



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“PLASTICIDAD VISCEROSENSORIAL EN
YEYUNO DE RATÓN INFECTADO CON
ASPICULURIS TETRAPTERA”**

Tesis que presenta

EGINA CRISEIDA VILLALOBOS HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

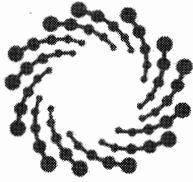
Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Carlos Barajas López

Dra. Marcela Miranda Morales

San Luis Potosí, S.L.P., Junio 2017



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Plasticidad Viscerosensorial en Yeyuno de Ratón Infectado con *Aspicularis tetraptera****" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Egina Criseida Villalobos Hernández y aprobada el **trece de julio de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Carlos Barajas López
Codirector de la tesis

Dra. Marcela Miranda Morales
Codirectora de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

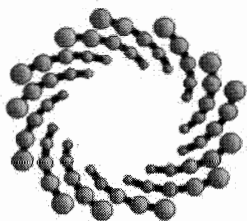
Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Carlos Barajas López (Proyecto no. 81409, 219859) y la Dra. Marcela Miranda Morales.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 250280 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 095 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2017, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|---|------------------------|---------------|
| Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro | Presidenta | IPICYT |
| Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado | Secretario | UASLP |
| Dr. Carlos Barajas López | Sinodal | IPICYT |
| Dra. Marcela Miranda Morales | Sinodal externo | UASLP |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Egina Criseida Villalobos Hernández

sobre la Tesis intitulada:

*Plasticidad Viscerosensorial en Yeyuno de Ratón Infectado con *Aspicularis tetraptera**

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López
Dra. Marcela Miranda Morales (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

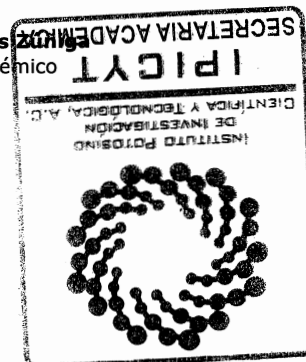
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2017.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores
Secretario Académico



Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis mentores principales, los cuales ha dedicado su vida entera a formarme como persona. Ellos se han esforzado para darme lo mejor, se han preocupado por mi futuro, desvelado con mis tropiezos, han tenido una gran paciencia y más que todo, han sido un gran ejemplo a seguir. Son personas admirables que me dieron la mejor educación, valores y fortalezas, sin las cuales, no hubiera llegado hasta donde me encuentro. Es por esto, que no solo les dedico esta tesis, sino les dedico mi vida entera a mis queridos padres Guillermo Villalobos López y Ma. Guadalupe Hernández Romo.

Agradecimientos

Hay una frase que dice “agradecer es tan simple, pero representa algo tan grande”.

Quiero agradecer a:

Mi codirector el Dr. Carlos Barajas por asesoría durante todo el doctorado, su apoyo incondicional y su gran humanidad. Ya que jamás me dejo sola en ningún problema, siempre dio la cara por mí. Agradezco también a mi codirectora la Dra. Marcela Miranda Morales por sus comentarios, asesoría, ayuda técnica, por enseñarme pacientemente la técnica de registro en nervio, por estar al pendiente de mis avances, su paciencia y principalmente por ser una persona tan positiva, con la cual se puede platicar de cualquiera cosa y siempre tendrá buenos consejos para dar.

Mi asesor el Dr. Roberto Salgado Delgado por sus comentarios y su ayuda durante los experimentos con citocinas. Su buena asesoría logro que sacáramos las cosas a tiempo.

Mi asesora la Dra. Irene Castaño Navarro la cual siempre tiene muy buenos comentarios y sugerencias para el desarrollo del proyecto. Mi gran admiración para ella por ser una mujer tan inteligente, fuerte, dedicada, por su gran capacidad integrativa y por su gran corazón.

La Dra. Elizabeth Martínez Salazar por su amabilidad, sin conocerme me brindo su ayuda en la identificación de los parásitos, me presto sus instalaciones, preparo las muestras para el SEM, realizó la identificación molecular del parásito y dispuso las muestras en la colección biológica.

El Dr. David Reed por darme la oportunidad de trabajar en con él en Canadá. Por su asesoría, confianza en mí, sus enseñanzas, por darme ánimos cuando no me salían las cosas, y por la oportunidad de ir a congresos, los cuales fueron una gran experiencia para mí.

La Dra. Olga A. Patrón Soberano por su ayuda técnica en la parte histológica y su buen humor. Ella me ayudó desde la preparación de los tejidos, inclusión, tinción, hasta el montaje de las laminillas.

La Técnico Rosa Espinosa Luna por su ayuda técnica durante todos estos años, siempre ayudándonos en todo lo que puede, desde perfusiones de animales, disecciones, cultivos, extracciones de tejidos, etc. Más importante mencionar que agradezco su apoyo moral, su preocupación por nuestro futuro, sus consejos y su deliciosa comida (especialmente los panes). Sin duda estoy muy agradecida por su amistad, es una persona con un gran corazón y una gran fuerza que siempre usa para ayudar al prójimo.

Gaby Ruiz Velarde por su ayuda en los experimentos de registro en nervio, ya que sin ella la parte de melatonina no habría avanzado tanto. Pero más que nada, agradezco que es una persona con un gran carisma y gran corazón, la cual siempre tiene una sonrisa para compartir y ayuda que brindar (gracias por cuidar de Kyra).

Kare S. Gómez Coronado, la cual sin titubear accedió a ayudarme en los experimentos de extracción de RNA, aunque eso implicara salir a altas horas de la madrugada y lo hizo con una actitud positiva, responsabilidad y con un gran espíritu de ayuda. Por ser una persona admirable tanto en el ámbito profesional como en el personal.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a:

Idun Berenice pues ella es el principal cimiento de la construcción de mi vida profesional. Me enseñó el esfuerzo que se necesita para lograr las cosas, me habló sobre responsabilidades, fomento mis sueños con su constante apoyo y acertados consejos, y cada uno de sus actos me han llevado a admirarla más y más cada día. No podría estar más agradecida de tenerla como hermana mayor y ejemplo a seguir.

Inari Cirene, ella es y ha sido mi cómplice en todo, siempre está dispuesta a escucharme, logra sacar mi estrés y me brinda su apoyo en cualquier cosa que necesite. No hay una sola ocasión que no admire alguna nueva habilidad que ella haya desarrollado, siempre busca hacer cosas nuevas e innovadoras. Sus virtudes infinitas y su gran corazón me llevan a estar orgullosa de que sea mi hermana.

Guillermo Esaú porque me ha demostrado que es muy capaz de hacer todo lo que se propone, de esforzarse por conseguir lo que quiere, de responsabilizarse de los trabajos en casa y de brindar ayuda a todos. Mi mayor agradecimiento es porque siempre me escucha y me muestra en cada una de sus acciones ese gran y noble corazón que tiene, el cual siempre pone primero antes de tomar cualquier decisión. Cada día que pasa me doy cuenta en el gran hombre que se está convirtiendo.

Francisco J Pérez de los Santos, por ser uno de los principales soportes en mi carrera, ya que siempre ha estado en mis mejores y peores momentos; en los buenos momentos para brindar por ellos y en los malos para abrazarme y consolarme. Por escucharme, apoyarme en cada uno de mis proyectos, brindarme su cariño, su comprensión y por caminar a mi lado durante todo este trayecto le estoy muy agradecida.

A mis amigas de toda la vida Yohari, Gaby, Karla, Lilia, Maricela, Celeste y Leslie, porque a pesar del tiempo y de la distancia no dejan de creer en mí, de escucharme, de darme palabras de aliento y de hacerme reír. A todas ellas las quiero y admiro como mujeres luchadoras que son y como grandes personas en las que se han convertido.

A mi maestra Lila Monaga por todas sus enseñanzas. Por mostrarme que en la vida hay que fluir, no hay posiciones estáticas, siempre se está en constante cambio y siempre se puede mejorar. Que sin esfuerzo la mente divaga y nos conduce a lugares donde no queremos ir o donde es muy fácil perderse.

A mis amigos de profesión Lupita Serna y Abraham que, por su esfuerzo y dedicación, cada día me demuestran que se puede ser mejor y que nunca se debe de dejar de soñar.

A mis amigos de trabajo Lili Méndez, Raúl, Néstor, Raquel, Lalo, Andrómeda, Lupita Nieto y Flor, por todo el tiempo compartido, sus enseñanzas, sus consejos, asesorías y más que nada por brindarme su valiosa amistad que aún perdura a pesar de la distancia. Así mismo, a las nuevas niñas del laboratorio Mariela, Jessica y Stephanie por ser tan alegres y dedicadas.

