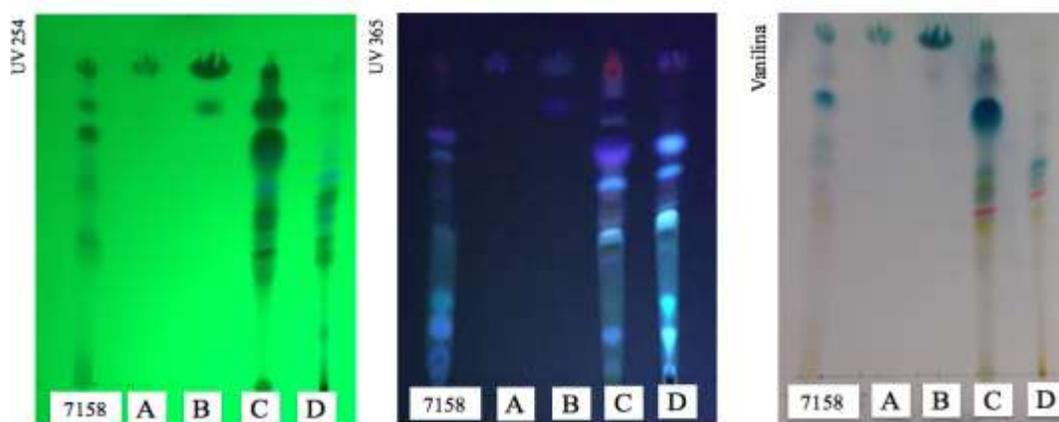


Figura 20. Cromatografía en capa fina (Fase normal) de las fracciones obtenidas del extracto 7158. Cromatogramas de las fracciones en el sistema CH_2Cl_2 - MeOH (9:1) con los reveladores UV 254, UV 365 y Vanilina-ácido sulfúrico, respectivamente.

b. Fraccionamiento del extracto 6078

El fraccionamiento del extracto 6078 (Tabla 07, Figura 21) requirió el uso de una fase estacionaria reversa con el uso de una gradiente de mayor polaridad a menor polaridad. Para ello se utilizó mayor proporción de solventes polares como agua para extraer los compuestos más polares primero y luego se fue disminuyendo la polaridad con sistemas de solvente Agua: MeOH, MeOH: CH_3CN y finalmente CH_3CN . La fracción con un mayor rendimiento fue la fracción A y las de menores rendimientos fueron las fracciones B y C. En la figura 22 se muestra el revelado de la

cromatografía en capa fina de las cuatro fracciones. Durante el fraccionamiento se obtuvo una pérdida de extracto de 23.51%.

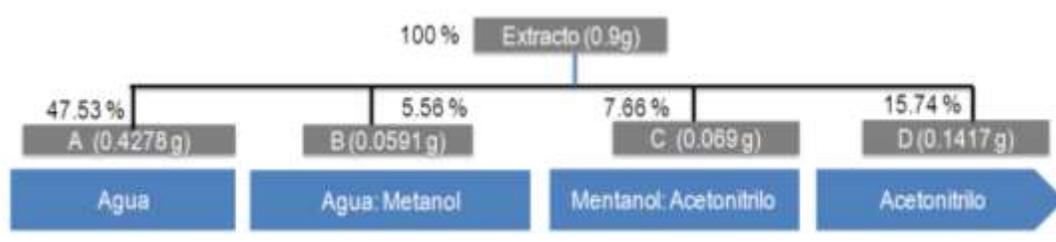


Figura 21. Peso y rendimiento de las fracciones por MPLC del extracto 6078.

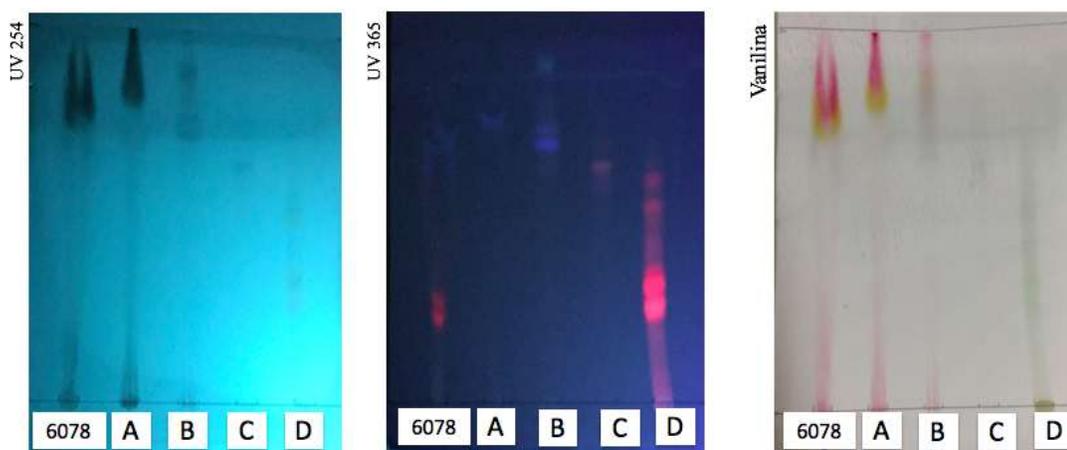


Figura 22. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas del extracto 6078. Cromatogramas de las fracciones en el CH₃CN-MeOH (4:6) con los reveladores UV 254, UV 365 y Vanilina-ácido sulfúrico, respectivamente.

c. Fraccionamiento del extracto 6518

El fraccionamiento del extracto 6518 (Tabla 07, Figura 23) requirió el uso de una fase estacionaria normal con el uso de una gradiente desde menor polaridad a una con mayor polaridad. Para ello se utilizó mayor proporción de éter de petróleo para

extraer los compuestos más apolares primero y luego se fue aumentando la polaridad con los sistemas de solventes, éter de petróleo-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-AcOEt, AcOEt con MeOH y finalmente MeOH. La fracción con mayor rendimiento fue la fracción D (53.90%) y la de menor rendimiento fue la fracción B (5.42%). Durante el fraccionamiento se obtuvo una pérdida de extracto de 10.3%.



Figura 23. Peso y rendimiento de las fracciones por MPLC del extracto 6518.

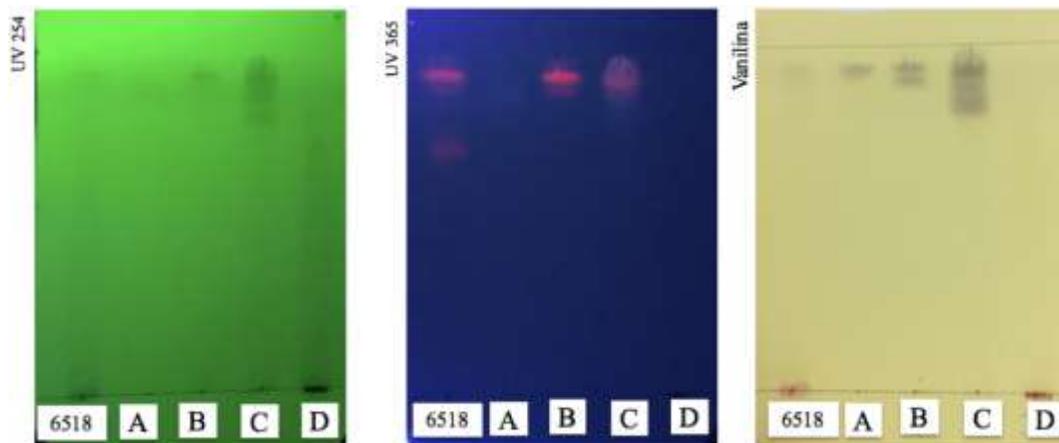


Figura 24. Cromatografía en capa fina (Fase normal) de las fracciones obtenidas del extracto 6518. Cromatogramas de las fracciones en el sistema de solventes CH₂Cl₂-MeOH (8:2) con los reveladores UV 254, UV 365 y Vanilina-ácido sulfúrico, respectivamente.

d. *Fraccionamiento del extracto 6521*

El fraccionamiento del extracto 6521 (Tabla 07, Figura 25) requirió el uso de una fase estacionaria normal con el uso de una gradiente desde menor polaridad a una con mayor polaridad. Para ello se utilizó una mayor proporción de éter de petróleo para extraer los compuestos más apolares primero y luego se aumentó la polaridad con combinación de sistemas de solventes, éter de petróleo: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂: AcOEt, AcOEt: MeOH y finalmente MeOH. La fracción con mayor rendimiento fue la D (50.6%) y la de menor rendimiento fue la B (0.27 %). Durante el fraccionamiento se obtuvo una pérdida de extracto de 26.16%.

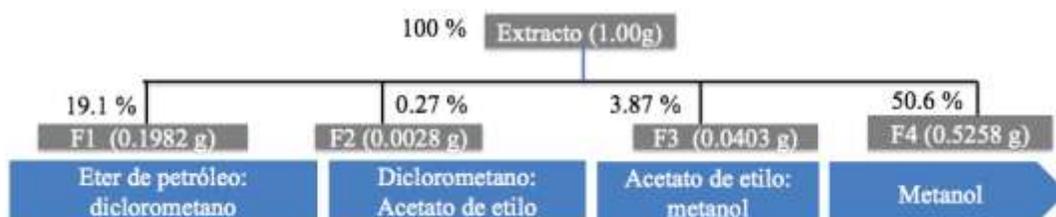


Figura 25. Peso y rendimiento de las fracciones por MPLC del extracto 6521.

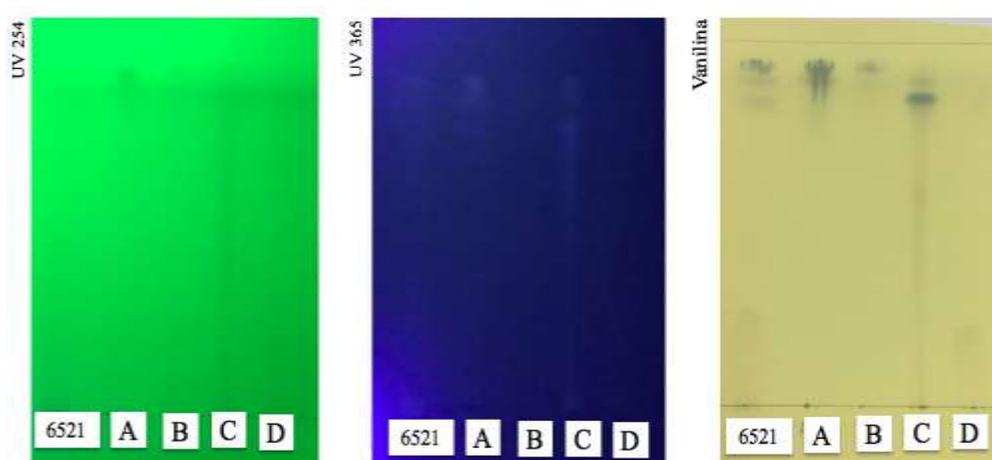


Figura 26. Cromatografía en capa fina (fase normal) de las fracciones obtenidas del extracto 6521. Cromatogramas de las fracciones en el sistema de solventes CH₂Cl₂-

MeOH (8:2) con los reveladores UV 254, UV 365 y Vanilina-ácido sulfúrico, respectivamente.

5.2. *Evaluación del modelo animal*

a. *Prueba de campo abierto*

En esta prueba se ha determinado la distancia total recorrida cada 30 minutos después de administrar los tratamientos (extractos, fracciones y *gold* estándar Clozapina) junto con la droga que induce la hiperactividad. En las fracciones del extracto 7158 (Gráfico 01), la fracción A (4.47 mg/kg) reduce la hiperactividad inducida por el MK-801 (10 mg/kg) significativamente ($p < 0.05$), lo que indicaría la presencia de potenciales compuestos antipsicóticos. Por otro lado, en el extracto 6078 (Gráfico 02), la fracción D (12.70 mg/kg) reduce la hiperactividad significativamente $p < 0.0001$. La fracción A (9.06 mg/kg) y D (90.21 mg/kg) del extracto 6518 muestran actividad significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Gráfico 03). Ninguna de las fracciones del extracto 6521 mostró actividad en esta prueba (Gráfico 04). En el experimento en donde se reconstituyeron las fracciones, sólo el reconstituido del extracto 7158 logra reducir la hiperactividad significativamente ($p < 0.01$). Como se muestra en los gráficos 1-4 fue necesario que los *gold* estándar (Vehículo/SS y MK-801/Clozapina) tengan diferencia significativa respecto al grupo Vehículo/MK-801 para poder validar la prueba.

Tabla 08. Distancia recorrida y desviación estándar para cada tratamiento del experimento de OFT para el extracto 7158.

Tratamiento	Inductor	Promedio de distancia total (cm)	Desviación estándar
Vehículo	SS	9616.42	1138.78
Vehículo	MK-801	23264.13	3383.64
Clozapina (10mg/kg)	MK-801	13734.95	1989.53
Extracto (150mg/kg)	MK-801	15588.5	6578.0
Reconstituido (150mg/mg)	MK-801	16277.7	2381.4
Fracción A (4.47 mg/kg)	MK-801	16612.3	1289.7
Fracción B (19.82 mg/kg)	MK-801	20572.33	4807.62
Fracción C (63.86 mg/kg)	MK-801	18235.68	4425.51
Fracción D (61.83 mg/kg)	MK-801	20901.0	2913.4

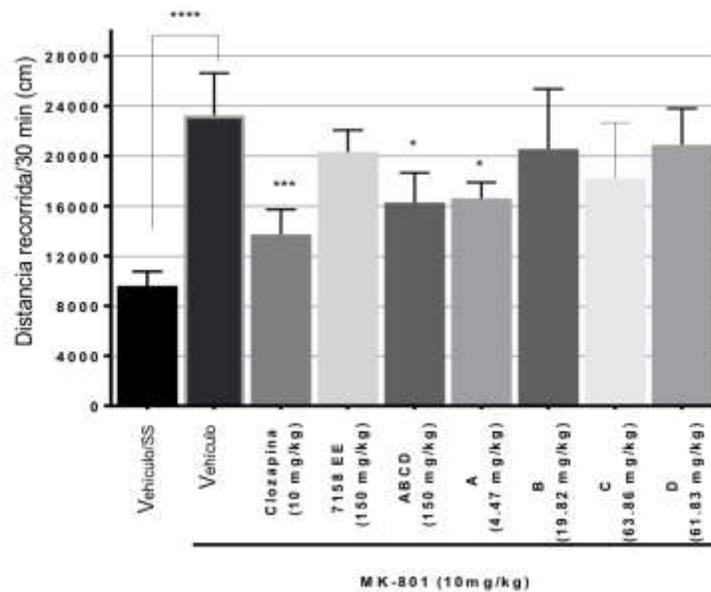


Gráfico 01. Prueba de campo abierto de las fracciones del extracto 7158. (****)

$p < 0.0001$; (***) $p < 0.001$ y (*) $p < 0.05$.

Tabla 09. Distancia recorrida y desviación estándar para cada tratamiento del experimento de OFT para el extracto 6078.

Tratamiento	Inductor	Promedio de distancia total (cm)	Desviación estándar
Vehículo	SS	9821.47	2395.72
Vehículo	MK-801	18438.46	1545.94
Clozapina (10 mg/kg)	MK-801	8500.62	2293.77
Extracto (150 mg/kg)	MK-801	10472.76	2263.42
Reconstituido (150 mg/kg)	MK-801	14355.74	4026.11
Fracción A (91.98 mg/kg)	MK-801	16103.55	2358.86
Fracción B (12.70 mg/kg)	MK-801	14240.74	484.74
Fracción C (14.84 mg/kg)	MK-801	16162.09	2254.87
Fracción D (30.46 mg/kg)	MK-801	9996.5	4441.2

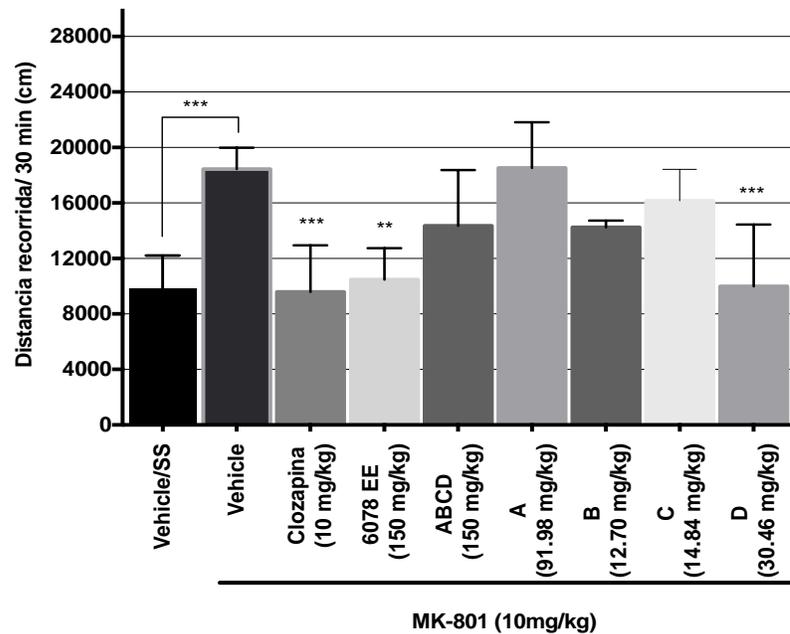


Gráfico 02. Prueba de campo abierto de las fracciones del extracto 6078. (***)

$p < 0.001$ y (**) $p < 0.05$.

