

Efecto de agentes específicos para grupos sulfhidrilos y enlaces disulfuro sobre la respuesta a GABA* en *Ascaris*

AURA MARIELA PANTOJA P.¹

La preparación neuromuscular de *Ascaris suum* se escogió para estudiar la influencia de agentes específicos para grupos sulfhidrilo y enlaces disulfuro sobre la respuesta a GABA, empleando el método de corte transversal *in vitro* de *Ascaris suum* y midiéndose el cambio en la tasa de relajación inducida por GABA, después de la incubación de la preparación con estos agentes.

Los agentes formadores de mercapturos (HgCl₂ y PCMBs) disminuyen significativamente la tasa de relajación inducida por GABA siendo este efecto parcialmente revertido por el agente reductor (2ME). El alquilante (NEM), bloquea la respuesta a GABA en esta preparación. El reductor (DTT), y el reoxidante (DINB) no tuvieron efecto estadísticamente significativo lo cual sugiere que probablemente el enlace disuelto no es un elemento determinante en la respuesta a GABA en el músculo de *Ascaris*.

Introducción

Los reactivos específicos para grupos sulfhidrilo y enlaces disulfuro son compuestos que modifican los grupos SH y S-S de las proteínas alterando procesos enzimáticos, metabólicos y funcionales (1); estos agentes han sido empleados para el estudio de diferentes tipos de proteínas especialmente las de receptores para neurotransmisores, tales como la del receptor colinérgico nicotínico y muscarínico, en donde la respuesta al neurotrans-

misor es afectada por estos compuestos. Es de esperar, por lo tanto, que los receptores para GABA al igual que el colinérgico también sea afectado y por lo tanto su respuesta alterada por estos mismos agentes.

Se escogió la preparación neuromuscular de *Ascaris* porque ésta puede servir como modelo de una célula ganglionar con la misma complejidad fisiológica y farmacológica, pero con mayores ventajas para hacer ensayos farmacológicos por su fácil consecución, manipulación, tamaño adecuado y morfología simple. En este trabajo se ha querido, como primera aproximación, comprobar si estos agentes influyen sobre la respuesta a GABA en *Ascaris*, lo cual nos permite complementar los estudios tendientes a ampliar los conocimientos acerca de esta preparación neuromuscular.

Recibido 10 de julio, Aceptado 27 de julio, 1986

* Ácido gamma-aminobutírico

1. Bióloga. M.Sc. Farmacología. Departamento de Ciencias Fisiológicas Universidad del Valle, Cali, Colombia.

© Universidad del Norte

Materiales y Métodos

Material biológico: *Ascaris suum*

Solución salina *Ascaris* con la siguiente composición (mM): NaCl 135, KCl 4, CaCl₂H₂O 3, MgCl₂.6H₂O 16, Glucosa 10, Tris 2, pH 7.4. Esta solución es semejante al agua de mar diluída al 30% , la cual es a su vez similar al líquido perientérico del *Ascaris* (2).

Reactivos: se emplearon los agentes formadores de mercapturos, cloruro de mercurio (HgCl₂) y ácido p-cloro mercurio benceno sulfónico (pCMBS). El alquilante N-etilmaleimida (NEM); los reductores DL-ditiotreitol (DIT) y 2 mercaptoetanol (2ME); el reoxidante ácido 5,5 ditiobis-(2-Nitrobenzoico) (DTNB), todos de la casa SIGMA y el neurotransmisor ácido gamma-amino-butírico (GABA) de Man Research Laboratories.

Estos reactivos fueron preparados en la solución salina *Ascaris* y el pH se ajustó a 7.4.

Se empleó el método de corte transversal *in vitro* de *Ascaris suum* descrito por Olaciregui (3). La preparación se dejó estabilizar por 20 minutos, después de lo cual se procedió a añadir los reactivos; en todos los experimentos la primera respuesta a GABA se tomó control y luego, se observó su modificación después de incubar la preparación con los reactivos. La duración de cada serie experimental osciló entre 2 y 3 horas.

Resultados

Los datos obtenidos se agruparon de acuerdo con cada secuencia experimental. Se midió la tasa de relajación como respuesta a GABA y se expresó en mili-Newtons segundo (mN/s); las gráficas se elaboraron con base en el promedio y el error estándar de la media. Para las pruebas de significancia se empleó el "test de Student para muestras pareadas", debido a la gran variabilidad que presenta esta preparación, se consideró significantes las diferencias entre los tratamientos cuando el valor de p fue igual o menor que 0.05.

Influencia de pCMBS y 2ME

Los compuestos mercuriales orgánicos han sido usados en investigación para demostrar la presencia de grupos SH de proteínas, al igual que los mercuriales inorgánicos, ya que tienen alta afinidad por los grupos SH.

