

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA - U. N. A. M.**



**EFFECTO DE LA GAMMA-HIDROXI, GAMA-FENIL CAPROA-
MIDA SOBRE LA CONTRACCION DEL MUSCULO ABDUC-
TOR DE LA QUELA DEL ACOCIL Procambarus clarkii
(Girard).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A**

GABRIELA MORENO TORRES

San Juan Iztacala, México

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

No existe

ningun problema
que no te aporte simultaneamente
un don.

Busca los problemas
porque necesitas
sus dones.

Richard Bach.

A mi papá y a mi mamá
porque siempre han estado ahí.

I N D I C E :

Agradecimientos

Introducción

Resultados

I.- EFECTO DE LA PTx SOBRE EL ABATI-
MIENTO DE LA CONTRACCION PRODUCI
DA POR GABA.

II.- ANALISIS COMPARATIVO DE LOS EFEC-
TOS DEL GABA Y DE LA HIPCA.

Discusión

I.- EFECTO DE LA PICROTOXINA

II.- EFECTO DE LA HIPCA

Conclusiones

Bibliografía

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Estudiantes del Departamento de Fisiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Biol. Ismael Jiménez Estrada.

A G R A D E C I M I E N T O S :

Al Dr. Hugo Arechiga, Jefe del Depto. de Fisiología del C.I.E.A. del I.P.N. por darme la oportunidad de realizar esta investigación en el depto. a su cargo y por las facilidades proporcionadas para llevarla a buen termino.

Al Dr. Julio Muñoz por sus valiosas sugerencias y revisión crítica de los resultados obtenidos.

Al Dr. Pablo Rudomín por ceder tiempo de su colaborador.

A todo el personal del Depto. de Fisiología del C.I. E.A. del I.P.N. que en diversas formas colaboraron en la realización de este trabajo.

Al Biol. Jaime Curts por su apoyo constante.

Y en especial al Biol. Ismael Jiménez Estrada, que - ademas de todos sus conocimientos siempre tiene la pala--bra precisa para hacerme seguir adelante.

I N T R O D U C C I O N :

El ácido gamma - Aminobutírico (GABA) fué identificado en el cerebro de varios mamíferos, incluido el hombre, en 1950 (Roberts y Frauker, 1950) y evidencias posteriores permitieron sugerir que podría actuar como un neurotransmisor inhibitorio en el Sistema Nervioso Central del mamífero (Obata y Takeda, 1969). Se ha demostrado que el GABA es uno de los neurotransmisores inhibitorios que se presentan en el Sistema Nervioso Periférico de ciertos crustáceos (Fatt y Katz, 1953; Dudel y Kuffler, 1961; Takeuchi y Takeuchi, 1965; Otsuka, Iversen, Hall y Kravitz, 1966).

Aceptando la hipótesis de que el GABA actúa como un mediador químico inhibitorio en los mamíferos, se ha sugerido que una deficiencia en el contenido de GABA por el Sistema Nervioso Central podría ser un agente causal de crisis convulsivas que afectan al humano, y que las crisis pueden ser prevenidas mediante la administración de GABA (Davidson, 1976).

Desafortunadamente la barrera hematoencefálica es poco permeable al GABA (Púrpura, Girado, Smith y Gómez, --- 1958) debido al momento dipolar del aminoácido, por lo --

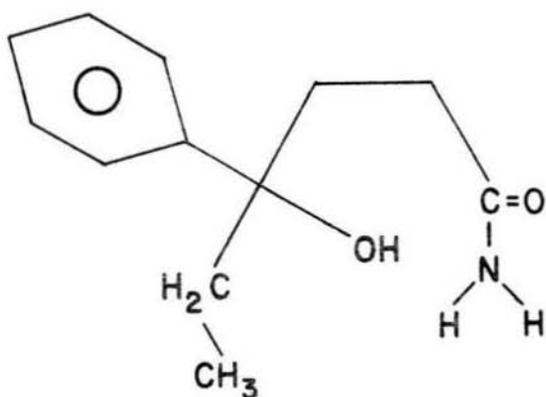
que las cantidades que debe ser administrado para prevenir las crisis convulsivas son excesivas y probablemente tóxicas.

