



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EFFECTO DE LA PICROTOXINA Y LA BICUCULINA
SOBRE LA ACCION DEL GABA EN LA CONTRACCION
DEL MUSCULO ABDUCTOR DEL QUELIPEDO DE
ACOCIL (Procambarus clarkii)

BO 124/83
E.3

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

ANGEL RENE ARZUFFI BARRERA

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis Padres
y Hermanos.

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización del presente trabajo y en especial al M. en C. Ismael Jiménez E. y a la Biól. Bertha Segura A.

Este trabajo fue realizado en la
Escuela Nacional de Estudios Prof
fesionales Iztacala U.N.A.M., baj
jo la dirección del M. en C.
Ismael Jiménez Estrada.

I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODO.....	17
RESULTADOS.....	22
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	46

INTRODUCCION.

La contracción del músculo abductor del quelípedo de acocil, como la mayoría de los músculos que participan en los movimientos de este organismo, se encuentra regulada periféricamente por la activación coordinada de vías excitadoras e inhibitoras. Las fibras musculares son inervadas en múltiples sitios solamente por dos vías nerviosas, una excitadora y otra inhibitora. En una fibra muscular individual la interacción de los potenciales sinápticos excitadores e inhibidores determina el nivel del potencial postsináptico total y por tanto la intensidad de la contracción (1,2).

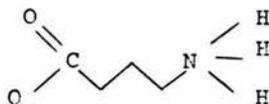
Este tipo de control periférico de la contracción muscular, presente en crustáceos, ha permitido el estudio de importantes aspectos electrofisiológicos y farmacológicos de las uniones neuromusculares inhibitoras. Uno de los resultados más importantes en la investigación de esos aspectos, en los sistemas neuromusculares de crustáceos, ha sido la identificación del ácido gamma amionobutírico como transmisor químico inhibitor (3,4).

1. Acido Gamma Aminobutírico (GABA)

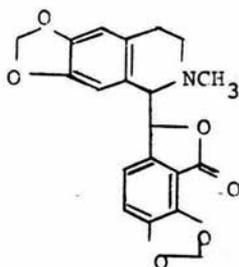
El GABA es uno de los principales transmisores de tipo inhibitor que se presenta en el sistema nervioso tanto de invertebrados como de vertebrados (3,4,5). Este aminoácido (figura 1) fue el primer transmisor químico inhibitor cuya acción pudo establecerse como resultado de una serie de estudios sistemáticos, que proporcionaron también un prototipo de investigación adecuado para lograr el establecimiento de otras sustancias como transmisores (6).

El GABA fue encontrado en extractos de cerebro de mamíferos como un metabolito del ciclo del ácido glutámico (5,6). Su papel como transmisor fue sugerido en primera instancia a partir de los resultados obtenidos al probar el efecto de este aminoácido y un agente inhibitor, llamado sustancia I, encontrado en extractos de tejido nervioso de crustáceos y mamíferos, sobre receptores al estiramiento del langostino (5,6).

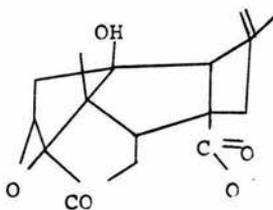
A fin de lograr el establecimiento del transmisor inhibitor del sistema nervioso de crustáceos, se examinó la acción de diferentes fracciones, obtenidas a partir de extractos de tejido nervioso de langostinos, sobre la unión neuromuscular de cangrejo. Como resultado de estos trabajos, diez sustancias inhibitoras fueron aisladas (5,6). De estas el -



Acido gamma aminobutírico



Bicuculina



Picrotoxinina (componente farmacológico activo de la picrotoxina).

Figura 1. Fórmulas estructurales de los compuestos en estudio.

GABA fue el más potente y el único que se encontró en concentraciones mayores en neuronas inhibitoras que en las excitadoras. La concentración de GABA encontrada en las neuronas inhibitoras fue de 10 a 200 veces más alta que la de las neuronas excitadoras (7,8). También se probó que este aminoácido se libera de los nervios inhibitoras, si estos son estimulados. El contenido de GABA en la solución perfundida se incrementó marcadamente durante la estimulación de los nervios inhibitoras, pero no se alteró durante la estimulación de los nervios excitadores (9).

1.1. Metabolismo del GABA.

En la síntesis y degradación del GABA están involucradas tres enzimas: La descarboxilasa del ácido glutámico, la transaminasa GABA-glutámico y la deshidrogenasa del aldehído succínico (figura 2), (4,10,11).

La descarboxilasa del ácido glutámico sintetiza GABA a partir del glutamato removiendo el grupo alfa-carboxilo, teniendo como cofactor al fosfato de piridoxal. Esta enzima es inhibida por su propio producto (GABA) a través de un mecanismo de inhibición competitiva. Un aspecto importante de esta inhibición, es que probablemente sirve como un mecanismo de regulación que impide la acumulación selectiva de GABA en

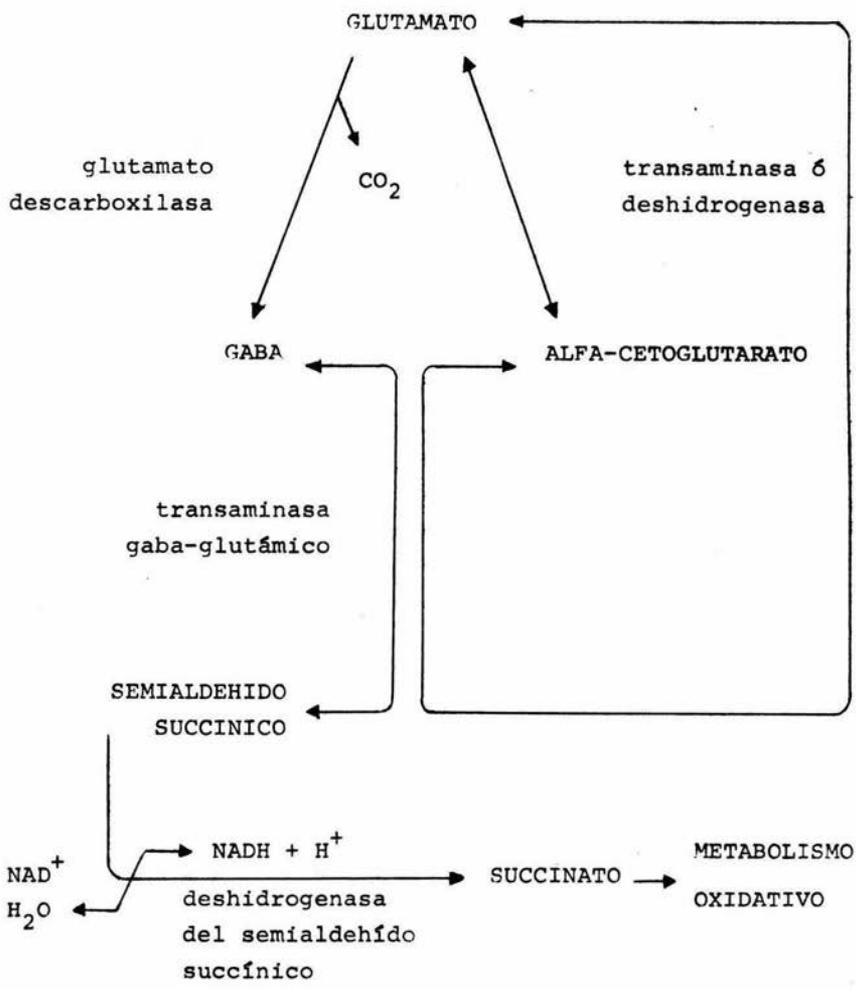


Figura 2. Metabolismo del ácido gamma aminobutírico (GABA).

las neuronas inhibitoras. Cuando la concentración del GABA es baja en dichas neuronas, se incrementa la actividad de la enzima para producir más GABA (4). En cuanto a su actividad en las neuronas inhibitoras y excitadoras, se ha demostrado que es aproximadamente 100 veces mayor en estas últimas (11).

La transaminasa del GABA es la enzima encargada de la degradación del aminoácido, convirtiéndolo en semialdehído succínico en presencia de alfa-cetoglutarato. Esta enzima puede ser inhibida por altas concentraciones de GABA y de alfa-oxoglutarato (4); se encuentra tanto en axones excitadores como inhibitoras de crustáceos, sin embargo, en los axones inhibitoras se ha detectado que tiene un 50% de mayor actividad (4,11).

