

Instituto «López-Neyra» de Parasitología. Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia. Granada. Prof. Dr. Diego Guevara Pozo.

ESTUDIOS SOBRE VALORACION DE FARMACOS ANTIHELMINTICOS POR REGISTRO GRAFICO

I.—*Ascaridia galli* COMO ANIMAL REACTIVO

POR

Diego Guevara Pozo
Catedrático de Universidad

y

Juan Cabrerizo Portero
Doctor en Medicina

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La resolución de manera aceptable del problema de la valoración de sustancias de acción antihelmíntica atrae con bastante frecuencia la atención de los investigadores.

Los métodos biológicos más frecuentemente seguidos pueden ser reunidos de una manera general en tres amplios apartados :

1. *Métodos «in vitro»*, entre los que pueden contarse los que numeran los animales reactivos que mueren cuando se introducen en soluciones de la sustancia a estudiar (en relación con los que en el mismo tiempo permanecen vivos), y aquellos otros que hacen el registro gráfico de las contracciones de un animal especialmente elegido para ello. En estos segundos pueden ser utilizados animales parásitos (*Ascaris lumbricoides*) o bien animales de vida libre (*Lumbricus terrestris*), según los autores.

2. *Métodos «in vivo», en animales.*—La técnica más usualmente seguida en estos casos consiste en disponer de animales espontánea o experimentalmente infestados por helmintos, ad-

ministrarles la sustancia de estudios en la forma y cantidad conveniente, recoger cuantos parásitos son expulsados (con o sin ayuda de purgante subsiguiente), sacrificar el animal y hacer recuento de los parásitos que aún le restan sin expulsar, y deducir de ambos números el grado de eficacia del producto. Así se han utilizado perros parasitados por *Ancylostoma caninum*; ratas con *Nippostrongylus muris* e *Hymenolepis diminuta*, etcétera, etc.

3. *Métodos «in vivo», en el hombre.*—El criterio seguido siempre en este tipo de estudios es el de «dosis-curación», con todas las posibles variantes aportadas por los diferentes experimentadores.

Es indudable que, desde un punto de vista teórico y definitivo, los métodos del último grupo son los que, cuando se trata de una nueva sustancia en estudio, han de decir la última palabra en medicina humana. Pero estos métodos no siempre son factibles, ni deben ser empleados desde un principio, sino que son precedidos de estudios llevados a efecto por métodos incluidos en el primero y segundo apartado.

Desde otro punto de vista resulta que el empleo de animales de experimentación, aparte de ser método entretenido, costoso y lento, adolece del inconveniente, cuando de sustancias destinadas a la medicina humana se trata, de no contrastar su eficacia frente al parásito humano sino frente a cualquier otro parásito del animal de experimentación utilizado.

Este último inconveniente lo presentan también generalmente los ensayos «in vitro»; pero, en compensación, son más rápidos, más objetivos, menos engorrosos, y mucho más económicos de realizar.

Realmente, antes de decidir sobre la eficacia y características de cualquier sustancia antihelmíntica en estudio, suelen ser empleados una variedad de métodos diversos que comprenden las tres modalidades descritas, pero comenzando habitualmente por los ensayos «in vitro». De la orientación aportada por éstos se deduce el camino posterior a seguir, por lo que un buen método «in vitro» representa un hallazgo importante, tanto por las consecuencias derivadas directamente de su puesta a punto, como por su aplicación a problemas prácticos farmacológicos y parasitológicos.

De todos los métodos que hemos llamado «in vitro», aquellos

que recogen gráficamente los movimientos del animal reactivo antes y después de ser sometido al antihelmíntico, es decir, los de «registro gráfico», son los que nos parecen más objetivos y más eficaces, siempre que a su vez la elección del «reactivo» vivo sea acertada, pues éste debe reunir una serie de particularidades sin las cuales no es utilizable. Entre ellas podemos citar: que sean sus respuestas constantes y conocidas en las condiciones habituales de trabajo; que sea de un grupo zoológico próximo o igual al de los helmintos; que sea de vida análoga a éstos (es decir, que sea parásito) y con localización semejante; que sea fácil de adquirir, conservar y manejar.

Por las razones que más adelante puntualizaremos, el nematode *Ascaridia galli*, parásito intestinal muy frecuente en las aves de corral, reúne en proporción singular las características exigidas; por lo que nos pareció interesante dedicar un estudio detenido a las posibilidades que esta especie tendría como animal reactivo en el estudio «in vitro» mediante registro gráfico de las sustancias antihelmínticas.

El uso de helmintos de vida libre o ectoparásitos (lombriz de tierra, sanguijuela) para el método de registro gráfico era practicado por algunos autores desde principios de siglo (Straub, 1902; Trendelenburg, 1915; Schulemann, 1920; Fünner, 1911, etc.); pero el empleo de gusanos parásitos intestinales con el mismo fin ha sido menos frecuente, sin duda por las dificultades inherentes a su obtención y conservación en buenas condiciones biológicas.

Parece ser que las primeras tentativas regladas y sistemáticas para el registro gráfico con helmintos parásitos se deben a Trendelenburg, quien utilizó segmentos de *Ascaris lumbricoides* despojados de su cubierta cuticular externa; si bien «no todos los preparados así obtenidos resultaban sensibles a las sustancias que actúan sobre la musculatura de los vermes».

Toscano Rico (1926), utiliza segmentos de *Ascaris lumbricoides* del cerdo de unos 3 cms. de longitud tomados de diferentes partes del gusano, haciendo resaltar que la elección no es indiferente, prefiriéndose la región anterior que lleva «la cabeza» del gusano.

