

Efecto del ambiente iónico y sustancias neurotransmisoras sobre la motilidad espontánea del intestino del caracol (*Cryptomphalus hortensis*)

A. Barber,* R. Jordana y F. Ponz

Departamento de Investigaciones Fisiológicas (C.S.I.C.)
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 16 de marzo de 1976)

A. BARBER, R. JORDANA and F. PONZ. *Effect of the Ionic Environment and of Various Neurotransmitters on Spontaneous Motility in Snail Intestine*. Rev. esp. Fisiol., 32, 323-330. 1976.

A spontaneous rhythmic motility of the isolated intestine in snail, *Chrytomphalus hortensis*, has been registered at 30° C with the aid of an electronic transducer and an appropriate amplification.

These slow regular movements are affected by ionic composition changes in the suspension medium. Na⁺, K⁺ and Ca⁺⁺ ions prove to be important in this motility, and the addition of Ba⁺⁺ markedly stimulates it.

ACh produces hypermotility from 1.8×10^{-11} g/ml. Its effect decreases in the presence of atropine and increases in that of pyridostigmine. The intestine is sensitive to 5-HT from 10^{-10} g/ml, which stimulates its activity. The effect of histamine is weak. Low concentrations of adrenaline tend to increase the amplitude, whereas concentrations from 10^{-5} g/ml onward produce a cease of motility in relaxation.

En un trabajo anterior (3) se mencionó el hecho de que el intestino aislado de caracol presentaba motilidad espontánea. Movimientos rítmicos espontáneos de ciertas regiones del tubo digestivo han sido ya referidos en distintas especies de Gasterópodos (5-7, 20, 21), así como en Cefalópodos (2, 6) y en Bivalvos (18), incluyendo algún estudio farmacológico o de efectos iónicos.

En el presente trabajo se describe la motilidad espontánea del intestino aislado de caracol, *Cryptomphalus hortensis*, y sus modificaciones frente a diversos iones (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺) y sustancias neurotransmisoras (acetilcolina, histamina, serotonina y adrenalina).

Material y métodos

Se han utilizado ejemplares del caracol común, *Cryptomphalus hortensis*, de un

* Becario Postdoctoral del C.S.I.C.

peso medio de 10 g incluida la concha. Se mantenían en terrarios con la adecuada humedad y con lechuga fresca.

La solución salina empleada se indica en un trabajo anterior (3), por modificación de la descrita por MENG (17) para caracol, a la que se adicionó glucosa (1 g/l).

La preparación de intestino consistía en la porción del tubo digestivo comprendida entre la abertura de la glándula digestiva y el comienzo del recto y se obtenía por disección fina, previa decapitación del animal. Lavada con solución salina, se disponía en un baño de órganos a 30° C suspendida en una copa de 10 ml con medio salino burbujeado con aire, fijada por un extremo, no cerrado, con hilo fino (Ethicon 5 ceros) y unido por el extremo libre, también abierto, a una palanca de brazos iguales, provista de contrapeso. Un peso de 260 mg resultó suficiente para mantener vertical el intestino. La palanca estaba conectada a un transductor electrónico para músculo isotónico (Harvard Apparatus, mod. 386) y éste, a su vez, a un quimógrafo de tinta de la misma casa, mediante un amplificador. La velocidad del registro era de 13 mm/minuto.

Para los ensayos se ha procedido como sigue: La preparación se mantenía en medio control durante 10 a 15 minutos para su estabilización. Se renovaba el medio y se registraba durante 5 minutos la motilidad espontánea normal. Se añadía el fármaco o se cambiaba el medio por el que se deseaba ensayar, observando durante 10 minutos los efectos que se producían. Se lavaba dos veces con medio control con intervalos de 5 minutos y se

ensayaba de nuevo con otra dosis de fármaco o con solución salina de distinta composición. Con los ensayos de fármaco, el orden de concentraciones ensayadas era de menor a mayor.