Tabla 10. Distancia recorrida y desviación estándar para cada tratamiento del experimento de OFT para el extracto 6518.

Tratamiento	Inductor	Promedio de distancia total (cm)	Desviación estándar
Vehículo	SS	9371.1	2244.1
Vehículo	MK-801	16176.7	2245.7
Clozapina (10 mg/kg)	MK-801	6323.2	1429.4
Extracto (150 mg/kg)	MK-801	9631.3	2694.3
Reconstituido (150 mg/kg)	MK-801	9840.6	3788.5
Fracción A (28.51 mg/mg)	MK-801	9957.3	2389.2
Fracción B (9.06 mg/kg)	MK-801	12870.9	2206.6
Fracción C (22.20 mg/kg)	MK-801	14434.9	1273.7
Fracción D (90.21 mg/kg)	MK-801	8283.5	995.7

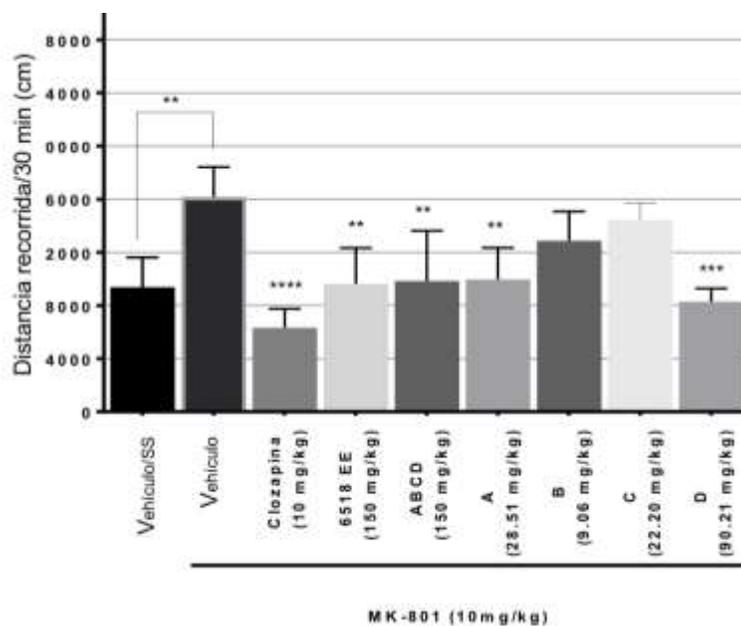


Gráfico 03. Prueba de campo abierto de las fracciones del extracto 6518. (****) $p < 0.0001$, (***) $p < 0.001$ y (**) $p < 0.05$.

Tabla 11. Distancia recorrida y desviación estándar para cada tratamiento del experimento de OFT para el extracto 6521.

Tratamiento	Inductor	Promedio de distancia total (cm)	Desviación estándar
Vehículo	SS	10569.19	687.42
Vehículo	MK-801	19051.42	2793.30
Clozapina (10 mg/kg)	MK-801	10875.91	1843.66
Extracto (150 mg/kg)	MK-801	14423.67	2359.54
Reconstituido (150 mg/kg)	MK-801	23621.17	5077.27
Fracción A (38.75 mg/kg)	MK-801	21304.86	4219.71
Fracción B (0.54 mg/kg)	MK-801	23039.78	2398.46
Fracción C (7.88 mg/kg)	MK-801	19564.99	4578.14
Fracción D (102.81 mg/kg)	MK-801	23087.68	3297.07

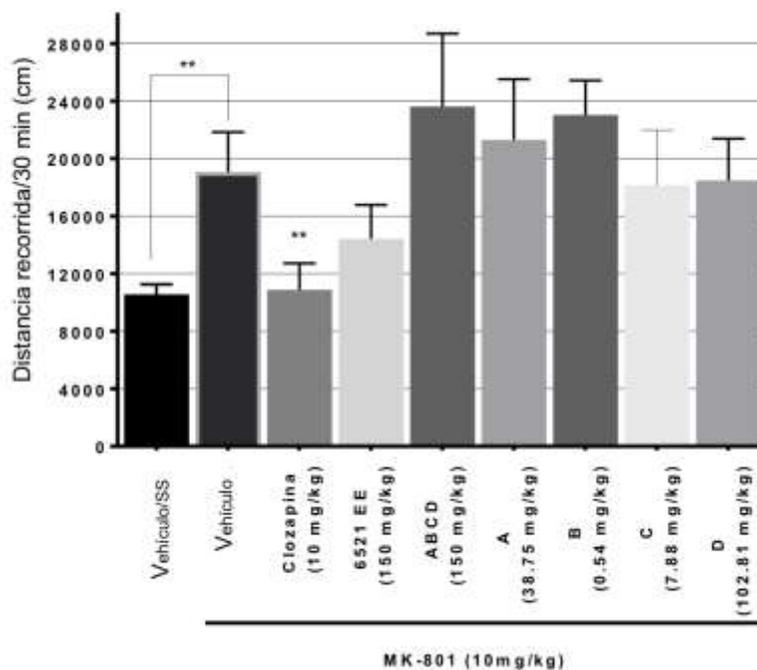


Gráfico 04. Prueba de campo abierto de las fracciones del extracto 6521. (**) $p < 0.05$.

b. Prueba de inhibición de sobresalto por prepulso

A los tres extractos que mostraron actividad en campo abierto se les realizó la prueba de inhibición del sobresalto por prepulso. Las fracciones A, C y D (Gráfico 05) del extracto 7158 muestran un aumento en la inhibición mediada por prepulso de la respuesta de sobresalto en comparación con el grupo que se le administró vehículo (solo DMSO) y MK-801 (10 mg/kg). Además, las fracciones C y D muestran una actividad comparable a la del fármaco de referencia Clozapina en las tres intensidades de prepulso (pp79, pp82 y pp88). La fracción B no presentó actividad en las tres intensidades de prepulso e incluso su actividad es mucho menor que la del MK-801 con vehículo en las intensidades pp82 y pp88.

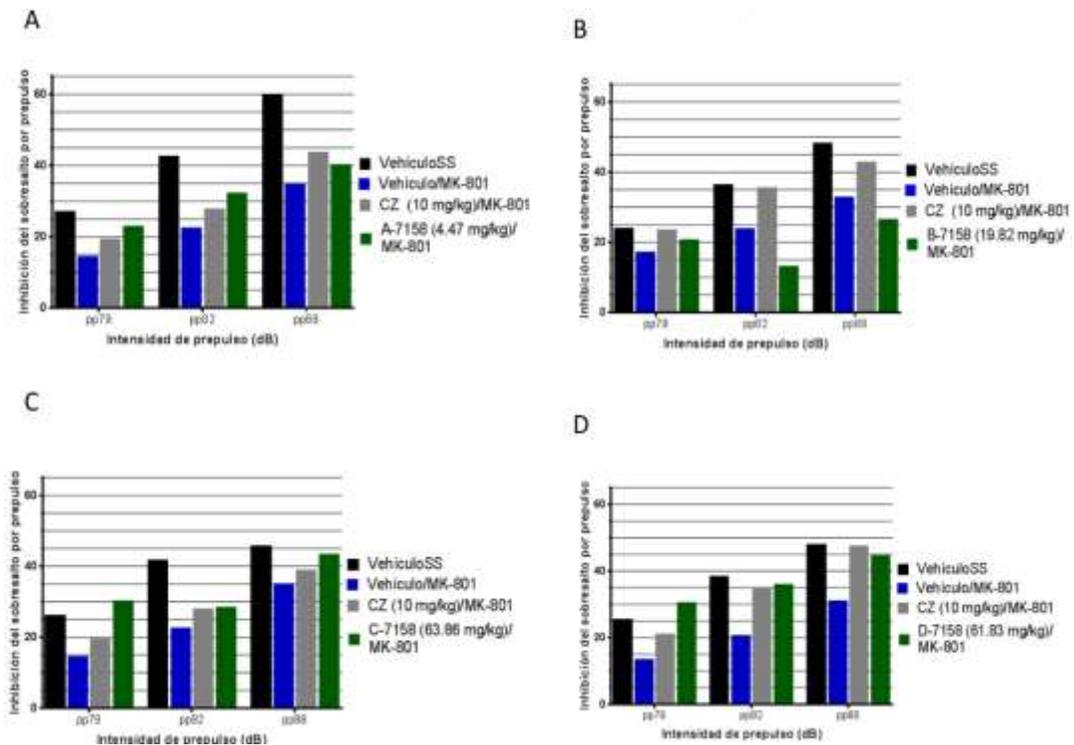


Gráfico 05. Prueba de inhibición del sobresalto por prepulso de las fracciones (A-D) del extracto 7158.

De igual manera, las fracciones A, B y C (Gráfico 6) del extracto 6078 muestran actividad en esta prueba. La fracción C muestra una actividad más alta que la del *gold* estándar clozapina en las tres intensidades de prepulso. La fracción A sobrepasa a la actividad de la clozapina solo en la intensidad de prepulso pp79 y la fracción B a pesar de ser activa en las intensidades de prepulso más altas (pp82 y pp88) en la intensidad pp79 su actividad es cercana a la de vehículo MK-801.

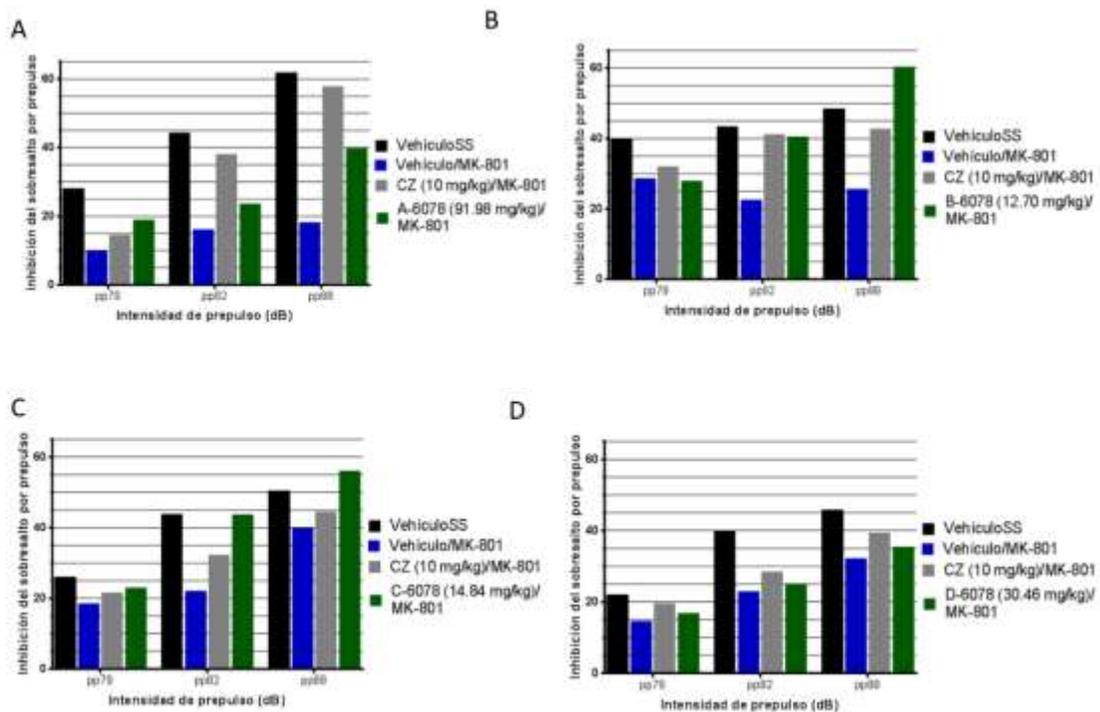


Gráfico 06: Prueba de inhibición del sobresalto por prepulso de las fracciones (A-D) del extracto 6078.

Las fracciones del extracto 6518 todas mostraron actividad. Sin embargo, la que presenta una actividad mayor que la clozapina son las fracciones A y D (Gráfico 07, A y D). La fracción B (Gráfico 07, B) solo presenta actividad mayor que la Clozapina

en la intensidad pp88. Las fracciones A, B y C a pesar de no haber tenido efecto en la prueba de campo abierto tienen efecto en la inhibición prepulso.

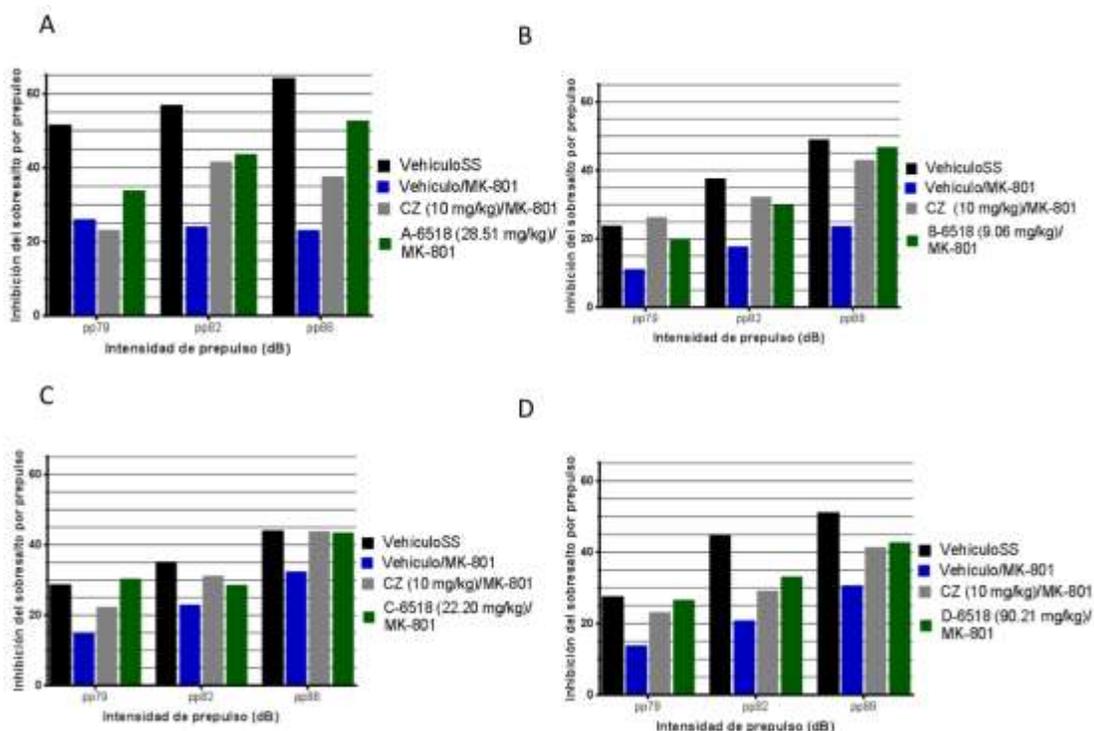


Gráfico 07: Prueba de inhibición del sobresalto por prepulso de la fracciones (A-D) del extracto 6518.

5.3. Identificación de blancos moleculares de los extractos

a. Ensayo de unión a radioligando

Los gráficos 08-11 muestran el porcentaje de desplazamiento de radioligando (eje Y) que origina cada extracto crudo sobre diferentes receptores. La afinidad de o los compuestos(s) presentes en el extracto genera un porcentaje de desplazamiento de un radioligando de referencia para cada receptor. El extracto 7158 (10 µg/ml) (Gráfico

08, Tabla 12) tiene una mayor afinidad (sobre los receptores mGlu5 (65.4%), PBR (61%), 5-HT2B (40.2%) y receptor de histamina H1 (40%).

El extracto 6078 (10 µg/ml) (Gráfico 09, Tabla 12) tiene una mayor afinidad el receptor muscarínico M3 (57.5%), mGlu5 (48.4%), 5HT1A (42.7%), H1 (33.3%), y PBR (33.9%). Se observó un 40.6% de desplazamiento de radioligando para el transportador DAT. El extracto 6518 (Gráfico 10, Tabla 12) tiene un mayor porcentaje de desplazamiento de radioligando en el receptor mGlu5 (30.6%).. Además, el extracto 6521 (Gráfico 11, Tabla 12), tiene un mayor porcentaje de desplazamiento de unión a radioligando en los receptores mGlu5 (47.9%) y H2 (31.4%).

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de los cuatro extractos en un panel de receptores probados a la concentración de 10 µg/ml.

