

" MECANISMO FARMACOLOGICO DE LA ACCION ANTIHELMINTICA DE LA PIPERAZINA "

Libardo Hernández y Antonio Guerra G. *

En el presente trabajo se discuten los posibles mecanismos por los cuales piperazina podría ejercer su efecto antihelmíntico:

- Alterando el flujo de iones en el parásito.
- Actuando como un análogo de una hormona inhibitoria.
- Alterando la síntesis de Acetilcolina.

Se demuestra la acción espasmogénica de piperazina sobre el músculo liso de mamífero (Ileon de Conejo) y se discuten varios mecanismos que podrían hallarse implicados en esta acción.

INTRODUCCION :

La piperazina fué introducida en la terapéutica antihelmíntica con buenos resultados desde 1949 por Fayard. Pocos años más tarde se descubrió que dicha acción era debida a una parálisis del helminto¹⁻²⁻³⁻⁴. El modo por el cual la piperazina produce una parálisis reversible del nemátodo⁵⁻⁶ no se conoce exactamente pero se han formulado varias hipótesis para explicarla:

Norton y Debeer⁷ suponen que la piperazina pueda actuar como un bloqueante ganglionar en forma similar a como lo hace d-tubocurarina. Goodwing y Vaughan⁸ concluyen que la piperazina actúa en forma similar a como la haría una neurohormona natural inhibidora. Del Castillo y col.⁹ y de Mello y col.¹⁰ apoyan esta hipótesis y sugieren que la piperazina actúa incrementando el potencial de reposo de la membrana muscular de *Ascaris*. Trabajos posteriores sugieren una interferencia con el paso del ión cloro por la cutícula del gusano¹¹⁻¹². La acción relajante de piperazina se aprecia también sobre el músculo estriado de algunos vertebrados¹³. Bueding¹ atribuyó el efecto relajante al bloqueo de los sistemas enzimáticos responsables de la producción de energía en el parásito.

Abreviaturas :

PIPERAZINA (PPZ)
ACETILCOLINA (Ach)

PIPERAZINA (PPZ), ACETILCOLINA (Ach), TIABENDAZOL (TBZ).

* Departamento de Ciencias Fisiológicas Sección de Farmacología
División de la Salud.

Las aparentes discordancias ya anotadas respecto al mecanismo de acción de piperazina nos movieron a realizar el estudio que aquí se reporta.

METODOLOGIA :

Tiras de 3 cm. de ileon de conejo fueron fijadas por un extremo a un dispositivo de polietileno y montadas en un baño de órganos aislados de 10 ml. de capacidad a 36°C. La preparación se montó de tal manera que solo una pequeña tensión de 500 mg era ejercida sobre la misma.

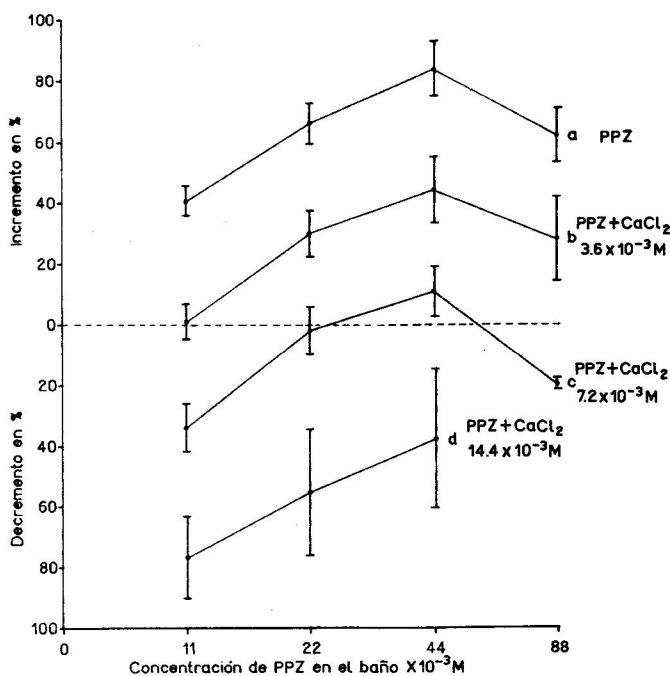
Las contracciones fueron registradas isotónicamente con un transductor de fuerza F. T. 0.3 C. acoplado a un sistema de registro, polígrafo Grass Modelo 79-2. El registro isotónico se realizó usando un sistema músculo - resorte - transductor-polígrafo. La preparación se dejó estabilizar en solución Tyrode, de pH 7.4 por un período de una hora, pasada la cual se comprobaba la estabilización de la preparación analizando las respuestas a dosis variables de acetilcolina (Ach) añadidas al baño.