Resultados

MOTILIDAD ESPONTÁNEA DEL INTESTINO AISLADO DE CARACOL

La preparación de intestino aislado de *Cryptomphalus hortensis* presenta movimientos espontáneos rítmicos (fig. 1), bastante lentos, con una frecuencia media de unas 8 contracciones cada 10 minutos (0,8/min). La amplitud de las ondas de contracción depende, para cada preparado, de la carga contra la que se le hace trabajar; para los distintos preparados, del espesor de la pared del intestino (relación peso/longitud).

Pudo observarse que la manipulación correspondiente a los lavados y renovación del medio control cada 10 minutos no influyen apreciablemente en la motilidad espontánea, que mantiene su tono, amplitud y frecuencia durante los 60 minutos de experimentación. Después de este tiempo, hay tendencia a que disminuya la frecuencia (por aumento del tiempo en relajación, esencialmente), la amplitud y la regularidad de las contracciones, lo que es más acusado cuando la pared intestinal tiene menos desarrollo o mayor es la carga contra la que trabaja la preparación. También se observa que la distensión pasiva del intestino en relajación se va haciendo mayor a lo largo del tiempo como consecuencia de la tensión a que le somete el contrapeso. Por este últi-

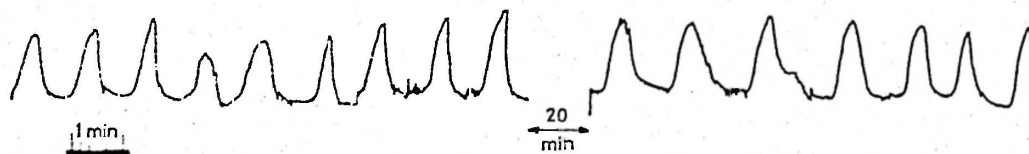


Fig. 1. Motilidad espontánea del intestino aislado de caracol.

mo motivo se corregía la línea de base del registro después de cada lavado, cuando era preciso. Con contrapesos de 260 mg los registros continuaban siendo bastante satisfactorios aun pasados los 60 minutos.

Las ondas de contracción son generalmente simples, con un trazo ascendente (contracción) y otro descendente (relajación), pero en algunos preparados se registraron movimientos más complejos, con ondas dobles o triples superpuestas. En general, el tiempo de contracción es algo inferior al de relajación.

EFECTO DEL AMBIENTE IÓNICO

Se han utilizado soluciones de trabajo de distinta composición iónica, iguales a las ya aplicadas para investigar su influencia sobre el transporte activo de azúcares (4).

Medios carentes de Na^+ , sustituido a efectos osmóticos por K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} o Tris. Siempre que el preparado de intestino se coloca en un medio sin Na^+ , en el que éste ha sido sustituido a efectos osmóticos por K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} o Tris, se observa un estado de contracción permanente, recuperándose la actividad normal al volver al medio con Na^+ . El efecto era máximo cuando el sustituyente del Na^+ era el K^+ , con contracción tres veces la normal y sin que en el trazado se insinuaran oscilaciones (fig. 2A). Al sustituir por Ca^{++} , la contracción era poco más intensa que la de las ondas normales, pero el intestino permanecía contraído y sólo algunas veces se superponían muy tenues oscilaciones (fig. 2B). Si la sustitución era por Tris o Mg^{++} , la contracción duradera era de amplitud similar a la de la activi-