RECEPTOR	Inhibición (%)			
	7158	6078	6518	6521
Serotoninérgicos				
5-HT2B	40.2	8.4	13.8	15.7
5-HT2C	23.2	-14	-5.8	-5.5
5-HT1A	0	42.7	28.5	29.3
5-HT6	-15	-15	-17	-2.1
5-HT7	-8.3	-0.6	8.2	2.7
5-HT1D	2.8	12.4	-1.5	29.3

Dopamina				
D1	-7.6	20.2	20.2	14.1
D2	-	-28	-16	-14
Histamina				
H1	40	33.3	29.4	12.9
H2	-19	29.6	21.8	38.4
Acetilcolina muscarínico				
M3	3.3	57.5	2.4	6.5
mGluR				
mGluR5	65.4	48.4	30.6	47.9
Transportadores de neurotransmisores				
DAT	-3	40.6	-19.2	-13.6
NET	-28	-50	-30	3.1
SERT	2.8	6.5	8.2	4.6
Otros				
PBR	61	33.9	8.3	-7.5
hERG	-2	-3.4	3.4	8.5

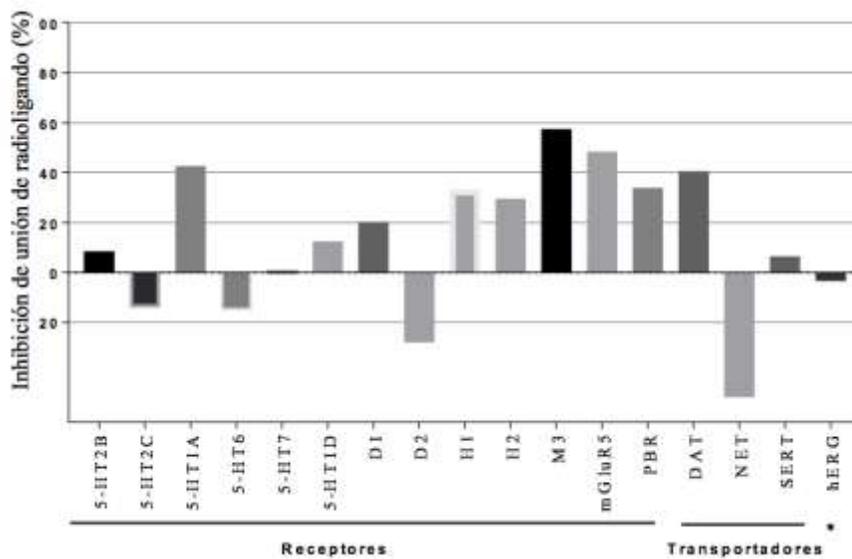


Gráfico 08: Ensayo de unión a radioligando del extracto 7158 sobre receptores y transportadores del PDSP. (*) canal de potasio hERG.

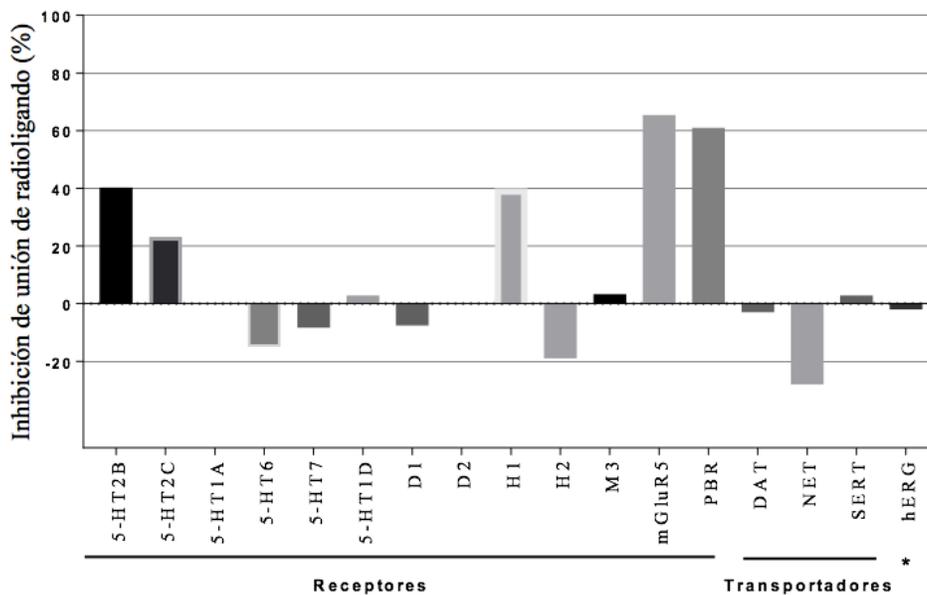


Gráfico 09: Ensayo de unión a radioligando del extracto 6078 sobre receptores y transportadores del PDSP. (*) canal de potasio hERG.

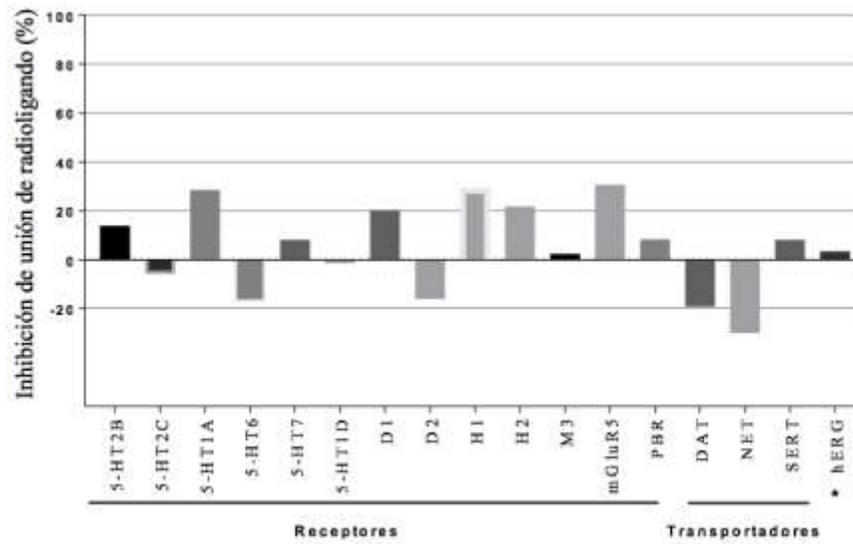


Gráfico 10: Ensayo de unión a radioligando del extracto 6518 sobre receptores y transportadores del PDSP. (*) canal de potasio hERG.

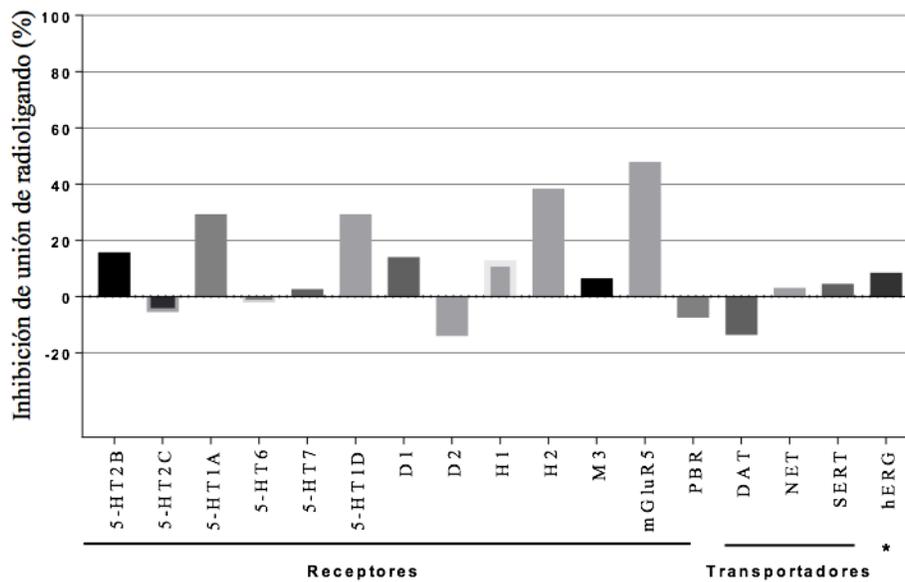


Gráfico 11: Ensayo de unión a radioligando del extracto 6521 sobre receptores y transportadores del PDSP. (*) canal de potasio hERG.

b. Ensayo funcional

El extracto 7158 (Gráfico 12) presenta mayor porcentaje de actividad antagonista sobre el receptor 5HT7A (31.1%). El extracto 6518 (Gráfico 14) tiene actividad antagónica en los receptores 5HT2B (40%), 5 HT6 (45%) y 5HT7A (52.5%). El extracto presenta un 30% de actividad en el canal de potasio hERG. Finalmente, el extracto 6521 (Gráfico 15) tiene actividad antagonista en los receptores 5HT6 (44.3%) y 5HT7A (45.3%). Además, hay actividad en el receptor de incorporación de serotonina SERT en un 32.7%.

Tabla 13. Porcentaje de actividad funcional de los extractos sobre los receptores.

RECEPTOR	ACTIVIDAD FUNCIONAL (%)							
	7158		6078		6518		6521	
	Agonista	Antagonista	Agonista	Antagonista	Agonista	Antagonista	Agonista	Antagonista
Serotoninérgicos								
5-HT2B								
(A)	0.8	17.5	1.7	22.1	4.3	40	-0.3	15.2
5-HT2C								
(A)	4.8	11.6	11.7	10.6	3.8	14.7	5.8	19.7
5-HT5A								
(C)	25	-	18.8	-	-6.2	-	3.6	-
5-HT6								
(B)	-0.8	13.6	2.1	16.9	-1.4	45	-2.3	44.3
5-HT7A								
(B)	-2.8	31.1	-1.1	25	-3.7	52.5	-3.7	45.3
Dopamina								
D2 (C)	0.3	-	0.1	-	-0.1	-	0	-
Acetilcolina muscarínico								
M3 (A)	-0.4	-6.1	3.1	-3.6	17.3	13.2	0.3	12

(A) Ensayo funcional de movilización de calcio (con FLIPRETETRA) y ensayo de acumulación de IP intracelular para Gq acoplados a GPCRs (B) Ensayo funcional para Gi o Gs acoplados a GPCRs - Ensayos de cAMP biosensor de luciferasa dividida (C) Ensayos GPCR Tango: reclutamiento de beta-arrestina independiente de proteína G.

Tabla 14. Porcentaje de actividad funcional de los extractos sobre transportadores de neurotransmisores y canal de potasio.

RECEPTOR	ACTIVIDAD FUNCIONAL (%)			
	7158	6078	6518	6521
Transportadores de neurotransmisores				
DAT uptake				
(D)	4.2	4.5	3.3	16.4
NET uptake (D)	3.2	-14.3	0.9	0.2
SERT Uptake				
(D)	-14.9	5.5	-7.7	32.9
Canal de potasio				
hERG (E)	21.7	9.7	30	15

(D) Ensayo funcional de transportadores de neurotransmisores (E) Ensayo funcional de ERG: ensayo de flujo de talio (Tl+) (FluxOR)

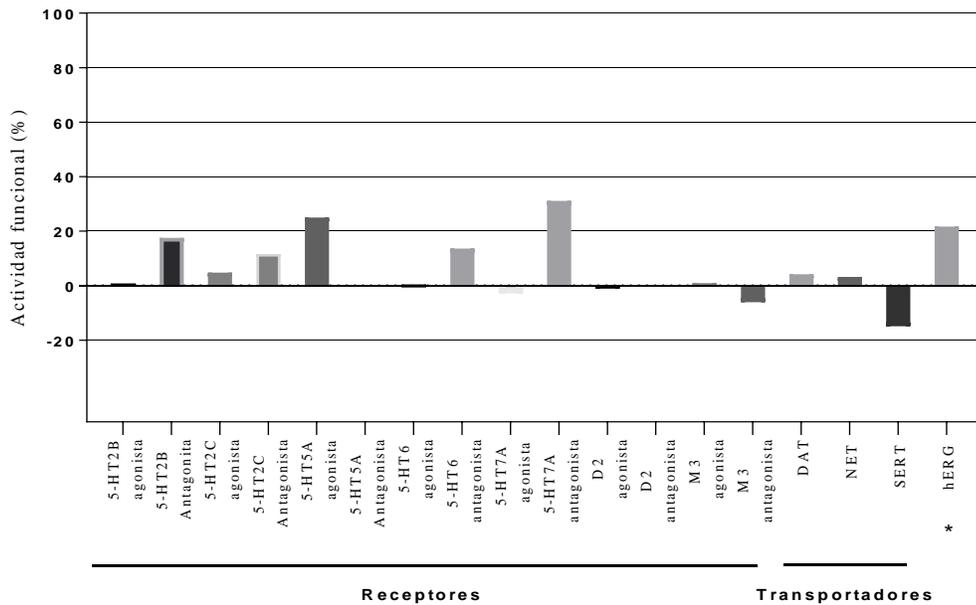


Gráfico 12: Actividad funcional (%) del extracto 7158 sobre un panel de receptores del PDSP.

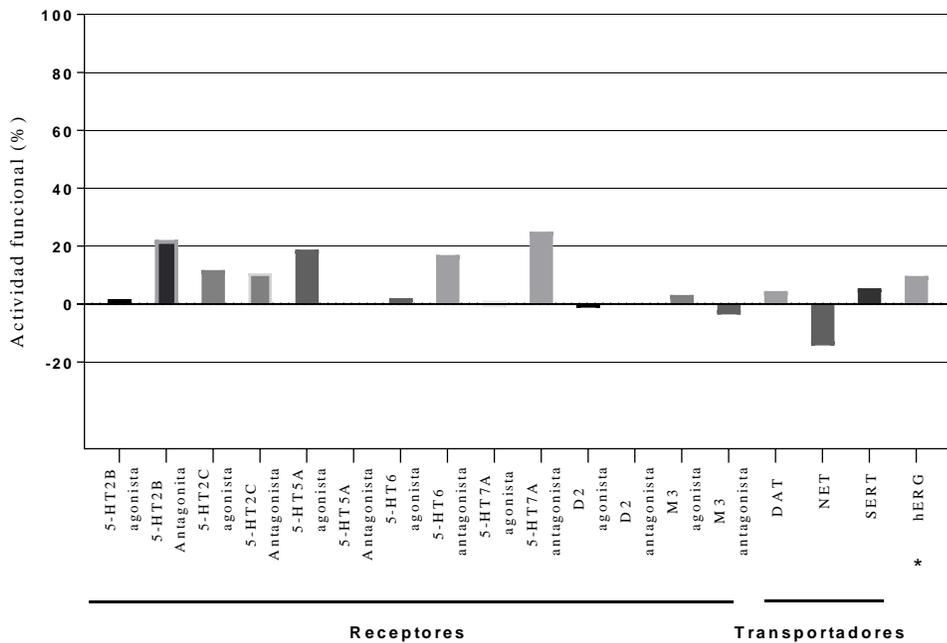


Gráfico 13: Actividad funcional (%) del extracto 6078 sobre un panel de receptores del PDSP.

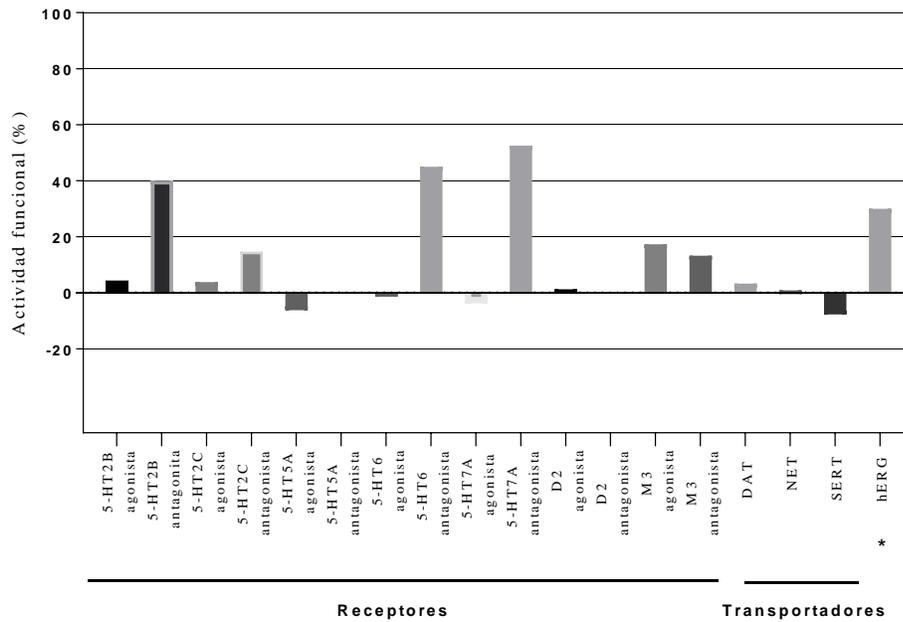


Gráfico 14: Actividad funcional (%) del extracto 6518 sobre un panel de receptores del PDSP.

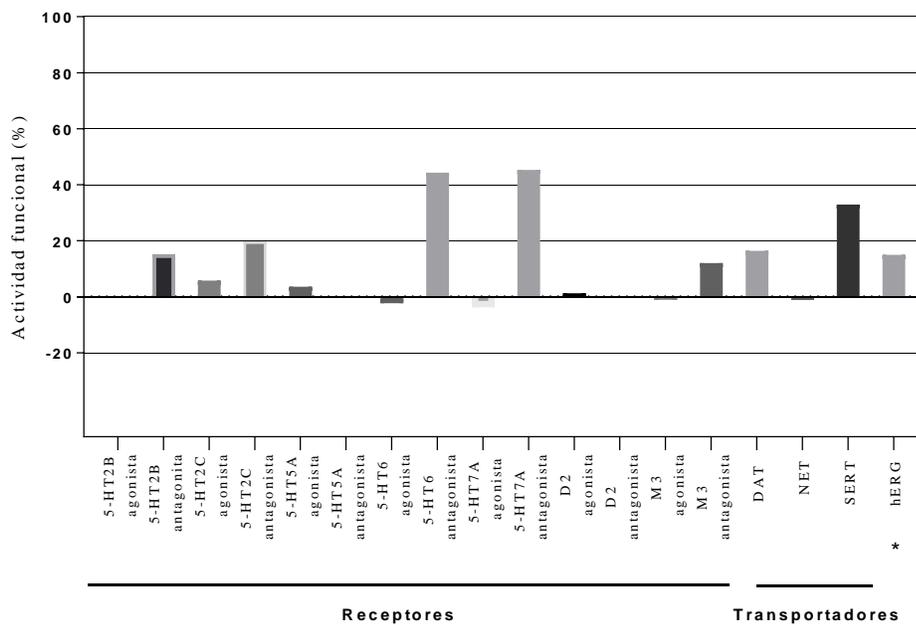


Gráfico 15: Actividad funcional (%) del extracto 6521 sobre un panel de receptores del PDSP.

