

EFFECTO DE LA HORMONA NEURODEPRESORA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AURICULA AISLADA DE RATA (*RATTUS NORVEGICUS*).

Carlos E. Aguilar, Abia E. Peña de Aguilar y Ventura Barreto*

RESUMEN.

La hormona neurodepresora (HND) inhibe la actividad neuronal en los crustáceos, demostrándose que existe reactividad cruzada entre dos grupos de ellos. Esta investigación se planteó dilucidar si la HND obtenida de un crustáceo podría afectar o no la actividad de la aurícula aislada de *R. norvegicus*. El extracto crudo de 2000 tallos oculares de camarones de la familia Hippolytidae se purificó pasándolo sucesivamente por columnas de Sephadex G-25 y G-15. Se juntaron las fracciones que resultaron positivas a la actividad hormonal y 10 μ l eran equivalentes a 80,73 unidades. Se usó un lote de 11 *R. norvegicus*, de la cepa Sprague-Dawley, machos y de aproximadamente 350 g de peso. La aurícula se colocó en un baño para órganos aislados que contenía 10 ml de solución de Tyrode, burbujeada con 100% de O₂ y los registros se derivaron hacia un polígrafo. Se realizó la curva dosis-respuesta de HND en forma acumulativa desde 30 u hasta 7500 u, las cuales produjeron una disminución en la contracción y la frecuencia auriculares. La DE50 obtenida fue cercana a 100 u de HND. El efecto de la HND fue bloqueado por ouabaína 10⁻⁵ M. La diferencia entre los promedios de actividad de HND en ausencia y en presencia de ouabaína 10⁻⁵ M fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$ ó $p < 0,001$) para las dosis de HND iguales o mayores que 100 u. Esto indica que la HND activa una bomba de Na⁺ electrogénica en la aurícula.

PALABRAS CLAVES: Hormona neurodepresora, aurícula aislada, ouabaína.

ABSTRACT

Neurodepressing hormone (NDH) inhibits the neuronal activity in crustaceans and cross-sensitivity has been shown in two groups of them. The aim of this

* Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Núcleo de Bolívar, UDO, Cd. Bolívar. Proyecto financiado por Fundacite-Guayana.

Recibido: Junio 1997. Aprobado: Febrero 1998.

research was to find out whether or not NDH obtained from a crustacean could affect the activity of the isolated auricle from *Rattus norvegicus*. The crude extract from 2000 eyestalks of fresh water shrimps of the family Hippolytidae was purified using Sephadex G-25 and G-15 columns. Positive fractions to hormone activity were pooled and 10 μ l were equivalent to 80.73 units. A group of 11 white rats was used (*R. norvegicus*), males, of 350 g of weight approximately, of the Sprague-Dawley strain. The auricle was placed in a bath for isolated organs which contained 10 ml of Tyrode solution, bubbled with 100% O₂. Accumulative doses of NDH were added to the bath from 30 u to 7500 u, which decreased the force of contraction and frequency of the auricle. A sigmoid dose-effect curve was obtained with a D50 of 100 u of NDH, approximately. Ouabain 10⁻⁵ M blocked the NDH effect. The difference between the means of NDH activity with and without ouabain 10⁻⁵ M was statistically significant ($p < 0,05$ or $p < 0,001$) for NDH doses of 100 u or higher. This is a pharmacological evidence that NDH stimulated an electrogenic Na⁺ pump in the auricle.