Por último y no por eso el menos importante, a Gehenna, Bere y Gema porque a pesar de que tenemos poco tiempo de juntarnos, siento una gran admiración por ellas, ya que son mujeres luchadoras, pacientes, que se proponen algo y buscan conseguirlo, que se levantan de las adversidades y que se ayudan unas a otras para salir adelante.

Contenido

| | |
|--|-------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos Institucionales | iii |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Contenido | x |
| Lista de tablas | xii |
| Lista de figuras | xiii |
| Anexos | xv |
| Abreviaturas | xvi |
| Glosario | xviii |
| Resumen | xx |
| Abstract | xxi |
| | |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| Tracto Gastrointestinal (GI) | 1 |
| Información sensorial en el GI | 4 |
| ⊕ Tipo I: Aferentes laminares intraganglionares | 6 |
| ⊕ Tipo II. Aferentes intramusculares | 7 |
| ⊕ Tipo III. Aferentes mucosas | 8 |
| ⊕ Tipo IV. Aferentes mucosas-musculares | 9 |
| ⊕ Tipo V. Aferentes Vasculares | 10 |
| ⊕ Aferentes silenciosas | 10 |
| ⊕ Aferentes primarias entéricas viscerofugales | 11 |
| PLASTICIDAD VISCEROSENSORIAL EN YEYUNO DE RATÓN INFECTADO CON <i>ASPICULURIS TETRAPTERA</i> | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| MATERIALES Y METODOS | 15 |
| Animales | 15 |
| Infección e identificación del parasito | 15 |
| Preparación del tejido para registro multiunitario | 17 |
| Registro multiunitario | 17 |

| | |
|--|----|
| Análisis de espiga única | 18 |
| RT-PCR Semi-cuantitativa | 18 |
| Histología | 19 |
| Análisis de datos | 20 |
| Fármacos | 20 |
| RESULTADOS | 22 |
| Identificación morfológica y molecular de los gusanos | 22 |
| Papel de los receptores colinérgicos en las respuestas mecanosensoriales | 25 |
| Antagonista muscarínico disminuye la respuesta a distensión de las espigas de alto-umbral en los ratones infectados | 27 |
| La infección por parásitos incrementa la expresión de citocinas pro-inflamatorias, pero no genera cambios histológicos evidentes | 29 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| CONCLUSIONES | 37 |
| BIBLIOGRAFIA | 38 |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| PLASTICIDAD VISCEROSENSORIAL EN YEYUNO DE RATÓN INFECTADO CON <i>ASPICULURIS TETRAPTERA</i> | 12 |
| Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la RT-PCR semi-cuantitativa | 19 |
| Tabla 2. Alineamiento de las dos secuencias de <i>A. tetraptera</i> | 22 |
| Tabla 3. Actividad espontánea multiunitaria y unitaria en ratones control e infectados. | 29 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| Figura 1. Diferencias en la anatomía del tracto gastrointestinal (GI) entre humano y ratón | 2 |
| Figura 2. Esquema representativo de las distintas capas del intestino. | 3 |
| Figura 3. Esquema de las vías nerviosas aferentes del intestino. | 5 |
| Figura 4. Cinco tipos de neuronas sensoriales aferentes en el intestino. | 9 |
| PLASTICIDAD VISCEROSENSORIAL EN YEYUNO DE RATÓN INFECTADO CON <i>ASPICULURIS TETRAPTERA</i> | 12 |
| Figura 5. Esquema representativo del equipo utilizado para la obtención de registros multiunitarios. | 21 |
| Figura 6. Estructuras características del género <i>A. tetraptera</i> . | 23 |
| Figura 7. La actividad espontánea del nervio incrementa en el ratón infectado. | 24 |
| Figura 8. La inhibición de la contracción no tiene un efecto diferencial en la actividad espontánea del nervio entre el grupo control e infectado. | 25 |
| Figura 9. Una pequeña proporción de la actividad espontánea del nervio involucra receptores nicotínicos, pero no muscarínicos, en ambos grupos | 26 |
| Figura 10. La respuesta mecanosensorial es similar entre el grupo control y el infectado. | 26 |
| Figura 11. Los receptores muscarínicos están involucrados en la respuesta a distensión, pero solo en el grupo infectado | 27 |
| Figura 12. Las espigas se clasificaron por su morfología y su respuesta al incremento en la presión intraluminal. | 28 |
| Figura 13. En el ratón infectado, los receptores muscarínicos están involucrados en la respuesta a distensión de las fibras de alto umbral en nervios mesentéricos de yeyuno. | 30 |
| Figura 14. No se encontraron diferencias significativas en el grado de inflamación del yeyuno y del colon entre ambos grupos. | 31 |
| Figura 15. Incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias en el yeyuno y colon de ratones infectados. | 32 |
| ANEXO 1 | 50 |

| | |
|--|----|
| LA MELATONINA DISMINUYE LA RESPUESTA MECANOSENSORIAL Y LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EN NERVIOS MESENTÉRICOS DE YEYUNO DE RATÓN | 50 |
| Figura 16. La melatonina no tiene efecto sobre la actividad aferente espontánea del yeyuno de ratón. | 56 |
| Figura 17. La acetilcolina incrementó la frecuencia de disparo de los nervios aferentes en una manera concentración dependiente. | 57 |
| Figure 18. La melatonina inhibe la respuesta inducida por acetilcolina. | 58 |
| Figure 19. La melatonina inhibe la respuesta inducida por carbacol | 58 |
| Figura 20. Proporción de los receptores muscarínicos y nicotínicos que responden a agonistas colinérgicos. | 59 |
| Figura 21. La melatonina inhibe la respuesta inducida por los receptores nicotínicos. | 60 |
| Figure 22. La melatonina tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta mecanosensorial de los nervios mesentéricos | 61 |
| Figure 23. El DMSO no afecta la actividad mecanosensorial. | 62 |
| Figure 24. La mecanosensibilidad de las espigas de bajo umbral no se ve afectada por la aplicación de melatonina. | 63 |
| Figura 25. Las espigas de amplio rango reducen su respuesta a distensión cuando se aplica melatonina. | 64 |
| Figura 26. La melatonina disminuye la respuesta a distensión de las fibras de alto umbral en yeyuno de ratón. | 65 |
| Figure 27. La mecanosensibilidad de las espigas de bajo umbral no se ven afectadas por la aplicación de DMSO. | 66 |
| Figura 28. Las espigas de amplio rango no son afectadas por DMSO. | 67 |
| Figura 29. La actividad mecanosensorial de las fibras de alto umbral en yeyuno de ratón no se ve afectada por la aplicación de DMSO. | 68 |
| ANEXO 2 | 72 |
| PRODUCTOS OBTENIDOS | 72 |

Anexos

| | |
|--|----|
| ANEXO 1 | 50 |
| LA MELATONINA DISMINUYE LA RESPUESTA MECANOSENSORIAL Y LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EN NERVIOS MESENTÉRICOS DE YEYUNO DE RATÓN | 50 |
| INTRODUCCIÓN: | 50 |
| MÉTODOS | 54 |
| Animales | 54 |
| Preparación del tejido para registro multiunitario | 54 |
| Registro multiunitarios | 54 |
| Análisis de espiga única | 54 |
| Análisis de datos | 54 |
| Fármacos | 55 |
| RESULTADOS | 56 |
| La melatonina reduce la respuesta de los agonistas colinérgicos | 56 |
| La melatonina inhibe la respuesta colinérgica a través de los receptores nicotínicos. | 59 |
| La melatonina inhibe la respuesta de los nervios mesentéricos inducida por la distensión intraluminal en el yeyuno de ratón | 60 |
| La melatonina inhibe principalmente a las fibras WDR y a las de alto umbral. | 62 |
| DISCUSIÓN | 69 |
| CONCLUSIONES | 71 |
| ANEXO 2 | 72 |
| PRODUCTOS OBTENIDOS | 72 |