5.4. Evaluación de la citotoxicidad

En la tabla 15 se muestran los IC50 ($\mu\text{g/ml}$) correspondientes a la concentración requerida para inhibir el 50% del crecimiento celular después que las células fueron expuestas a los extractos, fracciones o clozapina durante 48 horas. Cada valor de IC50 es un promedio de dos experimentos independientes. La fracción A del extracto 7158 siendo la única activa en las pruebas de comportamiento OFT y PPI es menos citotóxica en los mioblastos de corazón de rata (H9C2), células de fibroblasto de ratón (3T3), fibroblastos de prepucio humanas (BJ), células de melanoma humano (R22) y células epiteliales de riñón de mono (VERO) en comparación con el extracto crudo, a pesar de haber sido probadas en las mismas concentraciones. Además, la fracción B (negativa en los bioensayos), es la que presenta más citotoxicidad que el extracto crudo en las cinco líneas celulares, especialmente en las células 3T3 ($<3.91 \mu\text{g/ml}$). Por otro lado, el extracto 6078 presenta un IC50 $>250 \mu\text{g/ml}$ en las células H9C2, 3T3, BJ mientras que para las células R22 y células VERO su IC50 es de 91.6 y 76.42 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La fracción C de este extracto tiene el IC50 más bajo en las células H9C2. La fracción B del extracto 6078 presenta una citotoxicidad comparable a la del extracto crudo. En el extracto 6518, la fracción C es la que presenta el IC50 más bajo (15.65 $\mu\text{g/ml}$) sobre las células 3T3. El extracto 6521 tiene la más alta citotoxicidad, en comparación a los extractos, fracciones y clozapina.

Tabla 15: Valores de IC50 ($\mu\text{g/ml}$) de los extractos antipsicóticos y sus fracciones.

	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)				
	H9C2	3T3	BJ	R22	VERO
Extracto 7158	24.3	27.45	33.75	14.25	89.4
Fracción A-7158	23.95	33.95	100.85	35.8	96.2
Fracción B-7158	6.4	<3.91	25.45	5.35	24.7
Fracción C-7158	29.6	23.95	53.65	13.35	32.55
Fracción D-7158	55.9	99.6	138.7	27.25	143.85
Extracto 6078	>250	>250	>250	48.4	150
Fracción A-6078	144.4	94.6	>250	32.9	211.3
Fracción B-6078	>125	>125	>125	91.6	76.42
Fracción C-6078	15.9	31.2	>250	31.9	130.4
Fracción D-6078	77.9	124.3	>250	>250	>250
Extracto 6518	>250	64.4	>250	224.6	>250
Fracción A-6518	>250	>250	>250	>250	>250
Fracción B-6518	190.07	58.75	>250	146.45	100.45
Fracción C-6518	>250	31.35	>250	222.6	>250
Fracción D-6518	>250	202.15	>250	265.55	>250
Extracto 6521	15	8.7	41	20.2	60.3
Clozapina	24.78	21.58	>6.5	12.62	>6.5

6. DISCUSION

El objetivo de la presente investigación fue realizar una búsqueda de compuestos potencialmente antipsicóticos a partir de extractos etanólicos de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de síntomas tipo psicosis, que los chamanes o personas que practican la medicina tradicional la caracterizan como “locura”, “posesión por espíritus” o “nervios”. Para ello se utilizó el enfoque de fraccionamiento guiado por bioensayo para determinar qué fracciones están involucradas en la actividad farmacológica deseada.⁹³

Los resultados de estudios previos por nuestro equipo de investigación mostraron que los cuatro extractos seleccionados tenían efecto positivo en las pruebas de campo abierto (OFT) y prueba de inhibición de sobresalto por prepulso (PPI), pero no en la prueba de cruz y prueba de nado forzado, estos dos últimos para determinar ansiedad y depresión respectivamente.²¹ Las pruebas de OFT y PPI son utilizadas para determinar la actividad y/o potencia antipsicótica de fármacos comerciales.⁶⁸ La prueba de campo abierto permitió determinar la disminución de la hiperactividad causada por el MK-801 al aplicar el extracto y sus fracciones. El antagonismo del estereotipo inducido por MK-801 (10mg/kg) y otras drogas inductoras de psicosis son modelos animales validados para evaluar la actividad antipsicótica.^{13,68,92} Esta locomoción se debe a que además de afectar al receptor NMDA con MK-801 se genera una hiperactivación de la vía dopaminérgica en las áreas estriatales del cerebro de los ratones, debido a que la vía dopaminérgica y glutamatérgica se regulan

mutuamente.^{8,32,34} En ambas pruebas (OFT y PPI), se utilizó como “gold estándar” la administración del antagonista de dopamina (Clozapina) que contrarrestó los efectos inducidos por MK-801.^{91,94}

Por cada extracto se obtuvieron cuatro fracciones y cada una de ellas fue evaluada en la prueba OFT y PPI. En la prueba de OFT la fracción A (4.47 mg/kg) del extracto 7158, B (12.70 mg/kg) y D (30.46 mg/kg) del extracto 6078 y D (90.21mg/kg) del extracto 6518 redujeron la hiperactividad inducida por MK-801, lo que indicaría que estas fracciones de los tres extractos contendrían uno o más compuestos con potencial acción antipsicótica. El tratamiento con el extracto crudo nos permitió controlar la actividad previa a la extracción; mientras que el tratamiento con el reconstituido (fracción A+B+C+D) nos permitió identificar pérdida de actividad debido a errores en el fraccionamiento o sinergismo de los compuestos contenidos en el extracto. Además, ninguna de las fracciones del extracto 6521 (Figura 09) mostraron efecto en la prueba de campo abierto, debido a posibles problemas de la naturaleza de los grupos funcionales presentes en los compuestos de la planta o por sinergismo entre moléculas.⁹⁵

La reducción de la amplitud de sobresalto refleja la capacidad del sistema nervioso de adaptarse temporalmente a un estímulo sensorial fuerte cuando un estímulo más débil lo precede. En pacientes con esquizofrenia, a pesar de existir el estímulo previo, el sobresalto es similar al que cuando no hay un estímulo previo. Los antipsicóticos mejoran esta respuesta de sobresalto deteriorada.⁹⁶ La droga utilizada en nuestros experimentos, MK-801, además de inducir a hiperactividad, genera un

déficit en la inhibición de la respuesta de sobresalto (PPI).⁵⁹ Para provocar el sobresalto, nosotros utilizamos un estímulo sonoro de 120 dB precedido (50 a 500 mseg antes) por un pre-estimulo apenas detectable (79pp, 82pp y 88pp). Esta prueba es altamente predictiva para la determinación de la potencia antipsicótica de ciertos fármacos.⁵⁴ Hasta el momento, se ha evidenciado que varias plantas medicinales con uso tradicional para el tratamiento de la psicosis mejoran la inhibición del sobresalto en ratones inducidos con antagonistas del receptor NMDA.^{62,96-99} De acuerdo a los gráficos 05-07, algunas fracciones que no mostraron actividad en la prueba de OFT mostraron actividad en la prueba de inhibición del sobresalto por prepulso. Podemos notar que en el extracto 7158 la fracciones C y D que no fueron activas en OFT muestran actividad en PPI y la fracción C del 6078 tienen mejor actividad que la clozapina en las tres intensidades de prepulso. Interesantemente, la fracción B del extracto 6078, a pesar de ser activa en las intensidades de prepulso más altas (pp82 y pp88), en la intensidad pp79 su actividad es cercana a la del vehículo/MK-801; y la fracción D del extracto 6078 a pesar de tener la actividad altamente significativa en OFT no muestra actividad en PPI. Las fracciones del extracto 6518 también muestran actividad variada. Sin embargo, la fracción D tiene mejor actividad en PPI, al igual que en OFT. Además, las fracciones A, B y C (extracto 6518) a pesar de no haber tenido efecto en la prueba de campo abierto tienen efecto en la inhibición prepulso.

Estas diferencias se deben a que los compuestos involucrados en la inhibición de la hiperactividad pueden no ser los mismos involucrados en el mejoramiento de la respuesta de sobresalto o debido a la superposición de algunos compuestos en las

fracciones o la dosis que llega a tener una fracción a pesar de ser menor es suficiente para ejercer su efecto deseado. Estudios previos reportan evidencias que dosis altas o bajas pueden tener o no el efecto deseado en la prueba de PPI⁹⁹⁻¹⁰⁰, incluso el efecto puede ser notorio en una determinada intensidad de prepulso.^{99,101} Diferentes estudios en la etapa de fraccionamiento muestran también efectos variados en la actividad, debido a que los extractos crudos tienen un número de moléculas complejas en el cual pocas pueden ser activas. Para tal escenario, la actividad resultante del extracto puede incrementar/reducir/disminuir dependiendo de las interacciones de sinergismo/antagonismo entre varios tipos de moléculas presentes en el extracto.¹⁰²⁻¹⁰⁵

Otra posible explicación al efecto en la actividad en la prueba de PPI y no en la prueba de OFT, es que, si bien es cierto un buen antipsicótico tiene efecto tanto en OFT y PPI, se debe considerar que la respuesta a sobresalto no solo está alterada en la esquizofrenia.⁵⁹ Además, es probable estas diferencias se atribuyan a que los compuestos contenidos en las fracciones están actuando sobre los diferentes circuitos involucrados en la regulación sensorimotora.¹⁰⁶

La limitación de nuestro estudio fue que no se pudo realizar un análisis estadístico de la prueba de inhibición del sobresalto, debido a la variación del peso de individuos, la respuesta diferente de cada individuo a pesar de tener pesos aproximadamente similares, u otras variables que no se pudieron controlar. Sin embargo, la respuesta esperada entre los grupos V/Solución salina, V/MK-801 y MK/clozapina, nos permitió validar cada experimento. Estudios posteriores

necesitarán la incorporación de más individuos en cada grupo y tener un control estricto del peso de los individuos.

En la esquizofrenia hay una alteración de sistema de neurotransmisores. Los antipsicóticos actuales ejercen su efecto en receptores que están hipoactivados o hiperactivados en la enfermedad, sin embargo, algunos antipsicóticos tienen actividad en otras vías de señalización involucradas en los efectos secundarios.^{9,31} Como primeros pasos para el descubrimiento de drogas, se ha realizado un tamizaje con el PDSP para continuar con la selección basada en actividad en modelos animales y blancos moleculares. Los ensayos realizados con el PDSP proveen evidencia de la interacción de los cuatro extractos, mediante ensayos de unión a radioligando y ensayos funcionales, con receptores (dopamina, serotonina, dopamina, muscarínico e histidina), transportadores de neurotransmisores y el indicador de cardiotoxicidad (activadores del canal de potasio HERG).⁷⁴

La “afinidad” se refiere a que tan fuerte (juzgado por la constante de disociación Kd) se une un ligando a su receptor. El extracto no marcado desplaza un ligando específico radiomarcado.^{76,77} Este porcentaje de desplazamiento o inhibición de la unión del radioligando, nos indica la afinidad de los componentes del extracto al receptor.⁷⁵ Como puede observarse en los gráficos 8-11, los extractos tienen porcentajes variados inhibición, indicando que los componentes contenidos en el extracto desplazan a ligandos marcados específicos para cada receptor. Sin embargo, algunos receptores fueron poco afectados por la presencia de extracto y además hay

porcentajes negativos de inhibición de ligando marcado. El porcentaje de inhibición negativo indica que (1) los componentes del extracto mejoran la unión del ligando de referencia al receptor y (2) los componentes del extracto interfieren con la medida de radioactividad de tal manera que se registra más radioactividad de la que realmente hay.⁷⁷

La actividad negativa en el ensayo de agonismo (e.g. 5-HT_{5A} en el extracto 6518) indica la presencia de agonistas inversos que se unen a los receptores en el sitio de unión de agonistas e induce a una respuesta farmacológica opuesta al agonista.⁷⁸ La eficacia de un agonista completo es 100%, un agonista neutral 0% de eficacia y la de un agonista inverso < 0% de eficacia (% negativo). Además, aunque a este nivel de extracto no podemos determinar el efecto de compuestos unitarios en los receptores, es posible que tengamos en los extractos compuestos que realicen sinergismo.^{78,104,105}

El extracto 7158 contiene compuestos, que al interactuar con el receptor, generan un 65.4% de inhibición de la unión del radioligando específico sobre el receptor metabotrópico del glutamato mGlu₅ (65.4%). Se ha reportado que la activación del receptor mGlu₅ conduce a una actividad mejorada del receptor NMDA (inhibido en esquizofrenia).^{41,42} Por ejemplo, Zavodnick & Ali²⁹ demostraron que el agonismo del receptor mGlu₅ mejora los defectos cognitivos inducidos por el bloqueo del receptor NMDA en ratas. Los moduladores alostéricos positivos de mGlu₅ son potenciales candidatos terapéuticos para el tratamiento de la

esquizofrenia.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ Los estudios preclínicos muestran que estos moduladores alostéricos son capaces de atenuar los déficits cognitivos inducidos por el antagonismo del receptor NMDA, así como también los efectos psicomiméticos inducidos por antagonistas del receptor NMDA como MK-801, indicando su potencial de aliviar los síntomas positivos, negativos y cognitivos de los pacientes con esquizofrenia. Esto contrasta con los antipsicóticos actuales, que aunque son ampliamente eficaces para los síntomas positivos, muestran beneficios mínimos para los síntomas negativos y cognitivos.¹⁰⁷ En esta investigación, solamente tenemos información a partir de ensayos de unión a radioligando para este receptor, por lo tanto es necesaria la incorporación de pruebas funcionales de este receptor aclarará el panorama si la interacción de los extractos con este tipo de receptores es la responsable de su efecto antipsicótico.

El extracto 7158 muestra además un 61% de inhibición sobre el receptor periférico de benzodiazepina (PBR). La expresión de este receptor en el cerebro ha sido vinculada a condiciones clínicas tales como ansiedad, psicosis, Alzheimer, entre otras.⁴⁸ Si bien es cierto, los estudios realizados en pacientes esquizofrénicos con síntomas negativos han determinado *in situ* la reducción de receptores PBR^{48,49}, no se han reportado extractos con actividad antipsicótica en ensayos de unión a radioligando ni funcionales. Sin embargo, es posible que el efecto antipsicótico que tiene esta planta ejerza un agonismo sobre estos receptores. Futuros estudios necesitarán probar el efecto de la fracción con actividad y además probar en ensayos funcionales si hay un efecto agonista.

Otro receptor que probablemente esté involucrado en la actividad antipsicótica de este extracto, es el receptor de histamina H1 el extracto 7158 tuvo un 40% de inhibición sobre el receptor H1 en un 40%. La importancia de este receptor en esquizofrenia radica en estudios de tomografía de emisión de positrones, que muestran que los pacientes con esquizofrenia tienen una reducción de los receptores H1 en la corteza prefrontal y en el giro cingulado.⁴⁶ Además, Bradford *et al.*⁴⁴, reportaron que el antagonismo sobre estos receptores H1 puede ser responsable de la supresión mediada por antipsicóticos de la locomoción espontánea.

Como búsqueda de drogas potencialmente antipsicóticas, se esperaba que los compuestos contenidos en el extracto ejerzan un efecto sobre receptores de serotonina. El extracto 7158 presenta mayor porcentaje de actividad antagonista sobre el receptor 5HT7A (31.1%). El receptor 5-HT7 ha sido bien evidenciado como blanco de drogas antidepresivas¹⁰⁹ y de drogas antipsicóticas atípicas.¹¹² Por lo tanto esta actividad es la que podría estar involucrada en su efecto antipsicótico en las pruebas de OFT y PPI. Muchas, pero no todas las drogas antipsicóticas, son también potentes antagonistas de los receptores 5-HT6 o 5-HT7; algunos fármacos típicos son también potentes de ambos. Ambos receptores juegan un rol modulador.^{36,50}

El antagonismo de la señalización D2R sería el principal modo de acción de las drogas antipsicóticas.^{44,111-112} Sin embargo, la actividad deseada de un fármaco antipsicótico es que tenga menores efectos secundarios y para ello es requisito que

tengan actividad antagonista más potente en los receptores 5-HT_{2A} que en los receptores D₂.^{50,109} En nuestros resultados no se muestra un porcentaje de inhibición (mayor de 30%) en el ensayo de unión a radioligando y funcional para los receptores de dopamina, lo que indicaría que los compuestos contenidos en los extractos tienen perfiles de actividad atípicos.