Después de que el GABA ha sido convertido en semialdehído succínico por la transaminasa, este último es convertido en ácido succínico por la deshidrogenasa del aldehído-succínico (4).

1.2. Liberación del GABA.

Se ha mostrado que la estimulación de nervios inhibitoras de la contracción muscular de crustáceos provoca la liberación de GABA contenido en las vesículas de las termina-

les nerviosas. Sin embargo, la cantidad liberada, aunque vir
tualmente proporcional al número de estímulos aplicados, no
ha sido estimada satisfactoriamente en las diferentes preparaciones
empleadas; dado que el transmisor es captado, en gran
parte, inmediatamente después de su liberación por células ve
cinas (células gliales), (5,9). La liberación de GABA es dependiente
de la concentración de calcio en el medio extracelular;
a bajas concentraciones de este catión disminuye o es -
bloqueada completamente la liberación del mismo (9).

Recientemente se ha propuesto que una parte del -
transmisor se libera mediante un proceso que depende de la sín
tesis del mismo. En este proceso se supone que la descarboxil
asa del ácido alfa-glutámico se encuentra unida a la membrana
presináptica, por lo que una parte del GABA puede ser libera
do inmediatamente después de ser sintetizado (5).

1.3. Acción del GABA.

Los primeros trabajos realizados con el fin de es
tudiar la inhibición química de la contracción muscular en -
crustáceos, sugirieron que el transmisor inhibitor debía producir
la inhibición mecánica afectando el mecanismo de acople
entre los eventos de despolarización membranal y la contracción
muscular (12). Sin embargo, los resultados de trabajos posteri

riores, no indican que el transmisor inhibitor tenga algún efecto sobre el acople entre el potencial de membrana y los eventos mecánicos (13). Al parecer diferentes fármacos, al igual que cambios iónicos en el medio extracelular, son capaces de incrementar la corriente de estimulación necesaria para producir la contracción de los músculos en algunos crustáceos.

La aplicación de GABA, al igual que la estimulación de los nervios inhibidores, provoca un incremento en la permeabilidad membranal para los aniones, especialmente para el ión cloro, en las fibras musculares de crustáceos. Al aumentar la conductancia al cloro, este tiende a alcanzar su potencial de equilibrio electroquímico, el cual depende de la concentración del ión, tanto en el interior como en el exterior de las células, siendo generalmente más negativo que el potencial de membrana de las células musculares. Tal hiperpolarización inhibe la generación de potenciales de acción en las fibras musculares, evitando así su contracción (5,14).

Además de la inhibición postsináptica, también se presenta en el sistema neuromuscular de crustáceos inhibición presináptica. En su investigación original acerca de este fenómeno, Dudel y Kuffler (12) observaron una notable disminución en los potenciales postsinápticos excitadores (monosinápticos) en fibras musculares de patas de langosta, en respues-

ta a la estimulación de una fibra inhibidora (3 ms antes de - estimular el nervio excitador), sin que ésta ejerciera acción postsináptica perceptible. Además observaron que el contenido cuántico de transmisor en el nervio excitador era reducido considerablemente (12).

Se ha considerado que la inhibición presináptica, en la unión neuromuscular del langostino está mediada químicamente por el GABA. En esta preparación se observaron efectos presinápticos inhibidores similares a los señalados anteriormente, al aplicar iontoforéticamente pequeñas concentraciones de este neuroaminoácido (5,15).

En la inhibición presináptica, el GABA al interactuar con la membrana del elemento presináptico induce un incremento en la conductancia al ión cloro, pero a diferencia de lo que sucede en la inhibición postsináptica, este anión sale del interior celular provocando una despolarización membranal. Recientemente se ha señalado que el transmisor inhibidor presináptico puede provocar una disminución en la liberación del - transmisor excitador (p.e. ácido glutámico) al bloquear la - conducción de los potenciales de acción en las bifurcaciones axonales (15).

A pesar de las similitudes que se observan en las vías presinápticas y postsinápticas, existen evidencias de tipo farmacológico que indican que los receptores al GABA en -

ambas, no son idénticas (15).

Por otra parte, estudios de microscopia electrónica han demostrado la presente de sinapsis axo-axónicas en preparaciones neuromusculares de crustáceos. En este tipo de contactos es muy probable que se presente el fenómeno de inhibición presináptica (4).

1.4. Receptores al GABA.

Los receptores al GABA en las fibras musculares de crustáceos están localizados, al parecer, en las mismas regiones sinápticas membranales donde se encuentran los receptores al ácido glutámico, el cual es considerado como el transmisor excitador en las sinapsis neuromusculares de crustáceos; sin embargo, ambos receptores son estructuralmente diferentes (4). La falta de competencia entre el GABA y el ácido glutámico ha sido confirmada mediante experimentos de fijación de voltaje, en los que se registra la corriente iónica generada por la aplicación iontoforética de ambas sustancias. La aplicación de GABA no altera la corriente provocada por la entrada del ión sodio y generada en respuesta al ácido glutámico - (3,4).

Después de establecer curvas dosis-respuesta, rela

cionando diferentes concentraciones de GABA perfundido con los correspondientes cambios en la conductancia por unidad de longitud de la fibra Takeuchi y Takeuchi (3,4) concluyeron que el incremento en la conductancia membranal es linealmente proporcional al número de receptores ocupados por el GABA. De ecuaciones derivadas de la cinética Michaelis-Menten, estos investigadores calcularon que dos moléculas de GABA deben combinarse con un receptor a fin de producir un cambio en la conductancia membranal. Por otra parte, Feltz (3) a partir de curvas dosis-respuesta similares a las señaladas y tratando de minimizar la posible desensibilización de los receptores al transmisor inhibitor, propuso una reacción de cuatro moléculas de GABA por receptor, para activar sólo uno de los canales iónicos asociados al receptor.

Algunos agentes bloqueantes que en la membrana postsináptica tienen una gran afinidad por los sitios receptores para el GABA, pueden ser de gran utilidad para el estudio de una gran variedad de aspectos sobre los mecanismos y procesos donde interviene el GABA. Dos agentes bloqueadores de este tipo son la picrotoxina y la bicuculina (16, 17).

2. Picrotoxina.

La picrotoxina, también conocida como coculina, -

es una substancia no nitrogenada que puede ser extraída de las semillas de Anamirta cocculus. Su composición química general es $C_{30}H_{34}O_{13}$, contiene un mol de picrotina, la cual es farmacológicamente inerte y un mol de picrotoxina (figura 1) (18).

La picrotoxina administrada tanto a vertebrados como a invertebrados tiene un efecto convulsionante. Se ha mostrado que el efecto convulsionante en crustáceos se manifiesta como resultado de que esta droga bloquea las sinapsis neuromusculares GABA-érgicas (19,20). Existen razones para creer que la picrotoxina no tiene efecto directo sobre el mecanismo excitador, debido a que el valor inicial de la contracción durante la estimulación de fibras excitadoras es aproximadamente el mismo antes y después de la aplicación de picrotoxina. Cuando la droga está presente, no hay un cambio significativo en el valor de la contracción producida por estimulación de las fibras excitadoras (19).

A partir de los primeros estudios acerca del efecto de la picrotoxina sobre el sistema inhibidor de la contracción muscular de crustáceos se postuló que esta droga podía actuar como un antagonista competitivo del GABA por combinación reversible con los sitios receptores inhibidores de la membrana postsináptica (20). Recientemente Shank y colaboradores (21) también señalan a la picrotoxina como efectivo an-

tagonista de tipo competitivo del GABA. No obstante, estudiando el efecto de la picrotoxina sobre la unión neuromuscular de crustáceos, se ha observado que este fármaco deprime la amplitud de los potenciales inhibidores, así como la respuesta producida por la aplicación de GABA, en forma no competitiva (22). El análisis de las curvas dosis-respuesta sugiere que esta droga puede bloquear los sitios receptores impidiendo la formación del complejo transmisor-receptor. Sin embargo, el complejo picrotoxina-receptor resultante, por sí mismo no produce cambios en la conductancia membranal (22).