Abreviaturas

| | |
|--------------|---|
| μL | Microlitros |
| μm | Micrometros |
| μM | Micromolar |
| 5.8S | RNA ribosomal subunidad 5.8S |
| 5-HTP | 5-Hidroxitriptofano. Llamado serotonina. |
| AANAT | N-acetiltransferasa |
| ACh | Acetilcolina |
| ANOVA | Análisis de Varianzas (ANalysis Of VAriances) |
| ATP | Trifostato de Adenosina (Adenosine Tryphosphate) |
| CCK | Colecistoquinina |
| CNS | Sistema Nervioso Central (Central Nervous System) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DRG | Ganglio de la Raíz Dorsal (Dorsal Root Ganglion) |
| ENS | Sistema Nervioso Entérico (Enteric Nervous System) |
| GABA | Ácido γ-aminobutírico (Gamma-AminoButyric Acid) |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa |
| GI | Tracto Gastrointestinal (GastroIntestinal tract) |
| GLP | Péptido Parecido al Glucagon (Glucagon Like-Peptide) |
| GPCR | Receptores Acoplados a los Proteínas G (G-Protein Copled Receptor) |
| High | Espigas de alto umbral de activación |
| HIOMT | Hidroxindol-O-metiltransferasa |
| IBS | Síndrome del Intestino Irritable (Irritable Bowel Syndrome) |
| ICC | Células Intersticiales de Cajal (Interstitial Cajal Cells) |
| IGLE | Aferentes Laminares Intraganglionicas (Intraganglionic Laminar Endings) |
| IMA | Arreglos Intramusculares (Intramuscular Array) |
| INFγ | Interferón gamma |
| ITS | Espaciador Transcrito Interno (Internal Transcribed Spacer) |

| | |
|---------------|--|
| Low | Espigas de bajo umbral de activación |
| M | Molar |
| mAChRs | Receptores muscarínicos |
| Min | Minutos |
| mM | Milimolar |
| mmHg | Milímetros de mercurio |
| nAChRs | Receptores nicotínicos |
| NG | Ganglio nodoso (Nodose ganglia) |
| NMDA | Receptores N-metil-D-aspartato |
| pb | Pares de Bases |
| PCR | Reacción en cada de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) |
| PNS | Sistema Nervioso Periférico (Peripheral Nervous System) |
| RT-PCR | Reacción en cada de la polimerasa con transcripatasa reversa (Reverse Trasncription Polymerase Chain Reaction) |
| s | Segundos |
| S.E.M. | Error Estándar de la Media (Estándar Error of the Mean) |
| SEM | Microscopio Electrónico de Barrido (Scanning Electron Microscope) |
| Th1/2 | Linfocitos T auxiliares (T Helper) |
| TNBS | Ácido Trinitrobenceno Sulfónico (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) |
| TRP | Receptores de Potencial Transitorios (transient receptor potential cation channels) |
| WDR | Espigas de amplio rango dinámico (Wide Dynamic Range) |

Glosario

Cizallamiento: Es la fuerza aplicada contra una superficie a medida que los tejidos se deslizan en planos opuestos, pero paralelos. Lo que ocasiona fricción.

Corteza Cingulada: Es parte del cerebro, situado en el aspecto medial de la corteza cerebral. La corteza cingulada incluye el giro cingulada. Esta corteza es usualmente considerada como parte del lóbulo límbico.

Extramural: Se encuentran fuera de la pared del tubo digestivo.

Fibras nociceptivas: Son fibras nerviosas aferentes las cuales mandan señales al cerebro en respuesta estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Estas fibras se encuentran en muchos tejidos corporales como la piel, vísceras, vasos sanguíneos, músculo, tejido conectivo, periostio y meninges, etc. Estos receptores transmiten la información a través de fibras nerviosas que son clasificadas dependiendo de su diámetro y grado de mielinización en fibras A y C.

Fibras A δ : Las fibras A se subdividen en los tipos α , β , γ y δ . De estos subtipos, las fibras A δ son las que conducen las señales nociceptivas. Son fibras de pequeño diámetro y mielinizadas que conducen impulsos nerviosos relativamente rápidos variando de 5 a 50 metros por segundo. Algunas de ellas responden a la estimulación química o térmica en forma proporcional con el grado de lesión tisular; otras, sin embargo, se activan principalmente por estimulación mecánica, como presión, lo que muestra que estas fibras se localizan en el lugar de la lesión. Algunas fibras A δ pueden tener respuestas polimodales y comenzar a excitarse después de que se haya alcanzado el umbral alto de excitación tras la producción del daño tisular.

Fibras C; Son fibras nerviosas de conducción lenta, inferior a la rapidez de conducción de las fibras A delta. Son estructuras no mielinizadas o amielínicas, que responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Se calcula que existen alrededor de 200 fibras tipo C por centímetro cuadrado de piel.

Intramural: Referente a que penetran la pared del tubo digestivo.

Neuronas Aferentes; También conocidas como neuronas sensoriales. Estas neuronas son las encargadas de llevar los impulsos nerviosos desde los órganos (donde se recibe la señal) hasta el sistema nervioso central.

Resumen

Plasticidad Viscerosensorial en Yeyuno de Ratón Infectado con *Aspiculuris tetraptera*

Aspiculuris tetraptera es un gusano observado frecuentemente en las instalaciones de los laboratorios de investigación, el cual infecta el ciego y el colon proximal del ratón. No obstante, poco se sabe acerca del impacto de esta infección en la sensibilidad del tracto gastrointestinal. En el presente estudio, nosotros investigamos los posibles cambios en la actividad espontánea del nervio mesentérico y la actividad mecanosensorial en las regiones libres de gusanos en ratones naturalmente infectados con *A. tetraptera*. En colon y yeyuno, se encontró una mayor cantidad de RNA mensajero de algunas citocinas pro-inflamatorias en animales infectados, sin embargo, no hay cambios entre ambos grupos a nivel histológico. A nivel funcional, la infección incrementa la frecuencia basal de disparo de los nervios mesentéricos en yeyuno. Además, nuestros hallazgos indican que los receptores nicotínicos, pero no los muscarínicos, participan de igual manera en la actividad espontánea en animales control e infectados. Sin embargo, y contrario al grupo control, durante la infección, la señalización muscarínica se eleva cuando se aplica un estímulo mecánico. En este trabajo, nosotros mostramos por primera vez, que las alteraciones en la actividad espontánea inducida por esta infección fueron independientes de la función colinérgica, pero los cambios en la mecanosensibilidad fueron mediados por receptores muscarínicos, y no por los nicotínicos, y específicamente en las fibras de alto umbral (activadas arriba de 20 mmHg), conocidas por su papel importante en la nocicepción. Estos cambios plásticos dentro de la señalización muscarínica podrían funcionar como un mecanismo compensatorio para mantener una respuesta mecanosensorial completa. Además, estos cambios indican que la infección por gusanos localizada en colon puede afectar otros tejidos lejos del sitio de infección.

PALABRAS CLAVE.

Respuesta mecanosensorial; registros aferentes multifibra; fibras sensoriales gastrointestinales; respuestas colinérgicas; *Aspiculuris tetraptera*

Abstract

Viscerosensorial Plasticity in Jejunum of Mice Infected with *Aspiculuris tetraptera*

Aspiculuris tetraptera is a pinworm frequently observed in laboratory facilities, which infests the mice cecum and proximal colon. However, little is known about the impact of this infection on the GI sensitivity. Here, we investigated possible changes in spontaneous mesenteric nerve activity and on the mechanosensitivity function of worm-free regions of naturally infected mice with *A. tetraptera*. Colon and Jejunum showed an increase in pro-inflammatory cytokines messengers in infested mice, nonetheless, no difference were observed at histological level between groups. At a functional level, infection increased the basal firing of mesenteric afferent nerves in jejunum. Furthermore, our findings indicate that nicotinic but not muscarinic receptors, similarly affect spontaneous nerve firing in control and infected animals. However, and contrary to the control group, during infection, the muscarinic signaling was shown to be elevated when a mechanical stimulus was applied. In conclusion, we showed for the first time that alterations induced by infection of the basal afferent activity were independent of the cholinergic function but changes in mechanosensitivity were mediated by muscarinic, but not nicotinic, receptors and specifically by high threshold nerve fibers (activated above 20 mmHg), known to play a role in nociception. These plastic changes within the muscarinic signaling would function as a compensatory mechanism to maintain a full mechanosensory response and the excitability of nociceptors during infection. These changes indicate that pinworm colonic infection can target other tissues away from the colon.

KEY WORDS.

Mechanosensitive response; afferent multifiber recordings; gastrointestinal sensory fibers; acetylcholine responses; *Aspiculuris tetraptera*.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tracto Gastrointestinal (GI)

El tracto gastrointestinal (GI) es un tubo largo y muscular, compuesto por el estómago, duodeno, yeyuno, íleon, cecum o ciego, y colon (Fig. 1). El GI es responsable de la digestión del alimento, asimilación de los nutrientes y eliminación de los residuos. Este es un órgano extraordinario, ya que, durante el curso de la vida humana, este órgano digerirá entre 100 y 700 toneladas de comida. Se calcula que un británico promedio, probablemente consumirá a lo largo de su vida 550 aves de corral, 36 puercos, 36 ovejas, 8 bueyes, 10,000 huevos y en productos lácteos, lo equivalente a 18 toneladas de leche¹. Un fino control neuronal, sensorial, endocrino e inmunológico permiten que todo esto pueda ser digerido y absorbido. El área superficial en la cual estos nutrientes son absorbidos excede los 100 m² y está en contacto con 10¹¹ bacterias (en el colon), lo que sin duda habla de una proporción de bacterias 1:1 con respecto al número total de células presentes en el cuerpo humano^{2,3}.