KEY WORDS: Neurodepressing hormone, isolated auricle,

INTRODUCCIÓN

La hormona neurodepresora (HND) es un péptido que ha sido aislado y purificado de la glándula sinusal de los crustáceos (Aréchiga et al 1977). Esta hormona disminuye o elimina por completo la actividad del tensoreceptor y las motoneuronas de los ganglios abdominales del acocil (*Procambarus clarkii*) porque estimula una bomba de Na⁺ electrogénica (Aréchiga et al 1979a) y su acción puede ser bloqueada por digitálicos cardíacos (Aguilar 1982). Existe reactividad cruzada para esta hormona entre diferentes especies de crustáceos (Aréchiga et al 1979b) y como una extensión de esos estudios comparativos, esta investigación está dirigida a evidenciar si la HND puede o no disminuir la actividad espontánea de la aurícula de un mamífero, como *R. norvegicus* que en la escala evolutiva, se encuentra muy separado de los crustáceos. Esta hipó-

tesis se fundamenta en que varios de estos péptidos neuroactivos y otros neurotransmisores se conservan en especies que se encuentran en diferentes Phyla de la escala zoológica (Kandell *et al* 1991).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales de experimentación.

Se utilizaron camarones de agua dulce de la familia Hippolytidae provenientes del río Orinoco en la vecindad de Ciudad Bolívar.

Se usó un lote de 11 ratas blancas (*R. norvegicus*) de 350 g de peso aproximadamente, machos, de la cepa Sprague-Dawley.

Soluciones usadas.

Para los bioensayos de la HND en el tensoreceptor de crustáceos se usó la solución de van Harreveld(1936). Se utilizó solución de Tyrode para mamíferos, en el baño que contenía la aurícula. Todos los reactivos fueron de la casa Sigma, grado analítico.

Obtención de la HND.

La purificación de la HND se realizó pasando sucesivamente el extracto crudo de 2000 tallos oculares a través de columnas de Sephadex G-25 y G-15. La técnica usada fue descrita originalmente por Huberman *et al* (1979). Las distintas fracciones fueron sometidas a

bioensayos y las que resultaron positivas a la actividad hormonal se juntaron en un frasco y se almacenaron a -4°C hasta el momento de ser usadas.

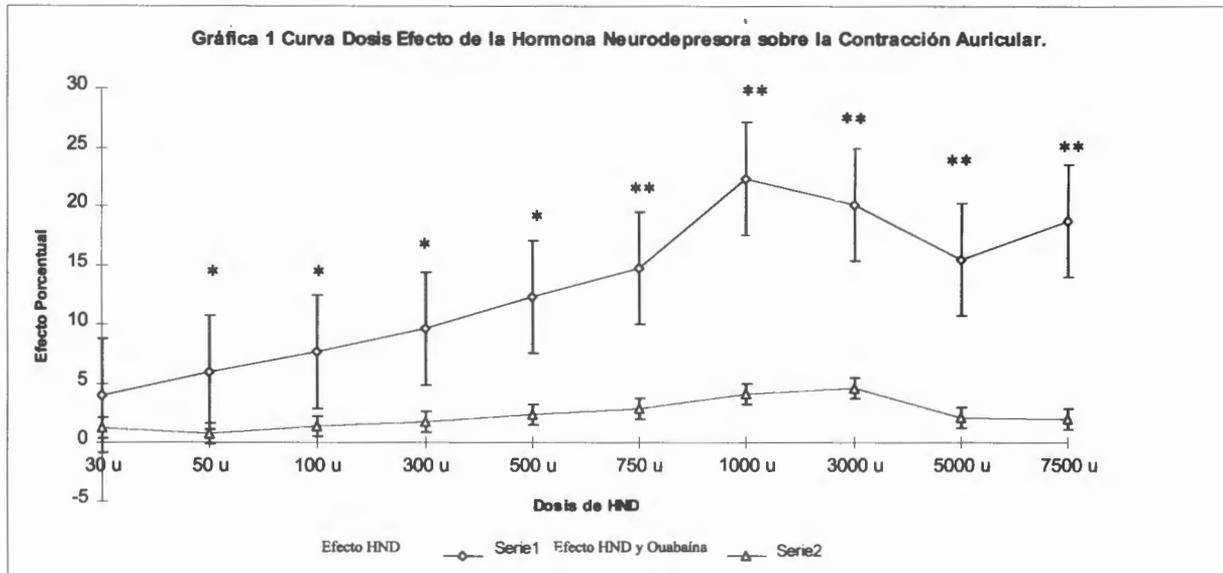
El bioensayo de la hormona se realizó en el tensoreceptor de los crustáceos, agregando 10 µl de la muestra en la inmediata vecindad del tensoreceptor. La unidad(u) de actividad de HND se define como la disminución de 1% de la frecuencia de los potenciales de acción del tensoreceptor. Mayores detalles sobre la técnica de bioensayo pueden consultarse en Aguilar (1982).

