

Sensibilidad de la placa motora al carbachol en presencia de reactivos sulfhidrúlicos

C. Bravo, J. A. Sobrino, J. Ortiz, M. D. Comas, J. A. García-Baro y T. del Riego

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28003-Madrid

(Recibido el 30 de mayo de 1984)

C. BRAVO, J. A. SOBRINO, J. ORTIZ, M. D. COMAS, J. A. GARCIA-BARO and T. DEL RIEGO. *Motor Endplate Sensitivity to Carbachol in Presence of Sulphydryl Reagents*. Rev. esp. Fisiol., 41, 5-10. 1985.

The effect that bath application of sulphydryl reagents (SR) exerts on frog sartorius motor endplate sensitivity to iontophoretically applied carbachol (CCh) has been studied. Sensitivity to CCh is expressed as the ratio of the CCh potential (mV) to the nanocoulombs delivered by the iontophoretic pulse and has been determined before and after addition of SR to the bath. Two groups of SR have been tested: oxidizing reagents, o-iodosobenzoate and reducing agents, dithiothreitol (DTT). CCh was applied iontophoretically by means of a microelectrophoretic programmer with constant current source. Exposure of the muscle to 1 mM DTT in a bath pH range of 7-8 for 2 to 85 min showed no significant differences in endplate sensitivity to CCh before and after addition of the reducing agent. o-Iodosobenzoate at a 1 mM bath concentration (pH 7) for 2 to 19 min strongly decreases endplate sensitivity to CCh. The statistical methods used were Wilcoxon rank tests and linear regression. Since previous studies have shown that oxidizing and reducing SR evoke depolarizations when applied iontophoretically at the endplate region, these results suggest that activation of the receptor is achieved only when SR are delivered iontophoretically, and that discrepancies observed can be attributed mainly to the different techniques of drug application.

Key words: Frog neuromuscular junction, Sulphydryl reagents, Iontophoresis.

Establecido el carácter proteico de los receptores colinérgicos, se ha abordado la caracterización de determinados grupos funcionales y/o estructurales de la proteína aceptora con técnicas y conceptos actualizados. En esta línea de trabajo, los experimentos de KARLIN *et al.* (9-11)

demostraron la presencia de un puente disulfuro a nivel de la sinapsis colinérgica de la electroplaca. Un hecho a resaltar en el pensamiento de Karlin es que el receptor, en estado reducido, se combina peor con la acetilcolina (ACh) o con el carbachol (CCh), es decir, que la unión

receptor reducido-agente colinérgico se traduce en un cambio de permeabilidad menos eficiente y, que la posible cooperatividad entre el lugar activo aniónico y el subsitio hidrofóbico disminuye en el receptor reducido. Todo ello, en comparación con la interacción receptor oxidado-agente colinérgico. Es de destacar que, en todos los experimentos de esta línea de trabajo los reactivos sulfhidrúlicos (RS) se han añadido al baño de la preparación.

Por otra parte, los trabajos de DEL CASTILLO *et al.* (4-7) y de SOBRINO y DEL CASTILLO (15) demostraron que la aplicación electroforética de RS oxidantes a nivel de la placa motora de la rana y de la sinapsis colinérgica de la electroplaca, da origen a despolarizaciones fásicas similares a las producidas por la ACh. La sensibilidad de la proteína receptora a los agentes oxidantes lleva a estos autores a postular que el proceso de activación depende fundamentalmente del hecho de que los grupos SH⁻ del receptor en reposo abandonen su estado libre. De esta forma, el proceso de activación requeriría la presencia de grupos sulfhidrúlicos libres en la proteína aceptora.

En el terreno teórico resulta evidente la discrepancia existente entre ambas concepciones del receptor colinérgico. En el terreno experimental no se encuentran datos que apoyen indefectiblemente una u otra hipótesis ya que, cada una de ellas cuenta con un amplio sustento experimental.

Cabe por tanto preguntarse si las discrepancias observadas obedecen a la distinta metodología seguida en cada caso: aplicación electroforética de los reactivos en un caso y aplicación de los reactivos al baño en otro. Tomando como punto de arranque esta hipótesis, se ha abordado el estudio del efecto de los reactivos sulfhidrúlicos sobre la placa motora de la rana utilizando la técnica iontoforética y la aplicación de los mismos al baño de la preparación. Se pretende de esta forma una definición más exacta

de las características funcionales de los grupos -SS- y SH- de la proteína aceptora.