Este mismo autor, en colaboración con Rebello y Gomes da Costa, publica una serie de trabajos en los que se dan cuenta de los resultados obtenidos por el método de registro gráfico utili-

zando como animales reactivos *Temia serrata* (= *T. pisiformis*), *Dypilidium caninum*, *Macracanthorhynchus hirudinaceus*, *Ascaris lumbricoides* (del cerdo) y *Ancylostoma brasiliensis*, sobre los que hacían actuar una variada serie de sustancias antihelmínticas. (Años de 1926 a 1933).

Los trabajos de G. Ettish y S. F. Gómez da Costa (1937) utilizando líquido oleoso como medio de perfusión, para facilitar la disolución de la mayoría de los antihelmínticos, pueden considerarse como continuación de los de la misma escuela portuguesa en lo que concierne a la técnica de registro gráfico.

En el año 1947, Armijo de Valenzuela realiza estudios por el método de la escuela portuguesa de registro gráfico, empleando porciones anteriores de *Ascaris lumbricoides* del cerdo.

Otro autor que sigue en sus estudios sistema análogo fue Baldwin en 1948, pero haciendo un preparado neuro muscular de *Ascaris lumbricoides*; método que suma la dificultad inherente a un delicado modo de conseguir el preparado.

Mackie y Parnell, 1955; Goodwin, 1956, etc., han utilizado, entre otros, las técnicas de registro gráfico, empleando *Ascaris lumbricoides*.

En ninguno de los trabajos consultados se hace mención del uso de *Ascaridia galli* como animal reactivo para esta técnica ni de las características que dicho parásito presenta a estos fines.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

El parásito.—A continuación vamos a describir de una manera breve las características morfológicas del parásito, que más interesan al fin que lo utilizamos, los motivos de su elección y la técnica de su recolección y montaje.

Siguiendo la clasificación de Morgan B. B. y Hawkins P. A. (1953), la localización taxonómica de la especie de nematode parásito, *Ascaridia galli*, elegida por nosotros como animal reactivo, es la siguiente :

Phylum	<i>NEMATHELMINTHES</i>
Clase	<i>NEMATODA</i>
Sub-clase	<i>PHASMIDIA</i>
Orden	<i>Rhabditida</i>
Sub-orden	<i>Ascaridina</i>
Super-familia	Ascaridoidea
Familia	Ascarididae
Género	Ascaridia
Especie	<i>Ascaridia galli</i> (Scharank, 1788)

Es un nematode de tamaño relativamente grande, aunque más pequeño que otras especies, como *A. lumbricoides* y *A. lumbricoides var. suum*, que han sido anteriormente utilizados en estudios similares. Los machos de *A. galli* alcanzan una longitud de 30-60 mm., mientras que la hembra puede oscilar entre 50-120 mm. Su diámetro máximo, en machos y hembras, es de 1-2 mm. Su forma es fusiforme, con el diámetro mayor hacia la mitad de su longitud, adelgazándose paulatinamente hacia ambos extremos. Su sección, en cualquier punto de la longitud, es circular.

Como en todos los nematodes, la musculatura principal, la más poderosa (aparte de algunos elementos musculares viscerales), se halla en la pared del cuerpo, formando la capa más interna de la misma, en íntimo contacto y estrechamente unida a los tejidos del hipodermo, que a su vez lo está con la cutícula, capa acelular continua, constituida por escleroproteínas, que forma la superficie más externa del gusano.

La cutícula está finamente estriada transversalmente. Estas estrías representan zonas transversas de máximo y mínimo espesor, alternativamente dispuestas, lo que presta una gran facultad de alargamiento y acortamiento de la longitud total del animal a impulso de las contracciones y relajaciones de la capa muscular subyacente.

Como muchas especies pertenecientes a la familia Ascaridiidae es polimíaria, es decir, presenta células musculares abundantes y prominentes dentro de la cavidad corporal, a lo largo de la longitud del cuerpo y comprendidas entre los cuatro cordones longitudinales. Esta musculatura sencilla, pero relativamente enérgica, es la que hace que esta especie sea apta para el sistema de registro gráfico adoptado.

La musculatura somática de estos nematodes no es comparable a la de los vertebrados. En primer lugar, no constituyen largas fibras en haces musculares, sino que más bien aparecen como células aisladas contráctiles e independientes, pero sólo en apariencia, pues el sarcoplasma de las mismas, al menos de cierto número de ellas, emite procesos que las relacionan funcionalmente entre sí. Se han descrito también redes de fibrillas, probablemente de función conductora, que también relacionan las células musculares.

Un hecho curioso de las células musculares de los nematodes

parece ser que, al contrario de otros animales, estas células presentan procesos que se extienden hasta los nervios motores (cuyo recorrido es paralelo a la extensión de la musculatura) en lugar de ser fibras nerviosas las que, partiendo de los nervios, se dirigen a los músculos.

Esta anatomía, someramente descrita y no muy bien puntualizada por los autores que se ocuparon de este tema, explica los resultados de una parte de nuestros trabajos, los que se refieren a la no influencia de ligaduras en diferentes regiones del cuerpo del nematode durante la experiencia de contractibilidad, ni de ciertos fármacos de relevante acción en vertebrados.

Omitimos, por razones de brevedad y concisión, la descriptiva morfológica de los restantes órganos y aparatos del animal reactivo, pues con lo dicho basta para nuestros propósitos.

Elección del parásito.—La elección de la *A. galli* como reactivo farmacológico en nuestros ensayos, cuyas reacciones a los distintos fármacos nos permiten hacer la valoración de su eficacia antihelmíntica in vitro, está justificada por las siguientes razones: su fácil obtención por la existencia de numerosos mataderos de gallinas y la frecuencia de su parasitación (del 20 al 50 por 100 de gallinas parasitadas en Granada) (Guevara y Galdón, 1960); su tamaño adecuado para trabajar con él en el sistema de registro gráfico, permitiendo dicho tamaño realizar los experimentos con el parásito íntegro y no con segmentos aislados del mismo, como se hace cuando se usan como reactivos parásitos de excesiva longitud, ya que los segmentos pueden mostrar distinta sensibilidad al fármaco que el gusano íntegro; además la facilidad de su obtención nos permite usar siempre parásitos de vitalidad excelente; así mismo la idéntica localización en el tramo intestinal de la *A. galli* y del *A. lumbricoides* en el hombre (intestino delgado); siendo la razón fundamental de su elección la similitud de algunas características embriológicas y morfológicas de éstas con los *A. lumbricoides*, parásitos del hombre.