Preparación de la aurícula aislada.

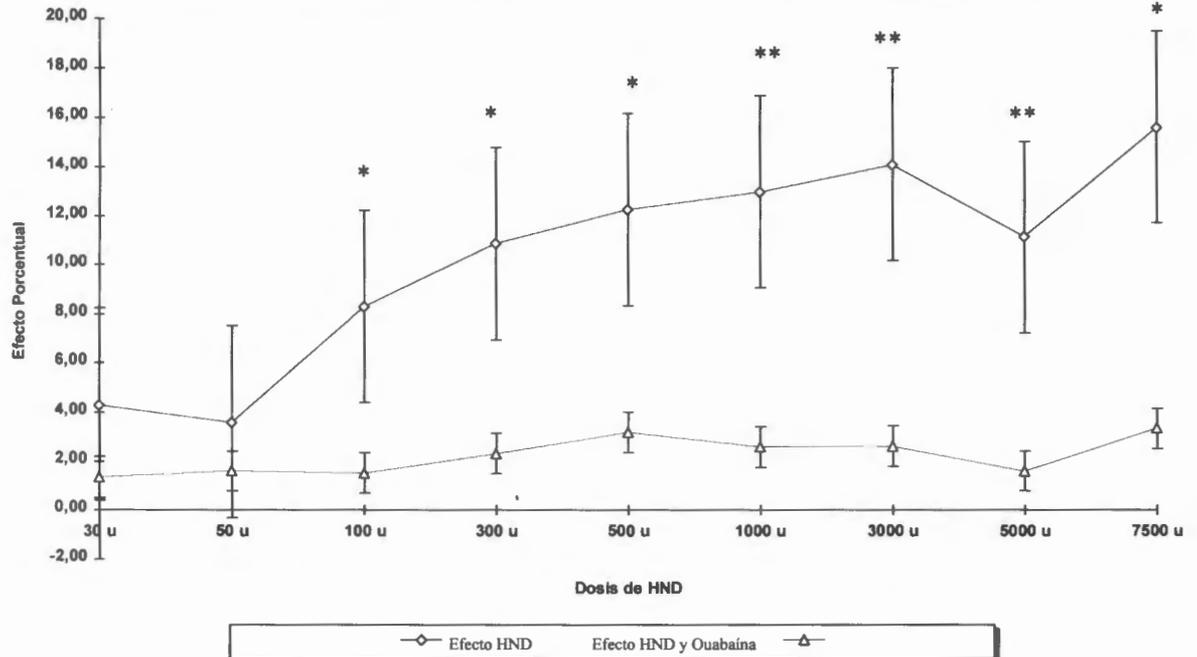
Las ratas (*R. norvegicus*) fueron sacrificadas por un golpe en la región cervical y posteriormente decapitadas y desangradas por completo. Para preparar la aurícula aislada se siguió la técnica descrita previamente por Martínez-Alvino (1995).

Protocolo experimental.

Después de un período de estabilización de 40 minutos se procedió a agregar al baño dosis crecientes y acumulativas de HND, en el margen de dosis comprendido entre 30 u y 7500 u. Los experimentos se realizaron en 11 aurículas. La frecuencia(latidos/min) y la fuerza de contracción (gramos) al inicio del experimento fueron las mediciones control. Los cambios en estos parámetros producidos por la HND se expresaron como variaciones porcentuales y se identifican en las gráficas como "Efecto HND".



Gráfica 2 Curva Dosis Efecto de la Hormona Neurodepresora en la Frecuencia Auricular.