Material y métodos

Todos los experimentos se han llevado a cabo en la preparación del músculo sartorio de rana. Los registros intracelulares se han realizado según técnica descrita (8, 13, 14). El CCh se ha aplicado iontoforéticamente (2) mediante un programador de microiontoforesis WPI 160 con dispositivo de corriente constante.

Los RS se han aplicado al baño de la preparación a concentración 1 mM. Previamente se ha medido la sensibilidad de la preparación al CCh en un Ringer convencional sin RS. Los datos así obtenidos se utilizan como término de comparación.

Una vez aplicado el RS al líquido que baña el músculo, se procede nuevamente a estudiar la sensibilidad de las placas al CCh.

Los datos obtenidos han sido manejados estadísticamente mediante utilización de un ordenador Commodore 4032. El estudio de la sensibilidad se ha realizado por medio de un análisis de la regresión donde las variables han sido los nculombios de corriente electroforética aplicada y los mV de despolarización correspondientes. De esta forma la pendiente de la recta expresa de manera directa la sensibilidad de la placa en mV/nC.

La comparación entre la sensibilidad al CCh de ambas poblaciones se ha efectuado por medio del test de Wilcoxon. En cada caso se toma como referencia la sensibilidad media de las placas en cada músculo frente al CCh; primero en Ringer convencional y luego en Ringer con RS. Se ha estudiado en total la sensibilidad de 117 placas en Ringer convencional y la sensibilidad de 140 placas en Ringer con RS.

Se han utilizado dos tipos de reactivos sulfhidrúlicos; oxidantes: ortoiodosoben-

zoato (OIB) y reductores: ditiotreitól (DTT). El pH del medio extracelular ha sido 7 excepto en el estudio de la acción del DTT donde, además, se ha empleado un Ringer a pH 8 con la finalidad de favorecer la acción reductora del mismo.

Resultados

Efecto de reactivos sulfhidrúlicos oxidantes. La aplicación de RS oxidantes (OIB) al baño de la preparación va seguida de un aumento transitorio en la frecuencia de potenciales miniatura. Este efecto presináptico del OIB ha sido observado anteriormente por otros autores (15). La aplicación de OIB al baño de la preparación a pH 7, en intervalos de tiempo comprendidos entre 2 y 19 min, evidencia un marcado efecto inhibitorio sobre la sensibilidad de la placa motora al CCh ($p < 0,025$) (Tabla I). Se estudió la sensibilidad del receptor al CCh en Ringer convencional y con OIB 1 mM en un total de 26 y 28 placas (8 músculos), respectivamente.

Efecto de reactivos sulfhidrúlicos reductores. La adición de DTT al baño a

Tabla I. Sensibilidad (mV/nC) de la placa motora de rana al carbacol (pH 7) ($\bar{x}$).

Entre paréntesis, número de placas de un total de 8 músculos. Test de Wilcoxon: hay diferencias significativas entre ambas muestras. OIB = o-iodosobenzoato.

Sartorio n.º	Ringer	
	Convencional	Con OIB
1	3,2 (5)	0,7 (5)
2	2,9 (3)	0,5 (3)
3	4,9 (4)	0,8 (4)
4	4,9 (3)	0,5 (5)
5	4,2 (4)	1,5 (4)
6	8,3 (3)	1,7 (3)
7	15,0 (1)	9,9 (1)
8	4,9 (3)	0,8 (3)

pH 7, no muestra diferencias significativas en la sensibilidad de la placa al CCh (Tabla II). En estas condiciones experimentales se estudió la sensibilidad del receptor (9 músculos) en 40 placas en Ringer convencional y 55 placas en Ringer más 1 mM de DTT en intervalos de tiempo comprendidos entre 5 y 85 min.

A pH 8 la aplicación de DTT tampoco permite encontrar diferencias signi-

Tabla II. Sensibilidad (mV/nC) de la placa motora de rana al carbacol. Efecto del ditiotreitól ($\bar{x}$).

Entre paréntesis, número de placas. Test de Wilcoxon: no hay diferencias significativas entre ambas muestras. DTT = ditiotreitól.