3. Bicuculina.

La bicuculina es un alcaloide convulsionante, que fue aislado originalmente de extractos de Dicentra coccularia. Su fórmula química general es $C_{20}H_{17}O_6N$ (figura 1). Fue introducida como antagonista del GABA más recientemente que la picrotoxina y ha sido utilizada ampliamente en los últimos años. La especificidad y la naturaleza de su acción antagonista no ha sido plenamente establecida, en algunos casos su acción parece ser más potente y selectiva que la de la picrotoxina, mientras que en otros es menor (18).

Los primeros reportes acerca del efecto antagonista de la bicuculina sobre la acción del GABA en el sistema nervioso de mamíferos y en neuronas receptoras al estiramiento

to de crustáceos, señalan que este alcaloide, en ciertas concentraciones (1×10^{-4} a $3 \times 10^{-4}M$) reduce o bloquea completamente la acción inhibitoria del neurotransmisor (23,24). Debido a esto, se propuso a la bicuculina como un antagonista relativamente específico del GABA y se pensó que este antagonismo podría estar confinado a los sitios receptores postsinápticos (25). Aun cuando los efectos de la bicuculina pueden ser explicados en términos de su combinación con el receptor al GABA, este alcaloide también puede afectar los procesos de síntesis, liberación y degradación del aminoácido transmisor (26 y 27).

Por otra parte, el análisis de las curvas dosis-respuesta, similares a las obtenidas para la picrotoxina, ha mostrado que la bicuculina es sólo un antagonista débil de la acción del GABA en las fibras musculares de algunos crustáceos y que este antagonismo es probablemente de tipo no competitivo (17,21).

En neuronas del sistema nervioso central de mamíferos, la inhibición producida por la aplicación iontoforética de GABA, no fue reducida por la bicuculina (28). En estos estudios se cuestiona si la bicuculina utilizada tiene realmente alguna actividad sobre los sistemas biológicos, dado que recientemente se ha observado que este alcaloide se transforma en bicucina y en bicuculina metaclorada, al disolverse

en solución salina a PH neutro (29,30). La bicucina es una sustancia convulsionante poco efectiva (29), mientras que - la bicuculina metaclorada reduce en gran medida la sensibilidad al GABA en neuronas corticales de mamíferos (30).

Objetivos.

La picrotoxina y la bicuculina ejercen un efecto antagonista, cuya naturaleza y especificidad no han sido plenamente establecidas, sobre la acción sináptica del GABA en distintas preparaciones neuromusculares, tanto de invertebrados, como de vertebrados (3,4). Teniendo esto en consideración, se emprendió el presente estudio con el fin de establecer la presencia o ausencia de similitud entre los efectos - que ejercen la picrotoxina y la bicuculina, sobre la inhibición producida por GABA en la contracción del músculo abductor del quelípodo de acocil (Procambarus clarkii).

Asimismo, se plantea la evaluación del efecto producido por la picrotoxina y por la bicuculina, en presencia y en ausencia del GABA, sobre la contracción muscular; dado que en la actualidad se ha incrementado el número de evidencias - que cuestionan la especificidad del mecanismo con el cual las dos sustancias realizan su acción antagonista sobre el GABA (3,4). Se ha indicado que los dos alcaloides no tienen efecto sobre los receptores sinápticos específicos para GABA, si-

no que su acción la llevan a cabo, en forma no específica, so
bre sitios no sinápticos de la membrana postsináptica (3,4).

En base a los resultados obtenidos, también se -
pretende evaluar las ventajas que ofrece la preparación empleada
aquí, para el análisis farmacológico de drogas antagonis-
tas y agonistas de la acción del GABA.

MATERIAL Y METODO.

1. Preparación y registros.

Se utilizaron 44 quelípedos de acocil (*Procambarus clarkii*), cada uno fue separado del cuerpo del acocil cortándolo cerca del plano autónomo del organismo. Una vez separado el quelípedo se cortó la punta del propodito y se conectó al sistema de perfusión (figura 3). A cada quelípedo se le hizo una horadación en la cara interna del propodito para permitir el libre flujo de la perfusión.

Los electrodos de estimulación fueron insertados en una incisión realizada en la cara interna del propodito, cerca de la articulación con el dactilopodito. La punta del dactilopodito era ligada a un transductor de tensión y este era conectado al sistema incriptor para llevar un registro en papel de la actividad muscular (figura 3).

La contracción del músculo abductor del quelípedo fue evocada aplicando pulsos de corriente de duración y frecuencia constantes (5 ms y 1 cada 4 s, respectivamente) y de una intensidad de 12 a 14 v, (este rango se obtuvo a partir -

de una curva voltaje-respuesta elaborada con el fin de encontrar el valor en el que aproximadamente el 75% de la maquinaria contráctil del músculo estaba activada).

Para evaluar el efecto producido por el GABA, la picrotoxina y la bicuculina por sí solos, sobre la respuesta muscular, se utilizaron 12 quelípedos (4 quelípedos para cada una de las sustancias), cada uno de los cuales fue perfundido con solución salina Van Harreveld hasta obtener una respuesta muscular constante, a los valores de estimulación señalados. Posteriormente se perfundieron (2-4 min.) soluciones salinas con GABA, picrotoxina y bicuculina en distintas concentraciones (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M) según el caso.

Para estudiar el efecto de la picrotoxina y la bi cuculina sobre la respuesta muscular en presencia de GABA se utilizaron 32 quelípedos (16 quelípedos para cada fármaco). Cada uno fue perfundido con solución salina Van Harreveld, al igual que en el caso anterior, hasta que la magnitud de la res puesta registrada se mantuvo constante. Posteriormente el que lípedo era perfundido con una solución salina que contenía - GABA a una concentración de (10^{-4} M) (2-4 min.), hasta que se observaba el efecto máximo de ésta, sobre la respuesta muscular; en este punto se perfundía a la preparación con una solución de picrotoxina o bicuculina (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M). Para cada una de las diferentes concentraciones aplicadas se utilizaron 4 quelípedos.

2. Medición del efecto.

Terminando cada registro, se medía la amplitud de los trazos obtenidos. La amplitud promedio de los trazos previos (n=10) a cada aplicación de GABA, picrotoxina y/o bicuculina, fue considerada como el 100% de la respuesta muscular - bajo las condiciones de estimulación y amplificación empleadas.

Para expresar el efecto porcentual provocado por cada una de las sustancias en estudio, se empleó la siguiente relación:

$$X = \frac{A}{B} (100)$$

A: Amplitud (mm) de cada uno de los trazos obtenidos durante la aplicación de las sustancias en estudio.

B: Amplitud (mm) promedio (n=10) de los trazos previos a la aplicación de las sustancias en estudio.

X: Valor porcentual de cada trazo.

Conociendo la amplitud porcentual de cada trazo, antes y durante la aplicación de determinada concentración de

las sustancias, pudo estimarse el efecto provocado por cada una de ellas sobre la respuesta mecánica, obteniendo las gráficas dosis-respuesta respectivas.

3. Tratamiento de datos.

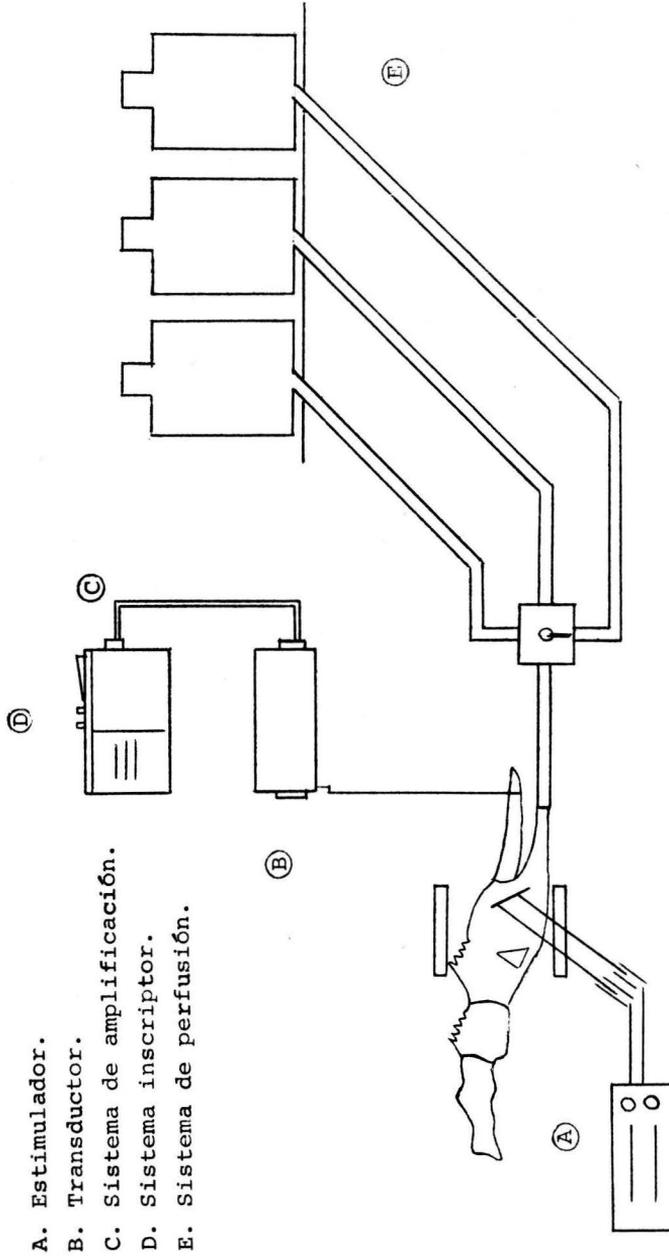
Los datos referentes al efecto provocado por las distintas concentraciones de GABA sobre la respuesta contráctil de la preparación, fueron tratados mediante un análisis de varianza simple, mientras que los datos referentes al efecto de la picrotoxina y bicuculina en ausencia y en presencia del neuroaminoácido, fueron respectivamente tratados utilizando un análisis de varianza bifactorial.