Influyó también en su elección la relativa dificultad de obtener *A. lumbricoides*, sumada a que los ejemplares obtenidos lo son casi siempre tras expulsión terapéutica y por tanto son parásitos alejados de la normalidad, y afectados por los agentes farmacológicos.

Recolección y preparación.—Las ascaridias que hemos usa-

do para nuestros ensayos han reunido las siguientes condiciones: vitalidad y movilidad excelentes, longitud adecuada, reciente obtención (salvo en aquellos casos en que se ensayó especialmente el método con parásitos de vitalidad escasa, por haber permanecido 24-48 horas en suero salino antes de realizarse los ensayos y con objeto de analizar la influencia de la conservación), permanencia lo más breve posible en un medio isotónico equilibrado y a temperatura adecuada, etc., etc.

Los parásitos los hemos obtenido del intestino de gallinas, (que habían sido sacrificadas el mismo día de los ensayos), trasladándose en un recipiente termo a la temperatura de 38° desde el Matadero al Laboratorio.

Una vez extraídos se sometían a cuidadosa limpieza con suero salino a 37°, manteniéndolos luego a igual temperatura durante un tiempo oscilante entre 10-60 minutos, para así habilitar al parásito a su nueva situación. A veces han permanecido más tiempo en la estufa, en los casos expuestos anteriormente.

Las ascaridias, colocadas en una caja de Petri con líquido isotónico equilibrado y a una temperatura adecuada, son ligadas con dos hilos por sus dos extremos, los que respectivamente sujetamos a la palanca inscriptora y al tubo de vidrio que hace de soporte; el parásito, así fijado por sus dos polos, se introduce en el vaso de precipitado que contiene el líquido de perfusión, moviendo simultáneamente trípode, aguja inscriptora, soporte de vidrio y ascaridia ya montada.

Durante las maniobras de preparación hemos observado las elementales precauciones de no traumatizar en absoluto la ascaridia; las ligaduras se han realizado mediante pinzas y nunca con los dedos; el parásito, desde su obtención hasta su empleo, permanece siempre en una solución de líquido isotónico equilibrado y a 37°, incluso mientras se realizan sus ligaduras.

APARATOS Y REACTIVOS

El dispositivo consta de un baño termorregulable, un vaso o bien un tubo cilíndrico de cristal (según la variante empleada), en cuyo interior se encuentra la Ascaridia bañada en el líquido de perfusión; un sistema mecánico de inscripción gráfica por palanca y un quimógrafo de negro de humo, donde se realiza la inscripción.

La ascaridia se liga por su extremidad distal, mediante uno de los hilos, a un tubo de vidrio incurvado en su porción final que se introduce y fija al vaso de perfusión. Por la extremidad proximal va ligada, mediante el otro hilo, a la aguja inscriptora.

La palanca de inscripción está dividida en 21 partes iguales, numeradas, con objeto de variar a voluntad, cambiando de posición el contrapeso, la tracción ejercida sobre el gusano durante la inscripción. El punto de giro de la palanca coincidía con la división n.º 7 de su longitud, para facilidad en el cálculo del peso ejercido.

Se ha usado en nuestros ensayos un peso metálico de 3'5 gr., el que corrientemente situado en las divisiones 8 ó 9 representa una acción o tensión de 0'5-1 gr. respectivamente.

Los restantes elementos del sistema son los habituales, por lo cual prescindimos de su descripción.

Perfusión en corriente continua.—En las experiencias donde se ha usado este método de perfusión (para los fines que más tarde exponaremos), la ascaridia en vez de estar en un vaso de perfusión amplio, está intubada, es decir, introducida en un tubo de vidrio de diámetro ligeramente superior al grosor del parásito (1-2 mm.).

En estos casos la perfusión se realiza haciendo pasar el líquido por el tubo que contiene la ascaridia; la que a su vez está ligada inferiormente a un punto fijo y superiormente a la aguja inscriptora.

El sistema consta de dos frascos A y B que contienen: el líquido de perfusión usado y este líquido más la sustancia a ensayar, respectivamente. De cada frasco sale un tubo con una llave de paso; estas llaves permiten regular a voluntad el líquido que en cada momento de la experiencia debe fluir. El líquido de perfusión es conducido después a un serpentín de vidrio situado en el baño para que adquiera la temperatura conveniente y vaya luego a bañar la ascaridia.

Este sistema se ha utilizado más particularmente para estudiar el comportamiento de motilidad de la ascaridia, ya que el pequeño diámetro del tubo recipiente impide una de las dos clases de movimientos que los parásitos realizan: esto es, las grandes ondulaciones que se traducen por acortamientos aparen-

tes, persistiendo sin embargo en la gráfica sólo aquellos que se deben a acortamientos reales.

Como la capacidad del tubo recipiente es escasa hay que renovar continuamente el líquido de perfusión para poder mantener el metabolismo normal del parásito. Esto nos ha permitido además observar si la renovación constante del líquido origina algún estímulo que se manifieste en las contracciones registradas.

Perfusión a volumen fijo.—En este sistema la ascaridia fijada por sus dos polos se introduce en un vaso de perfusión que contiene 250 c. c. de líquido, manteniendo su temperatura constante por el baño termoregurable, en el que está introducido.