Teniendo en cuenta lo anterior se planteó la síntesis de una molécula que fuese análoga al GABA, pero que atravesara fácilmente la barrera hematoencefálica, con la esperanza de que dada la similitud estructural, la substancia sintetizada se uniese a los mismos sitios receptores membranales para el GABA y que también manifestase una similitud funcional. Así pues, se sintetizó la 5 - etil, 5 - fenil pirrolidinona (EPP) molécula análoga al GABA, la cual gracias a la ausencia de cargas y a la presencia de grupos etilo y fenilo sería más lipofílica por lo que atravesaría fácilmente la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con las expectativas, la administración de la substancia sintetizada, produjo disminución o prevención de las crisis convulsivas inducidas en ratas por diversos agentes (Pérez de la Mora y Tapia, 1973). Puesto que entre los diversos modelos experimentales se ha utilizado para producir crisis convulsivas a la bicuculina - considerada como antagonista por competencia del GA

BA (Curtis, 1971) - y que el EPP también fué efectivo para prevenir o disminuir las crisis bicuculínicas se afianzó la idea de que, efectivamente, el EPP era un análogo tanto estructural como funcional del GABA. Posteriormente - Nathan, Massieu, Carvajal y Tapia (1977) decidieron analizar por resonancia magnética nuclear la substancia sintetizada para comprobar que se trataba efectivamente de EPP ya que hasta ese momento no existían pruebas rigurosas de este tipo; la identidad de la molécula había sido adjudicada por simple lógica al seguir el proceso de síntesis. Sorprendentemente, la substancia analizada no fué el EPP sino la gamma - Hidoxi, gamma - Fenil Caproamida (HIPCA).

A pesar de que el GABA y la HIPCA tienen importantes diferencias estructurales entre sí tal como se ve en sus fórmulas, (ver fig. 1) ello no invalida la posibilidad de que ambas substancias tuviesen efectos funcionales similares. Sin embargo, en trabajos posteriores, se obtuvieron resultados diferentes a los previamente publicados, ya que en fibras aferentes primarias de la médula espinal de gato, la HIPCA produce un efecto facilitatorio, en lugar de la inhibición presináptica que produce el GABA (Muñoz - Martínez y Jimenez - Dueñas, 1977).



**GAMMA-HIDROXI, GAMMA-FENIL CAPROAMIDA
(HIPCA)**



**ACIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO
(GABA)**

Figura 1.

Fórmulas estructurales de las sustancias en estudio.

Para ayudar en la solución de esta contradicción, - se realizó un estudio de la actividad de la HIPCA sobre la contracción del músculo abductor de la quela del acocil Procambarus clarkii (Girard).

Los músculos de los crustáceos proveen un material único para el estudio del modo de acción de las sinapsis inhibitorias. Ante la posibilidad de que la HIPCA actúe se como un agonista del GABA, se escogió esta preparación en la que se ha comprobado que el GABA es el mediador inhibitorio (Otsuka , Iversen, Hall y Kravitz, 1966).

Por lo tanto, si la HIPCA fuera un agonista del GABA, produciría una respuesta motora similar a la del mismo GABA.

M A T E R I A L Y M E T O D O :

Para determinar el efecto de la HIPCA, se utilizaron nueve quelípodos de acocil Procambarus clarkii (Girard), cortándolos lo más cerca del plano autónomo del organismo. Con tijeras de cutícula se retiró el exoesqueleto de la cara interna del propodito. Posteriormente en la cara interna del propodito. Posteriormente en la cara interna del dactilopodito se hizo un corte rectangular seccionándose el músculo extensor, por donde se introdujeron los electrodos de estimulación. Además se cortó la punta del brazo fijo de la quela y con una aguja se perforó para permitir el libre fluido de la perfusión. (Ver fig. 2)

En cada quela se registró la respuesta al estimular directamente sobre el músculo abductor. La intensidad de la estimulación en cada experimento se ajustó a ser supra máxima.

En todos los experimentos se tomaron registros testigo antes de administrar las drogas. El periodo testigo variaba dependiendo del tiempo que tardara en estabilizar se la contracción. Después de los periodos testigo se administraron las siguientes drogas mediante el sistema de perfusión; HIPCA (Sigma P.M. 207) en dosis de 10^{-2} a 10^{-6} M, GABA (Sigma P.M. 103) soluciones de 10^{-2} a 10^{-7} M, y -