En 5 aurículas de las antes mencionadas, después de agregar la dosis más alta de HND se procedió a lavar el baño por 5 veces y se permitió que la preparación se estabilizara de nuevo durante un periodo de 40 minutos. En seguida se agregó al baño ouabaína en cantidad suficiente para alcanzar la concentración de 10^{-5} M. Posteriormente se repitió la curva dosis- respuesta para la HND en el margen de dosis comprendido entre 30 u y 7500 u. Estos datos se identifican en las gráficas como "Efecto HND y ouabaína".

Análisis estadístico de los datos.

Para cada dosis y para cada parámetro fisiológico (fuerza de contracción y frecuencia) se calcularon el promedio (\bar{X}) y el error estándar del promedio (SEM). Para determinar si la diferencia entre los promedios de las series "Efecto HND" y "Efecto HND y ouabaína" eran estadísticamente significativas se aplicó la prueba t de Student. Se escogieron como niveles de significancia una probabilidad $p < 0,05$ (significativo) y $p < 0,001$ (muy significativo), que en las gráficas se señalan con los símbolos * y ** respectivamente. Para efectuar estos análisis se consultaron los textos de Daniel (1979) y Moroney (1951).

RESULTADOS

Variaciones espontáneas en la fuerza de contracción y la frecuencia de la aurícula aislada de *R. norvegicus*.

Para un total de 35 observaciones el $\bar{X} \pm$ SEM de la fuerza de contracción fue de $0,642 \pm 0,03$ g y de $123,14 \pm 3,08$ latidos/min para la frecuencia. Luego se calculó para cada experimento la variación porcentual entre cada observación y el promedio de dicho experimento. El promedio \pm ESM de estos valores porcentuales fue de $0,07 \pm 1,33$ ($n = 35$) para la fuerza de contracción y de $0,06 \pm 2,08$ ($n = 35$) para la frecuencia.

Curva dosis-efecto de la HND sobre la fuerza de contracción de la aurícula aislada de *R. norvegicus*.

Los datos referentes a esta curva se muestran en la gráfica 1 y puede observarse que a medida que se incrementó la dosis de HND, desde 30 u hasta 7500 u hubo una disminución gradual y progresiva en la fuerza de contracción de la aurícula. Los cambios se expresan como el $\bar{X} \pm$ ESM de la variación porcentual con respecto al control. La curva que se obtuvo es de tipo sigmoideo.

Cuando la curva dosis-respuesta se efectuó en presencia de ouabaína 10^{-5} M las disminuciones en la fuerza de contracción fueron notablemente inferiores que las obtenidas con HND únicamente. Para una misma dosis de HND, la diferencia entre ambos promedios fue estadísticamente significativa para las dosis desde 50 u hasta 7500 u.

Curva dosis-efecto de la HND sobre la frecuencia de la aurícula aislada de *R. norvegicus*.

Los datos mostrados en la gráfica 2 indican que al aumentar la dosis de HND en el margen de dosis de 30 u hasta 7500 u, se produjo una disminución progresiva en la frecuencia auricular, siendo expresados estos cambios como el $\bar{X} \pm$ ESM de la variación porcentual con respecto al control. Esta curva gradual puede ser descrita como sigmoidea.

Cuando la curva dosis-respuesta se realizó en presencia de ouabaína 10^{-5} M se observó que los cambios en la frecuencia auricular fueron de menor magnitud que los obtenidos con HND solamente. Para una misma dosis de HND la diferencia entre ambos promedios fue estadísticamente significativa para las dosis comprendidas entre 100 u y 7500 u.

DISCUSIÓN

Se ha evidenciado que la HND produjo una disminución de la fuerza de contracción y de la frecuencia de la aurícula, en el orden de un 15% a 20%, para las dosis más altas de HND, las cuales fueron de mayor magnitud que las variaciones espontáneas en los parámetros fisiológicos que se analizan en el presente trabajo.