El extracto 6078 genera inhibición de unión del radioligando sobre el receptor mGlu₅ (48.4%), M₃ (57.5%), 5HT_{1A} (42.7%), H₁ (33.3%), y PBR (33.9%), lo que indicaría que la interacción con estos receptores estaría mediando su efecto antipsicótico. El extracto 6078 también presenta un ligero antagonismo por el receptor 5HT_{7A} (25%). Los estudios en modelos animales sugieren que los receptores muscarínicos son potenciales blancos para el tratamiento de la esquizofrenia.¹¹³ La fuerte afinidad del extracto por los receptores muscarínicos y la rápida disociación del receptor D₂ estarían involucrados en el efecto antipsicótico. Esta actividad ha sido reportada para el fármaco de referencia clozapina, en el cual implica ausencia de efectos secundarios extrapiramidales.¹¹⁴ En estudios clínicos se ha demostrado que agonistas específicos de receptores muscarínicos reducen los síntomas positivos y negativos y mejoran la cognición en pacientes esquizofrénicos¹¹⁵; sin embargo, la ausencia de respuesta en el ensayo funcional de movilización de calcio indicaría que su interacción no involucra una actividad conocida.

El extracto 6078 tuvo un 29.6% de afinidad sobre el receptor H₂. El antagonismo del receptor H₂ puede proporcionar una nueva alternativa para el tratamiento de la

esquizofrenia.¹¹⁶ La implementación de ensayos funcionales para el receptor H1 y H2 es necesaria para establecer si la interacción involucra el efecto deseado.

Este extracto tiene un 42.7% de inhibición de unión a radioligando por el receptor 5HT1A. Muchos estudios en pacientes con esquizofrenia han demostrado alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica determinada por la concentración de 5-HT y su metabolito (ácido 5-hidroxiindoleacético, 5-HIAA) y la densidad de los receptores 5-HT1A o 5-HT2A en cerebros post-mortem. Esta información, deberá ser corroborada en ensayos funcionales para el receptor 5HT1A, debido a que la actividad agonista parcial del receptor 5HT1A que presentan ciertos fármacos como la clozapina está involucrada en el mejoramiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia.¹¹⁴

Además, en relación a la vía dopaminérgica, el principal mecanismo para el control espacial y temporal de los niveles de dopamina (DA) libre es el transportador de dopamina (DAT), que transporta activamente DA desde el espacio extracelular hacia la neurona presináptica. Muchos fármacos interactúan con DAT para suprimir la recaptación, incluyendo cocaína y anfetamina, que inducen la estimulación psicomotora y la adicción.¹¹⁷ En el ensayo de unión a radioligando el extracto 6078 tiene un 40% de inhibición de unión a radioligando sobre receptor DAT. Sin embargo, en el ensayo funcional, no se produce un incremento en la incorporación del fluoróforo (análogo de dopamina) por el transportador.

El extracto 6518 tiene un mayor porcentaje de inhibición de unión a radioligando sobre el receptor mGlu5 (30.6%), además genera actividad funcional para los receptores de serotonina 5-HT6 (45%) y 5HT7A (52.5%). La afinidad no detectada en el ensayo de radioligando se debe a que el sitio de unión no podría ser el mismo que el del radioligando marcado (por tal motivo no lo desplaza), a diferencia de reportes que se han hecho que la clozapina tiene una fuerte afinidad por el receptor 5-HT6.¹¹⁸ Los receptores 5-HT7 están implicados en una variedad de funciones del sistema nervioso central, incluyendo el control de los procesos de aprendizaje y memoria. Según los datos preclínicos recientes, el bloqueo selectivo de estos receptores puede ser un blanco potencial para la mejora cognitiva en la esquizofrenia.¹¹⁹

El extracto 6521 y tampoco ninguna de sus fracciones mostraron efecto en la prueba de campo abierto, debido a posibles problemas de la naturaleza de compuestos activos.⁹⁵ Sin embargo, el extracto 6521 tiene un mayor porcentaje de desplazamiento de radioligando en los receptores mGlu5 (47.9%) y H2 (31.4%). Presenta actividad antagonista en los receptores 5HT6 (44.3%) y 5HT7A (45.3%). Además, muestra actividad en el transporte de serotonina SERT (32.7% por encima del control). Existe evidencia que los antagonistas del receptor 5-HT6 en modelos animales mejoran el declive cognitivo en diferentes dominios relevantes para esquizofrenia.¹²⁰ Por lo tanto, al igual que los receptores anteriores, será necesario probar el efecto de la fracción involucrada en el efecto antipsicótico y además incorporar ensayos funcionales para cada uno de los receptores.

Las limitaciones en los ensayos “high-throughput” por el gran número de muestras a procesar conlleva a utilizar una sola concentración como ensayo inicial. Aquellos receptores que mostraron una actividad mayor de 30% serán considerados para una segunda evaluación con un rango de concentraciones.⁷⁴ Actualmente no hay datos sobre las composiciones químicas de estas plantas y no se sabe cuáles son las moléculas activas. Además, considerando que estos receptores se expresan en regiones cerebrales que están involucradas en la esquizofrenia, es posible que su actividad esté relacionada con su efecto antipsicótico. Sin embargo, es posible que la actividad de las fracciones se vea afectada por otros componentes del extracto que tengan la función de moduladores negativos (alosterismo).¹⁰²⁻¹⁰⁵ Estos moduladores negativos, reducen los efectos del ligando ortostérico (sitio específico), pero son inactivos en ausencia del ligando ortostérico.¹²¹ Por lo tanto, análisis posteriores de las fracciones activas de los extractos sobre ensayos de unión a radioligando y ensayos funcionales en receptores permitirán aclarar el mecanismo molecular por el cual ejercen su actividad antipsicótica.

Hasta la fecha, los mecanismos de acción de los antipsicóticos existentes comprenden la interacción con vías de dopamina, glutamato, GABA, serotonina y acetilcolina, actuando principalmente sobre los síntomas positivos de la esquizofrenia.⁹⁴ Considerando la variada actividad de los cuatro extractos sobre los receptores en el presente estudio, es posible que los extractos contengan compuestos con actividad no solo sobre los síntomas positivos de la esquizofrenia, sino también en los negativos y cognitivos.^{44,100,122,123}

En esta investigación se consideró la evaluación del canal de potasio éter-a-go-go humano (hERG) como indicador de potencial cardiotoxicidad. Los canales hERG conducen el componente rápido de la corriente de potasio rectificador retardado (IKr), que es crucial para la repolarización de los potenciales de acción cardíaca. Un bloqueo moderado de hERG puede producir un efecto benéfico de antiarrítmico clase III. Por el contrario, una reducción en las corrientes hERG debido a defectos genéticos o efectos adversos de drogas puede conducir a los síndromes del QT largo adquirido o hereditario caracterizados por la prolongación del potencial de acción, alargamiento del intervalo QT y un incrementado riesgo de arritmias y muerte súbita.¹²⁴ El extracto 6518 genera un 30% de actividad funcional sobre este receptor, lo que indicaría una potencial cardiotoxicidad. Se espera que esta interacción no esté presente en la fracción activa del extracto.

Además, se ha encontrado que el extracto 7158 inhibe un 40.2% la unión del radioligando específico del receptor 5-HT_{2B}; sin embargo en el ensayo funcional no provoca actividad. Contrariamente el extracto 6518 a pesar de no haber mostrado actividad en el ensayo de radioligando, presenta un 40% de actividad antagonista sobre este receptor. Esta actividad es adecuada, debido a que la estimulación del receptor 5-HT_{2B} conduce a la proliferación de los fibroblastos de las válvulas cardíacas, en donde la administración crónica de agonistas de este receptor conducen a valvulopatía severa y se ha evidenciado que la actividad antagonista inhibe la hipertrofia cardíaca inducida.¹²⁵

Finalmente, la prueba de citotoxicidad nos proporciona un medio crucial para considerar compuestos candidatos para ser usados como fármacos. Para los sistemas de cultivo celular *in vitro*, se considera que un compuesto o tratamiento es citotóxico si interfiere con la adhesión celular, altera significativamente la morfología, afecta negativamente a la tasa de crecimiento celular o causa la muerte celular.¹²⁶ Las drogas fallan en los ensayos clínicos porque no funcionan y no son seguras. Como tal, uno de los pasos más importantes en el desarrollo de un nuevo fármaco es la determinación de la toxicidad en modelos animales o ensayos *in vitro*.¹²⁷

La citotoxicidad de las fracciones obtenidas derivadas de las cuatro plantas (7158, 6078, 6518 y 6521) fue investigada en las líneas celulares H9C2, 3T3, BJ, R22 y VERO. Se hizo la comparación con el fármaco de referencia atípico clozapina. En general, los fármacos convencionales antipsicóticos atípicos, como la clorpromazina, la flufenazina y la pimozida, son más tóxicos en células PC12 (derivadas de tumor adrenal) que los fármacos atípicos, como la clozapina, la quetiapina y la risperidona. La alta citotoxicidad se ha correlacionado con efectos adversos en el sistema nervioso y cardíaco. Se ha reportado que la clozapina es citotóxica a 100 μM (32.78 $\mu\text{g/ml}$) en células PC12¹²⁸, y en células de cáncer de pulmón A549 y H1299 hay un detenimiento de ciclo celular en la fase G0/G1 a 50 μM .¹²⁹ En comparación con nuestros resultados, la fracción A del extracto 7158 siendo la única activa en las pruebas de comportamiento OFT y PPI es menos citotóxica en las células H9C2, 3T3, BJ, R22 y VERO en comparación con el extracto crudo, a pesar de haber sido

probadas en las mismas concentraciones. Además, la fracción B más negativa en los bioensayos, es la que presenta más citotoxicidad que el extracto crudo en las cinco líneas celulares, especialmente en las células 3T3 ($<3.91 \mu\text{g/ml}$), lo que se sugiere que la citotoxicidad del extracto se acumula en la fracción sin actividad antipsicótica. Por otro lado, las fracciones del extracto 6078 y 6518 presentan un IC_{50} comparable al del extracto. El extracto 6521 tiene la más alta citotoxicidad, en comparación con los demás extractos, sus fracciones y de la clozapina respecto a estos resultados, se deberán llevar a cabo experimentos adicionales para investigar si es que los compuestos involucrados en la potencial actividad antipsicótica observada en este trabajo tienen citotoxicidad en diferentes líneas celulares comparándolos además con otros fármacos antipsicóticos actualmente utilizados en el mercado.

Tomando en conjunto los resultados *in vivo* e *in vitro*, podemos inferir que la planta 7158 contiene compuestos antipsicóticos, los cuales se encuentran en la fracción apolar A. La potencia antipsicótica fue determinada en pruebas de comportamiento ampliamente utilizada para la búsqueda de drogas antipsicóticas. Adicionalmente a nivel molecular, podemos inferir que su actividad antipsicótica en los bioensayos se debe a que los compuestos contenidos en el extracto interaccionan con receptores alterados en esquizofrenia, especialmente en psicosis, tales como, mGluR, PBR, 5-HT_{2B} y H₁ y además generan una actividad funcional agonista sobre el receptor 5-HT_{7A}. Se espera que en estudios posteriores, la fracción apolar A, tenga similar actividad en los receptores.

Resultados similares fueron obtenidos para la planta 6078. Esta planta contiene compuestos antipsicóticos, los cuales se encuentran en la fracción apolar D (fue el último debido que para este caso se utilizó una cromatografía en fase reversa). A nivel molecular, podemos inferir que su actividad antipsicótica en ambas pruebas de comportamiento se debe a que los compuestos contenidos en el extracto interaccionan con los receptores que también están alterados en episodios de psicosis, tales como, el receptor M3, mGlu5, 5HT1A, H1, H2, PBR y además los compuestos tiene afinidad por el transportador del neurotransmisor de dopamina (DAT).

Los bioensayos y los ensayos sobre receptores indican que la planta 6518 contiene compuestos antipsicóticos, los cuales de acuerdo a las pruebas de comportamiento se encuentran en la fracción apolar A y apolar D. Esta planta, también contiene compuestos que interactúan con receptores involucrados en la psicosis, tales como, mGlu5, 5HT1A, H1, 5HT2B, 5 HT6 y 5HT7A. Se espera que en estudios posteriores, ambas fracciones, tengan similar actividad en los receptores. Estudios posteriores, deberán tener en cuenta que los compuestos activos de esta planta no presenten actividad en el receptor indicador de hERG.

Finalmente, el extracto etanólico 6521, a pesar de inicialmente haber mostrado actividad en los ensayos *in vivo*, el extracto crudo y sus cuatro fracciones perdieron actividad en las pruebas de campo abierto e inhibición del sobresalto por prepulso. Es posible que los compuestos activos, debido a su naturaleza inestable, perdieran actividad durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, este extracto si

presenta interacción con receptores alterados en la esquizofrenia, tales como, mGlu5, H2 y 5HT1A y genera actividad antagónica en los receptores 5HT6, 5 HT7A y tiene actividad en el transportador del neurotransmisor serotonina (SERT).

7. CONCLUSIONES

- La fracción apolar A del extracto etanólico 7158 tiene efecto positivo en la prueba de campo abierto e inhibición del prepulso. El extracto inhibe la unión de los radioligandos específicos de los receptores mGluR (65.4%), PBR (61%), 5-HT2B (40.2%) y H1 (40%) y genera una actividad funcional antagonista sobre el receptor 5-HT7A (31.1%). La fracción activa presenta menor citotoxicidad que el extracto crudo y la clozapina sobre líneas celulares de mamíferos.
- La fracción más apolar D del extracto etanólico 6078 tiene efecto positivo en la prueba de campo abierto e inhibición del prepulso. El extracto inhibe la unión de radioligando sobre el receptor M3 (57.5%), mGlu5 (48.4%), 5HT1A (42.7%), H1 (33.3%), PBR (33.9) y el transportador de dopamina DAT (40.%). El extracto no provocó actividad funcional mayor del 30% en ninguno de los receptores. La fracción D presenta menor citotoxicidad que el extracto crudo y la clozapina sobre líneas celulares de mamíferos.
- La fracción apolar A y apolar D del extracto etanólico 6518 tienen efecto positivo en la prueba de campo abierto e inhibición del prepulso. El extracto inhibió la unión de radioligando del receptor mGlu5 (30.%) y genera actividad antagónica en los receptores 5HT2B (40%), 5 HT6 (45%) y 5HT7A

(52.5%). Las fracciones presentan menor citotoxicidad que el extracto crudo y la clozapina sobre líneas celulares de mamíferos; sin embargo presenta actividad en el canal de potasio hERG (30%).

- El extracto etanólico 6521 y sus cuatro fracciones perdieron actividad en las pruebas de campo abierto e inhibición del sobresalto por prepulso. Esto podría indicar que los compuestos activos son sustancias poco estables. Sin embargo, el extracto 6521 si presenta inhibición de unión a radioligando sobre los receptores mGlu5 (47.9%) y H2 (31.4%) y genera actividad antagónica en los receptores 5HT6 (44.3%) y 5HT7A (45.3%). El extracto 6521 tiene actividad en el transportador del neurotransmisor serotonina SERT (32.7%).

8. REFERENCIAS

- 1) World Health Organization (WHO). Schizophrenia. 2015. Disponible en: http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/
- 2) American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5ta Edición. Washington, DC. Editorial New School Library. 2014. p. 87-123.
- 3) Instituto Nacional de Salud (INS). Esquizofrenia es una de las psicosis más frecuentes en hospital Rebagliati. 2014. Disponible en: <http://www.essalud.gob.pe/esquizofrenia-es-una-de-las-psicosis-mas-frecuentes-en-hospital-rebagliati/>
- 4) Ahmed MN, Kabidul MN. Traditional knowledge and formulations of medicinal plants used by the traditional medical practitioners of Bangladesh to treat schizophrenia like psychosis. Schizophr Res Treatment. 2014;2014:1-10.
- 5) Selemon LD, Zecevic N. Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. Transl Psychiatry. 2015;5:e623.
- 6) Heckers S, Barch DM, Bustillo J, Gaebel W, Gur R, Malaspina D. Structure of the psychotic disorders classification in DSM-5. Schizophr Res. 2013;150(1):11-4.
- 7) Tost H, Alam T, Meyer-Lindenberg A. Dopamine and psychosis: theory, pathomechanisms and intermediate phenotypes. Neurosci Biobehav Rev. 2010;34(5):689-700.

- 8) Kirkpatrick B. Understanding the physiology of schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2013;74(3):e05.
- 9) Cai HL, Tan QY, Jiang P, Dang RL, Xue Y, Tang MM. A potential mechanism underlying atypical antipsychotics-induced lipid disturbances. *Transl Psychiatry*. 2015;5:e661.
- 10) Yu HY, Hsiao CY, Chen KC, Lee LT, Chang WH, Chi MH. A comparison of the effectiveness of risperidone, haloperidol and flupentixol long-acting injections in patients with schizophrenia-A nationwide study. *Schizophr Res*. 2015. pii: S0920-9964(15)00475-2.
- 11) Stone JM, Pilowsky LS. Antipsychotic drug action: targets for drug discovery with neurochemical imaging. *Expert Rev Neurother*. 2006;6(1):57-64.
- 12) Jones CA, Watson DJG, Fone KCF. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol*. 2011; 164(4):1162–1194.
- 13) Bisong SA, Brown RE, Osim EE. Comparative extrapyramidal effects of *Rauwolfia vomitoria*, chlorpromazine and reserpine in mice. *J Nat Med*. 2013;67(1):107-12.
- 14) Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Nat Prod Commun*. 2016;11(3):315-37.
- 15) Valdizán H. La alineación mental entre los primitivos peruanos [tesis doctoral]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina; 1915.
- 16) Elferink JG. Mental disorders among the Incas in ancient Peru. *History of Psychiatry*. Printed in England;1999:303-318.