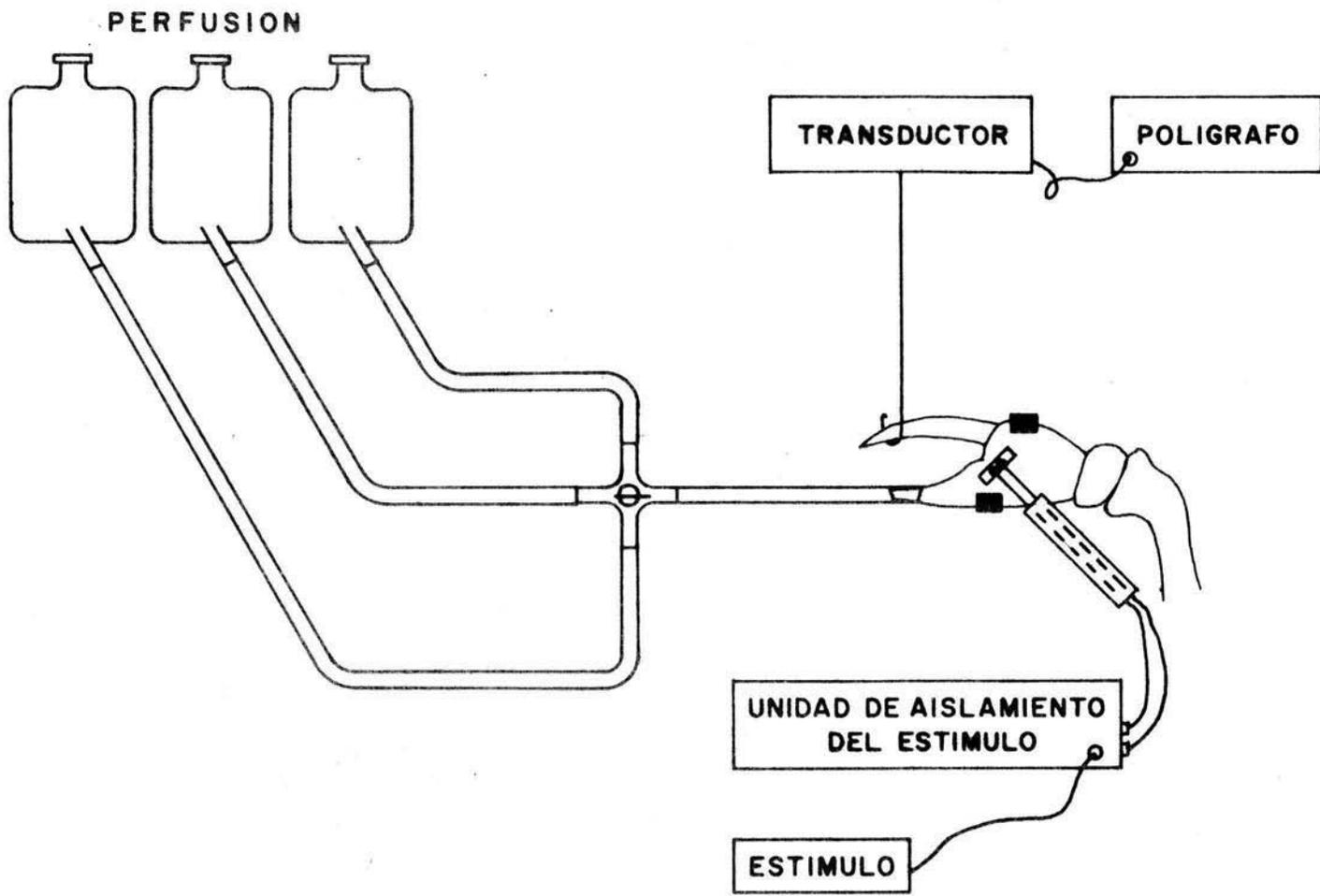


Figura 2.

Los electrodos de estimulación estan conectados a una --
unidad de aislamiento del estímulo (Grass modelo SIUSA),
la cual a su vez se conecta a un estimulador (Grass mode-
lo 88). El dedo fijo de la quela recibe el flujo del sis-
tema de perfusión, por medio de una manguera de látex, --
que a su vez mediante otras mangueras de látex se conec-
ta a tres botellas de suero, dos de las cuales se utili-
zan para las diferentes drogas y la tercera para la Solu-
ción de Van Hareveld con el cual se lava la preparación.

Picrotoxina (PTx, Pfaltz & Baver, Inc. P.M. 602.57) a -- una concentración de 10^{-4} M. Aforándose en cada caso con Solución de Van Hareveld.