Se realizaron curvas acumulativas dosis-respuesta¹⁴⁻¹⁵ para piperazina en presencia y ausencia de antagonistas. El efecto de tiabendazol, cloruro de calcio y atropina sobre la acción de piperazina se estudió agregándolos al baño, dejándolos actuar durante 90 segundos y realizando nuevamente la curva dosis-respuesta para piperazina.

Los resultados fueron analizados estadísticamente por los métodos del test de Student, de la comparación de pares y la de grupos.

RESULTADOS :

La piperazina en dosis de 0.5-5 mg/ml. en el líquido del baño produce estimulación de la musculatura lisa del intestino de conejo, aumentando el tono y la amplitud de las contracciones. A la concentración de $4.4 \times 10^{-2}M$ se produce un incremento de hasta 84% en la amplitud de la contracción con respecto al control (Gráfica 1 y 2). Si se continúa aumentando la concentración de piperazina se produce una disminución marcada de la amplitud de las contracciones, que puede llegar hasta su eliminación total. El aumento en el tono muscular producido por la droga no es modificado apreciablemente ya que el espasmo muscular se mantiene.



GRAFICA 1. EFECTO DEL CLORURO DEL CALCIO SOBRE LA RESPUESTA CONTRACTIL INDUCIDA POR PIPERAZINA EN MUSCULO LISO DE CONEJO (ILEON).

Los datos expresan el incremento ó decremento en tensión. El punto cero indica la tensión normal del músculo. Las curvas se realizaron siguiendo la técnica descrita bajo métodos.

- a - Curva dosis-respuesta para piperazina (PPZ)
- b - PPZ + $3.6 \times 10^{-3} M$ de $CaCl_2$.
- c - PPZ + $7.2 \times 10^{-3} M$ de $CaCl_2$.
- d - PPZ + $14.4 \times 10^{-3} M$ de $CaCl_2$.

Cada punto representa el promedio de no menos de ocho experimentos \pm el error estandard. Análisis estadístico por comparación de grupos $p < 0,001$.

Para el estudio del efecto estimulante de piperazina sobre la musculatura lisa del intestino se realizaron ensayos con inhibidores de la motilidad intestinal tales como atropina, cloruro de calcio y clorpromazina. Se incluyeron en esta serie de experimentos algunos con tiabendazol, droga que conforme se muestra en otro trabajo (16) posee una potente acción relajante sobre la musculatura lisa.

Los resultados obtenidos demuestran que el efecto estimulante de piperazina es bloqueado por cualquiera de estos agentes (Gráfica 1 y 2). Debe anotarse que el tiabendazol mostró una mayor potencia que la atropina y la papaverina como agente bloqueador¹⁶.

Durante el curso de estos experimentos con piperazina hubo necesidad de descartar la posibilidad que el efecto estimulante observado fuese debido al anión asociado a la molécula de piperazina. Con este objeto se estudiaron dos sales de piperazina; el hexahidrato y el citrato. Esta última sal se demostró más potente que el hexahidrato. La perfusión del intestino aislado con una solución de ácido cítrico,

neutralizado a pH 7.4 con hidróxido de sodio, fue capaz de causar estimulación del intestino, aunque en forma mucho menor a como lo hacía el citrato de piperazina.

Estos resultados muestran que el efecto de las sales de piperazina no dependen exclusivamente de la base¹⁷ y que el hexahidrato no es la sal más potente de piperazina¹⁸. El cloruro de calcio añadido al baño causa bloqueo en los efectos espasmogénicos de piperazina, disminuyendo el tono muscular y eliminando el peristaltismo. El calcio por si solo produce relajación en el intestino aislado de conejo (Gráfica 4) pero no tiene ningún efecto relajante sobre el músculo depolarizado (contraído) por concentraciones altas de K^+ (70mM0).

DISCUSION :

El efecto espasmogénico de piperazina ha sido demostrado en nuestro laboratorio sobre músculo intestinal de conejo y por Blanco y Fernández¹⁸ en ileon de cobayo. Estos últimos autores midieron la potencia espasmogénica de las diferentes sales de piperazina y reportaron que el hexahidrato de piperazina era la sal mas activa. Por otro lado, Goodwin¹⁷ afirma que la acción de las diferentes sales de piperazina está en relación directa a la concentración usada, expresada como la base, es decir, que el efecto paralizante se debe exclusivamente a la piperazina.