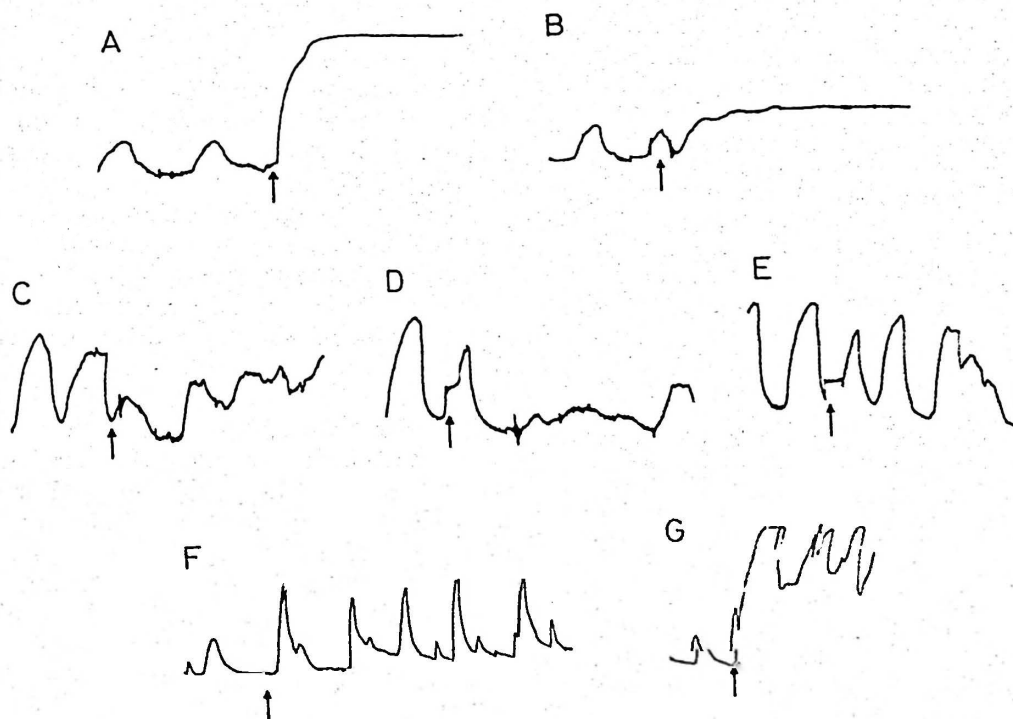


Fig. 2. Efecto del ambiente iónico sobre la actividad espontánea del intestino de caracol. Supresión de Na^+ , sustituido por K^+ (A) o Ca^{++} (B). Supresión de K^+ (C), Ca^{++} (D) o Mg^{++} (E). Acción del Cl-Ba $2,4 \times 10^{-5}$ (F) y $2,4 \times 10^{-3}$ g/ml (G). Cambios del medio en el momento indicado por la flecha.

dad rítmica y se apreciaban con claridad oscilaciones superpuestas.

Medios carentes de K^+ , Ca^{++} o Mg^{++} , sustituidos a efectos osmóticos por Tris-CIH. La ausencia de Ca^{++} en el medio induce un estado prolongado de relajación, con longitud pasiva superior a la normal (fig. 2D). A los tres minutos de parada, durante los que se observan sólo muy escasas variaciones, se comienzan a dibujar pequeñas ondas de amplitud 1/5 a 1/6 de lo normal. La frecuencia y regularidad de estas oscilaciones débiles es similar a las de la actividad normal.

La carencia de K^+ (fig. 2C) disminuye en más de un 50 % la amplitud de contracción, sin que se modifique la frecuencia ni la regularidad del ritmo. La relajación es algo menor o similar a la normal.

La privación de Mg^{++} tiene escaso efecto, aunque se ha observado un aumento más o menos acusado de la frecuencia y cierta tendencia a mayor relajación. La amplitud de contracción es igual o mayor (figura 2E).

Efecto del Ba^{++} . El Cl_2Ba se añadía al medio disuelto, en la proporción necesaria para conseguir la concentración deseada. Se ensayaron concentraciones entre $2,4 \times 10^{-9}$ y $2,4 \times 10^{-2}$ g/ml.

A partir de $2,4 \times 10^{-8}$ y hasta $2,4 \times 10^{-4}$ g/ml, se observa aumento en la amplitud de contracción y a veces aumentó también la frecuencia (fig. 2F). La concentración de Cl_2Ba $2,4 \times 10^{-3}$ g/ml (figura 2G) provoca una contracción muy potente y prolongada que es inicialmente de amplitud hasta cinco veces la normal. Al minuto o minuto y medio, disminuye algo la contracción a la vez que se dibujan en el trazado ondas superpuestas bastante irregulares. Con $2,4 \times 10^{-2}$ g/ml, la contracción es máxima, sin observarse tendencia alguna a la relajación. Los cambios de actividad con concentraciones bajas son fácilmente reversibles al volver al medio control, mientras que con las altas la reversibilidad disminuye.