Lo obtenido mediante las pruebas estadísticas mencionadas, se indica en la siguiente sección, según el caso, - empleando la notación que sigue a continuación:

F_c : N , $F_t = M$.

F_c : Valor del estadístico F, obtenido como resultado del análisis.

F_t : Valor del estadístico F, tomado de tablas al nivel de 0.05 de confianza, - con n y m grados de libertad.



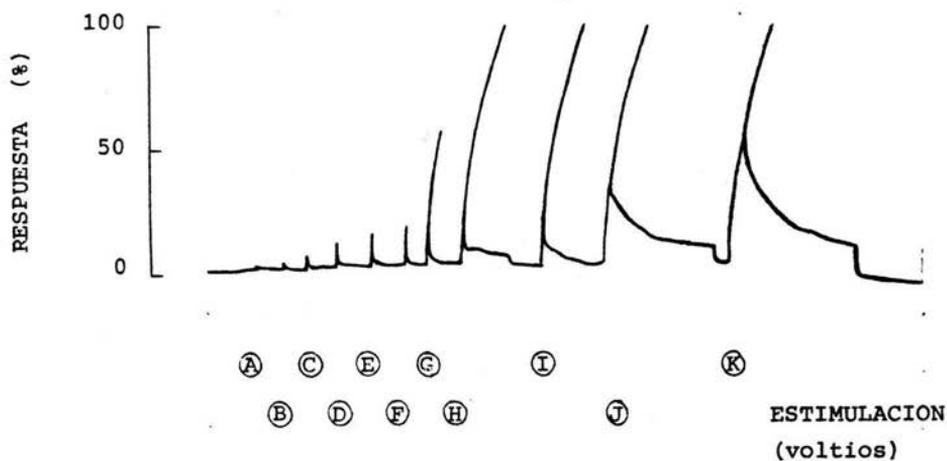
- A. Estimulador.
- B. Transductor.
- C. Sistema de amplificación.
- D. Sistema inscriptor.
- E. Sistema de perfusión.

Figura 3. Dispositivo experimental.

RESULTADOS

1. Relación entre la intensidad del estímulo y la respuesta contráctil.

Con el fin de establecer la amplitud de la respuesta contráctil que se consideraría a lo largo del presente estudio, se procedió a determinar la relación existente entre la intensidad del estímulo y la amplitud de la contracción muscular evocada. La figura 4 ilustra el registro de la respuesta contráctil del músculo abductor de un quelípedo ante distintas intensidades de estimulación. Como puede observarse en esta figura, a estímulos de baja intensidad se activaban fibras musculares de bajo umbral, que posiblemente sean rápidas y produzcan respuestas de pequeña amplitud. Incrementando la intensidad del estímulo, fibras de mayor umbral son reclutadas, generando una respuesta muscular más intensa, hasta que se produce la activación de la totalidad de las fibras musculares de este tipo. Es necesario notar que a intensidades de estimulación altas, se presentaba un segundo componente en la fase de caída de la contracción, (figura 4, 16 v.); tal componente podría corresponder a la activación de fibras lentas presentes en el músculo abductor, las cuales poseen un umbral de activación alto.



A: 2.2	E: 6.4	I: 19.2
B: 2.6	F: 9.6	J: 22.4
C: 2.8	G: 12.8	K: 25.6
D: 3.2	H: 16.0	

Figura 4. Registro de la respuesta contráctil del músculo abductor de un quelípedo de aco cil, ante distintas intensidades de estimulación.

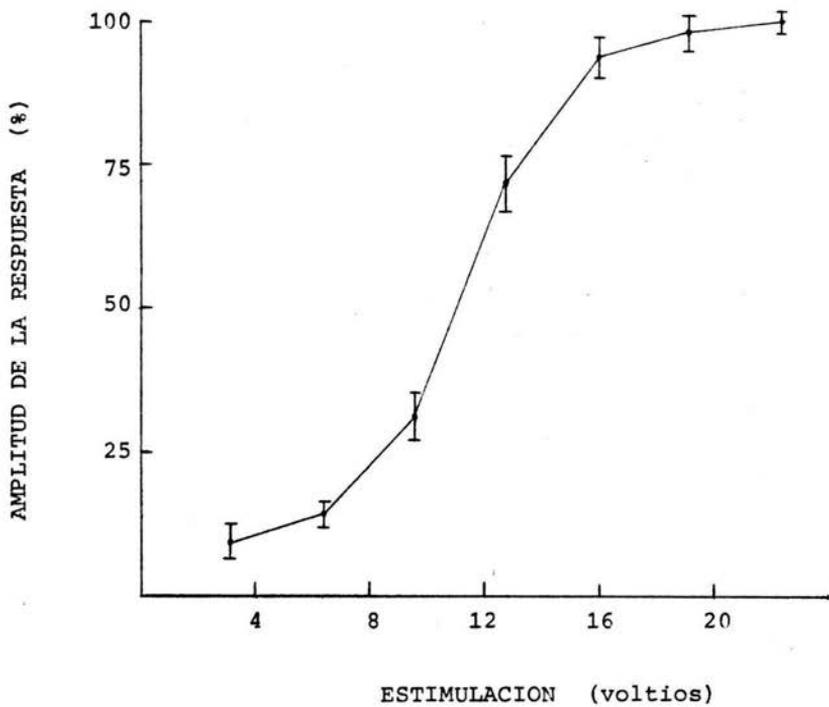


Figura 5. Porcentaje de respuestas contráctiles evocadas en el músculo abductor de diferentes quelpedos de acocil, ante intensidades crecientes de estimulación (N=4).

La gráfica de la figura 5, ilustra el porcentaje de las respuestas contráctiles del músculo abductor de diferentes quelípedos, ante intensidades crecientes de estimulación. Puede observarse que el estímulo mínimo necesario para evocar una contracción fue de 2.2 v, mientras que la intensidad necesaria para activar la mayoría de las fibras fue de - 16.0 v.

El intervalo de estimulación empleado para estudiar la acción de los fármacos (12 a 14 v) evocó respuestas del tipo de sacudida simple, que corresponden a la activación de fibras musculares fásicas (figura 4) y permitió observar los incrementos en la amplitud de la respuesta, que se manifestaron como reflejo del efecto que ejercen éstos sobre la misma.