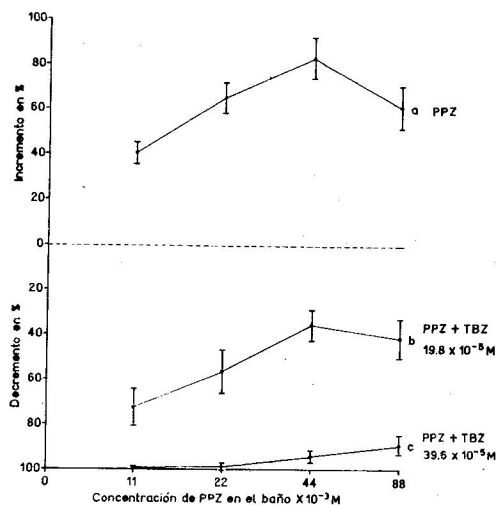
Estas aparentes contradicciones pueden ser conciliadas recordando que Goodwin¹⁷ midió el efecto relajante mientras que Blanco y Fernández¹⁸ midieron el efecto espasmogénico de la piperazina. Además en el primer caso se utilizó músculo de Ascaris y en el segundo músculo intestinal de cobayo. Nuestras observaciones difieren de las de Blanco y Fernández¹⁸ en que sobre el intestino de conejo el citrato es más potente que el hexahidrato de piperazina como espasmógeno y de las de Goodwin¹⁷ en que la acción sobre el músculo no depende exclusivamente de la piperazina como base.

No tenemos una explicación para el hecho de que el citrato de piperazina sea la sal más activa. Sin embargo ya que el ión citrato es una sustancia de fácil acceso a los ciclos celulares puede aducirse que este es utilizado como substrato y fuente de energía. La diferencia anotada con respecto al reporte de Goodwin¹⁷ puede explicarse en base a las obvias diferencias bioquímicas y fisiológicas entre el intestino del mamífero y el músculo del Ascaris. La acción de la piperazina es bloqueada por atropina en músculo intestinal de conejo (ileón) en forma similar a como lo hace sobre el músculo de la lombriz de tierra¹³, lo cual indica que por lo menos en parte la acción de la piperazina se ejerce sobre un mecanismo colinérgico. No se descarta la posibilidad de que la piperazina actúe por mecanismos alternos entre los cuales se podrían mencionar los mediados por Histamina o sobre la maquinaria contráctil muscular.

La importancia del calcio para la contracción muscular ha sido demostrada tanto en músculo liso normal²⁰ como en el depolarizado por potasio²¹⁻²². Esta dependencia de la respuesta del músculo liso a la concentración de calcio se ha demostrado tanto para drogas que estimulan la musculatura lisa a través de receptores específicos (acetilcolina e histamina)²⁰, como para otras cuyos receptores no han

sido completamente establecidos como es el caso de ocitocina²³⁻²⁴.

En músculos estimulados por concentraciones altas de potasio²² o por corrientes eléctricas el calcio es indispensable para producir la concentración²⁵.



GRAFICA 2. EFECTO DEL TIABENDAZOL (TBZ) SOBRE LA RESPUESTA CONTRACTIL INDUCIDA POR PIPERAZINA HEXAHIDRATO'

Los datos expresan el incremento ó decremento en tensión. El punto cero indica la tensión normal del músculo. Las curvas se realizaron siguiendo la técnica bajo métodos.

- a - Piperazina (PPZ) sola.
- b - PPZ + $19,8 \times 10^{-5}$ M de TBZ
- c - PPZ + $39,5 \times 10^{-5}$ M de TBZ

Cada punto representa el promedio de por lo menos 8 experimentos
Cada

Cada punto representa el promedio de por lo menos 8 experimentos \pm el error standard.