Es de hacer notar que en el tensoreceptor una dosis igual o mayor que 100 u detiene totalmente la actividad durante un período de 5 ó más minutos. En comparación con ésto, la respuesta de la aurícula con dosis de 5000 u o más es modesta. Esto sugiere que la sensibilidad de la preparación auricular es menor porque el número de receptores o la afinidad del receptor por la hormona podría ser menor en la aurícula que en el tensoreceptor de los crustáceos. Otra diferencia es que el tensoreceptor es una célula que por microdissección ha quedado expuesta directamente al líquido extracelular. En cambio, la aurícula está recubierta por endocardio y pericardio, lo cual podría limitar el acceso de la HND a las células auriculares. Por otro lado, la masa de tejido auricular es mayor, o bien los receptores podrían haberse expresado de manera diferente en la membrana de la célula auricular.

En la aurícula, al igual que en el tensoreceptor, la ouabaína fue capaz de inhibir la acción de la HND y ésto es una evidencia farmacológica de que su mecanismo de acción es el de estimular a una bomba de Na^+ electrogénica. Un bloqueo semejante se ha reportado

(Aguilar et al. 1992) en la piel del sapo en la corriente de cortocircuito usando la cámara de Ussing; en este caso dicha corriente depende directamente de la actividad de una bomba de Na^+ electrogénica.

Se ha reportado que la inyección intracerebroventricular de HND en el gato, en dosis que variaron entre 300 u y 1750 u, produjo cambios en el comportamiento descritos como somnolencia, que se acompañaron de cambios electroencefalográficos similares a los observados durante períodos espontáneos de somnolencia (Martínez-Gómez et al 1989). Los péptidos neuroactivos pueden tener un papel en la integración de respuestas complejas de los organismos y se ha sugerido (Aréchiga et al. 1985) que la HND es una neurohormona que en los crustáceos controla las variaciones circadianas en la actividad motora y en la respuesta a estímulos sensoriales. Existen otros ejemplos en invertebrados en los que patrones complejos de comportamiento son desencadenados por péptidos (Kravitz 1988; Scheller et al 1984; Truman 1980).

Hasta el presente se ha documentado solamente un péptido con actividad neurodepresora en el tallo ocular de los crustáceos; pero se ha advertido (Martínez-Gómez et al. 1989) que no es posible descartar por completo que otros péptidos de bajo peso molecular que han sido identificados en el tallo ocular como encefalinas, somatostatina, sustancia P y vasopresina (Fingerman et al. 1983; Jaros et al. 1985; Leung et al. 1987; Mancillas et al. 1981) pudieran estar presentes en la misma fracción, aún cuando se use la técnica de cromatografía líquida de alta presión.

Se han aportado evidencias (Martínez-Gómez et al. 1989) de que la HND actuaba a nivel del sistema nervioso central y podía modificar el comportamiento en el gato. Por otra parte, los presentes experimentos muestran que la HND actuaba a nivel periférico, modificando la actividad de la aurícula.

CONCLUSIONES

1. La HND produjo una disminución en la frecuencia y la fuerza de contracción en la aurícula aislada de *R. norvegicus*.
2. El efecto de la HND sobre la aurícula aislada fue bloqueado por ouabaína 10^{-5} M, lo cual es una evidencia farmacológica de que el mecanismo de acción de la HND es el de estimular una bomba de Na^+ electrogénica.