2. Efecto del GABA sobre la respuesta contráctil.

La aplicación de una solución salina con GABA a una concentración de 10^{-4} M en el músculo abductor del quelípedo, produjo una considerable reducción en la amplitud de la contracción de este músculo (figura 6A). La amplitud de la respuesta obtenida previamente a la aplicación de GABA se vió disminuida hasta aproximadamente en un 45%. El efecto señalado podría deberse a que el GABA produce una reducción en el -

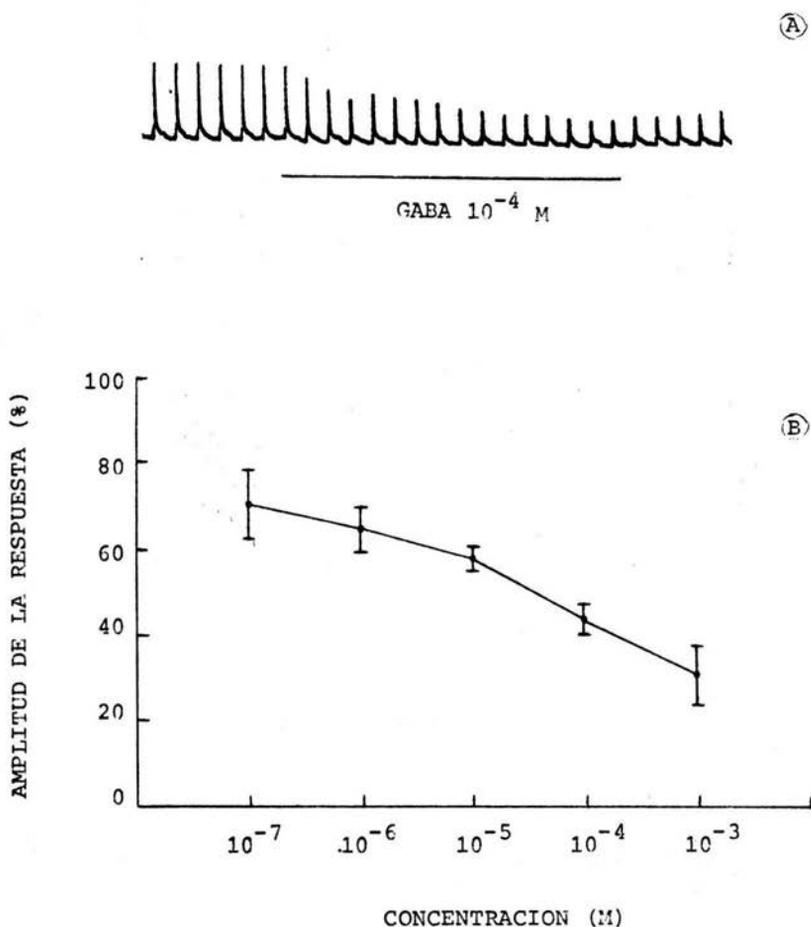


Figura 6. Registro de la respuesta contráctil del músculo abductor de un quelípido de acocil, en presencia de GABA 10^{-4} M (A). Porcentaje de respuestas contráctiles del músculo abductor de diferentes quelípedos de acocil, en presencia de distintas concentraciones de GABA (B) (N=4).

número de fibras musculares activadas por el estímulo, aumentando el umbral de activación de éstas, lo cual concuerda con la observación de que este aminoácido produce una notable hiperpolarización en distintos tipos de fibras musculares de crustáceos (3, 4, 5).

El efecto producido por diferentes concentraciones de GABA (10^{-7} a 10^{-3} M) sobre la respuesta contráctil de varios músculos abductores, es mostrado en la gráfica de la figura 6B. Como puede observarse en esta gráfica, existe una reducción considerable de la respuesta contráctil, la cual depende de la dosis aplicada ($F_C = 46.14$, $F_T = 3.06$). La relación obtenida (figura 6B) sigue un comportamiento que concuerda notablemente con lo reportado por otros investigadores (3,4,5).

Sin embargo, dadas las características del presente estudio no fue posible establecer la proporción de moléculas de GABA que interactúan con los receptores postsinápticos para producir un cambio apreciable en la contracción del músculo.

3. Efecto de la picrotoxina y de la bicuculina sobre la respuesta contráctil.

En la mayoría de los estudios reportados en rela-

ción al efecto de la picrotoxina y la bicuculina, en la unión neuromuscular inhibidora de crustáceos, los fármacos eran aplicados siempre en presencia de GABA (21,22,23,24), por lo que consideramos que el caracterizar el efecto que estos fármacos ejercen en ausencia de GABA sobre la concentración del músculo, nos proporcionaría información importante acerca de los mecanismos involucrados durante la acción de los mismos.

Ambas sustancias, por sí solas, produjeron un incremento significativo ($F_C = 10.68$, $F_T = 4.17$) en la amplitud de la respuesta contráctil (figuras 7A, 7B). Al aplicar picrotoxina a una concentración de $10^{-3}M$ se provocó un aumento en la respuesta contráctil de un 20% aproximadamente, mientras que al aplicar bicuculina en la misma concentración se observó un aumento de aproximadamente 30%. En ambos casos después de un breve período de lavado con solución salina, la respuesta muscular obtenida alcanzaba los valores iniciales.

El efecto que produjeron diferentes concentraciones de picrotoxina y de bicuculina sobre la respuesta muscular promedio de varias preparaciones es mostrado en la figura 8. Todas las concentraciones utilizadas (10^{-7} a 10^{-3} M) evocaron un aumento en la amplitud de la contracción siendo mayor el efecto de la bicuculina, en todas las concentraciones superiores a 10^{-7} M. ($F_C = 35.96$, $F_T = 2.69$).

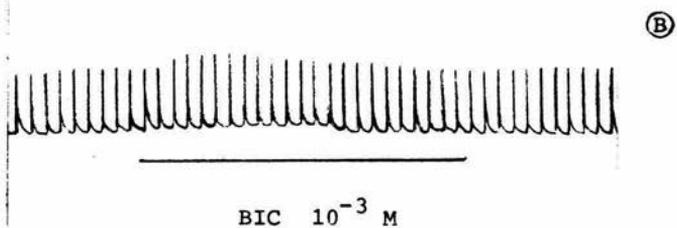
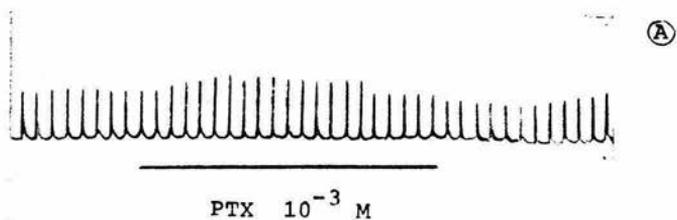


Figura 7. Registro de la respuesta contráctil del músculo abductor de un quelípedo de acocil, en presencia de picrotoxina (PTX) 10^{-3} M (A) y en presencia de bicuculina (BIC) 10^{-3} M (B).

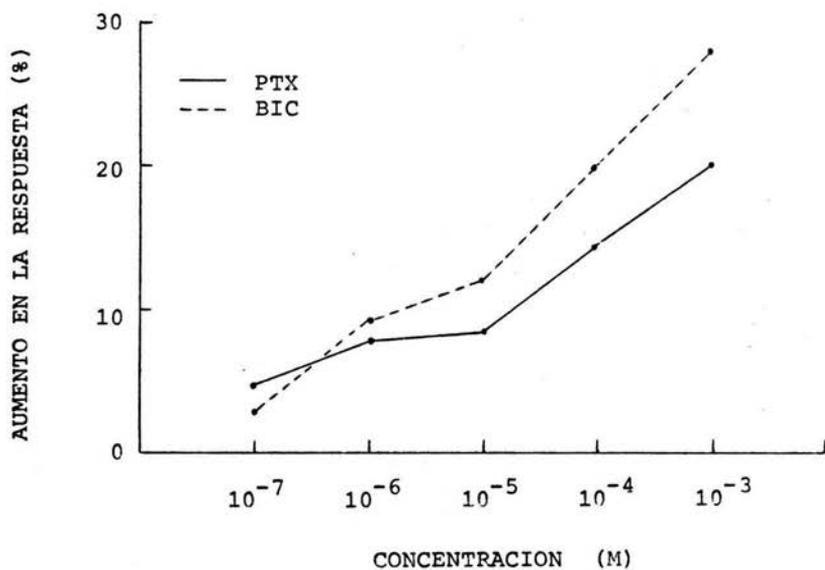


Figura 8. Efecto producido sobre la respuesta contráctil del músculo abductor de varios quelípedos de acocil, por diferentes concentraciones de picrotoxina y bicuculina.