La aplicación de la PTx - antagonista del GABA (Takeuchi y Takeuchi, 1969) - es con el propósito de probar el sistema de perfusión y que las drogas aplicadas alcancen los posibles sitios donde ejercen acción.

Los periodos de administración de cada una de las dosis fluctuaron entre 3 y 4 minutos esperando hasta que la respuesta se estabilizara, posteriormente se lavaba la -- preparación por un lapso de 10 a 15 minutos con Solución de Van Hareveld esperando la recuperación de la contrac-- ción, antes de administrar una nueva dosis. La secuencia de administración siempre fue de menor a mayor molaridad.

Se llevó en papel un registro continuo de la respues-- ta del músculo abductor, amarrando el brazo móvil de la -- queela a un transductor de desplazamiento previamente cali-- brado (Grass modelo FT03C) conectado este directamente a un polígrafo (Grass modelo 7D). (Ver fig. 2)

Los resultados se analizaron tomando el porcentaje - del decaimiento de la respuesta, considerando la respues-- ta control previa a la administración de la droga, como -

e1 100%.

R E S U L T A D O S :

I.- EFECTO DE LA PTx SOBRE EL ABATIMIENTO DE LA CONTRACCION PRODUCIDA POR GABA.

En la figura 3, se muestra que el GABA produce un abatimiento practicamente total de la contracción y que despues de la aplicación de la PTx, tiende a restablecerse y aumentar en su amplitud.

II.- ANALISIS COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DEL GABA Y DE LA HIPCA.

El efecto que producen diferentes concentraciones de GABA y de HIPCA sobre la contracción del músculo abductor, se muestra en la figura 4 y en la tabla 1 se representa el porcentaje de disminución de la contracción del músculo.

En primera instancia, se observa que existen notables diferencias, tanto en el porcentaje del efecto máximo, como en las concentraciones para lograrlo, con las dos sustancias. Esto es, el GABA produce su máximo efecto en -- concentraciones que varían de 10^{-5} M y 10^{-4} M, mientras - que la HIPCA lo produce entre 10^{-2} M y 10^{-1} M. Por otra parte el GABA disminuye hasta en un 65% en promedio la amplitud de la contracción muscular de la quela, mientras -