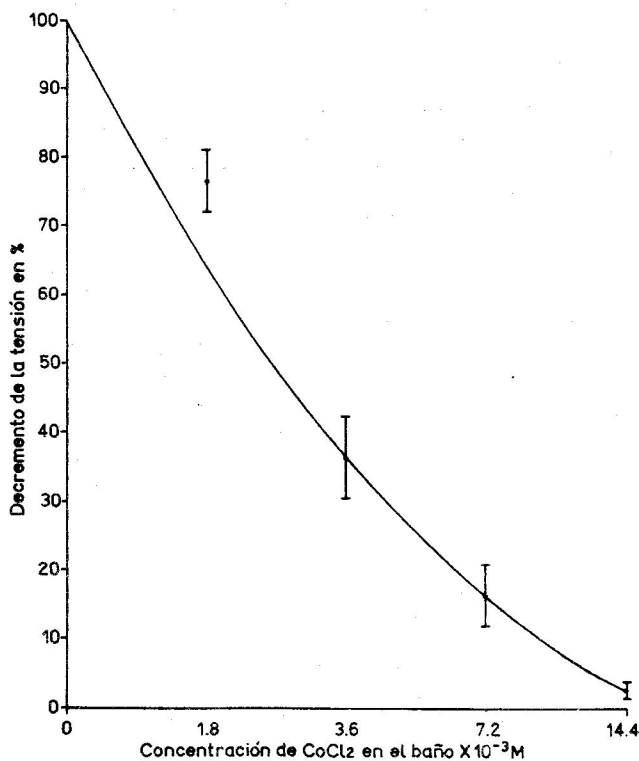
Análisis estadístico por comparación de grupos $p < 0,01$.

La concentración requerida de calcio en el medio es limitante, según lo demostraron Burgen y Spero²⁶ quienes determinaron que la concentración óptima es de 2,55mM y que cualquier variación en esta disminuye el efecto de las drogas estimulantes de la musculatura lisa. Borh y Uchida²⁷ proponen que las drogas estimulantes de la musculatura lisa, liberan calcio de los sitios de almacenamiento hacia el sarcoplasma y que el calcio iónico es el responsable de la activación muscular; la piperazina podría actuar favoreciendo la disponibilidad del calcio iónico necesario para la activación muscular¹⁸, ya sea bloqueando la captación de calcio por la vesícula sarcoplásmica ó alterando la estructura de la misma. Otra posibilidad sería el que la piperazina actuase bloqueando la Troponina la cual normalmente inhibe la contracción muscular²⁸.

Simonis, Ariens y Van de Broke²⁹ han propuesto un mecanismo general para las sustancias espasmogénicas (acetilcolina, histamina, cloruro de bario y potasic) las

cuales actuarían sobre el proceso de acoplamiento excitación - contracción muscular. La piperazina podría intervenir en uno de los muchos pasos de esta compleja serie de eventos.

Born y Bulbring³⁰, Lemback y Strobach³¹, Benerjee y Lewis³² afirman que las sustancias estimulantes de la musculatura lisa aumentan el flujo de potasio a la vez que disminuyen la captación del mismo. En forma similar podría actuar la piperazina alterando la permeabilidad de la membrana muscular al ión potasio, aumentando el flujo del mismo y disminuyendo el potencial de reposo. Como consecuencia se produciría una disminución del umbral a la estimulación, depolarización y contracción muscular. Para su confirmación esta posibilidad requiere la medición del flujo de potasio del músculo tratado con piperazina.



GRAFICA 3. EFECTO DEL CALCIO SOBRE EL TONO DEL MUSCULO LISO INTESTINAL DEL CONEJO.

Cada punto representa el promedio de no menos coho

Cada punto representa el promedio de no menos ocho determinaciones \pm el error standard.

Cabe aquí el mencionar la posibilidad que la contracción muscular causada por la piperazina sea debida a un bloqueo de la bomba de sodio con la consecuente disminución en el potencial de reposo³³. El efecto variable de piperazina, dependiendo del músculo utilizado (Ascaris, lombriz de tierra, músculo liso de mamífero) puede ser interpretado en términos del efecto de ésta sobre el mecanismo iónico que mantiene el potencial de la membrana muscular. Así vemos, que mientras el ión potasio es cualitativamente el más importante en el caso del músculo liso de mamífero³⁴

el ión cloro lo es en el músculo de *Ascaris*^{9,10}. Estos últimos autores han demostrado la existencia de una bomba de cloro que activa el eflujo del ión cloro a través de la pared (cutícula) del *Ascaris* y que el cloro solo representa el 30% de los aniones intracelulares, estando el resto formado por ácidos grasos de cadena corta. En estos términos la hiperpolarización y la consecuente relajación muscular vista en *Ascaris* como resultado de la acción de piperazina serían debidas a:

El bloqueo de la bomba de cloro produciría un aumento marcado en la concentración del cloro extracelular y por tanto, hiperpolarización de la membrana con la consecuente relajación del *Ascaris*. Alternativamente podría considerarse que la piperazina causa el bloqueo de procesos metabólicos conducentes a la formación de ácidos grasos produciendo así la hiperpolarización por un mecanismo distinto del anterior.