A una concentración de 0.25 mM el pCMBS produce una leve contracción de la musculatura de *Ascaris*, a concentraciones menores no produce ningún efecto; la tasa de relajación inducida por GABA disminuye significativamente después del pretratamiento con este mercurial orgánico como puede observarse en la figura 1.

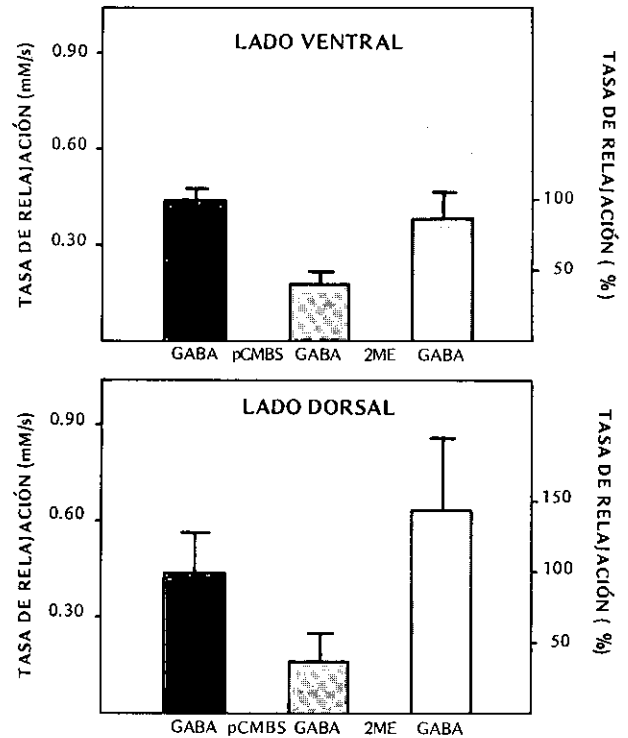


Figura 1. Influencia de pCMBS (0,25 mM) y 2 ME (5mM) sobre la tasa de relajación como respuesta a GABA (0,1mM) en tiras de *Ascaris suum*. Las barras representan el promedio ± SE para n=10. pH de las soluciones: 7.4

El 2ME, agente reductor que forma SH libres, se usó después del pretratamiento del músculo de *Ascaris* con pCMBS ya que teóricamente este compuesto debe reducir nuevamente los grupos SH que hubieran reaccionado con el pCMBS dejándolos en su forma libre.

La incubación de la preparación con 2ME 5mM aumentó la tasa de relajación inducida por GABA que había sido reducida por pCMBS, figura 1.

Influencia de HgCl₂ y 2ME

El HgCl₂ es el mercurial más comúnmente usado para detectar grupos SH. En esta preparación

reduce significativamente la tasa de relajación inducida por GABA; sin embargo, la exposición subsiguiente a 5mM de 2ME no revirtió significativamente este efecto, figura 2.

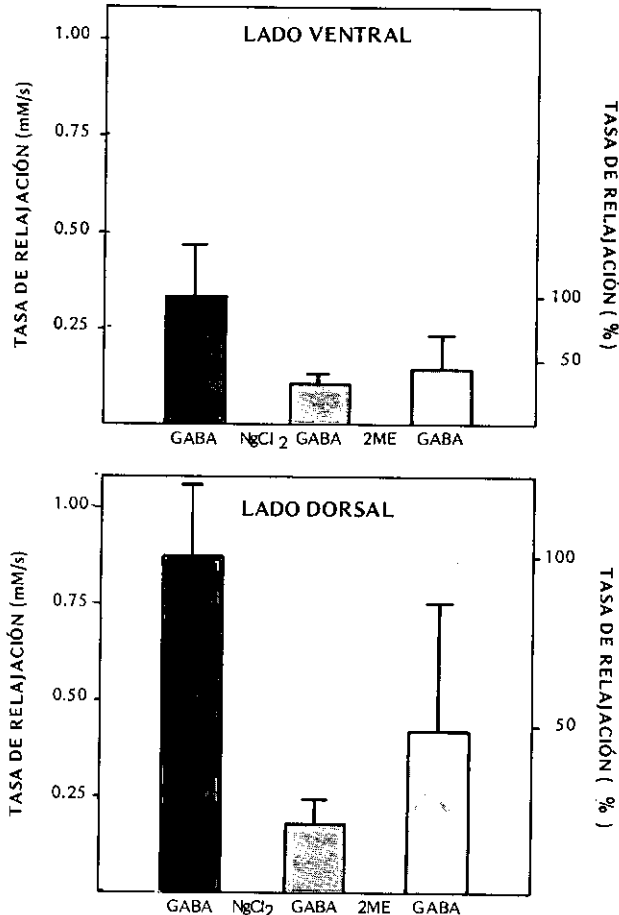


Figura 2. Influencia de HgCl₂ (0.1 mM) y 2ME (5 mM) sobre la tasa de relajación como respuesta a GABA (0.1 mM) en tiras de *Ascaris suum*. Las tiras representan el promedio \pm SE para n = 7. pH de las soluciones: 7.4

