

El papel de la neurotransmisión relacionada con la función de los músculos somáticos de *Ascaris*¹

NANCY OLACIREGUI²

Se usó la preparación de la musculatura somática de *Ascaris* para medir isométricamente la fuerza de contracción.

Con los fármacos utilizados en este trabajo no se ha observado diferencias cualitativas entre los lados dorsal y ventral; aparentemente ambos lados tienen receptores nicotínicos, muscarínicos, dopamínicos y gabaérgicos postganglionares.

El receptor colinérgico principal es de tipo nicotínico que tiene propiedades farmacológicas similares a las que se encuentran en ganglios.

La acetilcolina y el ácido gamma-aminobutírico tienen la misma potencia y, dadas las curvas dosis-respuestas, parecen ser los neurotransmisores principales.

El ácido gamma-aminobutírico causa relajación dependiendo de la concentración. La dopamina causa relajación muscular pequeña, transitoria y reproducible.

Dentro de los límites de este trabajo se ha demostrado que la neurotransmisión es parecida a la de un ganglio simpático y podría ser interesante usar esta preparación para estudiar la acción de los neurofármacos de acción central sobre los receptores identificados en este trabajo.

Introducción

Ascaris lumbricoides es un parásito de distribución mundial, pero es más frecuente en los países de clima tropical. Se ha desarrollado fármacos muy efectivos y de baja toxicidad contra este nemátodo; estos fármacos fueron encontrados con base empírica y luego estudiados a nivel celular. Se encontró que la mayoría de ellos paralizan los músculos de *Ascaris*. Por lo tanto parece importante estudiar farmacológicamente la neurotransmisión en este nemátodo para encontrar posiblemente nuevos fármacos.

Ascaris lumbricoides variedad Suum, del cerdo, es casi idéntico al del hombre y es fácil de conseguir y estudiar. Sus músculos son únicos en la naturaleza y la Figura 1, muestra su morfología.

Las células musculares de *Ascaris* están compuestas de tres partes:

1. Un eje de fibras oblicuas estriadas de los elementos contráctiles.
2. La bolsa nuclear o "Belly" de forma redonda de 600 μ de diámetro que contiene el núcleo y otros orgánulos citoplasmáticos.
3. De esta bolsa se extiende un brazo hasta el cordón nervioso, donde hacen contacto con los brazos de células adyacentes y terminales nerviosos, formando un sincito, (o sincicio).

Los primeros trabajos realizados con la musculatura de *Ascaris* fueron hechos por Del Castillo y col. (1). Ellos encontraron que el transmisor excitatorio es la acetilcolina (ACh) y el inhibitorio es el ácido gamma-aminobutírico (GABA)

Recibido 30 de Agosto, 1983. Aceptado 29 de Noviembre, 1983

1. Parte del trabajo de tesis para optar al título de Magister en Farmacología de la Universidad del Valle.

2. M.S. Profesora del Departamento de Ciencias Básicas Médicas. División Ciencias de la Salud. Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia.

© Universidad del Norte.

y concluyeron con base en experimentos electrofisiológicos que la neurotransmisión en *Ascaris* es muy parecida a la de un ganglio simpático.

A la misma conclusión llegaron Natoff (2) y Rohzkova (3) midiendo la fuerza de contracción muscular, empleando diferentes fármacos. Estos autores ya mencionados no encontraron efectos significativos de fármacos muscarínicos y catecolamínicos. Si la neurotransmisión en los músculos de *Ascaris* es parecida a la de un ganglio simpático, se esperarían efectos de esta clase de fármacos. Sin embargo, Bartels (4) y Meneses (5) han encontrado efectos muscarínicos y catecolamínicos con métodos electrofisiológicos por lo tanto parece importante ensayar estos fármacos de nuevo sobre la actividad contráctil de los músculos somáticos de *Ascaris* para asegurar si la actividad contráctil y eléctrica son independientes una de la otra en esta preparación.

La musculatura de *Ascaris* tiene una curiosidad morfológica: los ganglios que inervan los

músculos se encuentran únicamente en el cordón nervioso del lado ventral (6), los músculos dorsales son inervados por comisuras que tienen su origen en los ganglios ventrales.

Con la excepción del sistema nervioso el lado dorsal y ventral de la musculatura del *Ascaris* son iguales y se puede separar el lado ventral y el dorsal y estudiarlos independientemente. De esta manera se espera distinguir el efecto de los fármacos sobre receptores pre y post-ganglionares.

Materiales y métodos.

