

## Efecto de la aplicación *in vivo* de L-glutamato sobre el músculo extensor tibial de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775)

J. Díaz Mayans y A. Núñez Cachaza

Palabras clave: L-glutamato, músculo, *Schistocerca*.

### RESUMEN.-

Se ha estudiado el efecto que produce el L-Glutamato sobre la amplitud de las contracciones musculares de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775), al ser aplicado *in vivo* por instilación directa sobre el músculo, situado en su posición natural y manteniendo al animal vivo y entero durante las experiencias. Se obtuvieron contracciones isotónicas o isométricas, por estimulación eléctrica de las vías nerviosas motoras N3 y N5. Al aplicar soluciones de L-Glutamato en concentraciones de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-8}$  g/ml, ambas inclusive, en dosis de 5, 10 y 30 microlitros, se produce una disminución en la elongación de las contracciones registradas. La dosis no influye en el porcentaje de disminución producido, pero la concentración sí tiene influencia, tanto en contracciones isotónicas como isométricas.

### SUMMARY.-

The effect of L-Glutamate on the force of neurally evoked contractions of the muscle of *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) has been studied, when applied *in vivo* by direct instillation. The animal was kept alive and the muscle was kept in its natural position during the experiments. The isotonic or isometric contractions were obtained by electric stimulation of the motoneurons pathways. A decrease in the force of neurally evoked contractions is produced when L-Glutamate solutions at concentrations of  $10^{-3}$  up to  $10^{-8}$  g/ml and doses of 5, 10 and 30 microlitres were applied. No influence of the dose on the decreasing rate has been observed, The concentration does affect both isotonic and isometric contractions.

### INTRODUCCION.-

El L-Glutamato (producto de la disociación del ácido L-Glutámico, a pH fisiológico), está considerado actualmente como el transmisor más probable en la

unión neuromuscular de los insectos (Usherwood y Cull-Candy, 1975), como se admite en el caso de los Crustáceos (Gershenfeld, 1973; Usherwood, 1981).

Existe evidencia de la liberación de L-Glutamato en la unión neuromuscular a partir de las terminaciones nerviosas motoras excitadoras (Usherwood, 1972; Usherwood, Machili y Leaf, 1968). También se ha comprobado la existencia de receptores específicos de L-Glutamato en la membrana postsináptica (Cull-Candy, 1976; Gratton y Usherwood, 1980). Asimismo, la aplicación iontoforética de dicho transmisor en la unión neuromuscular excitadora, provoca despolarización en la membrana postsináptica y contracción en el músculo (Beranek y Miller, 1968). Además, parece que el L-Glutamato puede ser rápidamente inactivado por recaptación activa a cargo de estructuras gliales y traqueolares que acompañan a la placa motora, (Faeder, Matthews y Salpeter, 1974; Botham y cols. 1979).

Por otra parte, la amplitud de la respuesta generada por la aplicación de pulsos iontoforéticos de L-Glutamato, disminuye tras sucesivos y continuados pulsos (Usherwood y Machili, 1968). Lo mismo ocurre ante exposiciones prolongadas del músculo a este amoníaco, o tras su aplicación a elevadas concentraciones (Daoud y Usherwood, 1978).

Estos efectos son comparables a los que tienen lugar en la unión neuromuscular de los vertebrados cuando se aplica el neurotransmisor acetilcolina (Magazani y Vyskocil, 1976), y probablemente se deban a la pérdida de sensibilidad de los receptores situados en la membrana postsináptica (Anis, Clark, Gratton y Usherwood, 1981).

El presente trabajo se centra en el estudio farmacológico referido a las variaciones en la amplitud de las contracciones musculares, obtenidas a su vez por la estimulación eléctrica de las vías nerviosas motoras N3 y N5, y que se provocan por la aplicación directa, sobre el músculo, de soluciones de L-Glutamato en una amplia gama de concentraciones, manteniendo al animal vivo y entero durante las experiencias.