Sartorio n.º	Ringer (pH 7)		Ringer (pH 8)	
	Convencional	Con DTT	Convencional	Con DTT
1	4,9 (7)	2,9 (10)	7,2 (5)	6,4 (10)
2	6,1 (4)	2,2 (5)	5,9 (7)	5,8 (7)
3	4,0 (2)	2,8 (2)	5,1 (4)	5,2 (3)
4	4,8 (4)	5,5 (5)	4,8 (1)	4,4 (1)
5	16,2 (4)	9,4 (6)	5,7 (4)	8,5 (9)
6	13,2 (5)	10,2 (11)	3,5 (6)	4,4 (4)
7	4,4 (6)	5,5 (8)	5,4 (7)	5,1 (8)
8	4,8 (5)	8,0 (5)	6,9 (7)	3,4 (5)
9	4,2 (3)	5,7 (3)	4,8 (4)	3,2 (4)
10	—	—	4,9 (1)	4,9 (1)
11	—	—	11,0 (5)	9,7 (5)

ficativas en la sensibilidad de la placa al CCh. En estas condiciones experimentales se estudió la sensibilidad de 51 placas en Ringer convencional y 57 placas en Ringer más DTT 1 mM (11 músculos) en intervalos de tiempo comprendidos entre 2 y 59 min (Tabla II).

No se observaron efectos presinápticos de los RS reductores al ser añadidos al baño de la preparación.

Discusión

Efecto de RS oxidantes. Se escogió el OIB por su especificidad por los grupos SH^- (15) y por su no tendencia a formar reacciones en cadena como el DTNB.

La exposición prolongada de la placa motora a este reactivo condiciona resultados experimentales diferentes a los obtenidos por aplicación iontoforética del mismo (2). Estos resultados son, en parte, homogéneos con los obtenidos por otros autores. Es así que el efecto inhibitorio del OIB sobre la sensibilidad de la placa al CCh puede conectarse con la observación experimental de CHANG *et al.* (3), que obtuvieron inhibición de la respuesta contráctil a la estimulación directa e indirecta del músculo sartorio de rana en presencia de OIB añadido al líquido que baña la preparación. Cabe destacar, sin embargo, que en el presente estudio no se ha estimulado el nervio motor ni la fibra muscular directamente, sino que se ha aplicado el CCh iontoforéticamente, valorando de esta forma la sensibilidad de la placa al mismo.

Como medida de seguridad y para descartar un efecto sobre la resistencia efectiva de la membrana muscular, se procedió a medir este parámetro según técnica descrita (8). La resistencia efectiva de las fibras musculares inmersas en Ringer con OIB 1 mM se mantiene dentro de los márgenes fisiológicos habiéndose obtenido valores del orden de 300 000

ohmios una hora después de la aplicación del oxidante al baño. Quedaba de esta forma descartado un efecto inespecífico del OIB.

Efecto de RS reductores. El DTT es un reductor de puentes disulfuro más potente que el 2 ME. Los resultados demuestran que este agente reductor no tiene efecto alguno sobre la sensibilidad de la placa motora al CCh cuando se añade al baño de la preparación, ni a pH 7 ni a pH 8, y, por un período de tiempo comprendido entre 5 y 85 min.

Este nulo efecto contrasta con los resultados inhibitorios sobre el potencial de placa motora tras aplicación de DTT 1 mM al baño de la preparación obtenidos por BEN-HAIM *et al.* (1). Cabe destacar a este respecto que el efecto inhibitorio fue obtenido tras estimulación del nervio motor de la preparación del músculo sartorio de rana, circunstancia ésta que difiere del diseño experimental del presente trabajo en que se ha aplicado directamente el CCh sobre la zona de los receptores.

Estos resultados ponen en evidencia que la diversidad de los mismos depende en gran parte de la metodología empleada y, dentro de cada método de las circunstancias experimentales utilizadas.

La técnica iontoforética permite la obtención de concentraciones elevadas de la droga problema en las inmediaciones de una zona circunscrita de la membrana celular. Es de resaltar por tanto que el empleo de esta técnica permite el estudio de las posibles interacciones de reactivos de baja eficacia con grupos funcionales situados en el receptor o en sus inmediaciones. Ello es posible debido a que el dispositivo de corriente constante garantiza la concentración y localización del reactivo problema a nivel de la zona elegida para estudiar la interacción. Los resultados obtenidos con el empleo de la técnica electroforética deben conceptuarse ante todo como debidos a la acción breve de determinados reactivos de gru-

pos SH⁻ sobre zonas muy localizadas de la membrana de la fibra muscular, que garantizan concentraciones despreciables de los mismos en el líquido que baña la preparación.