Durante los ensayos con los fármacos, empleamos como recipiente del parásito un tubo cilíndrico de vidrio de capacidad total de 100 c. c. que facilita los cálculos sobre concentraciones.

Líquidos de perfusión.—Hemos usado los siguientes líquidos, que se diferencian entre sí y del Rhode sólo en pequeñas diferencias de electrolitos:

	Ringer	Ringer sin calcio	Fenwick	Tyrode
ClNa	0'65 gr. %	0'65 %	0'80 %	0'80 %
ClK	0'025 »	0'025 »	0'02 »	0'02 »
Cl ₂ Ca	0'03 »	—	0'02 »	0'02 »
CO ₂ HNa	0'02 »	0'02 »	0'01 »	0,01 »
PO ₄ H ₂ Na	—	—	—	0'005 »
Cl ₂ Mg	—	—	—	0'01 »

Productos ensayados.—Las sustancias ensayadas han sido de tres clases:

- a) iones salinos;
- b) sustancias de acción muscular;
- c) antihelmínticos.

En esta comunicación sólo haremos referencia a las dos primeras, dejando los antihelmínticos para un estudio posterior.

Como norma general de conducta en las experiencias diremos que las sustancias se ensayaron siempre después de haber registrado las contracciones espontáneas del parásito duran-

te unos 15 minutos. Se añadieron en disolución en el mismo líquido básico y a la misma temperatura del baño.

Las observaciones en cada experiencia se prolongaron hasta cerciorarse de haber pasado el efecto o de no producirse ninguno, según los casos. Además se han estudiado las influencias que sobre el trazado de las gráficas ejercen ciertos factores físicos y mecánicos; así como aquellos otros dependientes de la recolección, conservación y manipulación del animal; y en fin algunos que pudiéramos llamar de índole biológica por depender del estado vital, de desarrollo o anatómico del propio parásito.

III. RESULTADOS OBTENIDOS

Comenzamos por hacer registro gráfico con *Ascaridias* en condiciones que pudiéramos llamar «normales»; es decir, sin sustancia activa, a temperatura constante de 39° C y en líquido de perfusión formado por Tyrode, por considerar que, debido a la localización intestinal del parásito, este líquido sería el más próximo al que teóricamente le fuera óptimo.

En las gráficas a y b se reproducen dos trazados en dichas condiciones.

Hemos podido ver que no todos los ejemplares realizan el mismo gráfico; por el contrario, hay diferencias entre ellas, pero todos tienden a un tipo más o menos constante que viene a ser como las representadas en las figuras.

Como caracteres comunes y generales de la contracción de la *Ascaridia* en las circunstancias normales anotamos los siguientes:

La *A. galli* realiza dos tipos de movimientos que influyen en el trazado: a) ondulaciones amplias que se inician en el extremo cefálico y se propagan hasta el caudal, adoptando el gusano la forma de un senoide, de curvatura variable, con lo que se aproximan entre sí ambos extremos del gusano, produciendo un acortamiento aparente del mismo; b) acortamientos reales por contracción de su musculatura longitudinal.

En cuanto a la gráfica inscrita se caracteriza por una regularidad bien manifiesta en su trazado, con elevaciones de periodicidad marcada y trazado muy característico que, aunque algo diferente en los distintos gusanos, se mantiene invariable a lo largo de varias horas en un mismo ejemplar.

En cada elevación podemos distinguir una rama ascendente, casi rectilínea y vertical, (es decir, respondiendo a una contracción segura y rápida) y una rama descendente más lenta en la que suelen observarse accidentes repetidos, especialmente al final.

En los ejemplares vigorosos no se observa período de reposo, sino que el proceso de relajación se hace más lento al final del mismo, para pasar bruscamente a la contracción siguiente.

La mayor parte de las gráficas muestran en la rama descendente elevaciones mínimas intercaladas, que se deben a contracciones por pequeños acortamientos que se presentan durante la fase de extensión de la *Ascaridia*. Aunque no suelen existir entre las contracciones intervalos correspondientes a períodos de descanso, como quedó dicho, es decir, aunque las contracciones son continuas, pasado un cierto tiempo (que posteriormente analizamos) se inician fases de intervalo indicadoras de una posible fatiga del parásito.

Hemos observado que las contracciones en el comienzo de un ensayo son irregulares en su amplitud y frecuencia, (a veces se mejan estados fibrilares) para ir regularizándose paulatinamente al cabo de algunos minutos, lo que parece indicar que el animal necesita un cierto tiempo para acomodarse a la situación en que se le coloca.

La altura básica de la gráfica permanece aproximadamente constante a lo largo de la experiencia hasta que se inicia la fatiga, cosa muy variable de uno a otro gusano.

FACTORES FÍSICOS

Hemos estudiado la influencia de la temperatura, de la tracción y de la intubación sobre las contracciones normales del parásito.

Temperatura.—Las contracciones en las gráficas que hemos descrito anteriormente como normales han sido obtenidas en ensayos realizados a una temperatura que se ha mantenido constante durante todo el ensayo, ya que, como veremos a continuación, las variaciones de temperatura influyen sobre las características de las contracciones.

Siguiendo los ensayos realizados por Baldwin (1943) y otros

autores que han comprobado que la temperatura óptima para la supervivencia de los ascáridos es de 39°, hemos trabajado a esta temperatura, pero también ensayamos otras distintas temperaturas para comprobar su registro gráfico deduciendo que los límites óptimos para la inscripción de la ascaridia (en nuestras condiciones de trabajo) están entre 36° y 42°.

Los límites máximos y mínimos de temperatura compatibles con la motilidad de la *A. galli* están entre en 30° y 48° respectivamente. Las temperaturas superiores (dentro de los límites dichos) son estimulantes, originando un aumento de la amplitud y frecuencia de las contracciones, por lo que ascaridias situadas a temperaturas próximas al límite inferior se estimulan y recuperan rápidamente cuando se les traslada a medios de temperatura más elevada; en cambio, aquellas que han permanecido a temperatura ligeramente superior a la vital, no recuperan su actividad cuando se les traslada a medios de temperatura inferior, como era de esperar.