4. Efecto de la picrotoxina y de la bicuculina sobre la respuesta contráctil en presencia de GABA.

La aplicación de picrotoxina, a una concentración de $10^{-3}M$, inmediatamente después de que la respuesta muscular había sido abatida en un 45% de su valor inicial, por efecto del GABA ($10^{-4}M$), provocaba un aumento en la respuesta del 20% aproximadamente (figura 9A). Mientras que la aplicación de bicuculina, a la misma concentración y en condiciones similares, provocaba un aumento de sólo el 14% en la respuesta (figura 9B). Lo anterior, nos indica la probable existencia de mecanismos de acción diferentes, con los cuales estos fármacos ejercen su efecto.

La figura 10 muestra el efecto producido por diferentes concentraciones de picrotoxina y bicuculina, sobre la respuesta contráctil de varios músculos en presencia de GABA $10^{-4}M$. Cada una de las concentraciones empleadas (10^{-6} a $10^{-3}M$) de los fármacos tuvo un efecto significativo ($F_C = 63.94$, $F_t = 3.01$) sobre la respuesta muscular. En las concentraciones más altas (10^{-4} y $10^{-3}M$) la picrotoxina provocó un aumento mayor en la respuesta que la bicuculina ($F_C = 10.17$, $F_t = 4.26$).

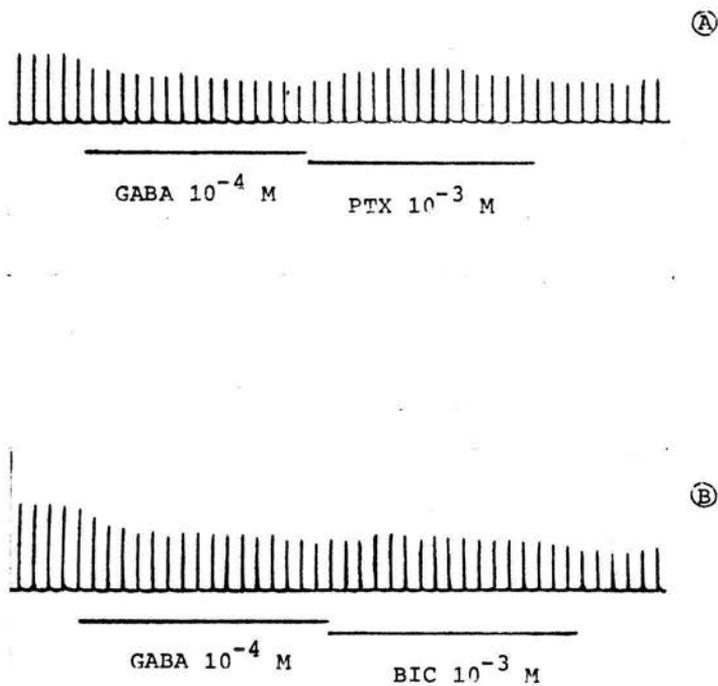


Figura 9. Registro de la respuesta contráctil del músculo abductor de un quelípedo de acocil, en presencia de picrotoxina 10^{-3} M (A) y de bicuculina 10^{-3} M (B), aplicadas después de GABA 10^{-4} M.

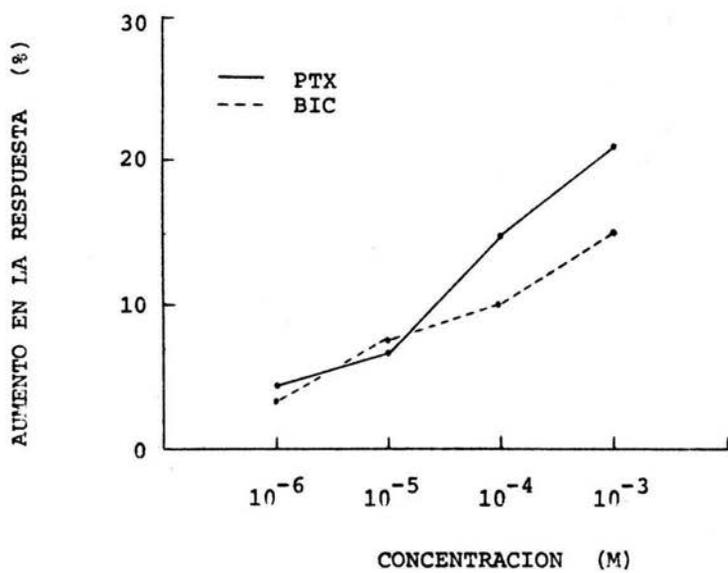


Figura 10. Efecto producido sobre la respuesta contráctil del músculo abductor de varios quelípedos de acocil, por diferentes concentraciones de picrotoxina y bicuculina aplicadas después de GABA 10^{-4} M.

5. Comparación de los efectos de la picrotoxina y la bicuculina sobre la respuesta contráctil en ausencia y en presencia de GABA.

Con el propósito de comparar los efectos provocados por los fármacos bajo las dos condiciones experimentales ya indicadas, se graficaron las respuestas evocadas, tanto en una como en otra condición, para una determinada concentración de fármaco. Las relaciones obtenidas se muestran en la figura 11.

Cada punto de la gráfica representa el valor promedio del efecto provocado en la respuesta contráctil por una determinada concentración de bicuculina y picrotoxina, en ausencia y en presencia de GABA. Las dos rectas que se observan, resultan al unir los puntos correspondientes a un fármaco y son índice del efecto que sobre el sistema provoca cada uno de ellos.

En dicha gráfica la inclinación mostrada por cada una de las rectas (segmentos), con respecto a los ejes, proporciona información acerca de bajo cual condición experimental, cada uno de los fármacos causa mayor efecto. Como puede observarse (figura 11), la recta correspondiente a la picrotoxina, forma un ángulo mayor de 45° ($M=1.26$), lo que indica que este fármaco causa un efecto mayor sobre la respues-

ta muscular, en presencia de GABA. La recta que corresponde a la bicuculina, en cambio, tiene una pendiente menor que uno (0.56), indicando así, que esta substancia causa mayor efecto sobre la respuesta, en ausencia del neuroaminoácido.

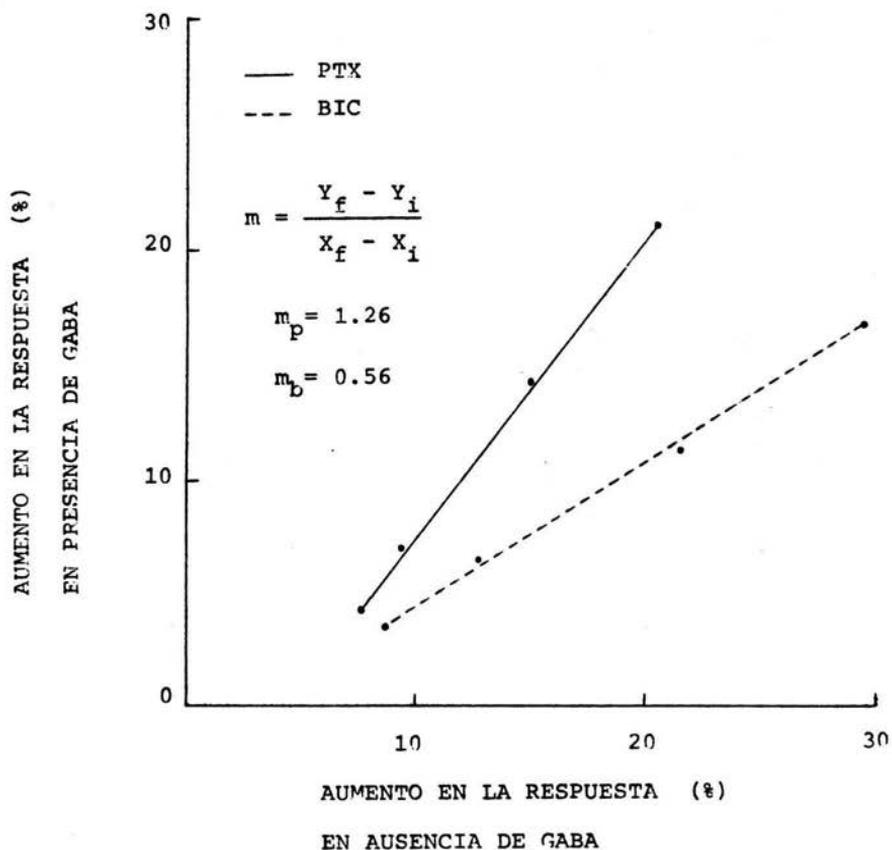


Figura 11. Comparación de los efectos causados por diferentes concentraciones (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M) de picrotoxina y bicuculina, tanto en ausencia como en presencia de GABA exógeno.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