La tarea del GI no es sencilla, requiere de una fina coordinación. Esta coordinación es proporcionada en su mayoría gracias al sistema nervioso entérico (ENS) que reside dentro de la pared del GI y a las neuronas aferentes extrínsecas que inervan el intestino. En conjunto esas neuronas pueden monitorear y modular las funciones de cada una de las capas del GI.

Las capas de celulares de la pared del GI se describen brevemente a continuación (**Fig. 2**):

- La capa más interna es la mucosa conformada principalmente por el **epitelio**, es una sola capa de células que comprende la interface entre el lumen intestinal y el medio interno. Las células epiteliales producen varias secreciones que son esenciales para la digestión. Algunas células son endocrinas y, secretan péptidos que actúan tanto localmente, en una manera paracrina o neurocrina, como distalmente, actuando como hormonas al entrar al torrente sanguíneo.

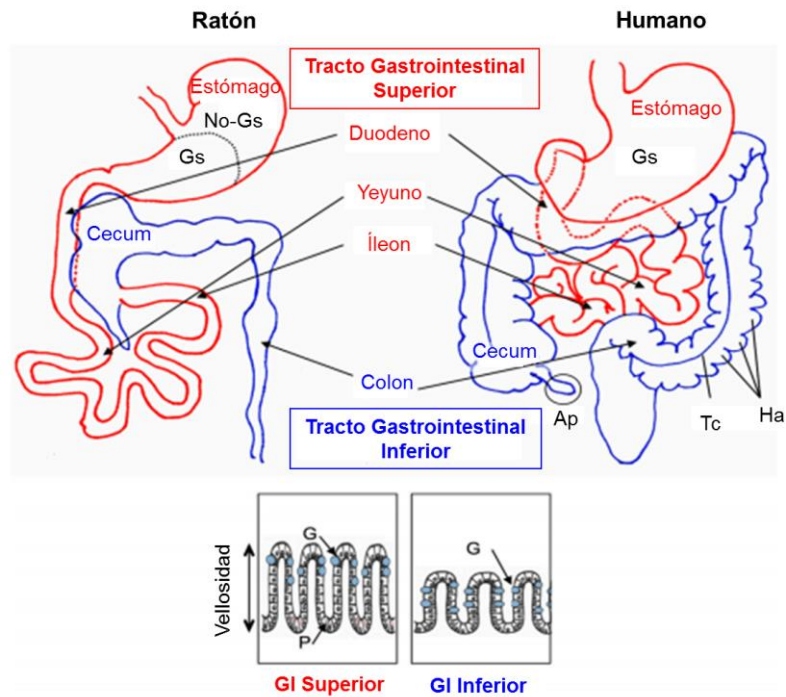


Figura 1. Diferencias en la anatomía del tracto gastrointestinal (GI) entre humano y ratón. El GI puede ser dividido en dos regiones: la superior (rojo) y la inferior (azul). La región superior está conformada por el estómago, duodeno, yeyuno e íleon, mientras que la inferior por cecum y colon. En la parte inferior de la imagen se muestran dos modelos esquemáticos de la anatomía de las vellosidades en el GI superior y el GI inferior. G=células caliciformes. P=células de Paneth, Gs=estómago glandular, No-Gs=estómago no glandular, Ap=apéndice, Tc=tenia coli. Ha=haustra. Modificado de Nishiyama *et al.*, 2016⁴

- Al epitelio le sigue la **submucosa** que consiste en tejido conectivo resistente. Esta capa contiene células inmunes (mastocitos y macrófagos), vasos sanguíneos y neuronas. Las células inmunes juegan un papel importante en la protección contra patógenos, liberando mediadores que coordinan las respuestas inflamatorias y pueden influir a las células nerviosas cercanas.
- En la submucosa se puede encontrar una red de neuronas entéricas, llamado **plexo submucoso**, este, se encarga principalmente de la regulación de la secreción, sin embargo, también interviene en otros procesos como motilidad.
- La capa muscular, está conformada por dos regiones de células musculares divididas por una capa de neuronas entéricas. Las células

de la capa exterior de músculo están orientadas longitudinalmente en dirección a lo largo del intestino. Las células de la capa interna de músculo están orientadas en dirección circular. La contracción del **músculo longitudinal** causa encogimiento del intestino, mientras que **músculo circular** controla el diámetro luminal.

- La red neuronal inmersa entre las capas de músculo, se le conoce como **plexo mientérico**. Este tiene múltiples funciones, sin embargo, entre las principales es el control de la motilidad intestinal².

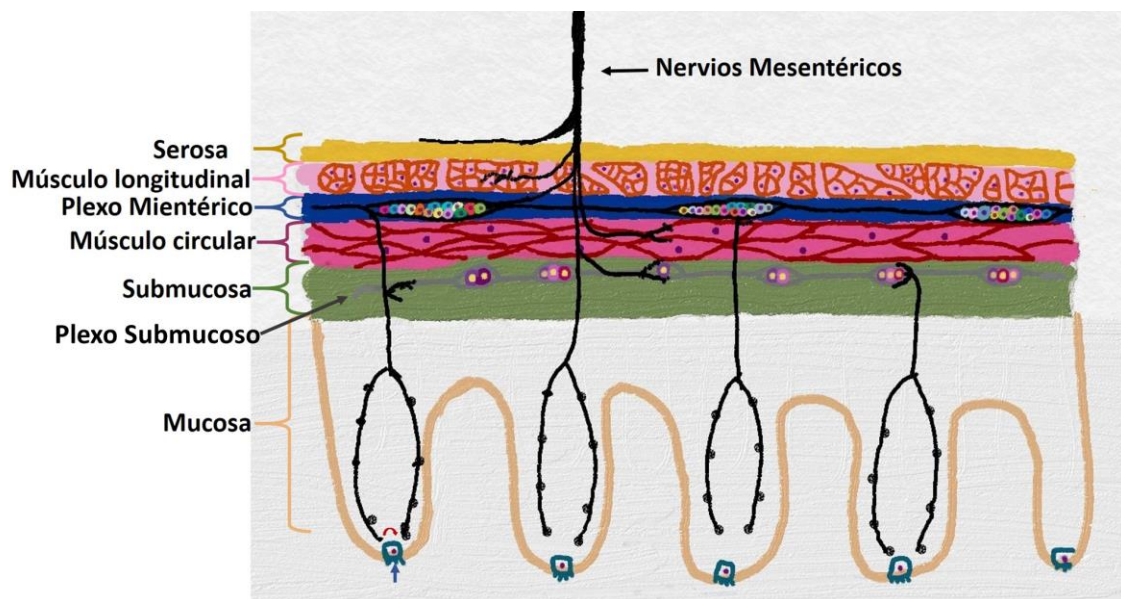


Figura 2. Esquema representativo de las distintas capas del intestino. La capa más interna es la mucosa, se encarga de la secreción y defensa en contra de agentes infecciosos. La submucosa (en verde), en esta capa de tejido conectivo se encuentran células inmunológicas encargadas de la defensa del intestino, también, se encuentra el plexo submucoso (en gris), el cual es una red neuronal (en círculos de colores representan los ganglios donde se encuentran los somas de estas neuronas) que se encarga principalmente de regular la secreción. Músculo circular (rosa), al contraerse genera disminución en el diámetro intestinal. Plexo mientérico (azul), se encuentra entre dos capas de músculo y su principal función es la de regular la motilidad intestinal. Músculo longitudinal (rosa), al contraerse genera reducción de la longitud del intestino. Serosa (amarillo), esta capa brinda protección y aislamiento al intestino. Todas las capas de intestino pueden ser inervadas por neuronas extrínsecas (representadas en negro) que son las encargadas de monitorear y llevar la información hacia el cerebro.

El plexo mientérico y el submucoso conforman el sistema nervioso entérico, con un estimado de 100 millones de neuronas disponibles para controlar y coordinar la actividad gastrointestinal. Algunas de estas neuronas son capaces de monitorear aspectos del proceso de digestión, es por esto, que son llamadas neuronas sensoriales intrínsecas. Estas aferentes intrínsecas proveen las bases de los reflejos locales que controlan la función gastrointestinal. Algunas de ellas proyecta a los ganglios simpáticos prevertebrales pero, no proyectan al Sistema Nervioso Central (CNS), por lo que no contribuyen a las sensaciones viscerales, ni a los reflejos cerebro-intestino, excepto indirectamente como consecuencia de cambios en la actividad secretomotora^{2,5-7}.