Los aumentos bruscos del orden de 3-4° originan una relajación de la *A. galli*, observándose en la gráfica una caída inmediata y brusca del tono, con detención momentánea de la contracción rítmica.

Los descensos rápidos de temperatura de igual valor originan una retracción del parásito, que se traduce en la gráfica por una subida inmediata del tono con ligera disminución de la frecuencia y de la amplitud de las contracciones.

Estas variaciones del tono son tanto más acusadas entre ciertos límites cuanto mayor es la variación de la temperatura, y están en menor grado influenciadas por la longitud y actividad del parásito. También depende de la «velocidad» con que varíe la temperatura.

El aumento de la temperatura, de un modo progresivo y lento, produce una relajación del parásito con caída progresiva y menos acusada del tono, produciéndose simultáneamente una estimulación ligera de la amplitud y frecuencia; mientras que el descenso, también lento, origina los efectos contrarios.

Las respuestas en la gráfica son más visibles para la elevación que para el descenso, cuando estos estímulos son del mismo orden.

Los segmentos parciales (anterior, intermedio o caudal) reaccionan de igual modo frente a los estímulos térmicos que el pará-

sito íntegro, siendo sus respuestas de un grado cuantitativo inferior, como era de prever.

Tensión o tracción.

Mediante la pesa metálica de 3,5 gr. que colocamos en la palanca inscriptora, realizamos distintas tensiones sobre la ascaridia, según cual sea la división en que se coloca.

Hemos comprobado cómo las ascaridias soportan tensiones de 0,5 a 2 gr., en relación con su longitud. Parásitos de 10 cm. soportan tensiones de 3 a 5 gr.; por encima de estas cifras no es soportada la tracción. Las contracciones se detienen; el gusano se estira más allá de su resistencia y acaba por partirse.

La tensión corrientemente usada, por haberse visto la más adecuada, fue de 0,5 a 1 gr., que es la que puede soportar normalmente la ascaridia durante las 15-20 horas que, como máximo, viven en el sistema de registro.

Intubación.

Cuando la ascaridia ha sido intubada, con perfusión en corriente continua, hemos apreciado que algunas veces ciertas elevaciones altas, que corresponden a las ondulaciones del parásito, desaparecen en la gráfica, ya que el escaso diámetro del tubo de vidrio no permite el acortamiento aparente del parásito por estas ondulaciones, persistiendo las que se deben a acortamientos reales de él. Por lo demás, la gráfica presenta iguales características.

Factores químicos.

Hemos ensayado la acción de algunos iones salinos y de ciertos fármacos de acción muscular.

Salinidad total.

En los medios de perfusión usados (Ringer; Ringer sin calcio; Tyrode, Fenwick) las curvas de inscripción gráfica son similares, lo que evidencia que las pequeñas diferencias en la concentración de iones Na, K y Ca no afecta al parásito lo suficiente para ser notado en su registro, así como tampoco la presencia o ausencia de algunos, como magnesio y fosfatos.

Estos datos han sido también confirmados por experiencias de supervivencia de ascaridias en estos medios.

Iones.

Potasio : en los 10 ensayos efectuados sobre la *A. galli* a titulaciones de 1 a 8 gr. por 1.000, hemos observado una pequeña subida de tono y ligero aumento de la frecuencia.

Calcio : en los 6 ensayos efectuados con diluciones de 1 a 4 gr. por 1.000, sólo en 4 hemos observado un ligero aumento de la amplitud de las contracciones, desapareciendo este efecto tras un período de tiempo pequeño.

Magnesio : de los 3 ensayos hechos con diluciones de 1 a 5 gr. por 1.000, hemos observado sólo un pequeño aumento de los intervalos entre las contracciones después de la aplicación de la solución ; recuperándose tras un breve período de tiempo la primitiva ritmicidad de las contracciones.

Curare.

Depresor de la placa motora en vertebrados, nosotros hemos hecho con él 5 ensayos, usando diluciones de 1 a 5 mlgr. en 500 c. c. de Tyrode, no observando ninguna alteración en la gráfica después de su aplicación.

Estricnina.

En la *A. galli* hemos realizado cuatro ensayos con concentraciones de 100-200 mlgr. por 1.000, no observando efecto alguno en la gráfica.

Cianuro potásico.

Es un inhibidor del metabolismo celular, pero en los ensayos realizados con diluciones de 20-40 mlgr. por 1.000 no hemos observado alteración alguna de la regularidad de la gráfica.

Acetilcolina.

Su efecto neuromuscular no lo hemos podido comprobar en la ascaridia, en los ensayos realizados con diluciones de 10-50 ctgr. por 1.000.

Atropina.

Relajante de la musculatura estriada, no muestra efectos sobre la *A. galli* a diluciones de 0,5-1 mlgr. por 1.000. Se han hecho 4 ensayos.

Adrenalina.

En los 4 ensayos efectuados con diluciones de 0,2-1 c. c. de la solución al 1/1.000 en 100 c. c. de Tyrode, no ha habido alteración del tono, ni de la amplitud o frecuencia de las contracciones del parásito en la gráfica registro.

Factores biológicos.

Hemos estudiado la influencia sobre el parásito, traducida en la gráfica, de una serie de factores, que a continuación exponemos.

La conservación del parásito.

El parásito, recién obtenido y con los cuidados expuestos anteriormente, registra una gráfica (cuyas características también han sido expuestas anteriormente) que podemos denominar normal.

No suelen existir intervalos entre las contracciones, correspondiendo a períodos de descanso ; es decir, que las contracciones son continuas. Hasta pasado un determinado tiempo, variable entre 1 a 4 horas (en el que se inicia la fatiga del parásito), no se hacen visibles en la gráfica los intervalos entre las contracciones.