#### MATERIAL Y METODOS.-

Se utilizó el músculo extensor tibial de la pata metatorácica del ortóptero *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775), cuyos individuos adultos, machos y hembras, procedían de una colonia que se mantiene en nuestro laboratorio.

Inmovilizado al animal sujeto a un bloque de plastelina, se procede a la fijación del abdomen y de las patas pro y mesotorácicas, así como el fémur de las metatorácicas, dejando libre únicamente la tibia del tercer par de patas, que se utiliza como palanca quimográfica natural ligándola directamente a la palanca inscriptora del quimógrafo o al transductor isométrico, según se registren contracciones isotónicas o isométricas respectivamente (Díaz Mayans y cols. 1980).

Las contracciones del músculo extensor de la tibia se obtienen por estimulación eléctrica de sus vías nerviosas motoras N3 y N5 (Hoyle, 1974). Para ello se disecciona la cutícula ventral torácica dejando libre acceso a dichas vías nerviosas y se colocan sobre ellas, por contacto, los electrodos conectados a un estimulador convencional de onda cuadrada, siguiendo la técnica descrita por Díaz Mayans y cols. (1983).

Las soluciones de L-Glutamato se aplicaron por instilación directa sobre el músculo, mediante micropipetas automáticas Socorex, para lo cual se diseccionó la cutícula femoral ventral en toda su extensión, y se eliminó el músculo flexor de la tibia, antagonista del extensor tibial, que se encuentra adosado a él. La preparación queda así dispuesta, con el músculo extensor situado en el fondo de la

cavidad femoral que se utiliza como recipiente *in situ*, contenedor natural de la preparación experimental.

Durante el montaje de la preparación experimental, las porciones desprovistas de cutícula se mantuvieron irrigadas con abundante líquido fisiológico según Usherwood y Grundfest (1966), y después de cada aplicación de transmisor se lavó repetidamente la preparación con el mismo líquido fisiológico, con el fin de eliminar el L-Glutamato que pudiera haber quedado alojado en el interior de la cavidad femoral.

El estudio se realizó sobre contracciones isotónicas e isométricas. Las contracciones isotónicas se registraron mediante un quimógrafo convencional, y las isométricas con un oscilógrafo Washington 400 MD, y el correspondiente transmisor isométrico. En todos los casos la velocidad de avance del papel de registro fue de 0,25 mm/s. Se empleó una frecuencia de estimulación fija de 12 est/min y un voltaje que varió, según los casos, entre 0,5 y 2,5 voltios.

Todas las experiencias se llevaron a cabo a temperatura ambiente, 20-25°C. Para la aplicación del transmisor se emplearon soluciones de L-Glutamato sódico (Merck), en una amplia gama de concentraciones, desde  $10^{-3}$  hasta  $10^{-16}$  g/ml, y se instilaron dosis de 5, 10 y 30 microlitros.

Para cada preparación experimental se obtuvo un registro de contracciones musculares correspondientes a la aplicación de una dosis de solución de L-Glutamato en una concentración determinada, y se calculó la disminución en la amplitud de tales contracciones, producida por la aplicación del transmisor. En cada caso se registró una serie previa de 10 contracciones basales antes de la aplicación del transmisor. Se midió cada una de las amplitudes de las contracciones con control, y se calculó la amplitud media que se expresó en milímetros.

Por otra parte se midió la amplitud mínima conseguida tras la aplicación del transmisor, y se calculó el porcentaje de disminución provocado respecto del valor medio de las contracciones previas. Se obtuvieron así los datos de 'tanto por ciento' de disminución de las amplitudes para cada dosis y concentración de L-Glutamato aplicado.

#### RESULTADOS.-

Se ha observado repetidamente que las concentraciones de  $10^{-8}$  g/ml o mayores, hasta  $10^{-3}$  g/ml, producen disminución en la amplitud de las contracciones tanto isotónicas como isométricas, y que este efecto es reversible si la concentración no sobrepasa de  $10^{-5}$  g/ml. (Fig. 1).

**Contracciones isotónicas:** Se emplearon un total de 83 preparaciones experimentales. Los porcentajes de disminución (%D), calculados para cada dosis y cada concentración de L-Glutamato aplicadas, aparecen representados en la figura 2.

Mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA), se compararon los valores de %D correspondientes a cada una de las dosis dentro de cada una de las concentraciones empleadas, obteniéndose los siguientes resultados:

$10^{-3}$ g/ml;	F = 0,48; F(2;12;0,05) = 3,89 > 0,48	—	No significativo.
$10^{-4}$ "	F = 2,34; F(2;11;0,05) = 3,98 > 2,34	—	"
$10^{-5}$ "	F = 0,61; F(2;13;0,05) = 3,81 > 0,61	—	"
$10^{-6}$ "	F = 0,28; F(2;11;0,05) = 3,98 > 0,28	—	"
$10^{-7}$ "	F = 0,83; F(2;8;0,05) = 4,47 > 0,83	—	"
$10^{-8}$ "	F = 1,83; F(2;10;0,05) = 4,10 > 1,83	—	"

Es decir, las dosis no parecen influir en el porcentaje de disminución producido

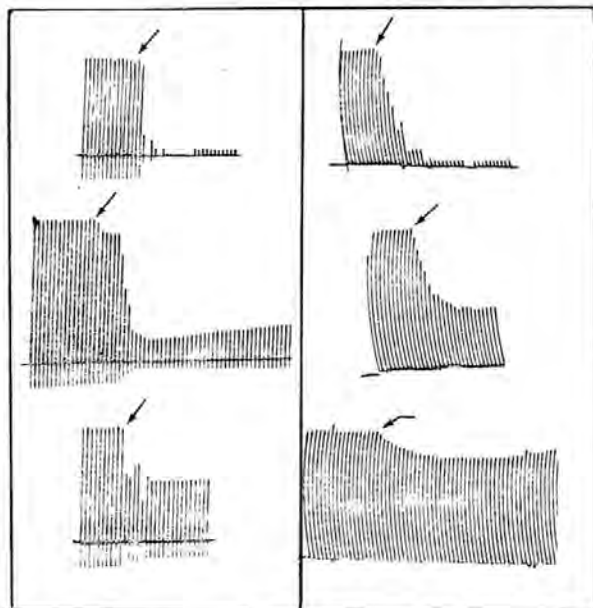


Figura 1.-

Disminución, a cargo del L-Glutamato, de la amplitud de las contracciones provocadas por estimulación eléctrica de las vías nerviosas motoras N3 y N5, en el músculo extensor tibial de *Schistocerca gregaria*.

Contracciones isotónicas (Izquierda) e isométricas (Derecha).

Concentración elevada (arriba), intermedia (centro) y débil (abajo).

El momento de la aplicación del L-Glutamato se indica mediante una flecha.

Nótese el distinto grado de disminución provocado por las distintas concentraciones de L-Glutamato aplicado.

por la aplicación de una solución de L-Glutamato de cada concentración determinada.

El ANOVA que se obtuvo comparando los valores de %D que corresponden a cada concentración, dió como resultado:

$$F = 45,76; F(51;77;0,01) = 1,90 < 45,76 \text{ — Altamente significativo}$$

Es decir, la concentración de la solución de L-Glutamato influye con independencia de la dosis, en el %D producido.

Al comparar los valores de %D correspondientes a cada concentración, mediante el test de la t de Student, se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla I, de los que se deduce que a efectos de %D, son equiparables las concentraciones de  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  g/ml, lo mismo que  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  g/ml, y  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  g/ml

**Contracciones isométricas:** Se emplearon un total de 54 preparaciones experimentales. En la Figura 2, aparecen los valores de porcentaje de disminución correspondientes a cada dosis y a cada concentración de las soluciones de L-Glutamato aplicadas. No se obtuvieron datos de %D correspondientes a la aplicación de 30 microlitros de L-Glutamato de  $10^{-8}$  g/ml. Al igual que ocurría con las contracciones isotónicas, al aumentar la concentración, aumenta el %D. Figurá 1. Mediante el ANOVA se compararon los valores de %D correspondientes a cada dosis dentro de cada concentración, obteniéndose los resultados siguientes:

