

## IDENTIFICACION DE ESTERES DE COLINA EN EL NEMATODO ASCARIS LUMBRICOIDES

ANTONIO GUERRA, M.D., Ph.D.<sup>1</sup> y DEANE N. CALVERI, Ph.D.<sup>2</sup>

Se adelanta este trabajo con el objeto de determinar la naturaleza química del neurotransmisor en el nematodo *Ascaris lumbricoides*. Técnicas de ensayo biológico, cromatográficas y electroforéticas fueron utilizadas para su identificación. La evidencia obtenida indica que la Acetilcolina (Ach) y probablemente la Butirilcolina (Bch) y la Propionilcolina (Pch) se hallan presentes en los tejidos de este helminto. Los resultados de este trabajo aportan evidencia que soporta la hipótesis según la cual existiría un sistema colinérgico de *Ascaris lumbricoides* y en el cual la Ach serviría como un neurotransmisor.

### INTRODUCCION

La existencia de un sistema colinérgico en el nematodo *Ascaris lumbricoides* fué postulada por Del Castillo y col. en 1963<sup>1</sup>. La evidencia experimental que respaldaba este postulado consistía principalmente en la observación de Mellamby<sup>2</sup> quien mostró que extractos de tejidos de *Ascaris lumbricoides* poseen actividad colinomimética y en que la aplicación iontoforética de Ach en la unión neuromuscular del parásito remedaba los efectos de la estimulación eléctrica de uno de sus nervios<sup>1,3</sup>.

La elucidación de la naturaleza química de tal neurotransmisor era de importancia puesto que ella ayudaría a entender la fisiología de este y otros nematodos así como para sustanciar una cualquiera de las hipótesis formuladas respecto al mecanismo de acción de la droga piperazina:

La de Norton y DeBeer<sup>4</sup> quienes postularon que piperazina produce un bloqueo de la neurotransmisión sobre la unión neuromuscular (U.N.M.) similar al producido por curare, o la de Del Castillo y col.<sup>1</sup> quienes postularon que piperazina remedaría la acción de un neurotransmisor inhibitorio de la U.N.M. el cual prevendría la depolarización neuromuscular producida por la liberación de Ach endógena.

El trabajo que aquí se reporta se relaciona con la identificación por medios químicos y biológicos de las sustancias colinérgicas presentes en *Ascaris lumbricoides*.

### METODOS Y MATERIALES :

Los *Ascaris* fueron obtenidos en un matadero local. Después de lavarlos extensamente con agua corriente, los segmentos más anteriores de ellos, correspondientes a la cabeza y en la

cual se encuentra el grupo de ganglios faríngeos, fueron cortados y colocados en nitrógeno líquido y almacenados luego a - 20°C para su uso posterior. El período de almacenamiento no fue mayor de 4 semanas. Los varios pasos detallados abajo fueron seguidos en todos los experimentos. Todas las sustancias químicas utilizadas fueron de la mejor calidad disponible.

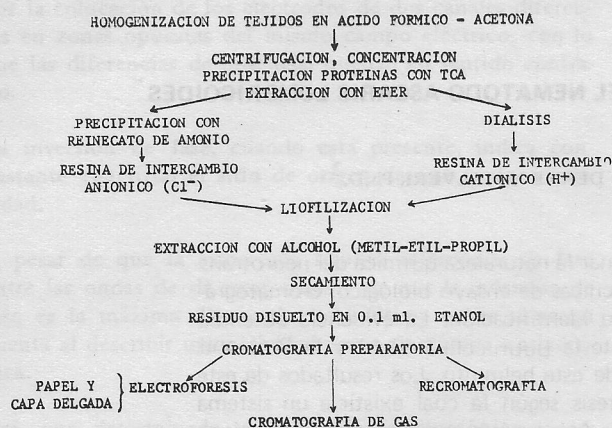
#### a) Procedimiento de Extracción :