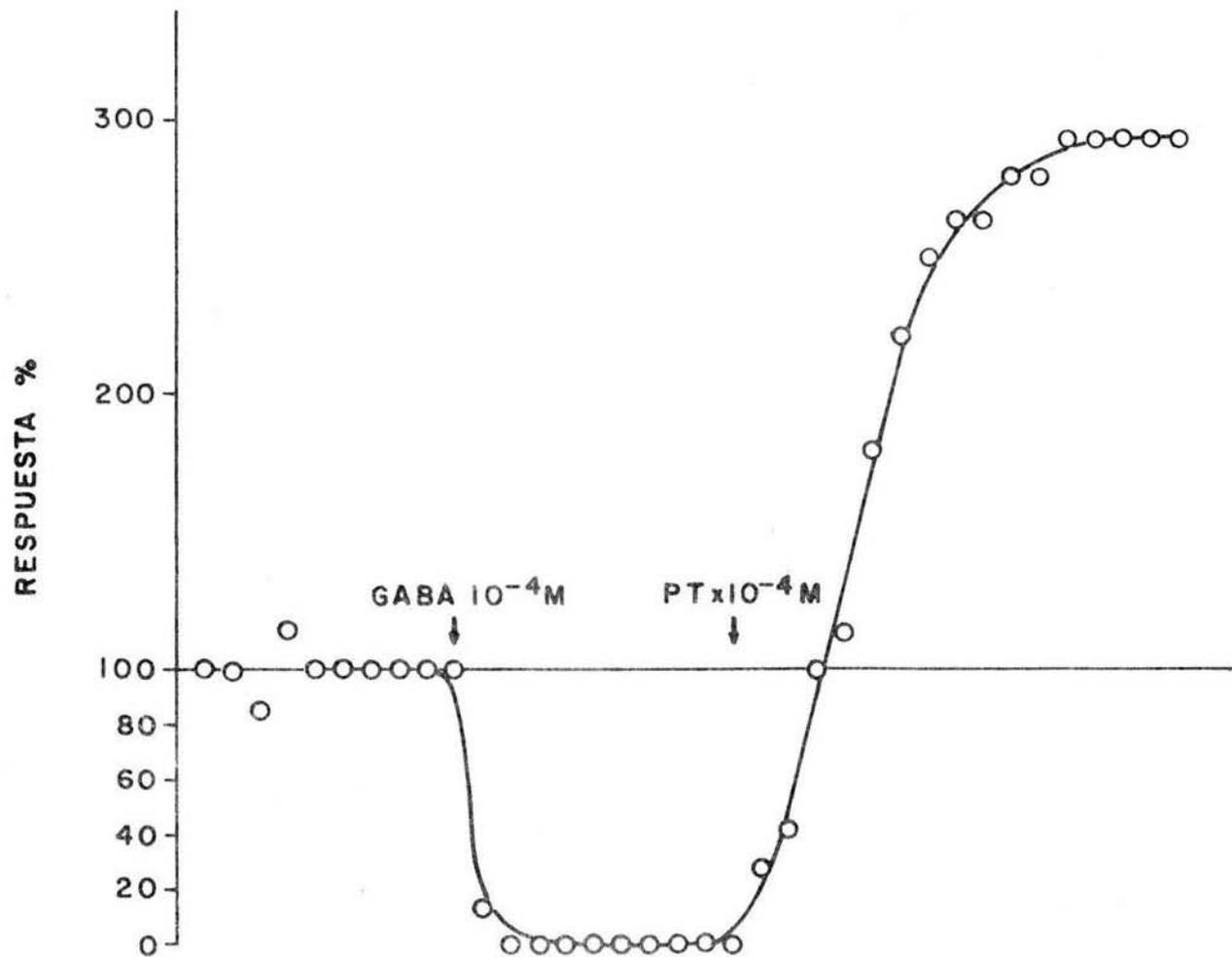
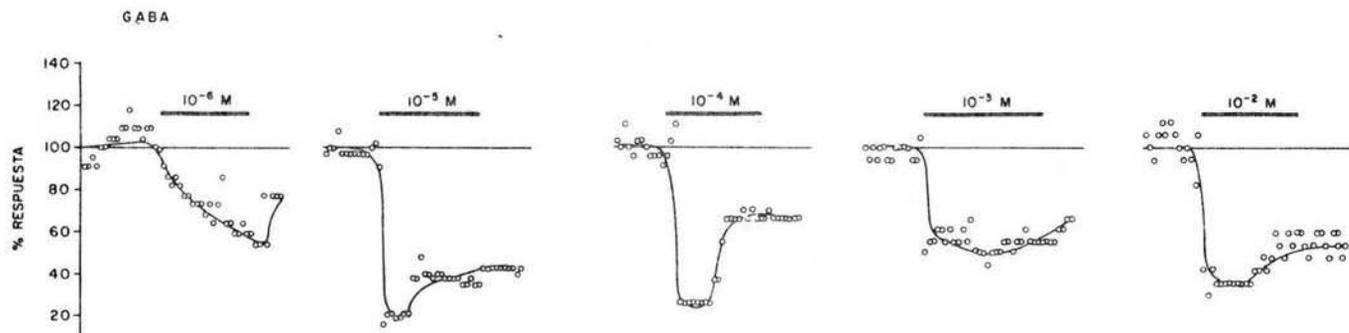


Figura 3.

Acción de la PTx sobre la disminución de la contracción -
del músculo abductor producida por la aplicación de GABA.