La aplicación de RS al baño de la preparación lleva inherente la posibilidad de interacción de los mismos con grupos reactivos accesibles de toda la superficie celular, no limitándose su acción sobre los grupos específicos reactivos a nivel del receptor. Otro problema que surge con esta metodología es que, debido a la baja eficacia de los RS (2), resulta evidente que la aplicación al baño de los mismos debe ir seguida de prolongados períodos de exposición o, alternativamente, la concentración del reactivo en el líquido extracelular debe ser muy elevada.

A modo de conclusión general y en la línea de pensamiento de KATZ y MILEDI (12) los resultados experimentales del presente trabajo confirman que la placa motora es un detector muy sensible para agentes activadores liberados instantáneamente desde una fuente puntual situada a nivel presináptico, en nuestro caso pipeta, pero es un detector poco eficiente para los mismos agentes si éstos se distribuyen espacialmente sobre toda la arborización terminal y temporalmente por un período de tiempo que sobrepase con mucho la duración de la corriente de los potenciales miniatura o como se demuestra en este trabajo, la duración media de un pulso iontoforético.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. García-Seoane y al Dr. Martín Molinero su valiosa colaboración en el análisis estadístico de datos.

Resumen

Se estudia el efecto de la aplicación de reactivos sulfhidrúlicos al baño de la preparación del músculo sartorio de rana sobre la sensi-

bilidad en la placa motora al carbacol (CCh), medida como mV/nC en condiciones basales y tras la aplicación de RS al baño de la preparación a una concentración de 10⁻³M. Se utilizan dos grupos de RS: reductores, ditiotreitól y oxidantes, o-iodosobenzoato.

El CCh se aplica iontoforéticamente a través de pipetas simples mediante un programador de microiontoforesis con corriente constante.

La administración de ditiotreitól al baño a pH 7 y 8 en intervalos comprendidos entre 2 y 85 min no da variaciones significativas en las respuestas obtenidas a la aplicación iontoforética de CCh en comparación con las obtenidas en condiciones basales.

La aplicación de o-iodosobenzoato al baño, a pH 7, en intervalos comprendidos entre 2 y 19 min inhibe fuertemente la sensibilidad de la placa al CCh ($p < 0,025$).

Este tipo de efecto vendría condicionado por la técnica de aplicación de los reactivos sulfhidrúlicos y permite postular que la placa motora se comporta como un detector muy sensible para estos reactivos únicamente cuando son liberados instantáneamente desde una fuente puntual.

Bibliografía

1. BEN-HAIM, D., LANDAU, E. M. y SILMAN, I.: *J. Physiol. (Lond.)*, **234**, 305-325, 1973.
2. BRAVO, C.: Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid, 1983.
3. CHANG, C. C., LU, S. E., WANG, P. N. y CHUANG, S. T.: *Europ. J. Pharmacol.*, **11**, 195-203, 1970.
4. DEL CASTILLO, J., ESCOBAR, I. y GILÓN, E.: *Inter. J. Neurosc.*, **1**, 199-209, 1971.
5. DEL CASTILLO, J., BARTELS, E. y SOBRINO, J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2081-2085, 1972.
6. DEL CASTILLO, J. y SOBRINO, J. A.: *Inter. J. Neurosc.*, **6**, 67-75, 1973.
7. DEL CASTILLO, J. y SOBRINO, J. A.: *Ann. Inst. Farm. Esp.*, **21**, 81-87, 1974.
8. FATT, P. y KATZ, B.: *J. Physiol. (Lond.)*, **115**, 320-370, 1951.
9. KARLIN, A. y BARTELS, E.: *Biochem. Biophys.*, **126**, 525-535, 1966.

10. KARLIN, A. y WINNIK, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **60**, 668-674, 1968.
11. KARLIN, A.: *J. Gen. Physiol.*, **54**, 245-264, 1969.
12. KATZ, B. y MILEDI, R.: *Proc. Roy. Soc. B*, **196**, 59-72, 1977.
13. LING, G. y GERARD, R. W.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**, 383-396, 1949.
14. NASTUK, W. L. y HODGKIN, A. L.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**, 39-73, 1950.
15. SOBRINO, J. A. y DEL CASTILLO, J.: *Inter. J. Neurosc.*, **3**, 251-258, 1972.