$10^{-3}$ g/ml;	F = 0,79;	F(2;6;0,05) = 5,14 > 0,79	— No significativo.
$10^{-4}$ "	F = 3,29;	F(2;7;0,05) = 4,74 > 3,29	— "
$10^{-5}$ "	F = 0,48;	F(2;7;0,05) = 4,74 > 0,48	— "
$10^{-6}$ "	F = 0,48;	F(2;6;0,05) = 5,14 > 0,48	— "
$10^{-7}$ "	F = 3,16;	F(2;6;0,05) = 5,14 > 3,16	— "
$10^{-8}$ "	F = 3,88;	F(1;5;0,05) = 6,61 > 3,89	— "

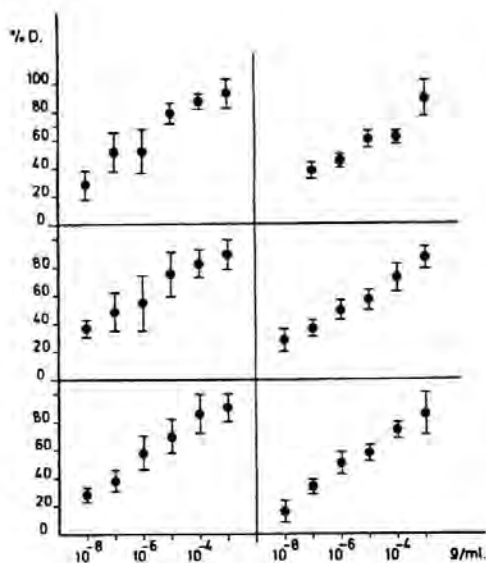


Figura 2. Disminución (%) de las contracciones isotónicas (izquierda) e Isométricas (derecha), tras la aplicación de soluciones de L-Glutamato en dosis de 5, 10 y 30 microlitros, para las concentraciones indicadas. (Valor medio  $\pm$  desviación típica).

#### DISCUSION.-

El efecto disminuidor de la amplitud de las contracciones musculares, producido por la aplicación de soluciones de L-Glutamato en concentraciones mayores de  $10^{-9}$  g/ml, parece que se deba a un exceso de transmisor que ocupa los receptores subsinápticos específicos del neurotransmisor natural, impidiendo así su activación, como ya indicaron otros autores (Usherwood y Machili, 1968; Clements y May, 1974), y que en definitiva se traduce en una pérdida de sensibilidad de dichos receptores (Anis y cols. 1981).

Al aumentar la concentración, aumenta el efecto disminuidor, y la dosis aplicada no parece influir en dicho efecto. Clements y May (1974), encuentran valores del orden de  $10^{-5}$  g/ml de L-Glutamato, como la concentración que provoca una disminución del 50%, estudiando registros de contracciones isométricas. En nuestras experiencias, con concentraciones del orden de  $10^{-6}$  g/ml se obtuvieron valores de %D de  $49,04 \pm 5,2$ , mientras que concentraciones del orden de  $10^{-5}$  g/ml provocan una disminución del  $58,07 \pm 5,5\%$ . Estas discrepancias pueden ser debidas a que las preparaciones usadas por nosotros (instilación directa) son más sensibles al transmisor que las de dichos autores (fémur perfundido). Las preparaciones de este tipo son menos sensibles al L-Glutamato que las preparaciones aisladas (Clements y May, 1974). En nuestro caso, las preparaciones experimentales sin ser aisladas, presentan una mayor facilidad a la actuación del transmisor,

Es decir, la dosis tampoco parece influir en el porcentaje de disminución producido por la aplicación de soluciones de L-Glutamato de cada concentración determinada.

El ANOVA que se obtuvo comparando los valores de %D que corresponden a cada concentración dió como resultado:  $F = 97,61$ ; y dado que la  $F$  para 5 y 48 g.d.l y a un nivel de significación de 0,01, da un valor de 3,50 que es menor que 97,61, las diferencias resultan ser altamente significativas. Es decir, igual que en el caso de las contracciones isotónicas, la concentración de transmisor aplicada influye en el %D producido.