Información sensorial en el GI

La información sensorial del GI viaja hacia el cerebro por medio de dos vías principales, la vía vagal y la espinal (**Fig. 3**). Las aferentes vagales transportan información hasta el tallo cerebral y su cuerpo celular se localiza en el ganglio bilateral nodoso/yugular. Las aferentes espinales por su parte llevan la información a la medula espinal y sus cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRG), distribuidos a lo largo de la médula espinal^{2,8}. Las fibras aferentes espinales que inervan el GI pueden ser divididas dentro de dos poblaciones; pélvicas y espláncnicas. Las neuronas vagales y espinales son pseudo-unipolares, con una rama del axón proyectando centralmente hasta terminar en el núcleo del tracto solitario (nTS) para las aferentes vagales, o para las aferentes espinales en la asta dorsal de la medula espinal⁷. La mayoría de las neuronas del DRG inervan estructuras somáticas, se ha estimado una proporción entre el 3% al 7% de neuronas del DRG inervando el GI⁹. Por su parte el nervio vago está integrado en su mayoría por fibras aferentes vagales superando a las eferentes en una proporción 10 a 1. Así, el nervio vago es un nervio predominantemente sensorial⁷.

La mayoría de las aferentes vagales tienen umbrales de activación y llegan a respuestas máximas dentro de niveles fisiológicos de distensión. En contraste, las espinales aferentes, son capaces de responder más allá de los

rangos fisiológicos y codifican tanto para niveles fisiológicos como para niveles nocivos de estimulación. Este perfil diferente de respuesta a estímulos es consistente con la hipótesis que las aferentes vagales están involucradas en la regulación de funciones gastrointestinales, mientras que las fibras aferentes espinales son responsables de la nocicepción. Sin embargo, evidencia reciente apoya la hipótesis de que las aferentes vagales pueden también modular experiencias sensoriales⁶.

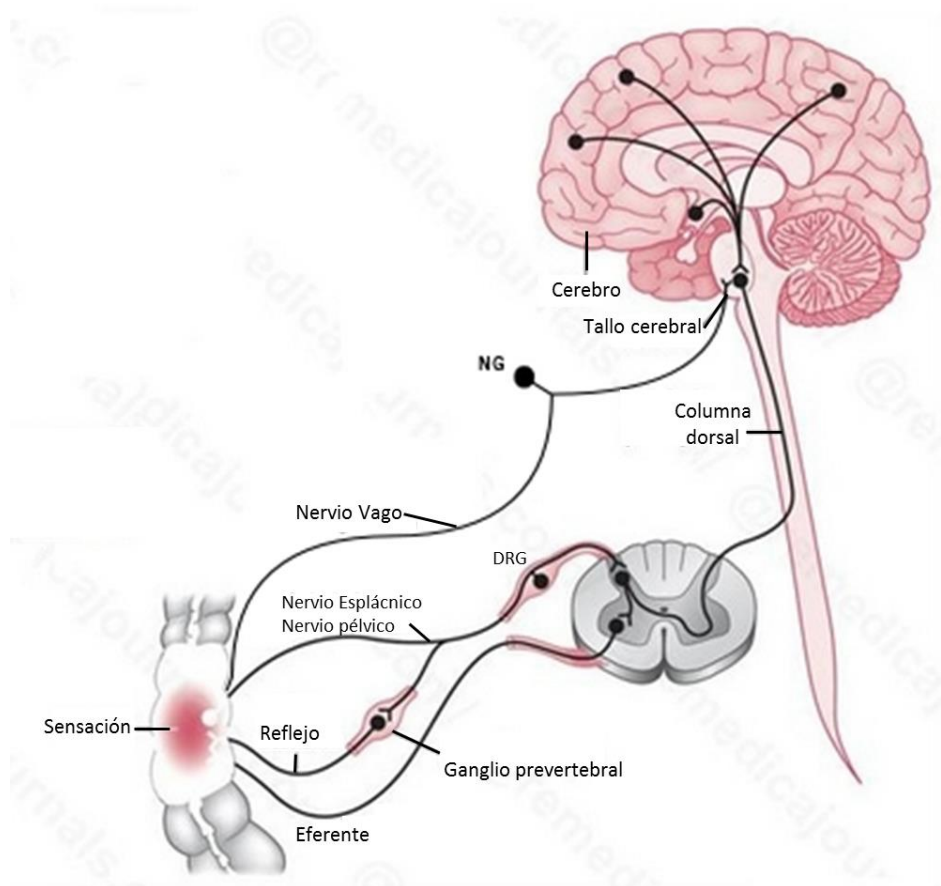


Figura 3. Esquema de las vías nerviosas aferentes del intestino. Existen dos vías por las cuales el intestino envía información sensorial. Por medio del nervio vago, que proyecta directamente hasta el tallo cerebral y cuyos cuerpos neuronales se localizan en el ganglio nodoso (NG). La otra vía es a través de los nervios espinales; esplácnicos y pélvicos que proyectan hasta la médula espinal, cuyos somas están en los ganglios de la raíz dorsal (DRG). Imagen modificada de Raffals y Camilleri, 2003¹⁰.

Existe una transmisión continua de información proyectando desde el intestino al CNS, donde la información es procesada y enviada hacia áreas superiores del cerebro. Estudios de imagenología del cerebro en humanos han

demostrado que las aferentes somáticas pueden causar que la corteza somatosensorial S1 se active. En contraste, estímulos en el GI activan al menos 3 vías ascendentes centrales que atraviesan el tálamo en ruta hacia la corteza cerebral donde la información es procesada en áreas somatosensoriales secundarias incluyendo corteza cingulada anterior y prefrontal^{2,7}.

Tanto las terminales axónicas vagales como las espinales se encuentran con una distribución en capas, incluyendo la serosa y los adjuntos mesentéricos, músculo, parénquima submucoso, y ganglio entérico². La localización de estas terminales juega un papel importante en la modulación de las propiedades funcionales de cada órgano gastrointestinal. Su sensibilidad es determinada por la localización en la pared intestinal, su relación con otras células y estructuras, y los receptores y canales iónicos que expresan⁹. Se han hecho varias clasificaciones de las fibras sensoriales intestinales en base a su morfología, su función, y estímulo que las activa. Sin embargo, debido a que la función de estas fibras puede cambiar durante la inflamación o daño tisular, la clasificación morfológica parece ser la más adecuada hasta ahora. Se han clasificado en 5 tipos principales debido a la localización de sus terminales (**Fig. 4**):

⊕ **Tipo I: Aferentes laminares intraganglionares**

Este tipo de fibra es principalmente vagal. Como su nombre lo dice, consisten en terminaciones aplanadas, que ramifican extensivamente dentro del tejido conectivo envolviéndose alrededor del ganglio mientérico, estas fibras corren en paralelo con las fibras de músculo liso de la pared intestinal¹¹. Debido a que están localizadas entre las capas del músculo circular y longitudinal, se encuentran expuestos a fuerzas de cizallamiento durante el estiramiento muscular o contracción. Las aferentes laminares intraganglionares (IGLEs) responden a estímulos de bajo-umbral, con mecanoreceptores sensibles a tensión, los cuales son activados por distensión y/o contracción, y pueden responder por periodos extendidos durante una distensión mantenida⁷. Las IGLEs detectan distensión del tejido circundante por un canal iónico activado

por estiramiento que aún no ha sido identificado. Se ha observado que los axones de estas fibras corresponden a fibras A δ provenientes del ganglio nodoso¹². Una característica intrigante de las IGLEs, compartida por muchas de las aferentes viscerales, es su sensibilidad a varios mediadores biológicos¹³. Estas fibras son potencialmente excitadas por ATP, probablemente cuando estos son liberados desde las células dañadas¹⁴.

Las IGLEs vagales son mayormente encontradas en el esófago, estómago y el intestino delgado, en densidades decrecientes. Sin embargo, un tipo similar de terminación ha sido identificada en el recto, llegando desde las fibras aferentes espinales que corren en los nervios pélvicos, llamadas IGLEs rectales o rIGLEs. Estas fibras espinales también responden a estímulos de bajo umbral, con mecanorreceptores que se adaptan lentamente. Responden a distensión de la pared intestinal con un amplio rango dinámico (WDR), desde un rango fisiológico causado por propulsión normal de la materia fecal hasta extremos nocivos. Las rIGLEs son también activados por contracción de las capas musculares circular y longitudinal, posiblemente por medio de fuerzas compresión actuando sobre el ganglio mientérico¹⁵.