- 17) Documet-Mafaldo T, Wong-Ferreya A, Traverso-Achaval E. Inventario y estudio preliminar de plantas medicinales usadas en medicina tradicional. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Medicina Humana; 1990.
- 18) Hernández-Alva M. Uso de plantas medicinales : manual para el personal de salud del primer nivel de atención. Lima: Proyecto Atención Primaria de Salud en la Región Loreto; 1997.
- 19) Seguin CA. Psiquiatría folklórica: shamanes y curanderos. Lima: Centro de Proyección Cristiana; 1979.
- 20) Valdizán H. Paleopsiquiatría del antiguo Perú. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 1990.
- 21) Vaisberg A. Gallo C. Poletti G. Drug discovery from Peruvian traditional medicine. 2015. [Comunicación personal].
- 22) Geyer MA, Gross G, Hofmann FB. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 213. Springer-Verlag; Berlin Heidelberg: 2012. Novel Antischizophrenia Treatments.
- 23) Yee BK, Singer P. A conceptual and practical guide to the behavioural evaluation of animal models of the symptomatology and therapy of schizophrenia. Cell Tissue Res. 2013;354(1):221-46.
- 24) Velazquez A. La carga de enfermedad y lesiones en el Perú y las prioridades del plan esencial de aseguramiento universal. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2009; 26(2): 222-31.

- 25) National Institute of Mental Health (NIMH). Schizophrenia. 2016. 1-12.
Disponibile en: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia/index.shtml>
- 26) Mizrahi R. Social Stress and Psychosis Risk: Common Neurochemical Substrates? *Neuropsychopharmacology*. 2015.
- 27) Del Bene VA, Foxe JJ, Ross LA, Krakowski MI, Czobor P, De Sanctis P. Neuroanatomical Abnormalities in Violent Individuals with and without a Diagnosis of Schizophrenia. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168100.
- 28) Gordon JA. Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Nat Neurosci*. 2010;13(1):2-4.
- 29) Zavodnick AD, Ali R. N-Acetylcysteine and metabotropic glutamate receptors: implications for the treatment of schizophrenia: a literature review. *Psychiatr Q*. 2014;85(2):177-85.
- 30) HealthAppointments. Chapter 8: Neurotransmitters. Disponibile en: <https://healtheappointments.com/chapter-8-neurotransmitters-essays/4/>
- 31) Guzman F & Farinde A. First-Generation Antipsychotics: An Introduction. *Psychopharmacology Institute*. 2016. Disponibile en: <http://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/first-generation-antipsychotics/>
- 32) Glass MJ, Robinson DC, Waters E, Pickel VM. Deletion of the NMDA-NR1 receptor subunit gene in the mouse nucleus accumbens attenuates apomorphine-induced dopamine D1 receptor trafficking and acoustic startle behavior. *Synapse*. 2013;67(6):265-79.

- 33) Chatterjee M, Verma R, Kumari R, Singh S, Verzma AK, Dwivedi AK, et al. Antipsychotic activity of standardized Bacopa extract against ketamine-induced experimental psychosis in mice: Evidence for the involvement of dopaminergic, serotonergic, and cholinergic systems. *Pharm Biol.* 2015;53(12):1850-60.
- 34) Giménez-Llort L, Martínez E, Ferré S. Different effects of dopamine antagonists on spontaneous and NMDA-induced motor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;56(3):549-53.
- 35) Bleich A, Brown SL, Kahn R, van Praag HM. The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1988;14(2):297-315.
- 36) Meltzer HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology.* 1999;21(2 Suppl):106S-115S.
- 37) Markota M, Sin J, Pantazopoulos H, Jonilionis R, Berretta S. Reduced dopamine transporter expression in the amygdala of subjects diagnosed with schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2014;40(5):984-91.
- 38) Hernandez I, Sokolov BP. Abnormal expression of serotonin transporter mRNA in the frontal and temporal cortex of schizophrenics. *Mol Psychiatry.* 1997;2(1):57-64.
- 39) Choo M, Hwang JA, Jeon SW, Oh SY, Yoon HK, Lee HJ, Kim YK. Association Study between Norepinephrine Transporter Gene Polymorphism and Schizophrenia in a Korean Population. *Psychiatry Investig.* 2015 Oct;12(4):551-8.
- 40) Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. *Neuron.* 2012;73(5):862-85.
- 41) Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology,

- pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:295-322.
- 42) Stefani MR, Moghaddam B. Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors attenuates deficits in cognitive flexibility induced by NMDA receptor blockade. *Eur J Pharmacol.* 2010;639(1-3):26-32.
- 43) Arsenault D, Coulombe K, Zhu A, Gong C, Kil KE, Choi JK, Poutiainen P, Brownell AL. Loss of Metabotropic Glutamate Receptor 5 Function on Peripheral Benzodiazepine Receptor in Mice Prenatally Exposed to LPS. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142093.
- 44) Bradford AM, Savage KM, Jones DN, Kalinichev M. Validation and pharmacological characterisation of MK-801-induced locomotor hyperactivity in BALB/C mice as an assay for detection of novel antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl).* 2010;212(2):155-70.
- 45) Huang XP, Karpiak J, Kroeze WK, Zhu H, Chen X, Moy SS. Allosteric ligands for the pharmacologically dark receptors GPR68 and GPR65. *Nature.* 2015;527(7579):477-83.
- 46) Iwabuchi K, Ito C, Tashiro M, Kato M, Kano M, Itoh M, et al. Histamine H1 receptors in schizophrenic patients measured by positron emission tomography. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005;15(2):185-91.
- 47) Dean B, Bymaster FP, Scarr E. Muscarinic receptors in schizophrenia. *Curr Mol Med.* 2003;3(5):419-26.
- 48) Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int.* 2002;40(6):475-86.

- 49) Wodarz N, Rothenhöfer C, Fischer R, Stöber G, Kiehl B, Jungkunz G, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptors in diagnostic subtypes of schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 1998;81(3):363-9.
- 50) Meltzer HY. Update on typical and atypical antipsychotic drugs. *Annu Rev Med.* 2013;64:393-406.
- 51) Leiderman EA, Lorenzo L. Prescription patterns in the treatment of schizophrenia. *Vertex.* 2015;26(119):11-6.
- 52) Sumiyoshi T. Possible dose-side effect relationship of antipsychotic drugs: relevance to cognitive function in schizophrenia. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2008 Nov;1(6):791-802.
- 53) McGonigle P. Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol.* 2014;87(1):140-9.
- 54) Young JW, Zhou X, Geyer MA. Animal models of schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci.* 2010;4:391-433.
- 55) Floresco SB, Geyer MA, Gold LH, Grace AA. Developing predictive animal models and establishing a preclinical trials network for assessing treatment effects on cognition in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2005;31(4):888-94.
- 56) Andiné P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Mårtensson E, Sandberg M. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290(3):1393-408.
- 57) Fernandes A, Wojcik T, Baireddy P, Pieschl R, Newton A, Tian Y. Inhibition of in vivo [3H]MK-801 binding by NMDA receptor open channel blockers and

- GluN2B antagonists in rats and mice. *Eur J Pharmacol.* 2015. pii: S0014-2999(15)30217-X.
- 58) Saletti PG, Maior RS, Hori E, Nishijo H, Tomaz C. Sensorimotor gating impairments induced by MK-801 treatment may be reduced by tolerance effect and by familiarization in monkeys. *Front Pharmacol.* 2015;6:204.
- 59) Geyer MA, Moghaddam B. Animal models relevant to schizophrenia disorders. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.* 2002; 7(10): 1039-1053.
- 60) Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The Open Field Test. Protocol Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. 2009 (42): 1-20.
- 61) Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):3-33.
- 62) Michel HE, Tadros MG, Abdel-Naim AB, Khalifa AE. Prepulse inhibition (PPI) disrupting effects of Glycyrrhiza glabra extract in mice: a possible role of monoamines. *Neurosci Lett.* 2013;544:110-4.
- 63) Mahler G, Saiz C. Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos, una vision iberoamericana. *RIDIMEDCHAG-CYTED.* México, DF. 2011. Pp 227-241.
- 64) Jain BN, Jain VK, Shete A. Antipsychotic activity of aqueous ethanolic extract of *Tinospora cordifolia* in amphetamine challenged mice model. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010;1(1):30-3.

- 65) Ebuehi DA, Aleshinloye OO. Extracts of *Cnestis ferruginea* and *Rawolfia vomitoria* affect blood chemistry and GABAergic neurotransmission in ketamine-induced psychotic rats. *Nig Q J Hosp Med.* 2010;20(4):171-6.
- 66) Pandey V1, Narasingam M, Mohamed Z. Antipsychotic-like activity of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:186.
- 67) Sotoing Taiwe G, Ngo Bum E, Talla E, Dawe A, Okomolo Moto FC, Temkou Ngoupaye G, et al. Antipsychotic and sedative effects of the leaf extract of *Crassocephalum bauchiense* (Hutch.) Milne-Redh (Asteraceae) in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2013;143(1):213-20.
- 68) Arowona IT, Sonibare MA, Umsukoro S. Antipsychotic property of solvent-partitioned fractions of *Lonchocarpus cyanescens* leaf extract in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2014;25(2):235-40.
- 69) Jash R, Chowdary KA. Ethanolic extracts of *Alstonia scholaris* and *Bacopa monniera* possess neuroleptic activity due to anti-dopaminergic effect. *Pharmacognosy Res.* 2014;6(1):46-51.
- 70) Magaji MG, Mohammed M, Magaji RA, Musa AM, Abdu-Aguye I, Hussaini IM. Evaluation of the antipsychotic potential of aqueous fraction of *Securinega virosa* root bark extract in mice. *Metab Brain Dis.* 2014b;29(1):161-5.
- 71) Hostettmann K, Terreaux C. Medium-pressure liquid chromatography (MPLC). University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. 2000. pp, 3296-3302.
- 72) Biradi M, Hullatti K. Bioactivity guided isolation of cytotoxic terpenoids and steroids from *Premna serratifolia*. *Pharm Biol.* 2017;55(1):1375-1379.
- 73) Biomodel. Disponible en: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/inicio.htm>).

- 74) Roth BL. National Institute of Mental Health Psychoactive Drug Screening Program (NIMH PDSP). Assay protocol Book Version II. 2013. Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599.
- 75) Lambert DG. Drugs and receptors. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 2004; 4 (6): 181-184.
- 76) Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Radioligand binding assays and their analysis. *Methods Mol Biol*. 2012;897:31-77.
- 77) Bylund DB, Toews ML. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am J Physiol*. 1993;265(5 Pt 1):L421-9.
- 78) Hulme EC, Trevethick MA. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol*. 2010;161(6):1219-37.
- 79) Lavreysen H, Atack J. Receptors: Functional Assays. *Encyclopedia of Psychopharmacology*. 2014: 1-11.
- 80) Arkin MR, Connor PR, Emkey R, Garbison KE, Heinz BA, Wiernicki TR, Johnston PA, Kandasamy RA, Rankl NB, Sittampalam S. FLIPR™ Assays for GPCR and Ion Channel Targets. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2012.
- 81) Molecular DEVICES. <https://www.moleculardevices.com/systems/flipr-tetra-high-throughput-cellular-screening-system>
- 82) Fan F, Binkowski BF, Butler BL, Stecha PF, Lewis MK, Wood KV. Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase. *ACS Chem Biol*. 2008;3(6):346-51.

- 83) Promega. GloSensor™ cAMP Assay.
<https://worldwide.promega.com/products/drug-discovery/gpcr-assays/glosensor-technology/glosensor-camp-assay/>
- 84) Zhang R, Xie X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2012; 33(3): 372–384.
- 85) Molecular DEVICES. <https://www.moleculardevices.com/products/assay-kits/neurotransmitter-transporter-uptake-assay-kit>
- 86) Titus SA, Beacham D, Shahane SA, Southall N, Xia M, Huang R, Hooten E, Zhao Y, Shou L, Austin CP, Zheng W. A new homogeneous high-throughput screening assay for profiling compound activity on the human ether-a-go-go-related gene channel. *Anal Biochem.* 2009;394(1):30-8.
- 87) Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med.* 2005;110:39-48.
- 88) Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1112-6.
- 89) Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002;43:244–58.
- 90) Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4): 303–306.
- 91) Granja V. Evaluación comparativa de antipsicóticos comercializados para el tratamiento de la esquizofrenia en ratones Swiss, utilizando las pruebas de campo abierto e inhibición de prepulso. Tesis de licenciatura. 2015. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

- 92) Chatterjee M, Singh S, Kumari R, Verma AK, Palit G. Evaluation of the antipsychotic potential of *Panax quinquefolium* in ketamine induced experimental psychosis model in mice. *Neurochem Res.* 2012;37(4):759-70.
- 93) Katiyar C, Gupta A, Kanjilal S, Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *Ayu.* 2012;33(1):10-9.
- 94) Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Bielau H, Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B, Braun K, Jankowski Z, Kumaratilake J, Henneberg M, Gos T. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front Psychiatry.* 2014;5:47.
- 95) Gang DR. *The Biological Activity of Phytochemicals. Recent Advances in Phytochemistry.* Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 2011.
- 96) Chindo BA, Kahl E, Trzeciak D, Dehmel P, Becker A, Fendt M. Standardized extract of *Ficus platyphylla* reverses apomorphine-induced changes in prepulse inhibition and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res.* 2015;293:74-80.
- 97) Oh HK, Jeon SJ, Lee S, Lee HE, Kim E, Park SJ, et al. Swertisin ameliorates prepulse inhibition deficits and cognitive impairment induced by MK-801 in mice. *J Psychopharmacol.* 2017;31(2):250-259.
- 98) Park SJ, Jeon SJ, Dela Peña IC, Lee HE, Kim DH, Kim JM, et al. *Prunella vulgaris* attenuates prepulse inhibition deficit and attention disruption induced by MK-801 in mice. *Phytother Res.* 2013;27(12):1763-9.
- 99) Chen HL, Lee HJ, Huang WJ, Chou JF, Fan PC, Du JC, Ku YL, Chiou LC. *Clerodendrum inerme* Leaf Extract Alleviates Animal Behaviors, Hyperlocomotion, and Prepulse Inhibition Disruptions, Mimicking Tourette

- Syndrome and Schizophrenia. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:284301.
- 100) Chindo BA, Adzu B, Yahaya TA, Gamaniel KS. Ketamine-enhanced immobility in forced swim test: a possible animal model for the negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;38(2):310-6.
- 101) Lee H, Won H, Im J, Kim YO, Lee S, Cho IH, Kim HK, Kwon JT, Kim HJ. Effect of *Valeriana fauriei* extract on the offspring of adult rats exposed to prenatal stress. *Int J Mol Med.* 2016;38(1):251-8.
- 102) Smilkstein M, Sriwilajaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48: 1803–1806.
- 103) Kumari P, Sahal D, Jain SK, Chauhan VS. Bioactivity guided fractionation of leaves extract of *Nyctanthes arbor tristis* (Harshringar) against *P falciparum*. *PLoS One.* 2012;7(12):e51714.
- 104) Ulrich-Merzenich G, Panek D, Zeitler H, Vetter H, Wagner H. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian J Exp Biol.* 2010;48(3):208-19.
- 105) Qin C, Tan KL, Zhang CL, Tan CY, Chen YZ, Jiang YY. What does it take to synergistically combine sub-potent natural products into drug-level potent combinations? *PLoS One.* 2012;7(11):e49969.
- 106) Frost WN, Tian LM, Hoppe TA, Mongeluzi DL, Wang J. A cellular mechanism for prepulse inhibition. *Neuron.* 2003;40(5):991-1001.

- 107) Newell KA. Metabotropic glutamate receptor 5 in schizophrenia: emerging evidence for the development of antipsychotic drugs. *Future Med Chem.* 2013;5(13):1471-4.
- 108) Matosin N, Newell KA. Metabotropic glutamate receptor 5 in the pathology and treatment of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(3):256-68.
- 109) Reynolds GP. Receptor mechanisms of antipsychotic drug action in bipolar disorder - focus on asenapine. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2011;1(6):197-204.
- 110) Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl).* 2009;206(3):345-54.
- 111) Corbett R, Camacho F, Woods AT, Kerman LL, Fishkin RJ, Brooks K, Dunn RW. Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacology (Berl).* 1995;120(1):67-74.
- 112) Urs NM, Peterson SM, Caron MG. New Concepts in Dopamine D₂ Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy. *Biol Psychiatry.* 2017;81(1):78-85.
- 113) Jones CK, Brady AE, Davis AA, Xiang Z, Bubser M, Tantawy MN, et al. Novel selective allosteric activator of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J Neurosci.* 2008b;28:10422–1043.
- 114) Fakra E, Azorin JM. Clozapine for the treatment of schizophrenia. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(13):1923-35.
- 115) Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC (2008) Selective muscarinic receptor

- agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 165:1033–1039.
- 116) Meskanen K, Ekelund H, Laitinen J, Neuvonen PJ, Haukka J, Panula P, Ekelund J. A randomized clinical trial of histamine 2 receptor antagonism in treatment-resistant schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 2013;33(4):472-8.
- 117) Foster JD, Vaughan RA. Phosphorylation mechanisms in dopamine transporter regulation. *J Chem Neuroanat.* 2016. pii: S0891-0618(16)30159-4.
- 118) Bantick RA, Deakin JF, Grasby PM. The 5-HT_{1A} receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? *J Psychopharmacol.* 2001;15(1):37-46.
- 119) Nikiforuk A1, Kos T, Fijał K, Hołuj M, Rafa D, Popik P. Effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 and amisulpride on ketamine-induced schizophrenia-like deficits in rats. *PLoS One.* 2013 Jun 11;8(6):e66695.
- 120) de Bruin NM1, Kruse CG. 5-HT₆ Receptor Antagonists: Potential Efficacy for the Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia. *Curr Pharm Des.* 2015;21(26):3739-59.
- 121) De Smet F, Christopoulos A, Carmeliet P. Allosteric targeting of receptor tyrosine kinases. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1113-20.
- 122) Olfson M, Gerhard T, Crystal S, Stroup TS. Clozapine for Schizophrenia: State Variation in Evidence-Based Practice. *Psychiatr Serv.* 2015:appips201500324.