A



B

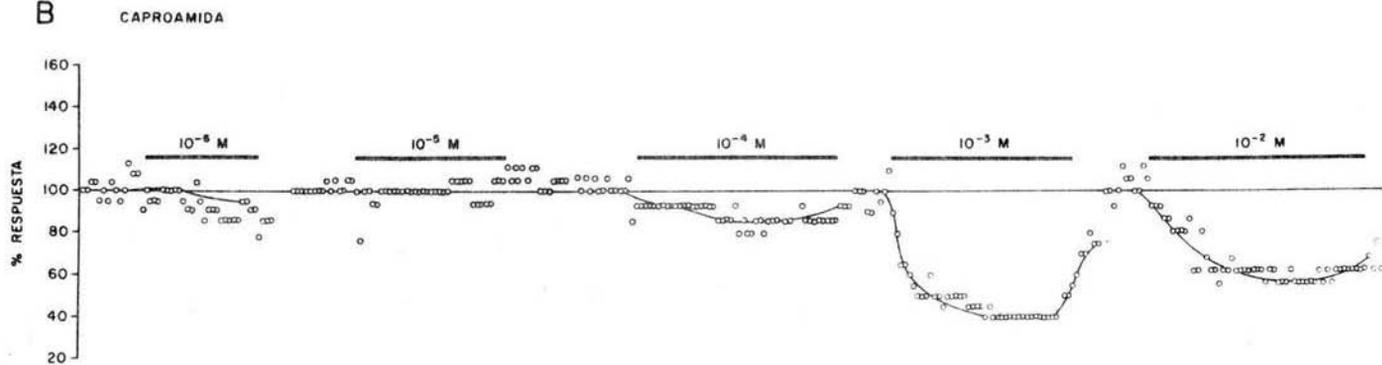


Figura 4.

Registros de la acción de diferentes concentraciones de GABA (A) y de HIPCA (B) sobre la contracción del músculo abductor de la quela del acocil. No se muestra la recuperación de la contracción en la figura ya que el lavado de la preparación es muy lento (de 10 a 15 minutos).

La frecuencia de la estimulación es de un pulso cada 20 segundos.

que la HIPCA, la disminuye en un 40%.

Para determinar en una forma más precisa las diferen
cias entre los efectos de ambas sustancias, se obtuvieron
por interpolación en la gráfica dosis - respuesta (ver fig.
5) los valores de las concentraciones con las que se pro-
duciría la mitad del efecto máximo (Dosis media), las cu
ales resultaron ser para el GABA: $D_m = 5.3 \times 10^{-7}$ M y para
HIPCA: $D_m = 6.4 \times 10^{-4}$ M. El cociente entre las dosis me-
dia de ambas sustancias nos puede dar una idea de que --
tan potente es una con respecto de la otra. De la cual -
se tiene que el GABA es 1200 veces más potente que la HIP
CA en producir tal respuesta.

T A B L A 1.

E F E C T O (%prom. \pm ds, n = 8)

DOSIS (M)	GABA	CAPROAMIDA
10^{-7}	19 \pm 2.37	-
10^{-6}	46 \pm 7.02	0
10^{-5}	63.5 \pm 5.08	0
10^{-4}	62 \pm 2.33	17 \pm 3.98
10^{-3}	60 \pm 1.70	46 \pm 4.84
10^{-2}	65 \pm 2.70	41 \pm 4.52