EFECTO DE DIVERSOS NEUROTRANSMISORES SOBRE LA MOTILIDAD ESPONTÁNEA DEL INTESTINO AISLADO DE CARACOL

Acetilcolina (ACh). Desde $1,8 \times 10^{-11}$ hasta $1,8 \times 10^{-7}$ g/ml, se observa aumento del tono y de la amplitud de la contracción; la frecuencia no parece afectarse, pero mejora la regularidad del ritmo (figura 3A). Estos efectos desaparecen al renovar el medio, para reaparecer al añadir de nuevo ACh.

A partir de $1,8 \times 10^{-6}$ y hasta la concentración máxima ensayada ($1,8 \times 10^{-4}$ g/ml), el efecto de la ACh es el contrario, con clara tendencia a la supresión de la motilidad (fig. 3B), lo que se produce en relajación o en niveles variables de contracción.

La adición del anticolinesterásico sintético piridostigmina ($2,5 \times 10^{-6}$ g/ml) produce aumento de la amplitud y del tono del intestino. Si a continuación se añade ACh ($1,8 \times 10^{-11}$ g/ml), se observa un ulterior aumento del tono, hasta niveles mayores de los que se alcanzaban con esa misma dosis en ausencia de piridostigmina (figs. 3D y E).

El efecto antagonista de la atropina sobre la ACh es poco manifiesto. Altas concentraciones de atropina ($6,2 \times 10^{-5}$ g/ml), que por sí solas parecen causar cierto incremento de la amplitud de contracción y del tono, incluso mantenidas 8 minutos antes, no impiden la supresión de la motilidad por aplicación de ACh $1,8 \times 10^{-6}$, pero permiten apreciar contracciones, aunque de amplitud débil, en presencia de ACh 9×10^{-7} , que sin atropina suprimirían la motilidad.

La atropinización ($6,2 \times 10^{-5}$) impide el efecto de la ACh a bajas concentraciones (10^{-10} a 10^{-11}) sobre la amplitud, aunque puede continuar el aumento del tono (figura 3C).

Histamina. Se han ensayado concentraciones de histamina entre 10^{-9} y $1,25 \times 10^{-4}$ g/ml. A 10^{-8} , sólo parece observarse un ligero aumento de la amplitud sin mo-

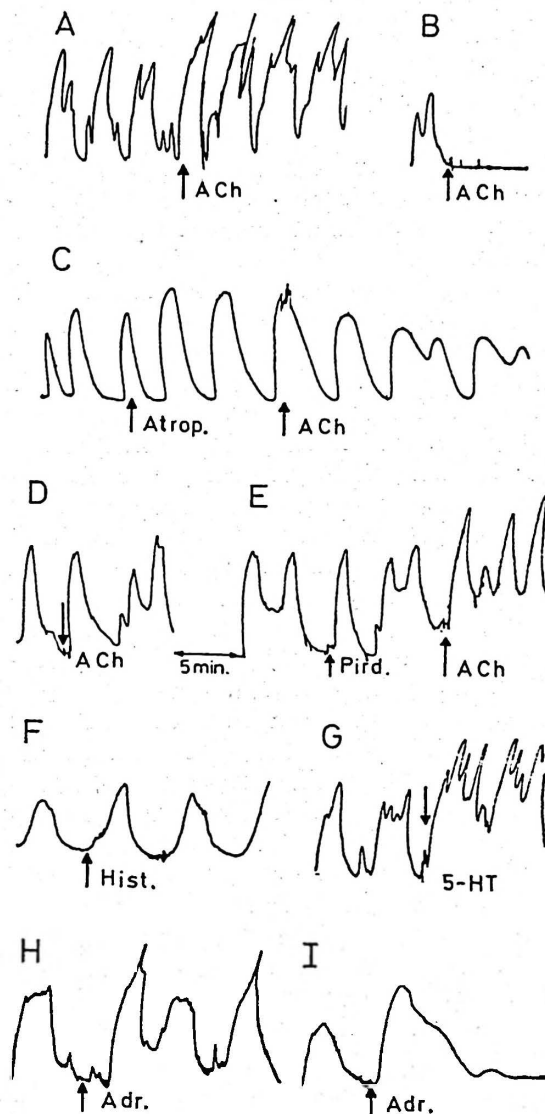


Fig. 3. Influencia de diversos fármacos sobre la actividad espontánea del Intestino aislado de caracol.