Influencia de NEM

El NEM es un agente alquilante, posee un doble enlace reactivo y reacciona selectivamente con los grupos SH de proteínas con los cuales forma enlaces covalentes estables.

Después del pretratamiento de la preparación con NEM 10 mM la respuesta a GABA se bloquea completamente.

Influencia de DTT y DTNB

El DTT es un compuesto reductor de enlaces disulfuro, a una concentración de 1mM no produce ningún cambio significativo en la respuesta inicial. El DTNB, agente oxidante, induce la formación de enlaces disulfuro mixtos al reaccionar con los grupos SH libres.

Este compuesto ha ido empleando con el fin de reoxidar los grupos SH que se forman por efecto del DTT y restablecer así la respuesta afectada por el reductor. Al hacer el análisis estadístico este agente no tuvo efecto significativo sobre la respuesta a GABA, figura 3.

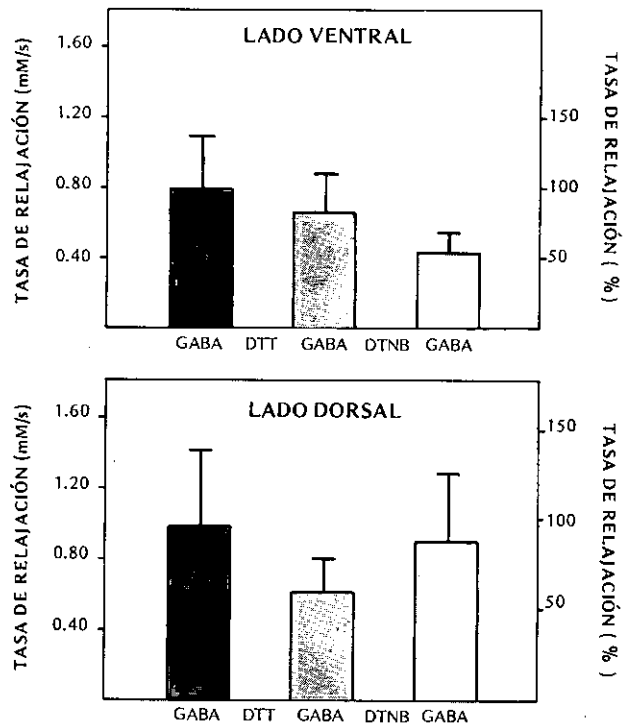


Figura 3. Influencia de DTT (1 mM) y DTNB (0.25 mM) sobre la tasa de relajación como respuesta a GABA (0,1 mM) en tiras de *Ascaris suum*. Las barras representan el promedio \pm SE para n=12 pH de las soluciones: 7.4

Discusión

Entre los compuestos que reaccionan con los grupos SH están los mercuriales tanto orgánicos como inorgánicos, los cuales forman mercapturos y agentes alquilantes como el NEM. El HgCl₂ tiene acción despolarizante en membrana de placa

terminal (4 y 5). El mercurial orgánico pCMBS causa despolarización y aumento en el flujo de Ca^{+2} (6), bloquea la corriente de Na^{+} (7) y disminuye la sensibilidad de la membrana a carbamilcolina en neuronas (8).

Muchos trabajos sobre enzimas y proteínas dan evidencia de que los grupos SH son el sitio primario de enlace de los mercuriales y a menudo el único sitio bajo ciertas condiciones. Es razonable suponer que los resultados de los presentes experimentos en la preparación neuromuscular de *Ascaris* son probablemente atribuibles a la reacción de estos compuestos con grupos SH libres localizados en el sitio de unión con GABA, lo cual altera de alguna manera la tasa de relajación inducida GABA-érgicamente, aunque la naturaleza precisa de esta alteración y la localización exacta de los grupos SH atacados no fue posible determinarlos bajo las condiciones experimentales presentes.

El 2ME aumentó la tasa de relajación inducida por GABA, la cual había sido previamente disminuída por el pCMBS siendo su efecto más leve después de tratar la preparación con HgCl_2 , esto podría indicar que los cambios inducidos por el pCMBS, cualquiera que sea su naturaleza son reversibles, mientras que la acción del HgCl_2 sea probablemente irreversible.