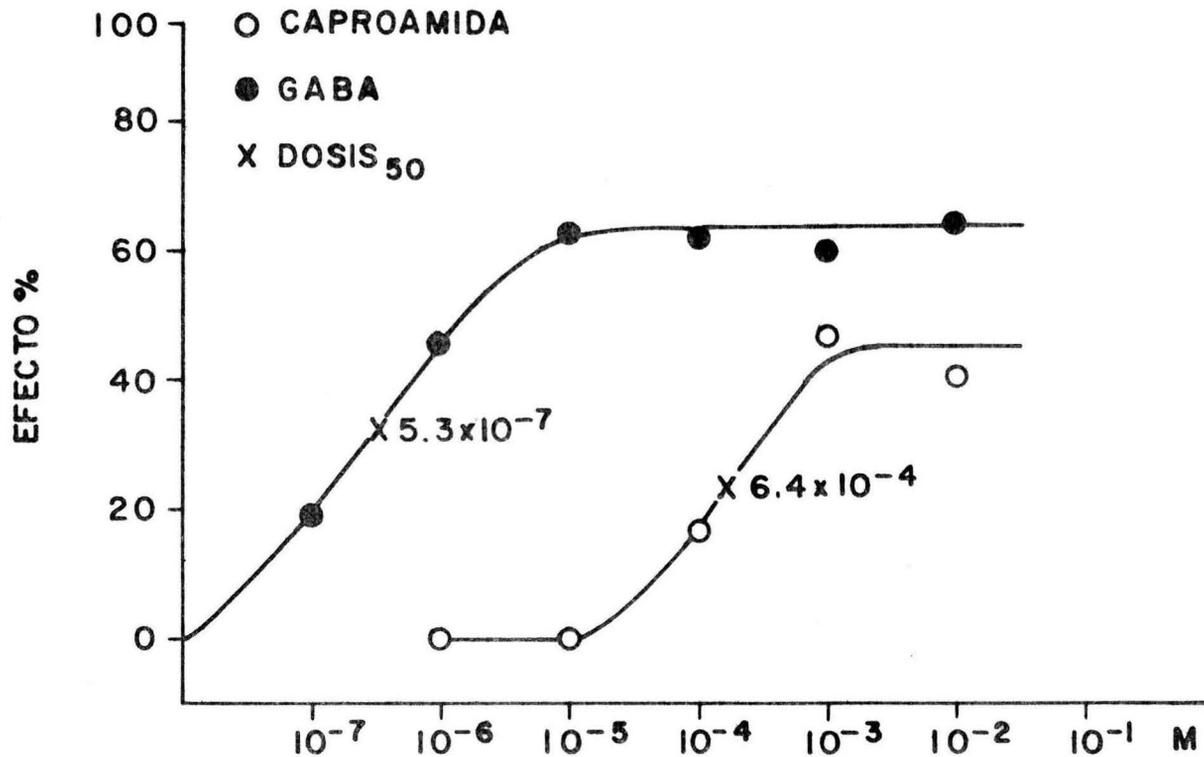


Figura 5.

Gráfica Dosis - Respuesta para GABA y Caproamida.

D I S C U S I O N :

I.- EFECTO DE LA PICROTOXINA.

Esta observación tuvo como finalidad el establecer -- que el sistema de perfusión que se utilizaría en el presente estudio fuera el adecuado para aplicar distintos tipos de drogas y observar si estas tendrían efecto sobre la -- contracción del músculo abductor. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron con la PTx, se puede considerar -- que el sistema de registro y de perfusión son los adecuados para un estudio de esta índole.

Sin embargo los resultados obtenidos en esta observación, sugieren que ante la estimulación general de la preparación se podrían activar los posibles mecanismos implicados en la generación de la contracción del músculo abductor del acocil, esto es, el mecanismo contractil del músculo, así como a las terminales nerviosas excitadoras e inhibitoras que se encuentran en esta preparación. En el caso de las terminales inhibitoras se pueden activar -- las de tipo presináptico que inciden sobre las terminales excitadoras y de tipo postsináptico que inervan a las fibras musculares. Por lo que la contracción resultante sería la suma de los efectos debidos a la activación de los

mecanismos mencionados. Aunque se desconoce la magnitud del efecto que poseen las inhibiciones (pre y postsinápticas) sobre la contracción del músculo.

El efecto producido por la PTx sobre la contracción del músculo (fig. 3) indica que las inhibiciones (pre y postsinápticas) al verse bloqueadas permiten que los mecanismos contractil y excitador se manifiesten con mucha mayor intensidad, produciendo una respuesta del doble de la control. De lo que se puede inferir, que los mecanismos inhibitorios juegan un papel muy importante en la expresión contractil del músculo.

II.- EFECTO DE LA HIPCA.

Puesto que en los resultados se presentan diferencias muy notables en el efecto de las drogas, tanto en las concentraciones de las mismas que produzcan la disminución de la contracción del músculo, como en la magnitud de la respuesta, además de que la HIPCA sea 1200 veces menos potente que el GABA, permite cuestionar la similitud funcional de la HIPCA con el GABA.

En base al hecho de que la forma de la curva dosis-respuesta para la HIPCA sea similar a la del GABA, pero de menor amplitud, se podría sugerir que esta sustancia

es un agonista parcial del GABA (Goldstein, Aronow y Kalman, 1969). Sin embargo, las altas concentraciones a las que la HIPCA tiene acción, permiten la posibilidad de que esta droga actúe sobre otros mecanismos que sean los causantes de tal efecto y no necesariamente sobre el receptor postsináptico específico al GABA.

C O N C L U S I O N E S :

1.- El GABA tiene un efecto inhibitorio sobre la contracción del músculo abductor.

2.- La PTx invierte el efecto producido por el GABA sobre el músculo.

3.- Estrictamente no se le puede considerar a la -HIPCA como un agonista del GABA.

4.- La metodología empleada no permite discernir cules serían los posibles mecanismos con los que la HIPCA - realice el efecto observado.