En consecuencia, se compararon los valores de dicho %D correspondientes a cada concentración, mediante el test de  $t$  de Student, cuyos resultados (Tabla II), indican que cada una de las concentraciones causa una disminución en la amplitud de las contracciones isométricas cuyo porcentaje, respecto a la contracción original, es significativamente distinto del de las provocadas por la aplicación de las demás concentraciones.

que las preparaciones de fémur perfundido.

TABLA I  
Valores de t de Student y su significación obtenidos al comparar entre sí, los %D correspondientes a cada una de las concentraciones empleadas. Contracciones isotónicas.

$10^{-3}$ $10^{-4}$ }	$t = 1,37$ ; $t(27;0,05) = 2,052 > 1,37$ — No significativo.
$10^{-4}$ $10^{-5}$ }	$t = 1,73$ ; $t(28;0,05) = 2,048 > 1,73$ — No significativo.
$10^{-5}$ $10^{-6}$ }	$t = 3,94$ ; $t(28;0,01) = 2,763 < 3,94$ — Significativo.
$10^{-6}$ $10^{-7}$ }	$t = 1,24$ ; $t(23;0,05) = 2,069 > 1,24$ — No significativo.
$10^{-7}$ $10^{-8}$ }	$t = 3,71$ ; $t(22;0,01) = 2,819 < 3,71$ — Significativo.
$10^{-3}$ $10^{-5}$ }	$t = 2,89$ ; $t(29;0,01) = 2,796 < 2,89$ — Significativo.
$10^{-4}$ $10^{-6}$ }	$t = 5,84$ ; $t(26;0,01) = 2,779 < 5,84$ — Significativo.
$10^{-6}$ $10^{-8}$ }	$t = 5,06$ ; $t(25;0,01) = 2,797 < 5,06$ — Significativo.

TABLA II  
Valores de t de Student y su significación obtenidos al comparar entre sí, los %D correspondientes a cada una de las concentraciones empleadas. Contracciones isométricas.

$10^{-3}$ $10^{-4}$ }	$t = 5,19$ ; $t(17;0,001) = 3,96 < 5,19$ — Alt. Signifvo.
$10^{-4}$ $10^{-5}$ }	$t = 3,59$ ; $t(18;0,002) = 3,61 > 3,59$ $t(18;0,01) = 2,87 < 3,59$ } — Significativo.
$10^{-5}$ $10^{-6}$ }	$t = 3,68$ ; $t(17;0,002) = 3,64 < 3,68$ $t(17;0,001) = 3,96 > 3,68$ } — Significativo.
$10^{-6}$ $10^{-7}$ }	$t = 6,25$ ; $t(16;0,001) = 4,01 < 6,25$ — Alt. Signifvo.
$10^{-7}$ $10^{-8}$ }	$t = 4,51$ ; $t(14;0,001) = 4,14 < 4,51$ — Alt. Signifvo.

La disminución de las amplitudes provocada por la aplicación de concentraciones de soluciones de L-Glutamato mayores de  $10^{-8}$  g/ml, y en la mayoría de los casos, consiste en un efecto reversible, recuperándose las amplitudes originales en mayor o menor tiempo. En algunos casos, y siempre con concentraciones mayores de  $10^{-5}$  g/ml, no se produce tal recuperación, bien por rotura de la preparación (desprendimiento de la pata metatorácica por la articulación coxotrocantérea), o bien por afuncionalidad del músculo objeto de las experiencias.