Se utilizaron *Ascaris* Summ obtenidas en el matadero municipal. Los nemátodos se mantienen por un máximo de tres días en el laboratorio en solución fisiológica de 32°C. La Solución fisiológica contiene (Mol/L) NaCl 0.135, KCl 0.0038 CaCl₂ 2H₂O, 0.003, MgCl₂ 6H₂O 0.0157, glucosa 0.01, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.0015, pH 7.2.

Se selecciona una hembra adulta, se corta una sección cilíndrica de 6 cm de largo de la parte anterior incluyendo el poro genital, se coloca en una caja de Petri y bajo el estereomicroscopio se procede a hacer un corte longitudinal siguiendo una de las líneas laterales; el intestino se remueve cuidadosamente quedando al descubierto la superficie del celoma, mostrando las bolsas nucleares; al centro la otra línea lateral, a cada lado los cordones nerviosos y el poro genital del lado ventral. Se separa el lado dorsal del ventral siguiendo la otra línea lateral; se cortan tiras de 3 cm de largo que se sujetan en los extremos con hilos.

Los músculos se suspenden en un baño de órgano aislado con un volumen constante de 25 ml de solución fisiológica a 37°C agitado con nitrógeno a través de todo el experimento. Uno de los hilos se ata al asa fija del fondo del baño de órganos, mientras el otro se ata al conductor de fuerza y desplazamiento (Grass Modelo FT 03) conectado a un polígrafo Grass Modelo 79, el cual registra isométricamente la fuerza de contracción del músculo (Fig. 2).

Se estandariza la tensión inicial del músculo en 2g. y se deja estabilizar la preparación por treinta minutos. Los fármacos se añaden al baño en concentraciones mínimas de forma que la primera concentración no dé respuesta, para buscar el umbral, luego sucesivamente se aumentan las concentraciones hasta observar una respuesta máxima; con cada concentración se espera hasta la producción de una meseta.

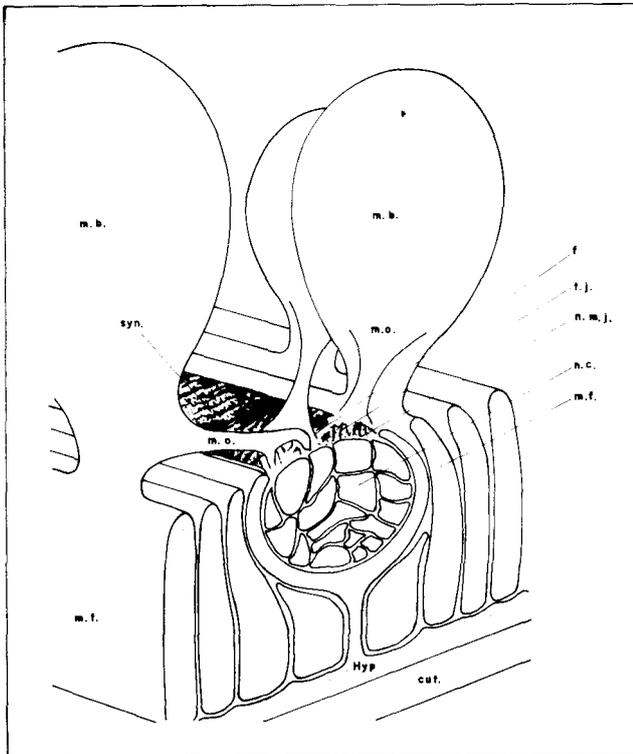


Fig. 1. Diagrama esquemático de la musculatura somática del *Ascaris*, (De: Del Castillo)

m.b. bolsas nucleares, m.f. fibras contráctiles, f. dedos, n.m.j. unión neuromuscular, n.c. cordón nervioso, m.o. brazo muscular, syn. sincitio, cut. cutícula, Hyp. tejido hipodérmico.

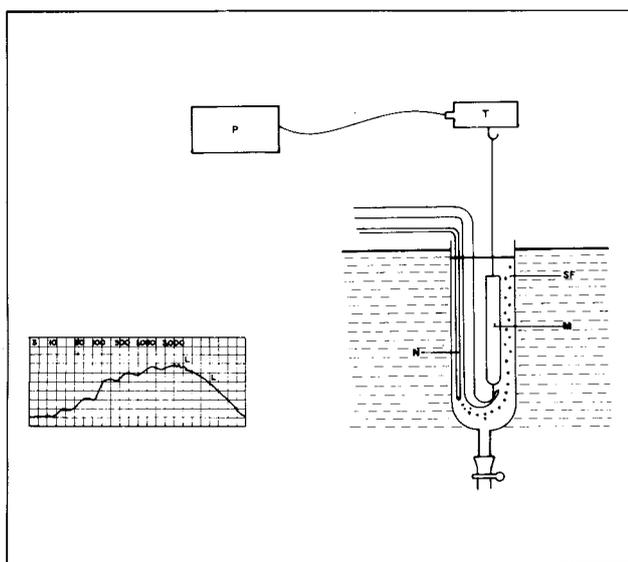


Fig. 2. Montaje experimental.