- 123) Shen AN, Newland MC. Examination of clozapine and haloperidol in improving ketamine-induced deficits in an incremental repeated acquisition procedure in BALB/c mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015.
- 124) Thomas D, Karle CA, Kiehn J. The cardiac hERG/IKr potassium channel as pharmacological target: structure, function, regulation, and clinical applications. *Curr Pharm Des*. 2006;12(18):2271-83.
- 125) Janssen W, Schymura Y, Novoyatleva T, Kojonazarov B, Boehm M, Wietelmann A, Luitel H, et al. 5-HT_{2B} receptor antagonists inhibit fibrosis and protect from RV heart failure. *Biomed Res Int*. 2015;2015:438403.
- 126) Niles AL, Moravec RA, Riss TL. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov*. 2008;3(6):655-69.
- 127) Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2011;162(6):1239-49.
- 128) Dwyer DS, Lu XH, Bradley RJ. Cytotoxicity of conventional and atypical antipsychotic drugs in relation to glucose metabolism. *Brain Res*. 2003;971(1):31-9.
- 129) Yin YC, Lin CC, Chen TT, Chen JY, Tsai HJ, Wang CY, Chen SY. Clozapine induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(3):945-56.

9. ANEXOS

9.1. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS POR MPLC.

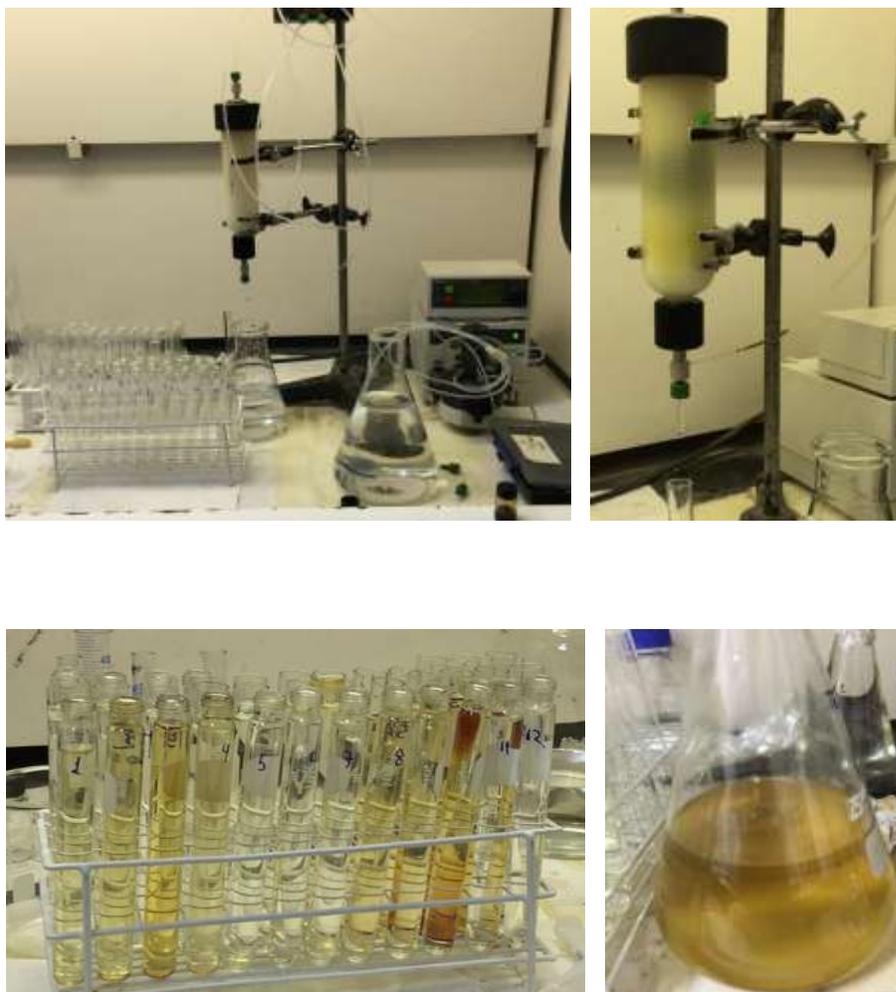


Figura 27. Procedimiento de fraccionamiento de los extractos. En la figura se muestra una columna fase reversa RP-18 y los tubos en donde se recolectó aproximadamente

20 ml.

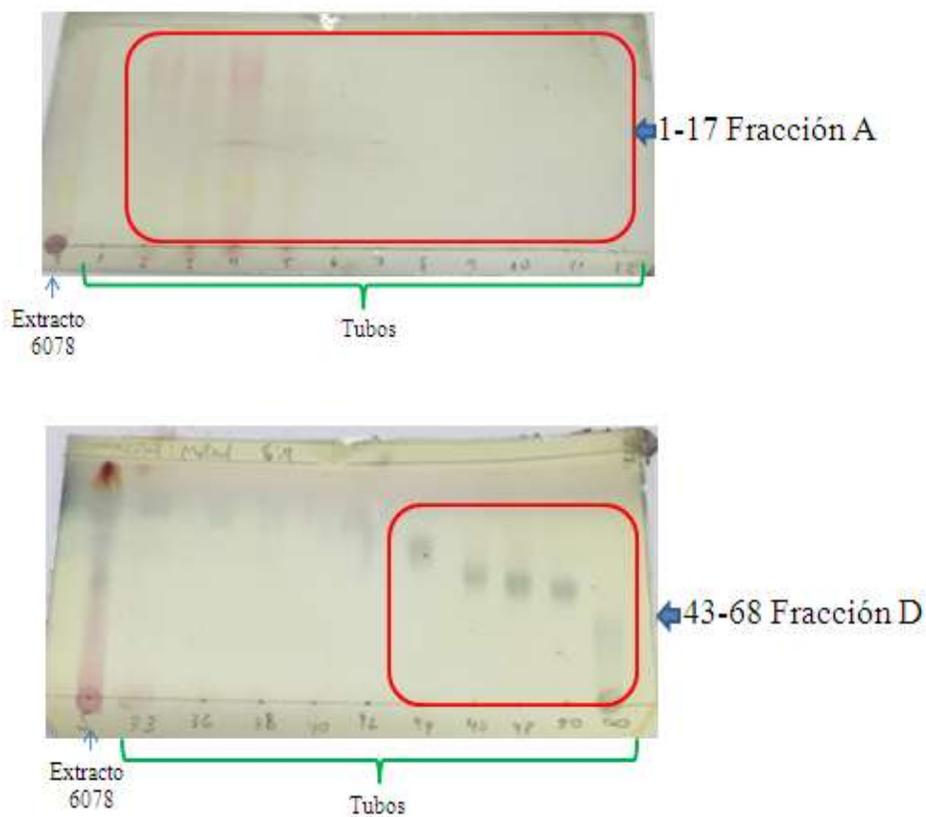


Figura 28. Cromatografía de capa fina (Fase reversa RP-18) de cada uno los tubos recolectados en la cromatográfica de presión media (MPLC). En base a la similitud del patrón de manchas en el cromatograma se agruparon como Fracción A, B, C o D (A y D mostradas en la figura) en balones para su posterior evaporación. Cromatogramas de las fracciones en el sistema de solventes $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (4:6) con el revelador Vanilina-ácido sulfúrico.



Figura 29. Ejemplo de agrupación del volumen de tubos que presentaron un patrón similar en la cromatografía de capa fina.



Figura 30. Evaporación de los solventes de cada fracción. Se utilizó diferentes niveles de presión para cada solvente. La temperatura del baño de agua fue 40 °C.



Figura 31. Preparación de los extractos, fracciones y reconstituido para las pruebas de campo abierto e inhibición del prepulso. Se pesa el extracto, luego se agrega 240 μ L de DMSO y luego se agrega 160 uL de agua ultrapura (12 horas antes) y al día siguiente se agrega 2 mL de agua ultrapura.

9.2 PRUEBA DE CAMPO ABIERTO

Tabla 16. Peso de los individuos, cantidad administrada vía oral para la prueba de campo abierto del extracto 7158 y sus fracciones.

ID	Peso del ratón (g)	Cantidad administrada (g)	grupo
Q1287	33.7	-	SS
S1324	35.6	-	SS
T1330	32.7	-	SS
U1336	35.2	-	SS
W1355	27.3	-	SS
W1359	34.2	-	SS
Q1286	34.9	-	Vehículo
R1308	32.4	-	Vehículo
S1327	34.6	-	Vehículo
V1349	31.8	-	Vehículo
W1358	29.3	-	Vehículo
X1362	30.6	-	Vehículo
Q1292	34.5	0.000345	Clozapina
R1310	30.3	0.000303	Clozapina
T1329	34.9	0.000349	Clozapina
V1348	30.4	0.000304	Clozapina
W1357	35.4	0.000354	Clozapina
X1363	34.1	0.000341	Clozapina
Q1291	33.1	0.004965	Extracto 7158
R1311	30	0.0045	Extracto 7158
S1325	37.6	0.00564	Extracto 7158
U1335	36.5	0.005475	Extracto 7158
V1350	31.2	0.00468	Extracto 7158
X1367	34.2	0.00513	Extracto 7158
R1307	30.6	0.00459	Reconstituido
S1321	31.2	0.00468	Reconstituido
T1331	35.6	0.00534	Reconstituido
U1337	36	0.0054	Reconstituido

V1352	31	0.00465	Reconstituido
X1365	33.9	0.005085	Reconstituido
Q1289	35.1	0.000156897	Fracción A
R1312	31.6	0.000141252	Fracción A
T1332	35.7	0.000159579	Fracción A
U1338	31.6	0.000141252	Fracción A
V1351	31.3	0.000139911	Fracción A
X1366	34.8	0.000155556	Fracción A
Q1288	34.5	0.00068379	Fracción B
S1323	35.1	0.000695682	Fracción B
U1333	36.2	0.000717484	Fracción B
V1346	30.1	0.000596582	Fracción B
W1354	31.7	0.000628294	Fracción B
X1361	33.4	0.000661988	Fracción B
R1306	32.6	0.002081836	Fracción C
R1309	34.3	0.002190398	Fracción C
S1322	37.5	0.00239475	Fracción C
V1347	32	0.00204352	Fracción C
V1353	32.9	0.002100994	Fracción C
W1360	29.5	0.00188387	Fracción C
Q1290	33.9	0.002096037	Fracción D
S1326	39.4	0.002436102	Fracción D
T3128	32.4	0.002003292	Fracción D
U1334	30.1	0.001861083	Fracción D
W1356	32.3	0.001997109	Fracción D
X1364	31	0.00191673	Fracción D

Tabla 17. Peso de los individuos, cantidad administrada vía oral para la prueba de campo abierto del extracto 6078 y sus fracciones.

ID	Peso del ratón (g)	Cantidad administrada (g)	grupo
U1981	39.8	-	SS
V1986	39.6	-	SS
W2007	40.6	-	SS
X2013	43.1	-	SS
Y2043	37.9	-	SS

R1936	39.3	-	SS
S1940	39.1	-	Vehículo
T1976	36.6	-	Vehículo
V1997	38	-	Vehículo
V1998	42.8	-	Vehículo
Y2042	37.2	-	Vehículo
Z2048	41.8	-	Vehículo
T1978	40.1	0.000401	Clozapina
U1982	37.4	0.000374	Clozapina
V2000	45	0.00045	Clozapina
X2012	36.7	0.000367	Clozapina
X2015	38.8	0.000388	Clozapina
Z2052	41.8	0.000418	Clozapina
S1944	38.6	0.00579	Extracto 6078
V1995	44.8	0.00672	Extracto 6078
V1999	40.1	0.006015	Extracto 6078
X2014	35.4	0.00531	Extracto 6078
Y2040	36.1	0.005415	Extracto 6078
Z2051	42	0.0063	Extracto 6078
S1943	39	0.00585	Reconstituido
U1984	42.2	0.00633	Reconstituido
V2002	39.4	0.00591	Reconstituido
X2011	39.8	0.00597	Reconstituido
Y2039	37.8	0.00567	Reconstituido
Y2045	37.6	0.00564	Reconstituido
U1980	40.9	0.003761982	Fracción A
U1985	41.2	0.003789576	Fracción A
W2003	36.9	0.003394062	Fracción A
W2006	39	0.00358722	Fracción A
X2017	37.8	0.003476844	Fracción A
Z2050	43	0.00395514	Fracción A
T1977	40.3	0.00051584	Fracción B
U1983	38	0.0004864	Fracción B
V2001	44.4	0.00056832	Fracción B
W2008	41.8	0.00053504	Fracción B
Y2041	40.5	0.0005184	Fracción B
Z2040	38	0.0004864	Fracción B
T1979	38	0.00056392	Fracción C

V1996	45	0.0006678	Fracción C
W2004	39.6	0.000587664	Fracción C
R1937	37.9	0.000562436	Fracción C
R1942	38.1	0.000565404	Fracción C
R1934	40.5	0.00060102	Fracción C
S1945	38.9	0.001184894	Fracción D
U1987	39.4	0.001200124	Fracción D
W2005	44.2	0.001346332	Fracción D
W2009	41.9	0.001276274	Fracción D
Y2044	38.5	0.00117271	Fracción D
R2049	40.2	0.001224492	Fracción D

Tabla 18. Peso de los individuos, cantidad administrada vía oral para la prueba de campo abierto del extracto 6518 y sus fracciones.

ID	Peso del ratón (g)	Cantidad administrada (g)	grupo
O3045	39.8	-	SS
Q3063	31.3	-	SS
R3077	37.6	-	SS
S3080	37.7	-	SS
U4001	34.8	-	SS
V4007	39.4	-	SS
Q3040	35	-	Vehículo
Q3059	39.7	-	Vehículo
Q3064	40.1	-	Vehículo
S3085	37.4	-	Vehículo
U4003	38.6	-	Vehículo
V4013	42.4	-	Vehículo
O3041	35	0.00035	Clozapina
Q3061	40.4	0.000404	Clozapina
R3075	39.2	0.000392	Clozapina
S3084	36.7	0.000367	Clozapina
U4000	39.1	0.000391	Clozapina
V4012	35.9	0.000359	Clozapina
O3044	39.8	0.00597	Extracto 6518

P3051	41.4	0.00621	Extracto 6518
Q3065	35.8	0.00537	Extracto 6518
S3082	41.3	0.006195	Extracto 6518
T3090	32.5	0.004875	Extracto 6518
V4011	39.6	0.00594	Extracto 6518
P3046	42.3	0.006345	Reconstituido
P3048	42.1	0.006315	Reconstituido
Q3066	39.3	0.005895	Reconstituido
T3088	38.8	0.00582	Reconstituido
U4004	39	0.00585	Reconstituido
		0	Reconstituido
O3042	40.2	0.001146102	Fracción A
P3049	39.5	0.001126145	Fracción A
R3076	39.1	0.001114741	Fracción A
T3086	37.2	0.001060572	Fracción A
U4002	39.6	0.001128996	Fracción A
U4006	39.3	0.001120443	Fracción A
O3043	41.3	0.000374178	Fracción B
Q3060	38.3	0.000346998	Fracción B
R3078	39	0.00035334	Fracción B
T3087	36.3	0.000328878	Fracción B
U4005	38.5	0.00034881	Fracción B
V4009	36.7	0.000332502	Fracción B
O3039	41.9	0.00093018	Fracción C
P3050	39.2	0.00087024	Fracción C
R3074	40	0.000888	Fracción C
S3083	41.5	0.0009213	Fracción C
T3091	35.3	0.00078366	Fracción C
V4008	38.6	0.00085692	Fracción C
P3047	44.5	0.004014345	Fracción D
Q3062	41.8	0.003770778	Fracción D
S3079	41	0.00369861	Fracción D
S3081	39.2	0.003536232	Fracción D
T3089	36.4	0.003283644	Fracción D
V4010	37	0.00333777	Fracción D

Tabla 19. Peso de los individuos, cantidad administrada vía oral para la prueba de campo abierto del extracto 6521 y sus fracciones.