Efecto de la acetilcolina $1,8 \times 10^{-11}$ (A) y $1,8 \times 10^{-6}$ g/ml (B). Respuesta a la ACh $1,8 \times 10^{-9}$ tras atropinización previa, $6,3 \times 10^{-5}$ g/ml (C). Efecto de la ACh $1,8 \times 10^{-10}$ g/ml sin y con adición previa de piridostigmina $2,5 \times 10^{-6}$ g/ml (D y E). Acción de la histamina 10^{-7} g/ml (F). Efecto de la serotonina 10^{-10} g/ml (G). Respuesta a la adrenalina 10^{-9} (H) y 10^{-4} g/ml (I).

dificación del tono, lo que también se observa con concentraciones hasta 10^{-5} (figura 3F). Con histamina 10^{-4} y $1,25 \times 10^{-4}$, la acción sobre la amplitud no pudo observarse.

En conjunto la acción de la histamina resulta dudosa y a lo sumo de escasa cuantía y significación.

5-hidroxitriptamina (5-HT). Se han utilizado concentraciones de serotonina comprendidas entre 10^{-10} y 10^{-5} g/ml. Con la menor y hasta 10^{-8} , se observa un refuerzo de la amplitud de contracción con tendencia a aumento del tono (figura 3G). Por encima de 10^{-8} se produce en los 3 ó 4 primeros minutos una potente elevación del tono con movimientos irregulares superpuestos de pequeña amplitud, para volver luego a sus valores normales.

Adrenalina. Se han ensayado concentraciones entre 10^{-9} y 10^{-4} g/ml. Con las inferiores (10^{-9} y 10^{-8}), hay aumento de la amplitud de contracción sin apenas efecto positivo sobre el tono (fig. 3H). Desde 10^{-7} hasta 10^{-5} , esos efectos son menos patentes, y se aprecia en cambio una tendencia al aumento de la duración de las contracciones. Con concentraciones todavía más altas, se provoca una fuerte contracción para cesar luego totalmente la motilidad en relajación (fig. 3I).

Discusión

El intestino aislado de caracol, *Cryptomphalus hortensis*, presenta motilidad espontánea rítmica, que puede ser registrada por los métodos mecánicos convencionales o, en mejores condiciones, con la ayuda de transductores y de la adecuada amplificación, en forma de ondas de notable regularidad, con una frecuencia media algo inferior a una contracción por minuto.

Antiguos trabajos habían descrito ya movimientos rítmicos espontáneos de las regiones anteriores al intestino en *Aplysia*

(7, 8), *Helix pomatia* y *Helix aspersa* (5, 10, 21), pero no se han encontrado referencias sobre la motilidad de preparados aislados de intestino propiamente dicho, quizás por las mayores dificultades de registro mecánico dado su débil desarrollo muscular. La motilidad espontánea del intestino parece bastante más regular y con menos fluctuaciones del tono que la observada en otras regiones más proximales del tubo digestivo de Gasterópodos.

Dicha actividad se ve afectada por cambios en la composición iónica de la solución de trabajo. La supresión del Na^+ conduce a contracción tónica duradera con ninguna o muy débil actividad rítmica superpuesta, con independencia de que el Na^+ haya sido sustituido a efectos osmóticos por K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} o Tris, por lo que puede atribuirse dicho efecto a la ausencia de Na^+ . No obstante, se aprecian diferencias cuantitativas, lo que supone que además de los efectos con Tris y Mg^{++} , el exceso de Ca^{++} y aun más el de K^+ refuerzan la intensidad de la contracción tónica.

Por otra parte, la ausencia de K^+ y aun mucho más la de Ca^{++} , inhiben la amplitud de las contracciones rítmicas; el tono disminuye sólo ligeramente cuando falta el Ca^{++} y se observa un débil aumento en ausencia de K^+ . La privación del Mg^{++} no produce efectos claros sobre la amplitud, aunque parece disminuir el tono y aumentar la frecuencia.