1. Relación entre la intensidad del estímulo y la respuesta contráctil.

La relación existente entre la intensidad del estímulo y la amplitud de la contracción muscular evocada (figura 5), indica que a medida que se incrementa la intensidad del estímulo, éste es capaz de activar un número cada vez mayor - de fibras musculares, lo cual produce un aumento en la magnitud de la contracción hasta alcanzar un máximo, donde la totalidad de las fibras musculares ha sido activada. También, se muestra la existencia de al menos, dos grupos diferentes de fibras musculares en el músculo abductor del quelípodo, lo - cual es frecuente en varios músculos de crustáceos que reciben inervación dual (excitadora e inhibidora) (32). A estímulos de baja intensidad (menores de 12 v) se activa el primer grupo de fibras, el cual parece constituido por fibras musculares fásicas, como las que se encuentran en varios músculos abductores y aductores de crustáceos; las cuales poseen un bajo umbral y responden rápidamente a la estimulación eléctrica directa (33,34). Conforme se incrementaba la estimulación (mayor de 12 v) empezaba a observarse la aparición de un segundo componente (figura 4) el cual presenta un umbral alto y una -

fase de relajación prolongada. Estas características concuerdan con las descritas para fibras tónicas de varios músculos de otros crustáceos (32, 33, 34).

Es necesario indicar que debido a las características de la respuesta muscular señaladas y a las condiciones de estimulación empleadas, se decidió analizar las respuestas, evocadas por la aplicación de distintas concentraciones de los fármacos, sobre la contracción de una población de fibras principalmente rápidas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los alcaloides hayan ejercido alguna acción sobre las fibras musculares lentas.

2. Efecto del GABA sobre la respuesta contráctil.

La respuesta contráctil de un grupo de fibras fue considerada como un índice del nivel de excitabilidad de sus membranas, dado que despolarizaciones supraumbrales de las mismas evocan respuestas contráctiles proporcionales a su intensidad y duración, alcanzando valores máximos cuando se activan la mayoría de las fibras individuales. El número de fibras musculares activadas depende tanto de la intensidad del estímulo, como del umbral de activación que posee cada fibra. Teniendo en cuenta esto, cualquier cambio en la respuesta contráctil, bajo condiciones de estimulación constante, se aso-

ció con un cambio en el umbral de las fibras, interpretando como despolarización de la membrana muscular, cuando se incrementaba la amplitud de la respuesta y como hiperpolarización cuando ésta era reducida.

La disminución de la respuesta mecánica que se observa durante las diferentes concentraciones de GABA (figura 6B) puede asociarse con la acción hiperpolarizante que este aminoácido ejerce sobre la membrana muscular. Consistiendo tal acción en provocar un incremento en la diferencia de potencial entre el valor de reposo y el umbral de activación de las fibras musculares. Lo cual trae como consecuencia que algunas fibras musculares de la población considerada, no puedan generar potenciales de acción que disparen la actividad mecánica de las mismas, reduciendo así, la respuesta mecánica global del músculo abductor. Lo anterior concuerda con algunas observaciones previas acerca de la actividad eléctrica -membranal de diferentes tipos de fibras musculares de crustáceos, en presencia de GABA exógeno o por la estimulación directa de vías nerviosas inhibitoras donde este aminoácido es el neurotransmisor (13, 14).

El efecto de las diferentes concentraciones de GABA empleadas, sobre la contracción del músculo abductor, muestra una relación que concuerda notablemente con la reportada en otros estudios, en donde se midió el efecto del amino

ácido sobre la conductancia membranal de fibras musculares individuales de langostino (3,4). Tal similitud, permite considerar a la respuesta mecánica global del músculo abductor como útil índice del nivel de excitabilidad de las fibras musculares y a la metodología empleada como conveniente para ser utilizada en el análisis de los efectos de diferentes fármacos (ya sean agonistas o antagonistas de la acción inhibitoria de GABA).

3. Efecto de la picrotoxina y de la bicuculina sobre la respuesta contráctil.

Como puede observarse en la figura 8, tanto la picrotoxina como la bicuculina son capaces de incrementar la respuesta contráctil, en ausencia de GABA exógeno. Tal efecto podría ser atribuido, como se ha propuesto anteriormente, a una acción despolarizante de los fármacos sobre la membrana de las fibras musculares, lo cual concuerda con los estudios de Freeman (17), Baker *et al* (35) y Heyer *et al* (36), en donde se muestran alteraciones en la conductancia membranal al K^+ en presencia de los fármacos. También puede considerarse que los dos alcaloides antagonizan la acción inhibitoria del GABA, liberado espontáneamente por la estimulación indirecta de las vías nerviosas inhibitorias, con los pulsos eléctricos empleados para producir la contracción muscular.

En cuanto a la factibilidad del segundo mecanismo propuesto para explicar el efecto de los fármacos, en ausencia de GABA, pueden indicarse algunos hechos y observaciones importantes:

i) Para que el transmisor (GABA) sea liberado de la terminal nerviosa inhibidora, por la estimulación eléctrica aplicada al músculo, se requiere de grandes cantidades de corriente eléctrica (37). La cantidad de corriente aplicada, dados los valores de voltaje empleados, fue pequeña y la pérdida (fuga de corriente) de la misma considerable, debido a la metodología usada.

ii) La liberación espontánea del transmisor, si es lo suficientemente intensa y constante como para mantener hiperpolarizada la membrana muscular en forma permanente, provocaría un aumento en la concentración de GABA en el medio externo a las fibras. Entonces, la aplicación de bajas concentraciones de GABA exógeno produciría la saturación de los receptores postsinápticos para el aminoácido, impidiendo de esta forma la contracción muscular. Lo cual, como puede verse en los resultados, no ocurrió.

Si la liberación espontánea de GABA no fuese inten

sa y por lo tanto el número de receptores postsinápticos ocupados fuese pequeño, se esperaría que el efecto antagonista de la picrotoxina y de la bicuculina fuese relativamente pequeño, al contrario de lo que se observó en el presente estudio.

- iii) Si se considera que ambas sustancias ejercen una acción antagonista del GABA, estrictamente sináptica, uno esperaría en primera instancia, que tuviesen un mecanismo de acción común y por lo tanto un efecto similar. Sin embargo, los resultados muestran lo contrario, ya que la aplicación de diferentes dosis de ambos alcaloides producen diferentes efectos entre sí (figura 8). La picrotoxina aplicada en concentraciones de 10^{-5} a 10^{-3} M, causa un aumento en la respuesta mecánica del músculo abductor, notoriamente menor que la producida por la bicuculina, aplicada en las mismas concentraciones.

Teniendo como base las consideraciones y evidencias expresadas anteriormente, estimamos que el efecto que producen ambos alcaloides, en ausencia de GABA exógeno sobre la contracción de fibras de bajo umbral del músculo abductor del acocil, se lleva a cabo, principalmente, mediante un mecanismo no sináptico, que al parecer es de distinta naturaleza para cada uno de ellos.

4. Efecto de la picrotoxina y de la bicuculina sobre la respuesta contráctil en presencia de GABA.

La aplicación de picrotoxina y/o bicuculina a músculos previamente sometidos a soluciones que contenían GABA - en distintas concentraciones, provocó un efecto reductor de la acción del neuroaminoácido (figura 10). Las curvas dosis-respuesta obtenidas para ambas sustancias, muestran que su acción la ejercen mediante mecanismos de diferente naturaleza, a diferencia de lo reportado por Takeuchi y Onodera (38). La picrotoxina (10^{-4} y 10^{-3} M) revirtió apreciablemente el abati-miento de la respuesta muscular producido por el GABA, mientras que la bicuculina (en las mismas concentraciones) únicamente ejerció un pequeño efecto sobre la misma inhibición de la contracción. Estas observaciones concuerdan con las reali-zadas por Shank y colaboradores (21), en la unión neuromuscular de langosta.

El efecto antagonista que ejercen los fármacos so-bre la acción represora de la contracción muscular provocada por GABA (10^{-4} M), puede atribuirse principalmente a la acción no sináptica ya discutida anteriormente. Sin embargo, aun - cuando la picrotoxina ejerció un efecto de magnitud similar, tanto en presencia, como en ausencia del aminoácido exógeno y la bicuculina causó mayor efecto en ausencia del mismo (figura 11); no puede descartarse que otro mecanismo de tipo siná-

tico este involucrado, tal como ha sido señalado en algunos reportes al bloqueo de sinápsis Gabaérgicas, por parte de estos compuestos en neuronas de mamíferos y fibras musculares de crustáceos (19, 20, 21, 22, 23).