Las sustancias colinomiméticas fueron extraídas con una mezcla al 15% de ácido fórmico 1.0 N en Acetona (v/v). Aproximadamente 15 mililitros de ella fueron utilizadas por cada gramo de tejido previamente pulverizado bajo nitrógeno líquido. Después de permanecer en el frío por 60 minutos, se centrifugó a 1.200 x g, se decantó y el residuo se mezcló con un cuarto del volumen original de una mezcla al 10% de ácido fórmico 1.0 N en Acetona. Este paso fue repetido dos veces más y el residuo descartado. Los supernadantes fueron reunidos y evaporados bajo vacío a 40°C. Después de agregar un volumen pequeño de agua, se centrifugó a 10.000 X g y el sedimento se descartó. Al supernadante se le agregaron 2 volúmenes de una solución acuosa saturada de reinecato de amonio en la forma recomendada por Gardiner y Whittaker<sup>5</sup> y por McCaman y Hunt<sup>6</sup>. Después de permanecer por dos horas a 4°C, el precipitado fue recogido, lavado con 2 ml. de agua helada y disuelto en un volumen pequeño de una solución acuosa de acetona al 50% (v/v). Puesto que cualquier ester de colina obtenido en esta precipitación se hallaría como sales de reinecato, ellos fueron transformados a la forma de clorhidrato por medio de su paso a través de una columna de intercambio aniónico (Dowex 1 X 8). El efluente de las columnas fue evaporado a un volumen pequeño adecuado para las varias técnicas cromatográficas y electroforéticas utilizadas (Gráfica 1).

#### b) Bioensayo de Ach :

Se siguió el procedimiento de Feltberg<sup>7</sup> utilizando el músculo recto anterior de la rana. La actividad colinomi-

1. Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas División de Salud - Universidad del Valle.
2. Depto de Farmacología, Marquette School of Medicine, Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.



GRAFICA 1.

RESUMEN DE PROCEDIMIENTOS SEGUIDOS.

Este diagrama muestra el procedimiento general seguido, y los métodos utilizados para la identificación de las sustancias colinomiméticas presentes en las "cabezas" de *Ascaris*. Una descripción detallada de cada procedimiento se encuentra en el texto.

metica del extracto fue comparado con la de soluciones patrones de Ach sintética a varias concentraciones. Las contracciones fueron medidas por medio de un transductor Statham.

c) Cromatografía de papel de los extractos :

Los extractos fueron sometidos a cromatografía sobre papel Whatman No. 3 usando tres tipos diferentes de solventes : n-butanol saturado con agua, n-propanol: agua (9:1) y n-propanol: ácido fórmico: agua (8:1:1). Las manchas fueron localizadas con vapores de yodo ó con una solución alcohólica de hidroxilamina férrica según el método de Whittaker y Wijesundera<sup>8</sup>. Puesto que los vapores de yodo no alteran la estructura química de los esteres de colina, las manchas localizadas en el cromatograma fueron recortadas y eluidas del papel con metanol. Las diferentes fracciones así obtenidas fueron recromatografiadas sobre papel Whatman No. 1. En todos los experimentos una cantidad conocida de H<sup>3</sup> - Ach fué añadida al extracto no purificado con el objeto de conocer los valores aproximados de recuperación del material con actividad colinomimética. Los varios esteres de colina visualizados fueron identificados, tentativamente, comparando su Rf con los de varios esteres sintéticos de colina. La radioactividad fué medida en un contador de centelleo Packard Tri-Carb. Las ventanas fueron ajustadas para obtener máxima eficiencia.

d) Electroforesis de papel y de capa delgada :

Algunas porciones de los extractos fueron sometidas a electroforesis sobre placas de capa delgada de Silica en la forma recomendada por Bayzer<sup>9</sup> o sobre tiras de papel Whatman No. 1. Se utilizó un tampón de Piridina: ácido acético a pH 3.8 ó alternativamente, un buffer de ácido fórmico: ácido acético, pH 2.3<sup>10</sup>. Los mejores resultados se obtuvieron con electroforesis de capa delgada usando el

sistema tampón de piridina: ácido acético<sup>9</sup> Los electroferogramas fueron secados al vacío, observados bajo luz ultravioleta y teñidos con vapores de yodo. La identificación se hizo comparando los Rf obtenidos con los de esteres sintéticos de colina.

e) Cromatografía de Gas :