⊖ **Tipo II. Aferentes intramusculares**

Los arreglos intramusculares (IMAs) consisten en ramificaciones varicosas axónicas que corren distancias largas, paralelos al haz de las fibras musculares tanto en el musculo circular como en longitudinal y terminan en las capas musculares, más que en los ganglios^{2,16}. Estas se encuentran en una mayor densidad en el fondo gástrico¹⁷ y en las regiones de los esfínteres del estómago donde corren cerca de las células intersticiales de Cajal (ICC)¹⁸. Esta posición ha permitido especular que los IMAs, las ICC intramusculares y posiblemente las fibras eferentes, pueden formar complejos funcionales, quizá análogos a los husos del músculo estriado. Sin embargo, no existe evidencia funcional que soporte esta especulación.

Algunas poblaciones de IMAs responden a bajo umbral con mecanorreceptores que se adaptan lentamente. Otro tipo de poblaciones

responde a altos umbrales y menor velocidad de disparo, responden a distensión con un WDR⁷. Es importante mencionar que muchos de los axones contienen canales sensibles a capsaicina (TRPV1) y son frecuentemente peptidérgicos, similares a muchos nociceptores espinales¹². Aunque los IMAs han sido estudiados extensivamente en vías vagales, terminaciones similares han sido descritas más distalmente, especialmente en el intestino delgado, en nervios espinales^{19,20}.

⊖ Tipo III. Aferentes mucosas

En el intestino delgado se observan terminales con arreglos no especializados, que proyectan a lo largo de la longitud de las vellosidades intestinales, con algunas fibras acercándose al lado basal de las células epiteliales y algunas que se ramifican densamente en la vellosidad vecina. Estas fibras son principalmente aferentes vagales, las cuales no son sensibles a distensión o contracción del intestino, pero sus mecanoreceptores de adaptación rápida, pueden ser activados por frotamiento o por compresión de la mucosa, generando una ráfaga de potenciales de acción. Muchas de estas fibras son también sensibles a estímulos lumbales osmóticos, pH y a químicos que atraviesan el epitelio de la mucosa durante la absorción (aminoácidos, glucosa, etc.)^{7,21,22} o químicos liberados por las células enteroendócrinas (colecistoquinina (CCK), péptido parecido al glucagón 1 (GLP1), gastrina, amilina, péptido YY, etc.)²³. Existen de 10 a 20 clases de células enteroendócrinas, cada una de las cuales liberan un subconjunto de 20 mediadores, usualmente en respuesta a nutrientes. Las células enteroendócrinas más abundantes son las células enterocromoafines que contienen y liberan gran parte de la serotonina (5-HT) del cuerpo, con efectos potentes sobre las aferentes mucosas²⁴.

También se ha encontrado un tipo similar de terminación mucosa en los nervios espinales. Estas fibras también son insensibles a distensión y contracción. Se excitan por frotamiento de la mucosa y son fuertemente activadas por 5-HT o agonistas de los receptores 5-HT₃. Las terminales espinales mucosas son más abundantes en las vías lumbosacras que en las

toracolumbares, pero la estructura detallada de estas terminaciones aún no ha sido reportada^{25,26}.

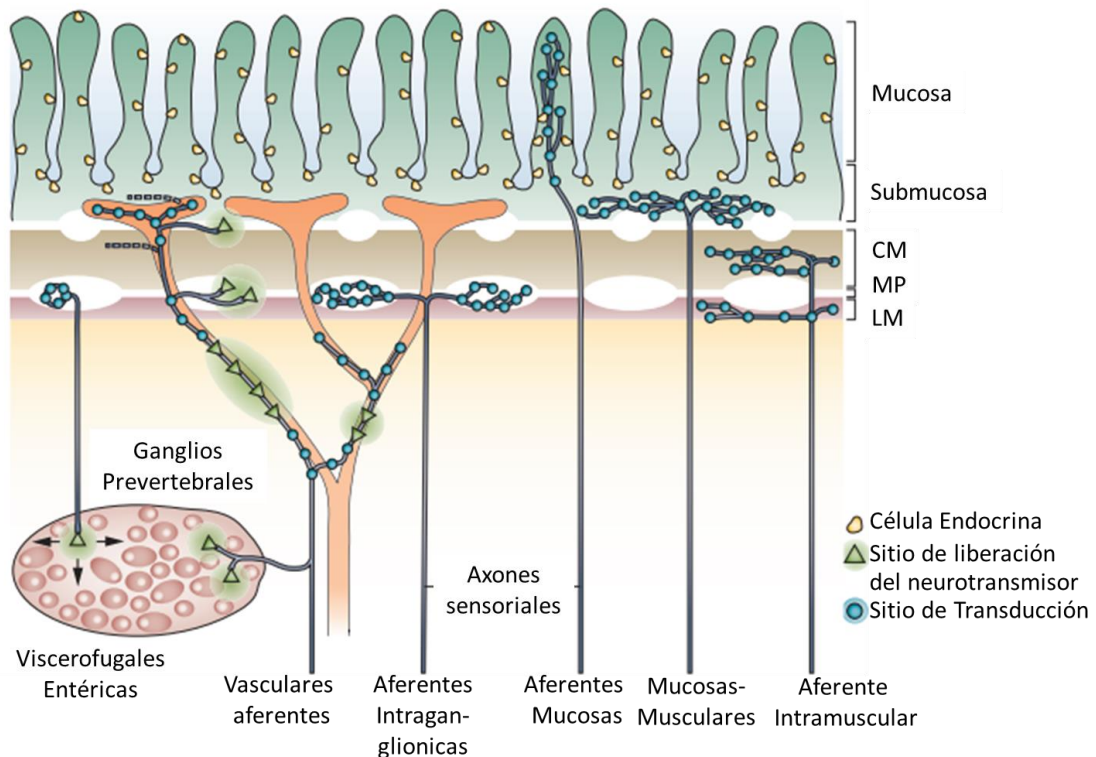


Figura 4. Cinco tipos de neuronas sensoriales aferentes en el intestino. Se ilustran los 5 tipos de terminales sensoriales en el intestino, junto con las neuronas viscerofugales. Los sitios de transducción se muestran en círculos abiertos; los sitios de liberación del transmisor se muestran en triángulos abiertos. Las aferentes vasculares son las más complejas, con axones perivasculares intramurales y extramurales, y con colaterales en el ganglio entérico, mucosa, *muscularis externa* y ganglio prevertebral. Los axones intraganglionares proveen terminales intraganglionares laminares, mayormente en el ganglio mientérico. Las aferentes mucosas inervan la mucosa subepitelial. Las aferentes musculares-mucosas, tienen terminales en la mucosa profunda, cerca de la *muscularis mucosae*, y las aferentes intramusculares tienen terminaciones dentro de las capas musculares longitudinal y/o circular. CM, músculo circular; LM, músculo longitudinal; MP, plexo mientérico. Imagen modificada de Brookes *et al.*, 2013⁷

☉ Tipo IV. Aferentes mucosas-musculares

Este tipo de terminales aferentes han sido descritos debido a que presenta características de aferentes mucosas y de aferentes musculares. Estas

terminales son de bajo umbral de activación, las cuales responden tanto a frotamiento como a distensión. Es posible que los axones de estas fibras bifurquen y termine tanto en la lámina propia de la mucosa como en la *muscularis externa*. Estas terminales aferentes se han descrito principalmente en vías espinales pélvicas. El papel de estas fibras se desconoce, pero su alta sensibilidad a cizallamiento de la mucosa sugiere que podrían detectar el movimiento del contenido sobre la superficie del GI^{2,7,16,26}.

⊕ **Tipo V. Aferentes Vasculares**

Estas terminales aferentes se han descrito solamente en nervios espinales, los cuales dan lugar a axones peri-arteriales delgados que ramifican y se asocian con puntos de ramificación arterial mesentérica, aunque también inervan la serosa del intestino, es importante mencionar que no están restringidas a vasos mesentéricos ya que continúan dentro de la pared intestinal, inervando las arterias y las arteriolas de segundo orden en la submucosa pero no ramificaciones arteriales más pequeñas o capilares. La misma unidad aferente puede tener sitios de transducción de vasos mesentéricos y submucosos^{7,27}. Estas aferentes detectan estímulos mecánicos desde los sitios de mecanotransducción en vasos sanguíneos extramurales e intramurales, codificando para contracción y distensión de la pared del intestino y tracción de los mesenterios con relativamente baja sensibilidad²⁸. Terminales de este tipo son sensibles a isquemia, hipoxia y capsaicina y se cree que ellas comprenden el tipo mayor mecanoreceptor²⁹. Son también sensibles a cambios en la velocidad de perfusión, con un incremento en el disparo durante la reducción del flujo³⁰, aunque esto parece ser más dependiente en factores mecánicos⁷.