Nuestra observación que el calcio antagoniza los efectos de PPZ, se explicaría en base a las observaciones de Burgen y Spero²⁴ quienes demostraron que el aumento en la concentración de calcio en el medio externo disminuye el efecto de las drogas estimulantes. En nuestros experimentos el cloruro de calcio disminuye también la actividad espontánea del intestino de conejo (Gráfica 3) indicando una posible competencia entre el ión calcio y el ión sodio, ya que este último, según Bulbring³⁵, es el responsable de la acción de marcapaso; las alteraciones de la actividad espontánea estarían relacionadas con las variaciones en las concentraciones del ión calcio ya que este condiciona la permeabilidad de la membrana muscular al ión sodio en fibras musculares de crustáceos³⁵ y en fibras nerviosas mielinizadas³⁶. Esto explicaría la utilidad terapéutica del cloruro de calcio en varios tipos de espasmos del músculo liso.

En conclusión postulamos que la acción antihelmíntica de la piperazina puede atribuirse a:

1. Alteraciones en el movimiento y concentración de aniones orgánicos e inorgánicos, intra y extracelulares a través del bloqueo de reacciones metabólicas propias del parásito.
2. Actuando como una neurohormona inhibitoria que actuaría en la forma descrita previamente^{9, 11}.
3. Por bloqueo de la síntesis de Ach.
 - a) Antagonizando la acción de CoA y ATP
 - b) Inhibiendo la colina acetilasa (39).

REFERENCIAS

1. Bueding, E.L., and Swartzwelder, C.: Anthelmintics. *Pharmacol Rev* 9: 329, 1957.
2. Cavier, R.: Alquistions recents dans la therapeutique des helminthiases intestinales. *Biol Med* 49: 201, 1960.
3. Norton, G., and De Beer, E.J.: Investigations on the action of piperazine on *Ascaris lumbricoides*. *Am J Trop Med* 6: 898, 1957.
4. Swartzwelder, C., Miller, J.H. and Spenfield, R. W. : The effective use of piperazine for the treatment of human helminthiases. *Gastroenterology*. 33: 87, 1957.
5. Standen, O. D. : Activity of piperazine in vitro against *Ascaris lumbricoides*. *Brit Med J* 2: 20, 1955.
6. Standen, O. D. : Activity of piperazine in vitro against *Ascaris lumbricoides*. *Brit Med J* 2: 20, 1955.
6. Brow, H. W., Chan, K. F. and Hussey, K. L. : Treatment of enterobiasis and ascariasis with piperazine, *Jama*. 161: 515, 1956.
7. Norton, S. and De Beer, E. J. : Investigations on the action of piperazine on *Ascaris lumbricoides*. *Am J Trop Dis* 6: 898, 1957.
8. Goodwin, L. G. and Vaughan Williams, E. M. : Inhibition and neuromuscular paralysis in *Ascaris lumbricoides*. *J Physiol* 168: 857, 1963.
9. Del Castillo, J., De Mello, W. C. and Morales, T. A. : Mechanism of the paralyzing action of piperazine on *Ascaris musele*. *Brit J Pharmacol* 22: 463, 1963.
10. De Mello, W. C., Del Castillo, J. and Morales, T. A.: Ion aspects of electrogenesis in the somatic muscle cells of *Ascaris lumbricoides*, *Physiologist*. 6: 167, 1963.
11. De Mello, E. C. and Tercafs, R. R. : Ionic permeability of the *Ascaris* body wall. *Acta Physiol. Lat Americana* 16 (2): 121, 1966.
12. Del Castillo, J., De Mello, W. C. and Morales, J. A.: The influence of some ions the membrane potential of *Ascaris* muscle. *J Gen Physiol* 48: 129, 1964.
13. Chang, Y. C. and Bruno, Z.: The effect of piperazine on toad and earthworm muscle membrane potentials. *Pharmacology*. 4: 143, 1970.
14. Van Rossum, J. M and Van Den Brink, F. C.: Cumulative dose response curves. Introduction to the technique. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 143: 240, 1963.
15. Van Rossum, J M.: Cumulative Dose-response curves, Technique for the making of dose-response curves in isolated organs on the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 143: 299, 1963.
16. Hernández, L. y Guerra, A.: Tiabendazol: Estudio farmacológico de su acción relajante sobre músculo liso. IV Congreso Latinoamericano de Farmacología. Caracas, Julio 1972.
17. Goodwin, L. G.: A method for recording the effects of anthelmintics on the movements of *Ascaris lumbricoides* *Brit J Pharmacol* 13: 197, 1958.
18. Blanco Gallego, G. y Fernández, P. L.: Estudio comparativo de la acción esparmógena de diversas sales de piperazina. *Arch del Instituto de Farmacología Experimental (Medicina)*. XXIII: 91, 1971.
19. Von Brand, T.: *Biochemistry of parasites*. Academic Press. New York 1966.
20. Yukisada, N. and Ebashi, F. : Role of calcium in drug action on smooth muscle. *Jap J Physiol* 11: 46, 1961.
21. Durbin, R. P. and Jenkinson, D. H.: The calcium dependence of tension development in depolarized smooth muscle. *J. Physiol (London)* 157: 90, 1961.
22. Edman, K. A. P. and Schild, H. O The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. *J Physiol (London)* 161: 424, 1962.
23. Berger, E. and Marshall, J. M.: Interactions of oxytocin, potassium and calcium in the rat uterus. *Am J Physiol* 201: 931, 1961.
24. Hinke, J. A. M., Wilson, M. L. and Burnhan, C. S.: Calcium and the contractility of arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 206: 211, 1964.
25. Sperelakis, N.: Contraction of depolarized smooth muscles by electric fields. *Ann J Physiol* 202: 731, 1962.
26. Burgen, A. S. V. and Spero, L.: The effects of calcium and magnesium on the response of intestinal smooth muscle to drugs *Brit J Pharmacol* 40: 492, 1970.
27. Bohr, D. G. Uchida, E.: Myogenic tone in isolated perfused vessels. *Cir Tes* 25: 549, 1969.
28. Ebashi, S. and Endo, M.: Calcium ions and muscle activation. *Progr Biophys* 18: 129, 1968.