M. Tira del preparado de *Ascaris*, N. fuente de nitrógeno, SF. solución fisiológica, T. transductor de fuerza, P. polígrafo.

Recuadro: registro experimental de una curva dosis-respuesta. Concentraciones indicadas en $\mu\text{M/L}$. L. lavado.

Todas las drogas fueron preparadas en la solución fisiológica que se ajustó a un pH 7.2.

Resultados

1. Efectos de la acetilcolina sobre la actividad contráctil de los músculos somáticos de *Ascaris*.

La respuesta a la ACh tiene un rango amplio que va desde respuesta nula hasta un máximo de 25g fuerza. En la Fig. 3 se observa que en el lado dorsal la respuesta es mayor en concentraciones bajas y medias que en el lado ventral. La diferencia entre los lados es estadísticamente significativa: $P < 0.05$.

La fuerza de contracción está relacionada directamente con la concentración de ACh: el umbral es de $1\mu\text{M}$ en ambos lados; la respuesta máxima del lado dorsal se obtiene a la concentración de $300\mu\text{M}$ y está de acuerdo con Rozhkova y col. (3). La concentración que es 50% de la respuesta máxima es de $20\mu\text{M}$. La curva del lado dorsal es sigmoidea, en el lado ventral no hay saturación en las concentraciones usadas. Cuando se hacen dos curvas dosis respuesta a la ACh en la misma preparación, generalmente la respuesta a la segunda aplicación es menor que la primera. El efecto de ACh es reversible, después de obtener una má-

xima respuesta, al lavar la preparación se relaja el músculo hasta llegar a la tensión inicial.

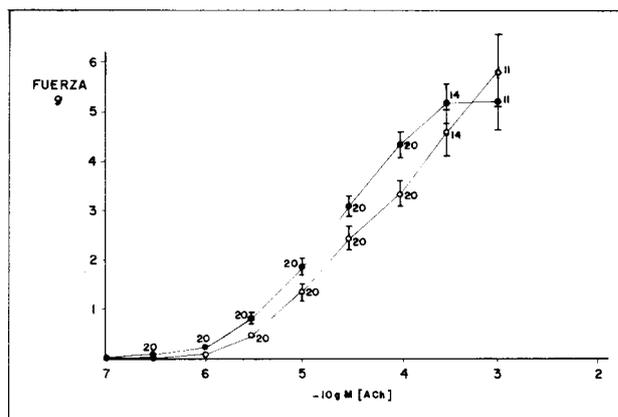


Fig. 3. Curva dosis-respuesta de ACh

● lado dorsal, ○ lado ventral. Los números colocados junto a las curvas corresponden al número de experimentos. Las líneas verticales indican \pm SEM.

2. Caracterización del receptor colinérgico

Ya que la ACh actúa por lo menos sobre tres receptores distintos, se ha ensayado fármacos específicos para investigar si existen más de un tipo de receptor colinérgico en esta preparación. Se usó carbamilcolina que tiene un alto grado de actividad nicotínica. El efecto estimulante es mayor en el lado ventral que en el dorsal. El umbral es semejante al de ACh. Se observó saturación en ambos lados. La concentración que produce el 50% de la respuesta máxima es $30\mu\text{M}$ para ambos lados.

La concentración umbral del fármaco nicotínico tetrametilamonio (TMA) es de $10\mu\text{M}$ y la concentración que produce el 50% del máximo es de $100\mu\text{M}$, hay saturación en ambos lados.

La pralidoxima (2-PAM) es un activador específico del receptor nicotínico ganglionar y no tiene efecto estimulante sobre receptor nicotínico en músculos esqueléticos.

Los efectos en la musculatura de *Ascaris Suum* son pequeños, el umbral es de $30\mu\text{M}$ y la concentración que produce el 50% de la respuesta máxima en ambos lados es $200\mu\text{M}$.

La metacolina y la pilocarpina son específicos para receptores colinérgicos de tipo muscarínico y no tiene efectos estimulantes sobre el receptor nicotínico. La concentración umbral de metacolina es de $10\mu\text{M}$, la concentración que produce el 50% de la respuesta máxima es de $1.000\mu\text{M}$. Si se aumenta la concentración se disminuye la respuesta. El efecto es mayor en el dorsal que en

el ventral y es menos reversible que el de los otros compuestos.