#### BIBLIOGRAFÍA.-

- ANIS, N.A.; CLARK, R.B.; GRATION, K.A.F. y USHERWOOD, P.N.R., 1981. Influence of desensitization of glutamate receptors on locust muscle. *J. Physiol.* 312:345-364.
- BERANEK, R. y MILLER, P.L., 1968. The action of iontophoretically applied glutamate on insect muscle fibres. *J. exp. Biol.*, 49:83-93.
- BOTHAM, R.P.; BEADLE, D.J.; HART, R.P.; POTTER, L. y WILSON, R.G., 1979. Glutamate uptake after stimulation-induced depletion of vesicles numbers in neuromuscular junctions of *Locusta migratoria* L. *Cell Tissue Res.* 203:379-386.
- CLEMENTS, A.N. y MAY, T.E., 1974. Pharmacological studies on a locust neuromuscular preparation. *J. exp. Biol.*, 61:421-442.
- CULL-CANDY, S.G., 1976. L-Glutamate receptors in locust muscle fibres. En THESELLEFF, S. (ed.): Motor innervation of muscle:263-288. Academic Press. London & New York.
- DAOUD, M.A.R. y USHERWOOD, P.N.R., 1978. Desensitization and potentiation during glutamate application to locust skeletal muscle., *Comp. Biochem. Physiol.* 59C:105-110.
- DIAZ MAYANS, J.; ANDREU MOLINER, E.S. y NUÑEZ CACHAZA, A., 1980. Evaluación de contracciones isotónicas del músculo extensor tibial de *Schistocerca gregaria*, provocadas por estimulación eléctrica del ganglio metatorácico y de su vía neural motora a dicho músculo. *Pharmacia Mediterránea.* 13:916-921.
- DIAZ MAYANS, J.; ANDREU MOLINER, E.S. y NUÑEZ CACHAZA, A., 1983. Alteraciones en las contracciones del músculo extensor tibial metatorácico de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) tras la aplicación *in vivo* de GABA., *Bol. Asoc. esp. Entom.* 7:197-205.
- FAEDER, I.R.; MATTHEWS, R. y SALPETER, M., 1974. (3H) Glutamate uptake at insect neuromuscular junctions: Effect of chlorpromazine., *Brain Research.* 80:53-70.
- GERSCHENFELD, H.M., 1973. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53:1-119.
- GRATION, K.A.F. y USHERWOOD, P.N.R., 1980. Interaction of glutamate with amino-acid receptors on locust muscle. *Verth. dt. zool. Ges.* 73:122-132.

- HOYLE, G., 1974. *Neural control of skeletal muscle*. En ROCKSTEIN, M. (ed): *The Physiology of insecta*. Vol.4: 175-236. Academic Press. Lond. & N.Y.
- MAGAZANIK, L.G. y VYSKOCIL, F., 1976. *Desensitization at the neuromuscular junction*. En THESLEFF, S. (ed): *Motor innervation of muscle*: 151-176. Academic Press. London & New York.
- USHERWOOD, P.N.R., 1972. *Transmitter release from insect excitatory motor nerve terminals*. *J. Physiol. Lond.* 227:527-551.
- USHERWOOD, P.N.R., 1981. *Glutamate synapses and receptors on insect muscle*. En DI CHIARA, G. y GESSA, G.L. (ed): *Glutamate as a neurotransmitter*: 183-193. Raven Press. New York.
- USHERWOOD, P.N.R. y CULL-CANDY, S.G., 1975. *Pharmacology of somatic nerve-muscle synapses*. En USHERWOOD, P.N.R. (ed): *Insect muscle*:207-280. Academic Press. London & New York.
- USHERWOOD, P.N.R. y GRUNDFEST, H., 1966. *Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects*. *J. Neurophysiol.* 28:497-518.
- USHERWOOD, P.N.R. y MACHILI, P., 1968. *Pharmacological properties of excitatory neuromuscular synapses in the locust*. *J. exp. Biol.* 49:341-361.
- USHERWOOD, P.N.R.; MACHILI, P. y LEAF, G., 1968. *L-Glutamate at insect excitatory nerve muscle synapses*. *Nature Lond.* 219:1169-1172.

Fecha de recepción: 7 de mayo de 1984

J. Javier Díaz Mayans  
 Departamento de Fisiología Animal  
 Facultad de Ciencias Biológicas  
 Universidad de Valencia  
 Avda. Doctor Moliner 50  
 BURJASOT Valencia.