El análisis de los ácidos grasos de cadena corta esterificados a la molécula de colina, por medio de cromatografía en fase gaseosa, fue utilizado como un método complementario de identificación. Para este tipo de análisis las fracciones que se deseaba examinar fueron pasadas a través de una columna de intercambio catiónico (Amberlita IRC 50 en forma sódica, 100 - 200 mesh) en la forma recomendada por Whittaker<sup>11</sup>. En esta forma, solo sustancias con una carga positiva neta pudieron ser estudiadas. Las muestras fueron evaporadas en vacío, extraídas con volúmenes pequeños de metanol, evaporadas y disueltas en 0.1 ml. de agua destilada. Los esteres de colina presentes en el extracto fueron sometidos a hidrólisis alcalina por medio de la adición de 50  $\mu$  l de 2 N NaOH. Después de mezclar y esperar 30 minutos, se les agregaron 50  $\mu$  l de HCl concentrado. En pH ácido, la ionización de los ácidos grasos liberados es mínima y pueden ser extraídos con solventes orgánicos poco volátiles. Volúmenes de 10  $\mu$  l fueron inyectados a una columna de 8 pies llena con Chromosorb W (AW) con 3% de polietilenglicol 20.000 terephalate. Se utilizó un cromatografo BarberColeman equipado con un detector de ionización por llama, programador de temperatura y un registrador Dorham con una deflección de 1 mV. Mezclas de ácidos grasos de cadena corta (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>) fueron utilizados como estandares.

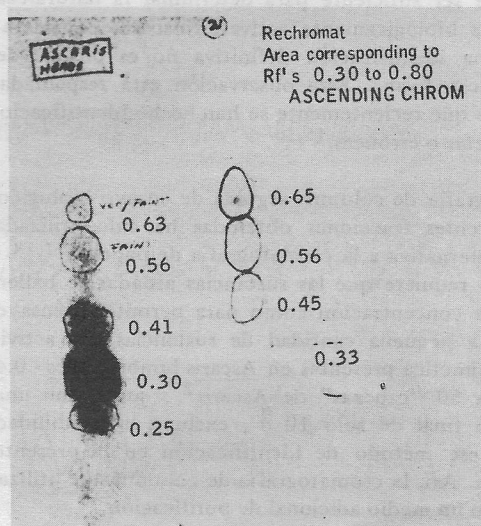
RESULTADOS:

Cromatografía de Papel :

Conforme se indicó bajo métodos, la cromatografía de papel se realizó después de haber precipitado las bases amónicas cuaternarias con reinecato de amonio y de convertirlas a la forma de clorhidrato.

Debido a la presencia de sustancias contaminantes de bajo peso molecular y a la concentración relativamente alta de sales inorgánicas, los cromatogramas dieron una resolución pobre y obligaron a recromatografiar todas aquellas manchas con Rf superior a 0.1 ó 0.2. Con los sistemas utilizados por nosotros, el Rf de colina se halla entre 0.3 y 0.4. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en Gráfica 2. Acetilcolina radioactiva (H<sup>3</sup>) fue cromatografiada junto con los extractos. El Rf calculado obtenido para esta Ach (H<sup>3</sup>) fue de 0.42 el cual es exactamente igual al de una de las manchas en el cromatograma (Gráfica 2b).

La mancha oscura, densa, en la parte inferior de Gráfica 2 b fue identificada como colina en base a su Rf y al hecho de que podía ser visualizada con vapores de yodo pero no con hidroxilamina férrica. Después de ser recro-

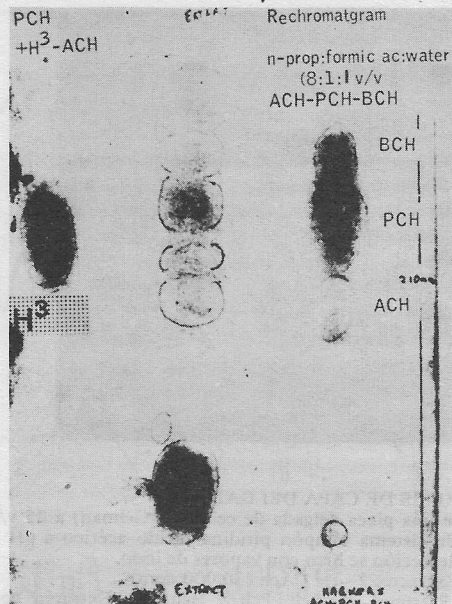


GRAFICA 2.