⊕ **Aferentes silenciosas**

En varios estudios, se observó la existencia de unidades aferentes que son silenciosas e insensibles a estímulos mecánicos, sin embargo, se vuelven activas y mecanosensitivas cuando se exponen a capsaicina o a mediadores de inflamación. Se ha sugerido que estas aferentes silenciosas pertenecen a las aferentes vasculares serosas, ya que muestran un amplio rango de

sensibilidad a estímulos mecánicos y consistentemente están entre las aferentes menos mecanosensibles. Son propensas a la modulación por mediadores de inflamación, generando tanto cambios agudos como cambios en la expresión génica a más largo plazo⁷.

⊕ **Aferentes primarias entéricas viscerofugales**

Existe otro tipo de fibras aferentes primarias, las cuales son de origen intrínseco, denominadas viscerofugales entéricas. Muchas de las neuronas entéricas son excitadas directamente por estímulos mecánicos y químicos; ellas pueden activar reflejos entéricos locales, motores, secretorios y vasomotores. Sin embargo, las neuronas viscerofugales son neuronas entéricas aferentes primarias que no tienen conexiones directas con el CNS, sus cuerpos celulares se encuentran en los ganglios mientéricos y proyectan afuera del intestino hacia los ganglios prevertebrales. No obstante, no se descarta que algunas de estas neuronas alcancen la médula espinal.

Las neuronas viscerofugales han mostrado ser directamente mecanosensibles, pero también activadas sinápticamente por circuitaría entérica. Sus axones viajan en los nervios mesentéricos, nervios pélvicos y posiblemente en los nervios espláncnicos y contribuyen a la descarga de potenciales de acción registrados en los nervios colónicos^{2,7}.

PLASTICIDAD VISCEROSENSORIAL EN YEYUNO DE RATÓN INFECTADO CON *ASPICULURIS TETRAPTERA*

INTRODUCCIÓN

Modulación de la información sensorial por gusanos intestinales

Los gusanos intestinales del orden Oxiurida son los parásitos más comunes en los animales del laboratorio, presentan una alta prevalencia en bioterios de todo el mundo³¹⁻³⁴. En general, entre las especies de este orden, *Syphacia obvelata* y *Aspiculuris tetraptera* son consideradas los gusanos intestinales del ratón, *Syphacia muris* de la rata, *Syphacia mesocricetus* del hámster y *Denstomella translucida* del gerbo³⁵. La prevalencia de estas especies en instalaciones de laboratorio va de un 3 a 90% para *Aspiculuris* sp y de un 9 a 90% para *S. obvelata*^{33,36,37}. Estos parásitos residen en el colon proximal y cecum del ratón, donde se alimentan con bacterias presentes en el lumen³⁸. Algunas características de estos gusanos, como el ciclo de vida, un periodo corto de desarrollo, una alta resistividad y un fácil esparcimiento de los huevos, hacen que estos parásitos sean muy difíciles de eliminar³². Sin una adecuada eliminación de los huevos y del parásito, los ratones son re-infectados ya sea por contacto directo con otros animales infectados, por comida, agua y cama contaminados con huevos, lo cual resulta en una infección crónica difícil de controlar en los bioterios³⁹.

Los animales con oxiuriasis parecen ser normales y saludables, ya que no presentan síntomas clínicos obvios, por esta razón, esta infección fue considerada como nula o medianamente patogénica y algunos investigadores han considerado a estos parásitos como inofensivos^{38,40}. Sin embargo, algunas investigaciones apuntan a que estos organismos pueden interferir con el desarrollo de protocolos y alterar la interpretación de resultados, debido al hecho de que estos gusanos pueden inducir una respuesta inmune humoral y celular del hospedero. Los ratones infestados con *S. obvelata* mostraron la presencia de anticuerpos específicos en contra de los antígenos somáticos del

parásito⁴¹, un incremento tanto en reticulonocitos de la sangre periférica como en varios linajes de células blancas en la médula ósea, y un cambio en la sensibilidad a IL-17⁴². Además, la infección con *S. obvelata* induce una respuesta inmune tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), un fenotipo severo en anafilaxis inducida experimentalmente en ratones BALB/c³⁹, y una depresión en el comportamiento exploratorio en ratones C57BL/6⁴³.

La Acetilcolina (ACh), es el principal neurotransmisor del sistema nervioso periférico (PNS), está involucrada en muchas funciones gastrointestinales a través de la activación de los receptores nicotínicos (nAChRs) y receptores muscarínicos (mAChRs)^{44,45}. Los receptores nAChRs son canales activados por ligando, mientras que los mAChRs son receptores acoplados a proteínas G. Existen 5 subtipos (M1-M5); M1, M3 y M5 estimulan la cascada de fosfatidilinositol (vía Gq/G11), mientras que M2 y M4 median la inhibición de la adenilciclase (vía Gi/Go)^{46,47}, todos estos subtipos son altamente sensibles a ACh ya que se activan desde concentraciones nanomolares. Se ha demostrado la presencia de mAChRs en el GI, con M1, M2 y M3 en el plexo mientérico, en el submucoso y en el musculo liso⁴⁷⁻⁴⁹, asimismo, por estudios funcionales, se ha postulado la presencia de estos en las neuronas del DRG⁵⁰.

Por su parte, los nAChRs son menos sensibles a ACh ya que responden a concentraciones mayores de 10 μM ⁴⁴. Estos receptores están formados por 5 subunidades. En mamíferos existen 11 subunidades; $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$, los cuales pueden ser homoméricos o heteroméricos. Han sido detectadas en el plexo mientérico del intestino de rata $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$; en el plexo submucoso a $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$ ⁵¹ y en el ganglio nodoso (NG) $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$ y $\beta 4$ ⁵². La presencia de estos receptores en neuronas viscerofugales y del DRG ha sido demostrada electrofisiológicamente. Se han reportado respuestas parecidas a $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ ^{53,54}. La presencia de los mAChRs y nAChRs en las neuronas sensoriales refleja la participación de estos en la señalización sensorial.

No hay reportes del impacto de la infección por oxiuros en nervios aferentes mesentéricos, contrario con la extensa investigación en las respuestas del hospedero provocadas por otros parásitos intestinales como *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichuris muris*, *Trichinella spiralis* y *Schistosoma mansoni*. Estos parásitos pueden alterar la mecanosensibilidad^{55,56}, contractilidad⁵⁷⁻⁵⁹, liberación de ACh⁶⁰, el transporte de fluidos a través de la mucosa que es mediado por nAChRs⁶¹, neurotransmisión entérica⁶², modulación purinérgica de la neurotransmisión colinérgica⁶³, metabolismo de la ACh y otras variables^{64,65}. Debido al uso extendido de los ratones en investigación, los cuales en muchas ocasiones son infectados de manera natural con oxiuros, el objetivo de nuestro estudio fue investigar si este tipo de infecciones puede modificar la actividad espontánea y la mecanosensibilidad de los nervios mesentéricos del yeyuno (una región libre de gusanos); así como, evaluar el papel de la función colinérgica en la transmisión aferente.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Ratones machos de la cepa C57BL/6 fueron se obtuvieron del Instituto de Neurobiología, *Campus Juriquilla, UNAM*. Los animales tuvieron acceso a comida y agua ad libitum. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con el comité de ética de del *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica*, apegándose a la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Infección e identificación del parásito

Se usaron dos grupos de ratones; el grupo control y el grupo infectado con gusanos intestinales de manera natural y crónicamente. La infección de los ratones se obtuvo en cerca del 100% de los casos, por medio del alojamiento de los animales (durante 4 a 6 semanas) en cajas que contenían animales previamente infectados. En ambos grupos el contenido total del intestino delgado y del intestino grueso se preservó en una solución de etanol al 70%, para su posterior identificación. Con el análisis visual en microscopio de luz (Leica DM750) no se observaron gusanos en el grupo control, mientras que en el grupo infectado contenían gusanos de un solo género.

Los gusanos fueron identificados de acuerdo con sus características morfológicas y por métodos moleculares. Nosotros observamos los especímenes recolectados en un microscopio de luz (Leica DM750) para identificar las estructuras principales. Las fotografías se tomaron usando la cámara Leica (ICC50HD). Dos de los gusanos (hembra y macho) se procesaron para su visualización en un microscopio electrónico de barrido (SEM). Los especímenes fueron guardados en etanol al 70%, deshidratados en una serie de baños de alcohol, secados en punto-crítico, cubiertos con una mezcla de oro-paladio y examinados bajo el SEM Hitachi SU1510 (Hitachi, Tokio, Japón).