En suma, puede deducirse que el Na^+ , K^+ y Ca^{++} son cationes de importancia para la motilidad. La ausencia de cualquiera de ellos deprime la amplitud de las contracciones rítmicas. Al K^+ le correspondería un efecto predominante sobre el tono y al Ca^{++} sobre la amplitud.

Estos resultados ofrecen bastantes semejanzas, aunque también diferencias, con los descritos en intestino de mamífero (15, 22). Por lo que se refiere a influencias iónicas en otros preparados de tubo digestivo de caracoles (5), se había referido que la supresión de K^+ o Ca^{++} deprimía

la motilidad; el exceso de K^+ conducía a aumentos del tono con menor amplitud de las contracciones o aun a su completa supresión; el exceso de Ca^{++} llevaba a amortiguar las variaciones del tono con otros efectos poco claros, y que el Mg^{++} , a concentración 10^{-3} g/ml, inhibía, aunque transitoriamente, el tono y las contracciones. El que esta inhibición de la motilidad por el Mg^{++} , observada también en tubo digestivo de *Aplysia* (13), no se haya comprobado en nuestros preparados de *Cryptomphalus*, puede atribuirse a que en este último caso el efecto podía quedar enmascarado por el de la ausencia de Na^+ . El Ba^{++} provoca potente hiper-motilidad, resultados coincidentes con los que se obtienen en el intestino de mamífero, tanto de rata (14), gato (16), cobaya (1, 14) o conejo (1). Son también análogos los observados en estómago aislado de *Helix pomatia* (21) y en esófago y recto de *Helix aspersa* (10).

La acetilcolina a concentraciones bajas provoca hiper-motilidad, con aumento del tono y la amplitud, pero con $1,8 \times 10^{-6}$ y superiores la actividad del intestino disminuye hasta llegar al cese de la motilidad en relajación.

En general, la magnitud de la respuesta del tubo digestivo de moluscos a la acetilcolina se ha considerado cuantitativamente pequeña en comparación con la del intestino de mamífero (5, 6, 11, 21); la sensibilidad varía con la especie, y para una misma especie con la región de que se trate. En intestino de *Helix* (6, 21) y *Aplysia* (5), la ACh produce elevación del tono y disminución de la amplitud a partir de concentraciones 10^{-6} g/ml y su acción se potencia con la eserina. En intestino de *Sepia* (5), por el contrario, sólo se observa acción a partir de 10^{-5} , disminuyendo la actividad hasta llegar al cese total, resultados que sugerían el carácter colinérgico de la inervación intestinal de los Gasterópodos, pero no de los Cefalópodos. Otros experimentos con *Helix aspersa* (10) revelaron muy baja sensibilidad

a la ACh, pero los preparados eran buche y recto.

En comparación con estas antiguas observaciones, los resultados con intestino de *Cryptomphalus hortensis* revelan una sensibilidad a la ACh considerablemente superior a la hasta ahora descrita en Gasterópodos, aun cuando las respuestas no son cuantitativamente grandes. El anticolinesterásico piridostigmina potencia algo el efecto de la acetilcolina sobre el tono, sin influir en la amplitud; en cambio, la atropinización impide que la ACh aumente la amplitud y a veces también el aumento del tono.

La acción de la histamina sobre el intestino de caracol resulta débil, con aumento del ritmo y de la amplitud como en intestino de mamíferos, aves y peces (19), pero cuantitativamente es mucho menos apreciable.

La serotonina tiene una conocida acción estimulante sobre la motilidad del tracto gastrointestinal en diferentes especies de vertebrados (9). En moluscos, el estómago aislado de *Helix pomatia* se contrae energicamente por adición de 5-HT a muy bajas concentraciones, mientras que el esófago y el intestino eran 10^5 y 10^7 veces menos sensibles, respectivamente (11, 12). Los experimentos ahora descritos en *Cryptomphalus hortensis* revelan también aumento de la amplitud y el tono del intestino, pero a concentraciones aún más bajas que las activas en intestino de *H. pomatia*. Con dosis superiores y hasta 10^{-5} g/ml, inicialmente se produce una potente elevación del tono con su correspondiente disminución de la amplitud, que cesa al cabo de 3 ó 4 minutos con vuelta al tono normal, aunque con un ligero aumento de la amplitud de contracción.