**CROMATOGRAFIA DE PAPEL DE LOS EXTRACTOS DE ASCARIS**

a) De un cromatograma preparatorio las manchas localizadas entre valores de Rf de 0.30 a 0.80 fueron cortadas, eluidas, concentradas y recromatografiadas - solvente: n-propanol: ácido fórmico: agua (8:1:1 v/v)

Derecha: Colina - Ach, Pch, Bch utilizados como patrones aparecen en ese orden, de abajo hacia arriba.



b) Condiciones similares a las de 2 a)

Derecha: Patrones, Centro: extracto

Izquierda: Aproximadamente 50 µg de Pch fueron cromatografiados junto con Ach (H<sup>3</sup>). La radioactividad se halló localizada en el área punteada marcada H<sup>3</sup>. El Rf de esta zona es igual que el de Ach "fria" y que el de una de las manchas dadas por el extracto.

matografiada dió una sola mancha con un Rf muy cercano al de colina sintética. La aparentemente más alta concentración de colina con respecto a sus esteres es una consecuencia de su abundancia relativa en tejidos de *Ascaris lumbricoides*<sup>12,13</sup> así como del hecho de que ella puede ser el producto de hidrolisis de uno cualquiera de los esteres presentes inicialmente en el extracto.

**ELECTROFORESIS:**

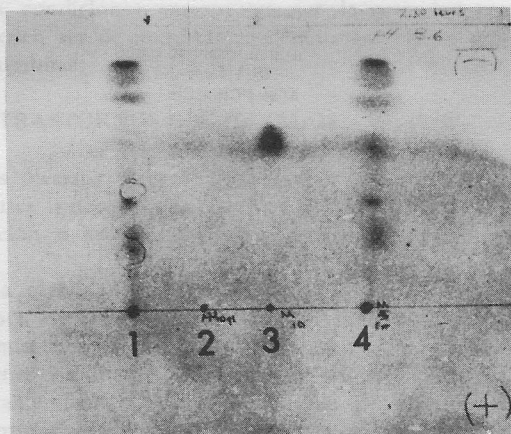
La electroforesis sobre placas de Silica fue preferida a la de papel debido a su mayor sensibilidad y a la mejor separación que ella ofrecía. Las Gráficas 3 y 4 muestran los resultados obtenidos con este procedimiento. Las manchas superiores corresponden a colina, la cual, debido a su menor peso molecular se mueve más rápidamente bajo los efectos de un campo eléctrico. Además de colina, Ach y 2 ó 3 sustancias con pesos moleculares mayores fueron separados en las placas. La distribución sobre la placa, de la Ach radiactiva, fue determinada midiendo la radioactividad localizada en bandas de 0.5 cm de ancho. Para ello, la silica correspondiente fue retirada de la placa y colocada dentro de viales para el contador de centelleo. Se observó que la Ach (H<sup>3</sup>) se localizó en su mayor parte (88 %) en una zona de 0.5 cm de ancho, pero corriendo ligeramente detrás de Ach "fria" (Gráfica 4). Las manchas con menor movilidad no fueron investigadas químicamente pero dadas las condiciones del experimento consideramos razonable suponer que ellas fuesen esteres de colina de cadena larga ó sustancias con un amonio cuaternario en su molécula.

**CROMATOGRAFIA DE GAS:**

Este procedimiento fue usado para caracterizar los esteres de colina presentes en los extractos de *Ascaris*. Conforme fue explicado anteriormente, solo fueron usados aquellas fracciones sometidas a cromatografía en una columna de resina de intercambio catiónico y que poseían volúmenes de elución dentro del rango previamente calculado para esteres de colina. Este paso eliminó cualquier ácido graso, ionizado o no, en los extractos y los cuales podrían invalidar los resultados obtenidos (Ver métodos). El análisis de los cromatogramas mostró la presencia de algunas sustancias con tiempos de retención similares a los de soluciones patrones de ácido acético, propiónico y butírico (Gráfica 5) Bajo las condiciones en que estos experimentos fueron desarrollados no cabe duda que el primer pico corresponde a ácido acético. Los dos picos siguientes parecen corresponder a ácido propiónico y a butírico o a algún ácido graso muy parecido a este (isobutírico, valérico). El grado de impureza de las muestras no permitió la obtención de una mejor separación.

**DISCUSION:**

La mayoría de los informes sobre la presencia de Ach en tejidos animales y vegetales provienen principalmente de métodos clásicos de ensayo farmacológico en sus varias modalidades. El bioensayo no permite, sin embargo, la identificación de un ester dado de colina cuando este se halla en una mezcla de ellos ó cuando se desconoce la



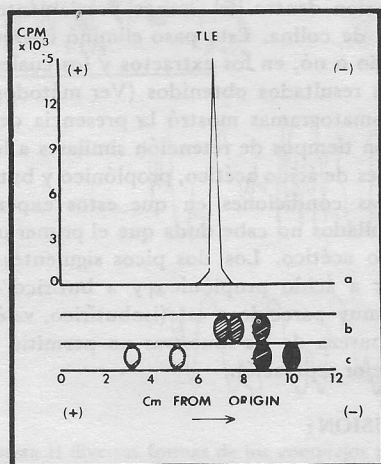
GRAFICA 3.  
ELECTROFORESIS DE CAPA DELGADA.