ID	Peso del ratón (g)	Cantidad administrada (g)	grupo
1	36	-	SS
16	35.2	-	SS
23	38.1	-	SS
34	32.7	-	SS
42	35.6	-	SS
49	37.1	-	SS
3	29.2	-	Vehículo
14	35.8	-	Vehículo
26	37.2	-	Vehículo
29	39.6	-	Vehículo
38	33.9	-	Vehículo
47	36.8	-	Vehículo
2	36.7	0.000367	Clozapina
10	40.3	0.000403	Clozapina
25	35.1	0.000351	Clozapina
28	36	0.00036	Clozapina
45	35.8	0.000358	Clozapina
53	36	0.00036	Clozapina
6	35.2	0.00528	Extracto 6521
13	33.5	0.005025	Extracto 6521
27	38.6	0.00579	Extracto 6521
31	39.8	0.00597	Extracto 6521
40	33.2	0.00498	Extracto 6521
54	33.3	0.004995	Extracto 6521
4	33.9	0.005085	Reconstituido
17	37.1	0.005565	Reconstituido
21	38.7	0.005805	Reconstituido
32	33.9	0.005085	Reconstituido
39	33.1	0.004965	Reconstituido
48	34.4	0.00516	Reconstituido
5	34.7	0.000989297	Fracción A
11	37.7	0.001074827	Fracción A
22	34	0.00096934	Fracción A

35	34.9	0.000994999	Fracción A
41	34.7	0.000989297	Fracción A
50	34.2	0.000975042	Fracción A
7	32.2	0.000291732	Fracción B
12	37.2	0.000337032	Fracción B
20	36.3	0.000328878	Fracción B
30	33.8	0.000306228	Fracción B
37	34.7	0.000314382	Fracción B
51	35	0.0003171	Fracción B
8	33.7	0.00074814	Fracción C
15	39.8	0.00088356	Fracción C
19	35.1	0.00077922	Fracción C
33	33.8	0.00075036	Fracción C
43	35	0.000777	Fracción C
52	35.6	0.00079032	Fracción C
9	37.6	0.003391896	Fracción D
18	36.1	0.003256581	Fracción D
24	37	0.00333777	Fracción D
36	36	0.00324756	Fracción D
44	34.9	0.003148329	Fracción D
46	35.4	0.003193434	Fracción D

9.3 PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL PREPULSO

Tabla 20. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción A extracto 7158.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
Q1287	V/SS	35.3	-
S1324	V/SS	38.7	-
T1330	V/SS	38.5	-
U1336	V/SS	37.9	-

Q1286	V/MK-801	37.6	-
R1308	V/MK-801	33.5	-
S1327	V/MK-801	34.2	-
V1349	V/MK-801	31.6	-
Q1292	CZ/MK-801	37.5	0.000375
Y1372	CZ/MK-801	31.7	0.000317
V1348	CZ/MK-801	30.8	0.000308
W1357	CZ/MK-801	36.5	0.000365
Q1288	7158-A/801	36.6	0.000163602
Y1374	7158-A/801	30.1	0.000134547
U1333	7158-A/801	36.6	0.000163602
X1361	7158-A/801	36.5	0.000163155

Tabla 21. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción B extracto 7158.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
Q1287	V/SS	35.3	-
S1324	V/SS	38.7	-
T1330	V/SS	38.5	-
U1336	V/SS	37.9	-
Q1286	V/MK-801	37.6	-
R1308	V/MK-801	33.5	-
S1327	V/MK-801	34.2	-
V1349	V/MK-801	31.6	-
Q1292	CZ/MK-801	37.5	0.000375
Y1372	CZ/MK-801	31.7	0.000317
V1348	CZ/MK-801	30.8	0.000308
W1357	CZ/MK-801	36.5	0.000365
Q1288	7158-A/801	36.6	0.000163602
Y1374	7158-A/801	30.1	0.000134547
U1333	7158-A/801	36.6	0.000163602
X1361	7158-A/801	36.5	0.000163155

Tabla 22. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción C extracto 7158.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
AI1486	V/SS	33.1	-
AI1490	V/SS	30.8	-
AJ1494	V/SS	30.6	-
AJ1498	V/SS	32.2	-
AI1487	V/MK-801	34.3	-
AI1491	V/MK-801	34.4	-
AJ1495	V/MK-801	31.1	-
AJ1498	V/MK-801	32.2	-
AI1488	CZ/MK-801	33.7	0.000337
AI1492	CZ/MK-801	33.5	0.000335
AJ1496	CZ/MK-801	29.2	0.000292
AK1508	CZ/MK-801	32.6	0.000326
AI1489	7158-C/MK-801	35.1	0.002241486
AI1493	7158-C/MK-801	33.6	0.002145696
AJ1497	7158-C/MK-801	32.5	0.00207545
AJ11501	7158-C/MK-801	34.7	0.002215942

Tabla 23. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción A extracto 6078.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
AZ1713	V/SS	33.8	-
A1735	V/SS	38.3	-
B1760	V/SS	32.9	-
A1741	V/SS	36.1	-
AY1704	V/MK-801	38.2	-
AY1705	V/MK-801	38.6	-
A1738	V/MK-801	34.3	-
C1773	V/MK-801	31.3	-
AY1710	CZ/MK-801	40.4	0.000404
AZ1719	CZ/MK-801	37.9	0.000379
AZ1715	CZ/MK-801	33	0.00033
C1772	CZ/MK-801	41.7	0.000417
AY1709	6078-A/MK-801	40.3	0.003706794
AZ1716	6078-A/MK-801	38.8	0.003568824
A1736	6078-A/MK-801	40.2	0.003697596
B1766	6078-A/MK-801	33.8	0.003108924

Tabla 24. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción B extracto 6078.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
AZ2881	V/SS	42.2	-
AZ2879	V/SS	45.5	-

AF2932	V/SS	37.6	-
G2948	V/SS	35.9	-
AZ2877	V/MK-801	44.2	-
AZ2876	V/MK-801	39.5	-
AF2927	V/MK-801	36	-
A2953	V/MK-801	30.8	-
AZ2882	CZ/MK-801	43.8	0.000438
AZ2777	CZ/MK-801	41.8	0.000418
AF2930	CZ/MK-801	35.2	0.000352
A2910	CZ/MK-801	39.2	0.000392
AZ2878	6078-B/MK-801	41.4	0.00052578
AF2931	6078-B/MK-801	39.2	0.00049784
AF2929	6078-B/MK-801	34.8	0.00044196
H2952	6078-B/MK-801	36.1	0.00045847

Tabla 25. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción C extracto 6078.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
O1915	V/SS	40.3	-
O1910	V/SS	39	-
P1920	V/SS	36.8	-
P1922	V/SS	36.4	-
O1911	V/MK-801	38.5	-
O1916	V/MK-801	37.4	-
P1930	V/MK-801	36	-
P1919	V/MK-801	39	-
O1914	CZ/MK-801	40.6	0.000406
O1913	CZ/MK-801	41.4	0.000414
P1924	CZ/MK-801	34.1	0.000341
P1925	CZ/MK-801	34.8	0.000348

O1917	6078-C/MK-801	37.3	0.000553532
O1912	6078-C/MK-801	39.7	0.000589148
P1921	6078-C/MK-801	33.4	0.000495656
P1918	6078-C/MK-801	37.7	0.000559468

Tabla 26. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción D extracto 6078.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
D1778	V/SS	37.6	-
D1783	V/SS	35.1	-
H1833	V/SS	38	-
F1794	V/SS	36.8	-
D1782	V/MK-801	35.9	-
E1838	V/MK-801	36.4	-
F1794	V/MK-801	40.2	-
F1796	V/MK-801	38.3	-
D1781	CZ/MK-801	37.1	0.000371
H1836	CZ/MK-801	40.3	0.000403
F1901	CZ/MK-801	37.1	0.000371
F1797	CZ/MK-801	40.2	0.000402
D1778	6078-D/MK-801	36.8	0.001121112
D1785	6078-D/MK-801	38	0.00115767
F1799	6078-D/MK-801	34.6	0.001054089
D1847	6078-D/MK-801	38.4	0.001169856

Tabla 27. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción A extracto 6518.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
G1809	V/SS	40.4	-
G1813	V/SS	38.3	-
H1817	V/SS	38	-
H1821	V/SS	36.4	-
G1810	V/MK-801	39.4	-
G1814	V/MK-801	37.4	-
H1818	V/MK-801	35.3	-
H1822	V/MK-801	38	-
G1811	CZ/MK-801	38.7	0.000387
G1815	CZ/MK-801	42.3	0.000423
H1819	CZ/MK-801	37.5	0.000375
H1824	CZ/MK-801	36.2	0.000362
G1812	6518-A/MK-801	33.9	0.000966489
G1816	6518-A/MK-801	37.8	0.001077678
H1820	6518-A/MK-801	37.6	0.001071976
H1824	6518-A/MK-801	36.2	0.001032062

Tabla 28. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción B extracto 6518.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
AZ2881	V/SS	42.2	-
AZ2879	V/SS	45.5	-
AF2932	V/SS	37.6	-
G2948	V/SS	35.9	-

AZ2877	V/MK-801	44.2	-
AZ2876	V/MK-801	39.5	-
AF2927	V/MK-801	36	-
A2953	V/MK-801	30.8	-
AZ2882	CZ/MK-801	43.8	0.000438
AZ2777	CZ/MK-801	41.8	0.000418
AF2930	CZ/MK-801	35.2	0.000352
A2910	CZ/MK-801	39.2	0.000392
AZ2884	6518-B/MK-801	40.5	0.00036693
AF2928	6518-B/MK-801	37.1	0.000336126
G2947	6518-B/MK-801	37.1	0.000336126
H2951	6518-B/MK-801	32.5	0.00029445

Tabla 29. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción C extracto 6518.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
AO1569	V/SS	30.6	-
AO1573	V/SS	41	-
AP1577	V/SS	36.2	-
AP1581	V/SS	37.2	-
AO1570	V/MK-801	36.3	-
AO1574	V/MK-801	34.1	-
AP1578	V/MK-801	36.8	-
AP1582	V/MK-801	36.8	-
AO1571	CZ/MK-801	39.4	0.000394
AO1575	CZ/MK-801	36.8	0.000368
AP1579	CZ/MK-801	38.2	0.000382
AP1583	CZ/MK-801	33.4	0.000334
AO1572	6518-C/MK-801	37.9	0.00084138

AO1576	6518-C/MK-801	39.3	0.00087246
AP1580	6518-C/MK-801	35.5	0.0007881
AP1595	6518-C/MK-801	34.2	0.00075924

Tabla 30. Peso de los individuos y cantidad administrada vía oral para la prueba de inhibición del prepulso de la fracción D extracto 6518.

Código de ratón	Tratamiento	Peso (g)	Cantidad administrada (g)
AM1546	V/SS	32	-
AM1550	V/SS	34.7	-
N1554	V/SS	35.2	-
N1558	V/SS	35.3	-
AM1547	V/MK-801	33.2	-
AM1551	V/MK-801	34	-
N1555	V/MK-801	29.7	-
N1561	V/MK-801	35.9	-
AM1548	CZ/MK-801	33	0.00033
AM1552	CZ/MK-801	29.7	0.000297
N1556	CZ/MK-801	31.3	0.000313
N1560	CZ/MK-801	31.2	0.000312
AM1549	6518-D/MK-801	33.1	0.002985951
AO1553	6518-D/MK-801	37	0.00333777
N1557	6518-D/MK-801	29.9	0.002697279
N1561	6518-D/MK-801	36.3	0.003274623

9.4. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Tabla 31. Distribución de las concentraciones seriadas de los tratamientos.

PLACA No. 1.1 - 2.9 CONCENTRACION DE EXTRACTO EN CADA WELLEN ug/ml.

MUESTRA #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.1-1,9	C	C	7158-A	7158-A	7158-B	7158-B	7158-C	7158-C	7158-D	7158-D	7158	7158
A	BLANK		250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
B	CONTROL		62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500
C	CONTROL		15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625
D	CONTROL		3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906
MUESTRA #												
1.1-8.1	6518-A	6518-A	6518-B	6518-B	6518-C	6518-C	6518-D	6518-D	6518	6518	OZAPINA	OZAPINA
E	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	6.50	6.50
F	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	62.500	1.625	1.625
G	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625	0.406	0.406
H	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	3.906	0.102	0.102

BLANK= 200 ul medio sin células.

CONTROL= wells con células concentración 0.0 de los extractos

Tabla 32. Densidad óptica y porcentaje de crecimiento de las células H9C2 al ser expuestas por 72 horas con las diferentes fracciones del extracto 7158 y 6518.

IS : PLACAS 1.1 - 8.1

CONTROL 0 HORAS. DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS O NUMERO DE CELULAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	H9C2	BJ	3T3	R22	VERO					
A	0.000									
B		0.1268	0.1353	0.1182	0.0936	0.0535				
C		0.1268	0.1353	0.1182	0.0936	0.0535				
D		0.1268	0.1353	0.1182	0.0936	0.0535				
E		0.1268	0.1353	0.1182	0.0936	0.0535				
F		0.1268	0.1353	0.1182	0.0936	0.0535				
G		0.1268	0.1353	0.1182	0.0936	0.0535				
MEDIA		0.127	0.135	0.118	0.094	0.053				

PLACA 1.1 DADES OPTICAS OBTENIDAS.

Células H9C2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.394	0.403	0.045	0.042	0.066	0.055	0.080	0.101	0.271	0.245	0.048	0.078
B	0.458	0.455	0.185	0.180	0.078	0.067	0.191	0.196	0.280	0.277	0.137	0.139
C	0.443	0.467	0.357	0.322	0.188	0.154	0.387	0.362	0.418	0.438	0.372	0.352
D	0.462	0.443	0.351	0.367	0.358	0.354	0.430	0.428	0.481	0.453	0.434	0.441
E	0.348	0.365	0.268	0.231	0.352	0.330	0.306	0.312	0.357	0.354	0.444	0.475
F	0.410	0.389	0.429	0.458	0.427	0.485	0.454	0.476	0.457	0.481	0.481	0.465
G	0.403	0.426	0.493	0.521	0.453	0.495	0.485	0.450	0.467	0.487	0.454	0.446
H	0.443	0.427	0.474	0.498	0.489	0.447	0.471	0.456	0.452	0.464	0.455	0.463
To =	0.126773		T71=	0.454373333		Tcr=	0.3276		Factor=	305.2503	DUPLICACION	2.58

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		C	7158-A	7158-A	7158-B	7158-B	7158-C	7158-C	7158-D	7158-D	7158	7158
A		84.4	-24.8	-25.8	-18.6	-21.8	-14.4	-7.7	44.0	36.1	-24.0	-14.9
B		100.1	17.7	16.3	-14.8	-18.2	19.5	21.3	46.7	45.9	3.1	3.8
C		104.0	70.4	59.5	18.6	8.4	79.3	71.7	88.8	95.1	75.0	68.8
D		96.6	68.4	73.3	70.4	69.2	92.6	91.9	108.1	99.5	93.8	95.8
GI50=			26.7	21.2	6.7	6.1	30.8	28.4	56.1	55.7	25.3	23.3
		6518-A	6518-A	6518-B	6518-B	6518-C	6518-C	6518-D	6518-D	6518	CLOZAPINA	CLOZAPINA
E		67.6	72.7	43.2	31.9	68.6	61.9	54.8	56.5	70.4	69.5	96.8
F		86.4	79.9	92.1	101.1	91.6	109.4	99.8	106.5	100.8	108.1	103.1
G		84.2	91.4	111.7	120.2	99.4	112.3	109.5	98.7	103.8	110.0	99.9
H		96.6	91.6	105.9	113.5	110.5	97.6	105.1	100.4	99.2	102.9	102.6
GI50=		>250	>250	206.24	173.93	>125	>125	>250	>250	>250	>250	>6.5

Tabla 33. Regresión lineal a partir de cuatro diluciones seriadas de los compuestos probados. SUPERV (indica % de crecimiento). El mostrado es para la fracción 6518-C sobre las células 3T3.

[C]	LOG [C]	SUPERV
mg/ml	X	Y
250	2.398	30.9
62.500	1.796	39.2
15.625	1.194	55.7
3.906	0.592	80.4

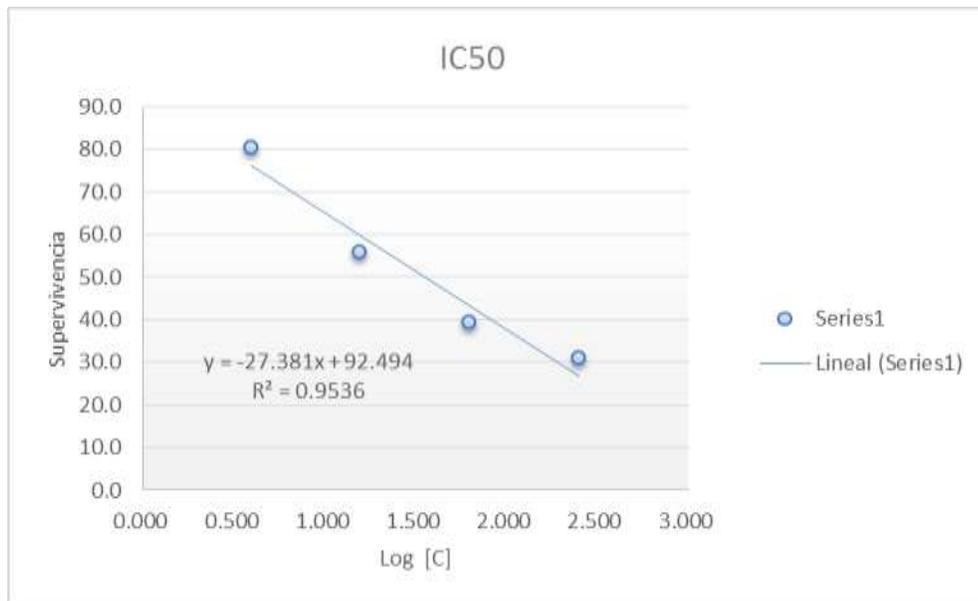


Gráfico 25. Regresión lineal para el cálculo de la inhibición del crecimiento IC50. El valor R para que sea estadísticamente significativo fue >0.95