La frecuencia de las contracciones no es idéntica para todos los ejemplares, dependiendo : del grado de actividad, del tiempo transcurrido entre su extracción y su montaje en el sistema de inscripción gráfica ; de la temperatura ambiente a que permanecen inevitablemente algún tiempo en el matadero, etc.

Las ascaridias, montadas para el registro, vivieron en esta situación períodos de tiempo variables entre 2 y 20 horas ; en la gráfica la disminución de la vitalidad se traduce siempre por una disminución paulatina de la frecuencia de las contracciones, con aparición y progresivo aumento de los intervalos entre las ondas, originándose finalmente la muerte del parásito, que se manifiesta en la gráfica por una línea recta continua.

Las ascaridias que llevan de 24 a 48 horas de supervivencia en soluciones salinas, tienen al parecer disminuída su vitalidad fuera del intestino, apreciándose en la gráfica con ellas obtenida contracciones de menor amplitud y menor frecuencia que las producidas por ascaridias de igual longitud, pero recién extraídas ; en aquéllas la línea de muerte se produce más rápidamente.

Sexo y tamaño.

Hemos realizado ensayos con parásitos machos y hembras; en general, hemos preferido éstas por su mayor longitud, ya que el tamaño influye en las gráficas obtenidas.

En los ensayos realizados con parásitos de distintas longitudes, sólo hay diferencias en las amplitudes de las contracciones; las demás características (frecuencia, tono, ritmicidad...) son iguales.

La amplitud de la contracción está en relación directa con la longitud del parásito usado (en parásitos de igual grado de actividad).

También hemos obtenido un mayor número de horas de supervivencia de los parásitos de mayor longitud, en el sistema de registro, en comparación con las horas de vida de parásitos de longitud mínima.

El sexo no afecta a la configuración de la gráfica en circunstancias normales, y sí solamente a la amplitud del registro por diferencias de longitud en ambos sexos. La amplitud de las contracciones es, pues, mayor en las hembras.

Por razones de comodidad, es preferible usar hembras y por la obtención de gráficas más amplias.

Ligaduras.

Todas las experiencias han sido hechas con los parásitos ligados en sus dos polos, mediante dos hilos finos y resistentes.

Las experiencias han mostrado que las gráficas son iguales, cualquiera que sea el polo (caudal o cefálico) que está ligado por el hilo, que transmitirá los movimientos del parásito al cilindro de papel ahumado del quimógrafo. En estos ensayos las ligaduras estaban colocadas en los polos de 3 a 5 mm. de los extremos.

En ensayos efectuados con parásitos en los cuales una ligadura (indistintamente la cefálica o caudal) o las dos ligaduras estaban situadas a distancias variables desde los extremos (a 5-10-15-20-25 ó 30 mm.), las gráficas obtenidas son similares en sus características, salvo amplitud, que está en relación directa con la longitud del parásito que se contrae (la porción de él comprendida entre las dos ligaduras).

Cuando hemos situado una ligadura en la mitad del parásito,

las contracciones conservan las mismas características, pero su amplitud está reducida y es mínima.

Segmentos.

Hemos realizado ensayos de registro gráfico de las contracciones de segmentos aislados de ascaridias.

Estos segmentos se han obtenido mediante cortes transversales del parásito, previas las ligaduras convenientes, que se han efectuado antes de seccionar las porciones que han de eliminarse.

Las gráficas obtenidas lo han sido con un segmento anterior (comprendida la porción cefálica), uno intermedio y uno posterior o caudal, siendo cada uno $1/3$ de la longitud total. Más frecuentemente se han obtenido gráficas con parásitos a los cuales se le había extirpado uno sólo de estos segmentos, el caudal o el anterior (restando por tanto $2/3$ de la longitud del ejemplar).

La longitud de la porción extirpada ha oscilado entre 1 y 3 centímetros.

Las gráficas obtenidas con segmentos, cualquiera que estos sean, son similares a las registradas con el parásito íntegro, existiendo sólo una menor amplitud de las contracciones, explicables por la menor longitud del segmento que se contrae.

El segmento anterior es ligeramente más activo que los restantes, manifestándose esta actividad por la amplitud de las contracciones, que en igualdad de longitud de los segmentos usados, son algo más amplias en el segmento anterior.

El segmento de ascaridia usado presenta actividad contráctil, siempre que su longitud no sea inferior a las $2/5$ partes de la longitud inicial del parásito. Por bajo de esta fracción el segmento no es utilizable prácticamente.

Así mismo, en los ensayos efectuados aplicando estímulos térmicos sobre segmentos, éstos han respondido al frío (en forma brusca o paulatina) y al calor (en las dos formas) de igual manera que el parásito íntegro.

Igual es han sido las respuestas de los segmentos que la de los parásitos íntegros, frente a los factores físicos y químicos, descritos anteriormente, y con los diversos antihelmínticos, como describiremos posteriormente.

Presión interna.

En ensayos en que hemos logrado una pérdida de la presión del parásito mediante una o dos punturas realizadas en cualquier porción de la pared del cuerpo, una vez colocada en el sistema de inscripción, las gráficas de sus contracciones muestran iguales características, estando sólo la amplitud un poco reducida. En estos ensayos, al realizar las perforaciones, se ha tenido la precaución de evitar que haya salida de los órganos del parásito.

Por tanto, en los ensayos hemos visto cómo la presión interna, representada por la tensión del líquido perivisceral, no parece influir en las contracciones.

Contenido y pared del cuerpo.

Hemos efectuado ensayos con parásitos, a los que se les había practicado, una vez montados en el registro, una incisión longitudinal de 5 a 30 mm., con la que se obtenía una pérdida de la presión interna y una salida más o menos completa de las vísceras del parásito.