29. Simonis, A. M., Ariens, E. J. and Van Den Broeke, J. J. W.: Non-competitive spasmolytics as antagonists of Ca^{++} -induced smooth muscle contraction. *J Pharm Pharmacol* 23: 107, 1971.
30. Born, G. V. R. and Bulbring, E.: The movement of potassium between smooth muscle and the surrounding fluid. *J Physiol* 131: 690, 1956.
31. Lembeck, F. and Strobach, R. Cited by Kosterlitz, N. W. (1967): Kaliumabgabe aus glatter Muskulatur. *Arch Path Pharmacol* 228: 130, 1956.
32. Banerjee, A. K. and Lewis, J. J. Effects of smooth muscle stimulants and their antagonists upon potassium ion uptake and release in strips of guinea-pig ileum. *J Pharm Pharmacol* 16: 134, 1964.
33. Goldman, D. E.: Potential impedance and rectification in membranes *J Gen Physiol* 27: 37, 1943.
34. Bulbring, E.: Electrical Activity in intestinal smooth muscle. *Physiol Rev* 42: 168, 1962.
35. Fatt, P. and Katz, B.: The electrical properties of crustacean muscle fibers. *J Physiol (London)* 120: 171, 1953.
36. Frankenhauser, B. and Hodgkin, A. L. : The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol (London)* 137: 218, 1957.
37. Osteux, R., Cohen, Y. et Lasieur, Demarquilly, I.: Mode d'action de la piperazine sur *Ascaris lumbricoides* var. Suum. Mode de penetration et localisation de la piperazine sur *L'ascaris* in vivo par autoradiographie avec la piperazine marquée. *Ann. Pharm Franc* 29: 371, 1971.
38. Osteux, R., Lesieur-Demarquilly, I. et Lasieur, D.: Mode d'Action de la piperazine sur *Ascaris lumbricoides* Var. Suum. I. Etude sur la respiration et antagonisme entre la piperazine et le coenzyme A et L'adenosine triphosphate. *Ann Pharm Franc* 29: 125, 1971a.

La Beneficencia del Valle del Cauca contribuye a la publicación de Acta Médica del Valle en su esfuerzo por mejorar la atención médica de la región.