El efecto de la pilocarpina sobre la fuerza de contracción es variado: algunas veces causa relajación y otras estimulación. Ambos efectos son mayores en el lado dorsal que en el ventral.

3. Efectos del GABA

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio y causa relajación muscular. La Fig. 4 muestra una curva dosis-respuesta sigmoidea, el umbral es de $1 \mu\text{M}$, la dosis que produce el 50% del máximo es de $20 \mu\text{M}$ y la respuesta máxima se observa con $30 \mu\text{M}$, estos datos coinciden con Donahue y col (7).

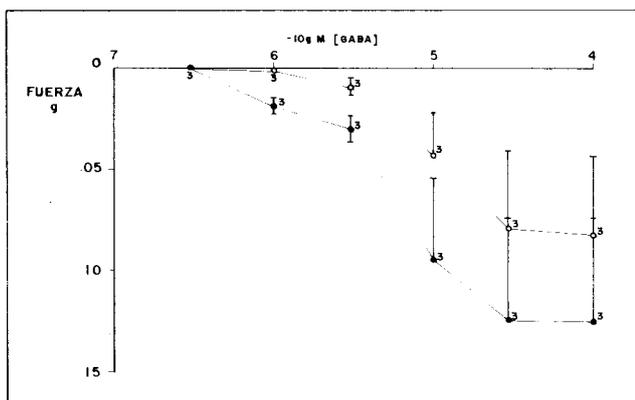


Fig. 4. Curva dosis-respuesta del GABA. ● lado dorsal, ○ lado ventral. Los números colocados sobre las curvas corresponden al número de experimentos. Las líneas verticales indican \pm SEM.

4. Efectos de la dopamina

La dopamina causa mayor relajación tanto en el lado ventral como en el dorsal. El efecto es transitorio y la tensión se recupera espontáneamente dentro de 15 a 20 minutos en presencia de la dopamina, lo cual coincide con los hallazgos de Meneses y col (5) con métodos electrofisiológicos.

Discusión

No se pretende que los resultados obtenidos necesariamente reflejen, a nivel molecular, la afinidad del agonista con el receptor; sin embargo, nos dan información suficiente para caracterizar farmacológicamente los receptores presentes y estimar la afinidad relativa de los fármacos ensayados sobre estos receptores y la interacción entre ellos.

Todos los fármacos ensayados tienen efectos en ambos lados, solamente con ACh hay diferencia

de efecto siendo mayor en el lado dorsal; la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

Con todos los fármacos colinérgicos hay relación directa entre la concentración y el efecto; las curvas muestran saturación que implica la existencia de receptores específicos para estos fármacos.

Sobre el receptor nicotínico el músculo de *Ascaris*, actúan en orden descendente de potencia: ACh, carbamilcolina, TMA y 2-PAM (ver Tabla 1), la ACh y la carbamilcolina no son específicos para el receptor nicotínico ya que también actúan sobre el receptor muscarínico. El TMA es 100 veces menos potente en el músculo esquelético que en el ganglio y el 2-PAM no tiene efectos excitatorios en el músculo esquelético, al contrario, causa ligera inhibición, mientras que en el ganglio causa excitación.

La metacolina agonista específico para receptor muscarínico, tiene aquí un efecto estimulante, pero menor que el de la ACh y actúa sobre ambos lados, lo que implica la existencia de receptores muscarínicos pos-ganglionares.

La pilocarpina también actúa sobre receptores muscarínicos, el efecto es pequeño y causa contracción y relajación; esto podría ser debido a su estructura química, parece que tiene baja afinidad por el receptor y poca eficacia.

Rozhkova y col, han encontrado efectos muscarínicos pero ellos no le dieron importancia por la afinidad relativamente baja, pues esperaban efectos muscarínicos semejantes a los obtenidos sobre músculos lisos intestinales.

Sin embargo, si la neurotransmisión de este nemátodo es parecida a la de un ganglio simpático, el efecto de los agentes muscarínicos es pequeño y sería regulatorio; las concentraciones que tienen efecto sobre la contracción de los preparados de *Ascaris* son comparables a las que actúan en ganglios donde tienen efectos estimulantes e inhibitorios, lo mismo se ha observado en este trabajo con metacolina y pilocarpina.

Se ha confirmado que la naturaleza de los receptores colinérgicos en *Ascaris* son de tipo nicotínico, semejantes farmacológicamente a los de un ganglio y probablemente un receptor muscarínico como han reportado Roshkova (3) y Bartels (4).