Previamente habíamos registrado sus contracciones durante 15 minutos antes de realizar dicha incisión. Hecha ésta, observamos que en aquellos casos en que la salida de las vísceras fue mínima, las características de la gráfica permanecen invariables, salvo la amplitud, que disminuye un poco.

Cuando la devisceración es grande se detienen las contracciones, visualizándose en la gráfica por una línea recta.

En otros ensayos hemos empleado exclusivamente la pared del cuerpo, que llamábamos «camisa». Para la obtención de esta camisa, se practican dos cortes transversales bruscos en los dos polos de la ascaridia; por uno de ellos se introduce una cánula, a través de la cual se inyecta lentamente líquido, con lo que las vísceras salen totalmente por el otro orificio. Estas camisas en la gráfica no muestran ningún signo u ondulación, sino sólo una línea recta, a pesar de que en dicha pared se localiza la musculatura somática.

IV. DISCUSIÓN

Hemos elegido como método objetivo para estudio de antihelmínticos el sistema de registro gráfico de las contracciones de

la *A. galli*, descrito anteriormente, por las razones que se deducen de las consideraciones que siguen y del que hacemos un estudio previo en esta comunicación.

Con algunos antecedentes aislados de Straub (1902) y de Trendelenburg (1915), fueron realmente Rebello, Rico y Gomes (1926) los que propusieron el registro gráfico sistemáticamente con vermes parásitos para el estudio de antihelmínticos; pero siempre (o casi siempre) usaban parásitos humanos, que presentan graves inconvenientes para sus disponibilidades en el momento adecuado.

Nuestra elección ha sido justificada, además de por sus ventajas propias, por los inconvenientes que generalmente presentan los restantes métodos «in vivo» con animales, que son los inconvenientes antes anotados.

Así mismo creemos preferible este método gráfico a los métodos «in vivo» en la clínica humana, por la complejidad y escasa asequibilidad de éstos, que requerirían encuestas y estadísticas amplias y no siempre bien llevadas; al menos para el estudio inicial de las sustancias.

Otras ventajas han sido también las razones de su elección: tales como permitir el uso de parásitos seleccionados de forma que ofrecieran las máximas garantías de vitalidad. Disponer de un método gráfico y en gran modo objetivo de la acción del fármaco; ser una técnica sencilla, de fácil manejo, y relativamente rápida.

Estos «tests» gráficos así obtenidos los creemos de gran valor para la comparación de una serie de compuestos de similar acción y poder seleccionar el más activo de entre ellos.

Por otra parte, los reactivos vivos corrientemente utilizados en los métodos gráficos han sido *Ascaris lumbricoides*, *Tenia serrata*, *Dypilidium caninum* y *Uncinaria stenocephala*.

Nosotros hemos elegido un reactivo-parásito que ofrece cierta semejanza con los áscaris del hombre, tanto en su situación taxonómica, como en su habitat intestinal como parásito. Evidentemente el animal de elección ideal sería aquel contra el cual haya de emplearse el antihelmíntico, pero esto presenta dificultades normalmente insuperables.

En todo caso, nos parece la ascaridia preferible a otros reactivos, tal vez de adquisición más fácil, como la lombriz de tierra..., que algunos han empleado y no son ni siquiera parásitos,

ni tienen similitud de características con los parásitos del hombre.

Además, nuestro reactivo es de fácil obtención por la existencia de numerosos mataderos de gallinas y por la densidad de parasitismo de estas aves por la ascaridia.

Hemos también preferido las ascaridias de la gallina a los áscaris del cerdo, usadas por muchos autores, porque su tamaño, oscilable en general de 7 a 11 cm., es más cómodo para su manejo en el sistema, permitiendo dicho tamaño trabajar con parásitos íntegros; mientras que con los áscaris del cerdo, de mayor tamaño, no pueden ser adaptados al sistema, teniendo que trabajar con segmentos del parásito, con el inconveniente de que éstos pueden tener distinta sensibilidad a los fármacos que el parásito íntegro, obteniéndose resultados tal vez más alejados de la realidad.

No es tampoco ventaja desdeñable el hecho de que puedan ser traídos al laboratorio los intestinos íntegros, sin abrir, de las aves, lo cual nos permite una vigilancia y una precaución adecuadas en las manipulaciones de extracción.

V. CONCLUSIONES

1. *Ascaridia galli*, parásito intestinal de aves, se emplea por primera vez como animal reactivo para estudio de antihelmínticos por el método de registro gráfico.

2. Este parásito presenta espontáneamente, en las condiciones que se establecen, contracciones rítmicas muy adecuadas para esta técnica; teniendo respuestas a los estímulos físicos y químicos que pueden servir para objetivar acciones farmacológicas.

3. Otras cualidades de *Ascaridia galli* dependientes de sus dimensiones, facilidad de obtención, manejo sencillo, amplia resistencia a cambios iónicos y salinos, etc., aumentan las ventajas de su utilización en este método.

4. El sexo del helminto no afecta la configuración general de la gráfica en circunstancias normales. Tampoco tiene influencia en las modificaciones provocadas en la misma por la acción de agentes físicos, químicos o farmacológicos (dentro de los ensayos por nosotros). Se recomienda, no obstante, el uso de ejemplares hembras por su mayor facilidad de manipulación, resistencia mecánica y energía contráctil.

5. Para los mismos fines pueden utilizarse segmentos de ascaridia en lugar de gusanos enteros, siempre que se guarden ciertas precauciones al seccionar, y el segmento no sea inferior a dos quintos de la longitud total. En estos casos resulta indiferente la región del gusano, de la cual se tome el trozo, aunque la región anterior parece algo más enérgica.

6. La presión interna, representada por la tensión del líquido perivisceral, no influye en el tipo de contracción normal ni en las respuestas. El contenido visceral, por el contrario, sí parece indispensable para la contractibilidad.