Se realizó sobre una placa delgada de celulosa (Gelman) a 25 v/cm por 2 horas. Un sistema tampón piridina: ácido acético a pH 3.6 fue usado. La detección se hizo con vapores de yodo.

Símbolos: 1 - Extracto. 2 -  $H^3$  - Ach (30,000 cpm)  
3 - Patrones de Ach, Pch y Bch. 4 - Extracto como en 1 más 10  $\mu$ g aproximadamente de cada uno de los patrones.

concentración relativa de los varios componentes en la mezcla<sup>14,15</sup>. Puesto que ningún método de identificación, por sí solo, da certeza absoluta de la estructura química de una sustancia cualquiera presente en un homogenizado de tejidos, es necesario el usar una combinación de varios métodos, los cuales, en la mayoría de los casos, permitirá su identificación.

Para muchos investigadores en esta área farmacológica la identificación preliminar o tentativa por medio de bioensayo seguida luego de cromatografía de capa delgada o de



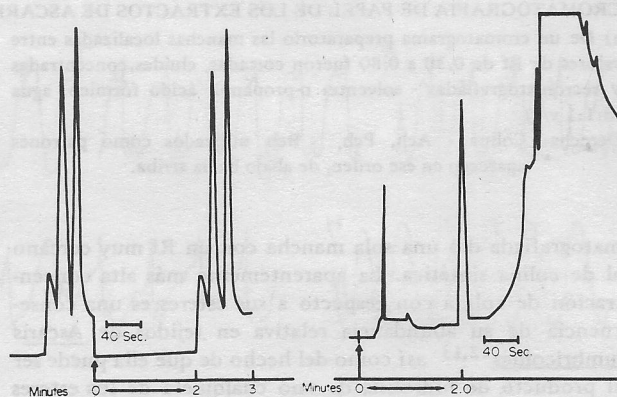
GRAFICA 4.  
ELECTROFORESIS DE CAPA DELGADA.

Mismo electroferograma que en Gráfica 3. Se muestra la distribución de la radioactividad de la Ach tritiada. 88% de la radioactividad se localizó en una banda de 0.5 cm de ancho.

Símbolos: a) Distribución de Ach ( $H^3$ )  
b) Mezcla de Ach, Pch y Bch como patrones  
c) Extracto de *Ascaris*

papel, parece ser suficiente para determinar la naturaleza de sustancias biológicamente activas. Nosotros consideramos que una identificación definitiva no es posible de realizar en esa forma. Esta observación está respaldada por el hecho que recientemente se han hecho identificaciones incompletas o erróneas,<sup>15,16</sup>.

La cromatografía de columna seguida de ensayo biológico de las diferentes fracciones obtenidas ha sido utilizada como una alternativa a la cromatografía de papel<sup>16,17,18</sup>. Ese método requiere que las sustancias aisladas se hallen en suficiente concentración como para permitir el ensayo biológico. La pequeña cantidad de sustancias con actividad colinomimética presentes en *Ascaris lumbricoides* - 0.4  $\mu$ g por cada 50 "cabezas" de *Ascaris*<sup>2</sup> - junto con una recuperación final de solo 10%, excluye la posibilidad de utilizar ese método de identificación en la presente investigación. Así, la cromatografía de columna fue utilizada solo como un medio adicional de purificación.



GRAFICA 5.  
CROMATOGRAFIA DE GAS.

Elución de los ácidos grasos de cadena corta asociados a la molécula de colina. Las condiciones experimentales se describen bajo métodos. Los tiempos de retención fueron comparados con los de soluciones patrones de ácido acético, propiónico y butírico. Izquierda: Patrones de Ac. acético, propiónico y butírico. Derecha: Extracto purificado de *Ascaris lumbricoides*.