A pesar de que la metodología empleada, no permitió establecer claramente la existencia de dicho mecanismo sináptico, es probable que el efecto total desarrollado por los dos alcaloides, sobre la respuesta mecánica del músculo abductor, involucre tanto acciones no sinápticas como sinápticas.

Estudios posteriores, en los que se analicen las observaciones anotadas anteriormente, permitirán el establecimiento preciso del tipo de mecanismo particular, por medio del cual ejercen su efecto cada uno de los compuestos. Esto es particularmente importante, si tomamos en cuenta que ambas sustancias constituyen una herramienta farmacológica común en el estudio de diferentes aspectos de las sinápsis, tanto de invertebrados como de vertebrados y su empleo supone cierto conocimiento acerca de sus efectos, el cual puede ser impreciso, si no se considera el tipo de preparación en la cual fueron probados y en la cual serán utilizados.

Por último, podemos mencionar las siguientes conclusiones:

- i) La picrotoxina y la bicuculina incrementaron la respuesta contráctil del músculo abductor del quelípodo de acocil, mediante una acción no sináptica (provocando, al parecer, una inactivación de los canales iónicos al K^+). Siendo mayor el efecto de la bicuculina que el de la picrotoxina.

- ii) Ambos compuestos provocaron un efecto reductor de la acción del GABA, sobre la respuesta mecánica del músculo abductor, probablemente mediante una acción de tipo sináptico. El efecto antagonista ejercido por cada uno de los fármacos, está mediado por mecanismos de diferente naturaleza.

- iii) Tanto la metodología experimental empleada, como la preparación del músculo abductor del quelípodo de acocil, resultan ser convenientes para el análisis farmacológico de compuestos que sean - agonistas o antagonistas del GABA.

BIBLIOGRAFIA

1. Hoyle, G. and Wiersma, C.A.G. Excitation at neuromuscular junctions in crustacea. *J. Physiol.* 1958. 143: 403 - 425.
2. Hoyle, G. and Wiersma, C.A.G. Inhibition at neuromuscular junctions in crustacea *J. Physiol.* 1958. 143: 426 - 440.
3. Atwood, H.L. Organization and synaptic physiology of crustacean neuromuscular systems. *Progress in Neurobiology.* 1976. 7: 291 - 391.
4. Gerschenfeld, H.M. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiological Reviews.* 1973. 53: 1 - 119.
5. Kuffler, S.W. and Nicholls, J.G. From neuron to brain. A cellular approach to the function of the nervous system. Sinauer. Sunderland, Mass. 1976.
6. Otsuka, M. Gaba in the crustacean nervous system: A historical review. In: Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (eds.) Gaba in nervous system function. Raven Press. New York. 1976. pp. 245 - 249.
7. Kravitz, E.A. et al Gama-aminobutyric acid and other compounds in crustacea. II. Peripheral nervous system. *J. Neurophysiol.* 1963. 26: 729 - 738.

8. Kravitz, E.A. et al Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea. III. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. J. Neurophysiol. 1963. 26: 739 - 751.
9. Otsuka, M. et al Release of Gamma-aminobutyric acid from inhibitory nerves of lobster. Proc. Nat. Acad. Sci. 1966. 56: 1110 - 1115.
10. Kravitz, E.A. et al A comparison of the enzymes and substrates of Gamma-aminobutyric acid metabolism in lobster excitatory and inhibitory axons. Proc. Nat. Acad. Sci. - 1965. 54: 778 - 782.
11. Hall, Z.W. et al The metabolism of gamma-aminobutyric acid in the lobster nervous system. J. Cell. Biol. 1970. 46: 290 - 299.
12. Dudel, J. and Kuffler, S.W. Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. J. Physiol. 1961. 155: - 543 - 562.
13. Orkand, R.K. Chemical inhibition of contraction in directly stimulated crayfish muscle fibres. J. Physiol. 164: - 103 - 115.
14. Takeuchi, A. Studies of inhibitory effects of GABA in invertebrate nervous systems. In: Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.F. (eds.) GABA in nervous system function. Raven Press. New York. 1976. pp. 255 - 267.

15. Nicoll, R.A. and Alger, B.E. Presynaptic inhibition: transmitter and ionic mechanisms. Int. Rev. Neurobiol. 1979. - 21: 217 - 258.
16. Olsen, R.W. Approaches to study of GABA receptor. In: - Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (eds.) GABA in - nervous system function. Raven Press. New York. 1976. pp. 268 - 272.
17. Freeman, A.R. Electrophysiological analysis of the actions of strychnine, bicuculline and picrotoxin on the axonal - membrane. J. Neurobiol. 1973. 4 (6): 567 - 582.
18. Davidson, N. Neurotransmitter aminoacids. Academic Press. New York. 1976. pp. 95 - 104.
19. Robbins, J. and Van der Kloot, W.G., The effect of picrotoxin on peripheral inhibition in the crayfish. J. Physiol. 1958. 143: 541 - 552.
20. Van der Kloot, W.G. Picrotoxin and the inhibitory systems of the crayfish muscle. In: Roberts, E., Chase, T.N. and Tower, D.B. (eds.) Gaba in nervous system function. Raven Press. New York. 1976. pp. 245 - 249.
21. Shank, R.P. et al Bicuculline and picrotoxin as antagonists of gamma-aminobutyrate and neuromuscular inhibitions in - the lobster. Brain Research. 1974. 72: 71 - 78.

22. Takeuchi, A. and Takeuchi, N. A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the crayfish. *J. Physiol.* 1969. 203: 377 - 391.
23. McLennan, H. Bicuculline and inhibition of the crayfish - stretch receptor neurones. *Nature.* 1970. 228: 674 - 675.
24. Curtis, D.R. et al Bicuculline and central GABA receptors. *Nature.* 1970. 228: 676 - 677.
25. Beart, P.M. and Johnston, G.A.R. Bicuculline and GABA metabolising enzymes. *Brain Research.* 1972. 38: 226 - 227.
26. Straughan, D.W. et al Evaluation of bicuculline as a GABA antagonist. *Nature.* 1971. 233: 352 - 354.
27. Curtis, D.R. et al Central action of bicuculline. *J. Neurochem.* 1974. 23: 605 - 606.
28. Godfraind, J. M. et al Doubtful value of bicuculline as a specific antagonist of GABA. *Nature.* 1970. 228: 675 - 676.
29. Olsen, R.W. et al Chemical instability of the GABA antagonist bicuculline under physiological conditions. *Brain Research.* 1975. 98: 383 - 387.
30. Johnston, G.A.R. et al Bicuculline methochloride as a GABA antagonist. *Nature New Biology.* 1972. 40 (102): 219 - 220.
31. Orkand, R.K. The relation between membrane potential and contraction in single crayfish muscle fibres. *J. Physiol.* 1962. 161: 143 - 159.

32. Dorai Raj, B.S. Diversity of crab muscle fibres innervated by a single motor axon. J. Cell. and Comp. Physiol. 1964. 64: 41 - 54.
33. Atwood, H.L. Characteristics of fibres in the extensor muscle of a crab. Comp. Biochem. Physiol. 1965. 14: 205 - 207.
34. Atwood, H.L. Excitation and inhibition in crab muscle fibres. Comp. Biochem. Physiol. 1965. 16: 409 - 426.
35. Bakker, J.L. and Mac Donald, J.F. Picrotoxin convulsions involve synaptic and no synaptic mechanisms on cultered mouse spinal neurons. Science. 1980. 208: 1054 - 1056.
36. Heyer, E.J. et al Membrane depolarization and prolongation of calcium dependent potentials of mouse neurons in cell culture by two convulants: bicuculline and penicillin. Brain Research. 1982. 232 (1): 41 - 56.
37. Katz, B. and Miledi, R. Propagation of electric activity in motor nerve terminals. Prog. Roy. Soc. 1965. 161: - 453 - 482.
38. Takeuchi, A. and Onodera, K. Effect of bicuculline on the GABA receptor of the crayfish neuromuscular junction. Nature. 1972. 236: 55 - 56.