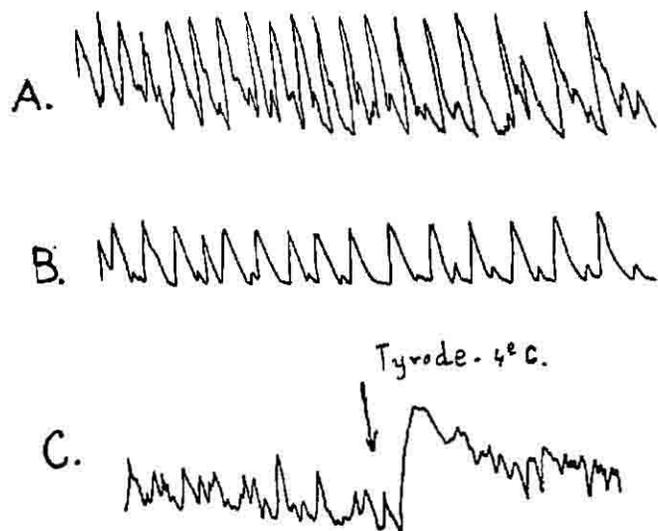
7. Variaciones de cierta amplitud en la concentración de los iones potasio, sodio, calcio y magnesio en el líquido de perfusión, no influyen de modo significativo en el registro conseguido.

8. La adición de curare, estriknina, cianuro, acetilcolina, atropina y adrenalina al líquido de perfusión, incluso a concentraciones relativamente altas, no manifiesta influencia en la gráfica.

9. La temperatura sí tiene importancia en la buena marcha de la contracción y del registro. Temperaturas comprendidas entre 37° y 40° centígrados pueden usarse, a condición de permanecer invariables durante la experiencia.

10. Variaciones térmicas de 0'3 a 0'9 grados de la temperatura bastan para imprimir modificaciones sensibles en la inscripción, tanto más acusadas cuanto más rápida ha sido la variación.

11. Una elevación de la temperatura provoca un aumento de la longitud del gusano (pérdida de tono), que se traduce por un descenso de la gráfica; una disminución origina efecto contrario.



GRÁFICAS OBTENIDAS CON *Ascaridia galli*

- A. Gráfica normal, en Tyrode a 38° C.
- B. Gráfica normal, en Tyrode a 38° C., al cabo de dos horas de inscripción ininterrumpida (disminución de la amplitud y de la frecuencia, así como de las contracciones secundarias).
- C. Efecto del brusco descenso térmico (se bajó la temperatura del baño en 4° C. en unos segundos).

RESUMEN

Se describe una técnica de registro gráfico para estudio de antihelmínticos, empleando *Ascaridia galli* como animal reactivo. Las ventajas, circunstancias y condiciones de empleo de este parásito intestinal son puntualizadas, así como las respuestas a ciertos estímulos físicos y farmacológicos.

SUMMARY

A description is given of a method to study anti-helminths by means of graphs, using *Ascaridia galli* as the re-active animal. The advantages, circumstances and conditions of using this intestinal parasite are detailed, as well as the replies to certain physical and pharmacological stimuli.

BIBLIOGRAFIA

1. ACKERT, J. E.—The morphology and life history of the fowl nematode *Ascaridia lineata* (Schneider). *Parasitology*, 1931, 23, 360-380.
2. ARMIGO VALENZUELA, M. DE.—Valoración de antihelmínticos con las técnicas de la escuela portuguesa. *Farmacoterapia actual*, año V, nov.-dic., núms 53-54, 593-600.
3. BALDWIN.—A study of anthelmintic potency in relation to chemical constitution. *Brit. J. Pharm.*, III, 91, 1948.
4. BALDWIN.—A study of anthelmintic potency «in vitro». *Pathology*, XXXV, 89, 1943.
5. GUEVARA POZO, D. y GALDÓN ABELLÁN, V.—Encuesta parasitológica sobre *Ascaridia galli* en *Gallus gallus* de la región granadina. *REV. IBÉR. PARASITOL.*, 20: 411-423 (1960).
6. ETTISCH, G. y GOMES DA COSTA, S. F.—Sur l'activité de diverses solutions huileuses d'un même composé. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 126, 596 (1937).
7. ETTISCH, G. y GOMES DA COSTA, S. F.—Sur la possibilité d'utilisation des huiles comme liquides de perfusion. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 126: 520 (1937).
8. MACKIE, A. y PARNELL, A.—A comparison of the results of four «in vitro» anthelmintic testing techniques. *Referata: Heriot War College. Edimburgo.*

9. MORGAN, B. B. p HAWKINS, PH. A.—«Veterinary Helminthology». Burgess Publishing C.º. 1953.
10. REBELLO, S., GOMES DA COSTA, S. F. y TOSCANO RICO, J.—Sensibilité des Cestodes a l'action de quelques anti-helminthiques. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 98 : 473 (1928).
11. REBELLO, S., GOMES DA COSTA, S. F. y RICO, T.—Action de quelques anti-helminthiques sur les Cestodes, L'*Ascaris* et L'*Ankylostome*. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 98 : 995 (1928).
12. REBELLO, S., GOMES DA COSTA, S. F. y RICO, T.—Sur la sensibilité de l'*Ankylostoma* a l'action de diverses substances. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 98 : 493 (1928).
13. REBELLO, S. y RICO, T.—Reactions des Cestodes étudiées par le Methode Graphique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 98 : 470 (1928).
14. TOSCANO RICO, J.—Sur le emploi de l'*Ascaris lumbricoides* comme reactife pharmacologique. Actions de la nicotine. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 94 : 918 (1926).
15. TOSCANO RICO, J. — Sur la sensibilité de l'*Ascaris lumbricoides* a l'action de quelques drogues. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 94 : 921 (1926).