AGRADECIMIENTO

A las Dras. Quiroga, M y Martínez, M, y al Dr. Rosas F. por las sugerencias y críticas durante la redacción de este trabajo; al TSU Machado, J. por su colaboración durante el procesamiento de los datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AGUILAR, C.E. 1982. Estudio experimental sobre la actividad de la hormona neurodepresora en el sistema nervioso de crustáceos. Trabajo de Ascenso. UDO, Ciudad Bolívar, pp175. Multigrafiado.
- AGUILAR, C.E., DE SOUSA, L. y BARRETO, V. 1992. Efecto de la hormona neurodepresora (HND) sobre la corriente de cor tocircuito en la piel del sapo. Bol. VIII Jorn. Cient. Tecn. Educat. Guayana. 1: 60.
- ARÉCHIGA, H., CABRERA, P. D. y HUBERMAN, A. 1979 a. Functional characterization of neurodepressing hormone in the crayfish. *J. Neurobiol.* 10: 409-422.
- ARÉCHIGA, H., CORTÉS, J. L., GARCÍA, U. y RODRÍGUEZ-SOSA, L. 1985. Neuroendocrine correlates of circadian rhythmicity in crustaceans. *Am. Zool.* 25: 265-274.
- ARÉCHIGA, H., HUBERMAN, A. y MARTÍNEZ-P, A. 1977. Release of a neurodepressing hormone from the crustacean sinus gland. *Brain Res.* 128: 93-108.
- ARÉCHIGA, H., WILLIAMS, J. A., PULLIN, R. S.V. y NAYLOR, E. 1979 b. Cross-sensitivity to neurodepressing hormone and its effects on locomotor rhythmicity in two different groups of crustaceans. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 350-357.
- DANIEL, W. W. 1979. Bioestadística, Editorial Limusa, S.A., México, D.F., pp. 414.
- FINGERMAN, M., HANUMANTE, M. y VACCA, L. 1983. Enkephalin- like and substance P- like immunoreactivity in the eyestalk neuroendocrine complex of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9: 439.
- HUBERMAN, A., ARÉCHIGA, H., CIMET, A., DE LA ROSA, J. y ARAMBURO, C. 1979. Isolation and purification of a neurodepressing hormone from the eyestalks of *Procambarus bouvieri*(Ortman). *Eur. J. Biochem.* 99: 203-208.
- JAROS, P. P., DIRCKSEN, H. y KELLER, R. 1985. Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* 24: 111-117.
- KANDELL, E.R., SCHWARTZ, J. H. y JESSELL, T.M. Principles of neural sciences. Elsevier. New York. pp 120-270.
- KRAVITZ, E. A. 1988. Hormonal control of behavior: Amines and the biasing of behavioral output in lobsters. *Science.* 241: 1775- 1781.
- LEUNG, M.K., KESSLER, H., WHITEFIELD, K., MURRAY, M., MARTÍNEZ, E. A. y STEFANO, G.B. 1987. The presence of enkephalin- like substances in the eyestalk and brain of land crab, *Geocarcinus lateralis*. *Cell Mol. Neurobiol.* 7: 91-96.
- MANCILLAS, J. R., MCGINTY, J. F., SELVERSTONE, A. I., KARTEN, H. y BLOOM, F. E. 1981. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurons of lobsters. *Nature.* 293: 576-578.
- MARTÍNEZ-ALVINO, M. R. 1995. Vigencia de la etnofarmacología. Un modelo de validación científica. Trabajo de Ascenso. UDO, Ciudad Bolívar. pp 52-65. Multigrafiado.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, M., PACHECO, P. y ARÉCHIGA H. 1989. Behavioral and electrophysiological effects of crustacean neurohormone on freely moving cats. *Physiol. Behav.* 46: 983-992.
- MORONEY, M. J. Facts from figures. Penguin Books Ltd., Harmondworth, England. 1951. pp463.
- SHELLER, R. H., KALDANY, R. R., KREINER, T., MAHON, A.C., NAMBU, J. R. SCHAEFER, M. y TAUSSIG, R. 1984. Neuropeptides: Mediators of behavior in *Aplysia*. *Science.* 225: 1300- 1308.
- TRUMAN, J. W. Organization and hormonal release of stereotyped motor programs from the CNS of an insect. En: Valverde-Rodríguez, C. y Aréchiga, H., eds. Comparative aspects of neuroendocrine control of behavior. Basel, 1980. pp1-13.
- VAN HARREVELD, A. 1936. A physiological solution for fresh water crustaceans. *Proc.*