Electroforesis de papel o de capa delgada ha sido utilizada por Friesen<sup>15</sup>, Chefurka<sup>19</sup>, Heuschler<sup>20</sup> y Potter y Murphy<sup>10</sup> para purificar y caracterizar los varios ésteres de colina. La electroforesis ofrece algunas ventajas sobre cromatografía de papel, tales como menos interferencia por sales inorgánicas o contaminantes y por la posibilidad de adelantar el procedimiento bajo las mejores condiciones de pH de tal manera que la hidrólisis espontánea de los ésteres se reduce a un mínimo.

La cromatografía de gas no puede utilizarse directamente para la identificación de Ach debido a la baja volatilidad de los compuestos amónicos cuaternarios. Para utilizar este método de análisis se requiere el transformar la amina cuaternaria en una amina terciaria sin producir la hidrólisis

del ester<sup>21</sup> o el reducir la porción ácida de la molécula para producir un alcohol el cual puede ser determinado luego<sup>22</sup>. El método utilizado por nosotros es muy sencillo suficientemente sensible como para detectar 0.05 - 0.10  $\mu\text{g}$  y ofrece buena reproducibilidad. Un procedimiento similar a este fue utilizado por Whittaker<sup>11</sup> para lograr la identificación de acrililcolina. Los resultados obtenidos, utilizando este método dan clara indicación que Ach y probablemente propionil y butirilcolina se hallaban presentes en el extracto.

La información obtenida en la presente investigación respalda la afirmación de Mellamby<sup>2</sup> de que Ach se halla presente en *Ascaris* y nuestra previa afirmación<sup>23</sup> que más de un ester de colina se encuentra normalmente en los tejidos de *Ascaris*. De gran significancia consideramos la demostración definitiva de la presencia de Ach, la cual, junto con nuestra demostración que las enzimas necesarias para la síntesis e hidrólisis de Ach se hallan presentes en *Ascaris*<sup>24</sup> llenan tres de las condiciones necesarias para afirmar que existe un sistema colinérgico de neurotransmisión en *Ascaris lumbricoides* y, probablemente, en otros nematodos.

#### REFERENCIAS

1. Del Castillo, J., De Mello, W.C. y Morales, T.A. (1963) *British J Pharmacol* 22: 463.
2. Mellamby, H. (1955) *Parasitology* 45: 287
3. Goodwin, L.G. y Vaughan Williams, E.M. (1963) *J Physiology* 168: 857.
4. Norton, S. y De Beer, E.J. (1957) *Amer J Trop Dis* 6: 898.
5. Gardiner, J.E. y Whittaker, V.P. (1954) *Biochem J* 58: 24
6. McCaman, R.E. y Hunt, J.M. (1965) *J Neurochem* 12: 253
7. Feldberg, W. (1945) *J Physiol (London)* 103: 367.

8. Whittaker, y Wijesundera, S. *Biochem J* 51: 348 (1952).
9. Bayser, H. (1966), *J Chromatogr* 24: 372.
10. Potter, L.T. y Murphy, W. (1967) *Biochem Pharmacol* 16: 1386.
11. Whittaker, V.P. (1959) *Biochem Pharmacol* 1: 342
12. Beames, L.A. (1966) *Biochemistry of parasites*, Academic Press New York.
13. Von Brand, T. (1966) *Biochemistry of parasites* Academic Press New York.
14. Hosein, E.A., Proulx, P. y Ara, R. (1962) *Biochem J* 83: 341
15. Friesen, A.J. Kemp, J.W. y Woodbung, D.M. (1965) *J Pharmacol Expt Therap* 148: 312.
16. Whittaker, V.P. (1963) *Handbuch Exp Pharmak* Springer - Verlag, Berlin. Chapter 1 Koelle, Ed.
17. Banister, R.J., Whittaker, V.P. y Wijesundera, S. (1963) *J Physiology (London)* 121: 55.
18. Keyl, M.J. (1957) Ph.D. Dissertation, University of Cincinnati.
19. Chefurka, W. y Smallman, B.N. (1956) *Biochem Biophys. Acta* 13: 331.
20. Henscheler, D. (1956) *Hoppe - Seylers, Z. Physiol Chem.* 305: 34.
21. Jenden, J., Hanin, J. y Lamb. S. J. (1968) *Analyt Chem* 40: 125.
22. Stavinoha, W.B., Ryan, L.C. y Treat. E.L. (1964) *Life, Sciences* 3: 689.
23. Guerra, A. (1968) *Fed Proc* 27: 472.
24. Guerra, A. y Calvert, D.N. (1969) Trabajo presentado ante el III Congreso Latinoamericano de Farmacología, Medellín, Colombia.