B I B L I O G R A F I A :

- BURTON, R.F. (1975) Ringer Solutions and Physiological Salines. Wright-Scientifica. Great Britain.
- CURTIS, D.R. et. al. (1971) Bicuculline and Antagonist of GABA and Synaptic Inhibition of the Spinal Cord of the Cat. Brain Res. 32:69-96.
- DAVIDSON, N. (1976) Neurotransmitter Amino Acids Academic Press. London.
- DUDEL, J. y KUFFER, S.W. (1961) Presynaptic Inhibition at the Crayfish Neuromuscular Junction. J. Physiol. 155:543-562.
- DUEÑAS JIMENEZ, S.H. (1978) Efectos Producidos por la Gamma-Hidroxi, Gamma-Fenil, Caproamida sobre la Transmisión Sináptica de la Médula Espinal del Gato. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad de Neurociencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- DURAN, L. , TAPIA, R. y DRUCKER COLIN, R. (1977) Actividad Anticonvulsivante de la Gamma-Hidroxi, Gamma-Fenil, Caproamida. XIII Congreso Latinoameri-

cano de Ciencias Fisiológicas y XX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. p.142.

FATT, P. y KATZ, B. (1953) The Effect of Inhibitory Nerve Impulses on a Crustacean Muscle Fibre. J. - Physiol. 121:374-389.

GOLDSTEIN, A.; ARONOW, L. y KALMAN, S.M. (1969) Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology. Harper & Row. New York.

GRUNDFEST, H., REUBEN, J.P. y RICKLES, W.H. (1959) The Electrophysiology of Lobster Neuromuscular Synapses. J. Physiol. 42:1301-1323.

✓ KRAVITZ, E.S., KUFFLER, S.W. y POTTER, D.D. (1963) Gamma Amino Butiric Acids and other Blocking Compounds in Crustacea. J. Physiol. 26:739-751

MARTINEZ DE MUÑOZ, D., NATHAN, J.P. y CARVAJAL SANDOVAL, G. (1977) Efecto de la Gamma-Hidroxi, Gamma-Fenil, Caproamida Sobre Convulsiones Producidas Experimentalmente. XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas y XX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas p,205

MUÑOZ MARTINEZ, E.J. y JIMENEZ DUEÑAS, S. (1977) Efecto de la Hidroxifelilcaproamida sobre la Transmi -

sión Sináptica en la Médula Espinal del Gato
XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas y XX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. p.142.

NATHAN, J.P., MASSIEU, G., CARVAJAL, G. y TAPIA, R. (1977)
Gamma Hidroxi, Gamma-Phenyl, Caproamide, an
Anticonvulsivant Molecule. Rev. Lat. Quim.
En Prensa.

OBATA, K. y TAKEDA, K. (1969) Release of Gamma Aminobutyric Acid into the Fourth Ventricle Induced by Stimulation of the Cat's Cerebellum. J. Neurochem. 16:1043-1047.

OTSUKA, M., INVERSEN, L.L., HALL, Z.W. y KRAVITZ, E.A. --
(1966) Release of Gamma Aminobutyric Acid --
from Inhibitory Nerves of Lobster. Proc. Nat. Acad. Sci. 56:1110-1115.

PEREZ DE LA MORA, M. y TAPIA, R. (1973) Anticonvulsivant Effect of 5-ethyl, 2-pyrrolidinone and its Possible Relationship Gamma Aminobutyric -- Acid Dependent Inhibitory Mechanisms. Biochem. Pharmacol. 22:2635-2639.

PURPURA, P.D., GIRADO, M., SMITH, G.T. y GOMEZ, J.A. (1958)

Synaptic Effects of Systemic Gamma Aminobuti-
ric Acid in Cortical Region of Increase Vas-
cular Permeability. EEG Clin. Neurophysiol.
10:677-685.

ROBERTS, E. y FRAUKER, S. (1950) Gamma Aminobutiric Acid -
in Brain: Its Formation from Glutamic Acis.
J. Biol. Chem. 187:55-63.

✓ TAKEUCHI, A. y TAKEUCHI, N. (1965) Localized Action of Ga-
mma Aminobutiric Acid on the Crayfish Muscle
j. Physiol. 177:225-238.

TAKEUCHI, A. y TAKEUCHI, N. (1969) A Study of the Action
of Picrotoxin on the Inhibitory Neuromuscu-
lar Junction of the Crayfish. J. Physiol. --
205:377-391.

VAN DER KLOOT, W.G. y ROBIN, J. (1958) The Effect of Gamma
Aminobutiric Acid and Picrotoxin on the Jun-
tional Potencial and the Contraction of Cray-
fish Muscle. Experientia. 15:35-36.

WEKSH, J.H. y SMITH, R.I. (1960) Laboratory Exercises in
Invertebrate Physiology. Burges Pub. Co. -
Minneapolis, U.S.A.