El NEM posee un doble enlace reactivo con el cual reaccionan los grupos SH gracias a un mecanismo de alquilación de manera irreversible, tiene gran selectividad por estos grupos y pasa fácilmente a través de membranas celulares (1 y 9). Los efectos farmacológicos del NEM demuestran que bloquea la conducción axonal (1 y 10).

Aunque el mecanismo por el cual el NEM bloquea la respuesta a GABA, en esta preparación es difícil determinarlos bajo estas condiciones, es posible, sin embargo, suponer con cierta probabilidad que su acción se debe al bloqueo irreversible de grupos SH.

Los enlaces S-S pueden modificarse por la reacción con agentes reductores como el DTT, que rompe los enlaces S-S para formar grupos SH manteniéndolos en su estado reducido (1). La importancia de la integridad del enlace disulfuro en la activación del receptor colinérgico está bien establecida. En preparaciones diferentes de *Ascaris*

el DTT disminuye marcadamente la respuesta inducida colinérgicamente, siendo recuperada por reoxidación subsiguiente con DTNB el cual presumiblemente restaura el enlace disulfuro original (11).

En este trabajo los resultados obtenidos muestran que el DTT no redujo significativamente la tasa de relajación inducida GABA-enérgicamente.

Estos hallazgos coinciden con los trabajos previos de Benhaim y col. en 1973 y Sato y col. en 1976. Estos autores han sugerido que si el receptor para GABA es una proteína integral de la membrana postsináptica es muy posible que también contenga enlaces disulfuro reactivos, los cuales sin embargo, o no son accesibles a los reactivos o no están involucrados en el sitio de interacción entre el receptor y el transmisor. Así, un disulfuro reactivo sería un elemento importante y exclusivo de los receptores colinérgicos.

En general, podemos concluir, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, que en la preparación neuromuscular de *Ascaris* aparentemente los grupos SH son importantes e influyen de alguna manera en la respuesta a GABA, mientras que los enlaces disulfuro no están involucrados directamente, aunque podrían estar presentes en el sitio de unión de este neurotransmisor con la membrana. Sería necesario hacer estudios adicionales con métodos más específicos para llegar a una conclusión definitiva acerca del efecto de estos agentes sobre la respuesta a GABA en músculo de *Ascaris*.

Referencias

1. WEBB, J.L. Enzyme and Metabolic Inhibitors: Academic Press Inc. 2, 1966.
2. DEL CASTILLO, J. and MORALES, T. Electrophysiological Experiments in *Ascaris lumbricoides* In: Physiology and Biochemistry. Academic Press Inc., 1969.
3. OLACIREGUI, N. El papel de la neurotransmisión relacionada con la función de los músculos de *Ascaris*. Salud Uninorte 1(1): 7-12, 1984.
4. GUY, H. and CONNOR, J. Effects of the electrophoretic application of sulfhydryl reagents to the end-plate receptors. Intern. J. Neuroscience, 1: 199-209, 1976.

UNIVERSIDAD DEL NORTE
BIBLIOTECA

5. DEL CASTILLO, J., BARTELS, E. and SOBRINO, J.A. Microelectrophoretic application of cholinergic compounds, protein oxidizing agents and mercurials to the chemically excitable membrane of the electroplax. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69(8): 2081-2085, 1972.
6. KIRSTEN, E. B. and KUPERMAN, A.S. Effects of sulfhydryl inhibitors on frog sartorius muscle: P-chloromercuribenzoic acid. *Br. J. Pharmacol.* 40: 814-826, 1970.
7. SHRAGER, P. Slow sodium inactivation in nerve after exposure to sulfhydryl blocking reagents. *The Journal of General Physiology*, 60: 183-202, 1977.
8. DEL CASTILLO, J. et al. Effect p-chloromercuribenzenesulfonic acid on acetylcholine induced responses of molluscan neurons. *The J. of Pharmacology and Experimental Therapy* 198(1): 146-154.
9. KIRSTEN, E.B. and KUPERMAN, A.S. Effects of sulfhydryl inhibitors on frog muscle: N-ethylmaleimide. *Br. J. Pharmac.* 40: 827-835.
10. SASAKI, K. RKER, W.K. and MATSUMOTO, M.N. Ethylmaleimide effects on synaptic transmission in frog sympathetic ganglion. *The Pharmac. and Experimental Therapeutics*, 225(3): 564-569, 1983.
11. EARLIN, A. and BARTELS, L. Effects of blocking sulfhydryl groups and of reducing disulfide bonds on the acetylcholine-activated permeability system of the electroplex. *Biochim. et Biophys. Acta*, 126: 535-545, 1966.