Del Castillo (1) ha reportado que GABA causa hiperpolarización de la membrana; en el trabajo se encontró que GABA produce relajación dependiente de la concentración. El umbral es el mismo que el de ACh, la curva dosis respuesta es sigmoi-

TABLA 1. Sensibilidad de los músculos de *Ascaris* a diferentes fármacos. Donde no se da sino un valor, no hay diferencias entre ambos lados, D. dorsal y V. ventral.

FARMACOS	CONCENTRACION (μM)			EFECTO	
	Umbral	DE ₅₀	Máxima	Contracción	Relajación
Nicotínico-Muscarínicos					
— Acetilcolina	1	D 20 V.—	D.300 V.—	+	
— Carbamilcolina	1	30	1.000	+	
Nicotínico					
— Tetrametilamonio	10	100	1.000	+	
— Pralidoxima	30	200	D.1000 V.30.000	+	
Muscarínico					
— Metacolina	10	100	1.000	+	
— Pilocarpina	100	—	—	+	+
Otros					
— Acido Gama-aminobutírico	1	20	30		+
— Dopamina	100	—	—		+

deca, se observa saturación; Koketsu (8) y Connor (9) han reportado que GABA despolariza los terminales presinápticos en el ganglio simpático debido a un aumento en la permeabilidad al ión cloruro. Lo mismo ha encontrado Del Castillo (1) en *Ascaris*, pero GABA, en esta preparación, causa hiperpolarización. Las diferencias en las respuestas de estas preparaciones se explican con las diferencias en los potenciales de reposo que en el ganglio simpático es más alto que el potencial de equilibrio para cloruro y en *Ascaris* está por debajo de este potencial.

Si la neurotransmisión es parecida a la de un ganglio simpático de mamífero como lo han postulado Del Castillo (1) y Natoff (2), la dopamina debe tener un efecto inhibitor en esta preparación. Anteriormente se ha encontrado efectos regulatorios de la dopamina sobre la actividad eléctrica de estos músculos (4, 5) y los resultados presentados aquí están de acuerdo con dichas observaciones.

En la musculatura somática de *Ascaris*, la dopamina no parece ser un neurotransmisor primario, causa relajación transitoria, el efecto es pequeño e independiente de la concentración, lo contrario de lo observado con GABA cuyo efecto es grande y depende directamente de la concentración.

Conclusiones

1. Se ha confirmado que la neurotransmisión en *Ascaris Suum* es parecida a la de un ganglio simpático de mamífero, bajo las condiciones de este trabajo.

2. Se ha encontrado un receptor nicotínico excitatorio, un receptor inhibitorio que responde a GABA, un receptor dopaminérgico y otro muscarínico, que parecen ser regulatorios.

3. No hay diferencias consistentes en el efecto de los fármacos ensayados sobre lado dorsal y el ventral. Parece que sus acciones recaen sobre receptores post-ganglionares.

Referencias

1. DEL CASTILLO, J. and MORALES, T. Electrophysiological experiments in *Ascaris lumbricoides*. Exp. in Physiol. and Biochem. v. 2. London, Academic Press, 1968.
2. NATOFF, I. L. The pharmacology of the cholinceptor in muscle preparations of *Ascaris lumbricoides* Suum. Br. J. Pharmac. 37:257, 1969.
3. ROZHKOVA, E. MALYUTINA, T.A. and SHISHOV, B. Pharmacological characteristic of cholinorecep-

tion in somatic muscles of the nematode *Ascaris*
Summ. Gen. Pharma. 11:141-146, 1980.

4. BARTELS-BERNAL, E., TORRES, C. y HERNANDEZ, L. Efectos de algunos farmacos colinérgicos sobre potenciales de acción y de reposo de los músculos somáticos de *Ascaris*. Memorias XII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas, 1977.
5. MENESES, M. Efectos de las catecolaminas sobre la actividad eléctrica de la musculatura somática de *Ascaris*. Memorias XVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Cúcuta, 1981.
6. STRETTON, A. et al. Structure and physiological activity of the motoneurons of the nematode *Ascaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:3493-3497, 1978.
7. DONAHUE, M.J., YACOUB, N.J. and HARRIS, B. G. Correlation of muscle activity with glycogen metabolism in muscle of *Ascaris* Summ. Am. J. Physiol. 242:514-521, 1982.
8. KOKETSU, K., SHOJI, T. and YAMAMOTO, K. Effects of GABA on presynaptic nerve terminals in Bullfrog (*Rana catesbeiana*) sympathetic ganglia. Experientia. 30:382-383, 1973.
9. COONNOR, J. et al. The effects of piperazine on rat sympathetic neurones. Experientia. 74:445-454, 1981.