La sensibilidad del intestino de caracol a la adrenalina resulta en general baja. A débil concentración hay tendencia al aumento de amplitud, mientras que cuando se supera la de 10^{-5} g/ml, se produce una contracción inicial potente seguida

de relajación permanente y pérdida de la motilidad.

Resumen

Se ha registrado la motilidad espontánea rítmica del intestino aislado de caracol, *Cryptomphalus hortensis*, a 30° C, con ayuda de un transductor electrónico y la amplificación adecuada.

Dichos movimientos, regulares y lentos, se afectan por cambios en la composición iónica del medio de suspensión. El Na^+ , K^+ y Ca^{++} se muestran de importancia en la motilidad; la adición de Ba^{++} la estimula notablemente.

La ACh produce hiperomotilidad desde $1,8 \times 10^{-11}$ g/ml; su efecto disminuye en presencia de atropina y se potencia con la de piridostigmina. El intestino es sensible a la 5-HT a partir de 10^{-10} g/ml, estimulando su actividad. La influencia de la histamina es débil. Bajas concentraciones de adrenalina tienden a aumentar la amplitud, mientras que a partir de 10^{-5} g/ml producen el cese de la motilidad en relajación.

Bibliografía

1. AMBACHE, N.: *J. Physiol.*, 104, 266-287, 1946.
2. BACQ, Z. M.: *Arch. int. Physiol.*, 38, 138-159, 1934.
3. BARBER, A., JORDANA, R. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 31, 119-124, 1975.
4. BARBER, A., JORDANA, R. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 31, 271-276, 1975.
5. BEAUVALLET, M.: *C. R. Soc. Biol.*, 124, 1084-1085, 1937.
6. BEAUVALLET, M.: *C. R. Soc. Biol.*, 126, 1128-1130, 1937.
7. BOTAZZI: *Arch. it. Biol.*, 1897 (Cit. TEN CATE, J.: *Arch. néerl. Physiol.*, 9, 199-212, 1924.)
8. BRUCKE: *Pflüg. Arch.*, 108. (Cit. TEN CATE, J.: *Arch. néerl. Physiol.*, 9, 199-212, 1924.)
9. ERSPAMER, V.: En «Handbook of Experimental Pharmacology». Vol. 19 (V. Erspamer, ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1966, pág. 298.
10. GRAHAM, J. D. P. y HEATHCOTE, R. S.: *J. exp. Biol.*, 29, 192-195, 1952.
11. GRYGLEWSKI, R. y SUPNIEWSKI, J.: *Bull. Acad. pol. Sci. (Ser. Sci. Biol.)*, 11, 53-56, 1963.

12. GRYGLEWSKI, R. y SUPNIEWSKI, J.: *Biochem. Pharmacol.*, **12**, Suppl. 39, 1963.
13. HOGBEN, L. T.: *Quart. J. exp. Physiol.*, **15**, 263, 1925. (Cit. BACQ, Z. M.: En «Handbook of Experimental Pharmacology», Vol. 17/1. Springer-Verlag, Berlín, 1963, pág. 154.
14. LEVY, J. y SIOU, G.: *J. Physiol.*, **46**, 601-617, 1954.
15. MAGEE, H. E. y REID, C.: *J. Physiol. (London)*, **63**, 97-106, 1927.
16. MAGNUS, R.: *Pflüg. Arch.*, **102**, 349, 1904.
17. MENG, K.: *Zool. Jber.*, **68**, 539-566, 1960.
18. NYSTROM, R. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **21**, 601-610, 1967.
19. PARROT, J. L. y THOUVENOT, J.: En «Handbook of Experimental Pharmacology», Vol. 18/1 (M. Rocha e Silva, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1966, pág. 205.
20. ROACH, D. K.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**, 865-878, 1968.
21. TEN CATE, J.: *Arch. néerl. Physiol.*, **9**, 199-212, 1924.
22. WHITEHEAD, R. W.: *Am. J. Physiol.*, **89**, 253-265, 1929.