Para la identificación molecular, dos hembras fueron lavadas con solución salina y preservadas en etanol al 97%. El DNA genómico fue extraído

individualmente usando el kit DNeasy Blood and Tissue siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se amplificaron por PCR las regiones del rDNA; espaciador transcrito interno 1 (ITS1), 5.8S y espaciador transcrito interno 2 (ITS2). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a un volumen final de 25 μ L (5.0 μ L of 5X GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 0.5 μ L de la mezcla de dNTPs a 10 mM, 3 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1 μ L de cada primer (10 pmol/ μ L), 0.12 μ L de GoTaq polymerase (5 U, Promega), 1-2 μ L de DNA molde, y se completó con agua destilada estéril). Las regiones ITS1, 5.8S y ITS2 del rDNA se amplificaron usando los primers BD1 5'-gtc gta aca agg ttt ccg ta-3' (forward) y BD2 5'-tat gct taa att cag cgg gt-3' (reverse)⁶⁶. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 92°C, 1 min 30 s a 50°C, 1 min 30 s a 72°C, y un periodo de extensión final de 10 min a 72°C (modificado de Tkach *et al.*, 2000⁶⁷). Los productos de PCR fueron purificados enzimáticamente con USB® ExoSAP-IT® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), en concordancia con las instrucciones del fabricante y posteriormente secuenciados (LANBAMA, IPICYT, SLP, México) en ambas direcciones en un 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los cromatogramas de ambos marcadores moleculares fueron editados manualmente usando Chromas LITE 2.01 (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australia). Se realizaron búsquedas independientes en BLAST (NCBI) y las dos secuencias obtenidas se alinearon junto con la secuencia de *A. tetraptera* disponible en GenBank (EF464551.1), usando ClustalW⁶⁸, se corrigió manualmente con el programa de computadora Bioedit v5.0.6. Aunque la secuencia es más larga que la obtenida aquí, se utilizó la alineación completa de los segmentos de las dos secuencias obtenidas aquí (1,338 pb, secuencia parcial que incluye el ITS1, 5.8S y el ITS2). Medidas de distancias entre pares, no corregido (distancias p) fueron calculadas usando el programa MEGA6. Las secuencias obtenidas en este estudio están disponibles en GenBank con números de acceso KY484153 y KY484154. Los especímenes restantes fueron depositados en la "*Colección de Invertebrados no Artrópodos (CINZ) of Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, Unidad Académica de Ciencias Biológicas (UACB), Universidad Autónoma de Zacatecas*" (México).

Preparación del tejido para registro multiunitario

Los animales fueron sacrificados por dislocamiento cervical. El abdomen fue abierto y el intestino, aún unido con el mesenterio, fue extirpado y puesto en solución de Krebs modificada la cual contenía las siguientes sales (en mM): 118.4 NaCl, 24.9 NaHCO₃, 1.9 CaCl₂, 1.2 MgSO₄ 7H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 2.3 KCl, 11.7 D-glucosa, misma que fue continuamente gasificada con 95% O₂ y 5% CO₂. Un segmento de cerca 4 cm de yeyuno fue removido, lavado internamente y puesto dentro de la cámara de registro, la cual fue continuamente perfundida (por gravedad) con solución de Krebs modificada (7 mL/min) a 33-34°C. El segmento intestinal de yeyuno también fue internamente perfundido con la misma solución a una velocidad de 150 µL/min usando una bomba de jeringa, esto se logró atando con hilo de seda las terminaciones del segmento intestinal a unos tubos de plástico. Más tarde se realizó una microdissección de los nervios mesentéricos. El nervio se cortó de la parte distal al intestino y después fue asegurado a una micropipeta de cristal por medio succión, lo que permite la adquisición de un registro extracelular de los potenciales de acción del nervio con relativamente bajo ruido.

Registro multiunitario

La micropipeta fue montada en un cabezal (NL 100, Digitimer Ltd) y las señales eléctricas fueron amplificadas y filtradas por un amplificador NL104 y un filtro NL125 (Digitimer Ltd), respectivamente. Las señales fueron digitalizadas usando un convertidor A/D (Micro 1401 MKII, Digitimer Ltd). La actividad eléctrica fue registrada en una computadora usando el software Spike 2 (Cambridge Electronic Design). Una vez que la actividad de disparo espontánea fue obtenida, el tejido fue estabilizado por una hora antes de comenzar con la fase experimental (**Fig. 5**). Todos los fármacos fueron aplicados en la perfusión extraluminal con intervalos de lavado de 15 y 30 min (solo para atropina).

Para evaluar la mecanosensibilidad, se realizaron rampas de distensión obtenidas al cerrar la salida de la perfusión intraluminal, esto generó la acumulación de la solución dentro del intestino y por lo tanto un incremento en la presión intraluminal. Ésta presión intraluminal fue monitoreada

continuamente por medio de un transductor de presión (NL108, Digitimer Ltd). Las rampas de distensión fueron aplicadas en intervalos de 15 min a una presión máxima de 60 mmHg. Nosotros determinamos el perfil de presión-respuesta usando un script hecho exclusivamente para este tipo de análisis (provisto por Cambridge Electronic Design, CED) en una interface del programa Spike 2.

Análisis de espiga única

Basados en la forma de las espigas, estas fueron clasificadas y separadas por medio de la herramienta Spike2 waveform discriminating software (offline). Los grupos de espigas fueron clasificados de acuerdo a su respuesta a distensión (alto-umbral, amplio rango dinámico y bajo-umbral) como lo describe⁶⁹. Esta clasificación fue basada en el disparo espigas relativo a presiones bajas y altas (La respuesta a 15 mmHg exhibida como un porcentaje de la respuesta a 60 mmHg). Así, las espigas de bajo umbral (LOW) fueron aquellas que responden a >55% antes de 15 mmHg, las de alto-umbral (HIGH) fueron aquellas que respondieron <20% antes de 15 mmHg, y las espigas de amplio rango dinámico (WDR) responden >20% pero <55%, antes de 15 mmHg.

RT-PCR Semi-cuantitativa

Un segmento del yeyuno y del colon fueron removidos de ratones control e infectados. Los tejidos fueron cortados en pequeñas piezas con ayuda de unas tijeras y 0.1 g fueron homogenizados con 1 mL de Trizol® reagent (Ambion). El RNA fue extraído de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA fue cuantificado en el Thermo Scientific nanodrop (ND-1000) y su integridad fue verificada por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2%. Para remover la contaminación por DNA, se incubaron 5 µg de RNA durante 30 min a 37°C con Turbo DNase (2 U/µL, Ambion). La inactivación de la DNasa se realizó usando fenol/cloroforma/alcohol isoamílico (Sigma) como lo recomienda el fabricante. Una vez purificado el RNA fue cuantificado nuevamente y su integridad verificada como se describe arriba. Para la síntesis de cDNA usamos 2 µg de RNA, 200 U de transcriptasa reversa (SuperScript II, Invitrogen), y 0.5 µg of Oligo dT (Invitrogen), esta mezcla se incubó por 50 min a 42°C. El cDNA obtenido fue cuantificado en el Thermo Scientific nanodrop (ND-2000). La PCR

Semi-cuantitativa se realizó usando 750 ng de cDNA, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 μM de cada primer (Ver la **Tabla 1** para la secuencia nucleotídica y la T_m), y 1 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial 5 min a 95°C, después 30 rondas de amplificación compuestas de desnaturalización por 30s a 95°C, alineamiento por 30s a la temperatura específica por cada oligonucleótido (**Tabla 1**), y una extensión por 50s a 72°C; la extensión final fue de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los controles negativos se realizaron sin cDNA. La proporción de Citocina/GAPDH fueron calculadas usando el Software ImageJ.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la RT-PCR semi-cuantitativa

| <i>Gen</i> | <i>Secuencia de los Oligonucleótidos</i> | <i>T_m (°C)</i> |
|---------------------|---|---------------------------|
| <i>GAPDH</i> | Fw 5'-GTCATCATCTCCGCCCTTC -3' Rv 5'-CATTGAGAGCAATGCCAGCC -3' | 65 |
| <i>INFγ</i> | Fw 5'-CCACGGCACAGTCATTGAAA -3' Rv 5'-TCTCTTCCCCACCCCGAAT -3' | 56 |
| <i>IL-1β</i> | Fw 5'-TGCCACCTTTTGACAGTGATG -3' Rv 5'-TGGGTGTGCCGTCTTTCATT -3' | 60 |
| <i>IL-6</i> | Fw 5'-TCCGGAGAGGAGACTTCACA -3' Rv 5'-TAACGCACTAGGTTTGCCGA -3' | 60 |

Histología

Para algunos experimentos, se removieron segmentos del yeyuno y de colon de ratones control e infectados, se perfundieron intraluminalmente con PBS y fueron procesados para análisis histopatológico, el cual incluye: i) fijación del tejido en formaldehído al 4%, ii) inclusión en parafina (Paraffin Wax Embedding Centre, MPS/P2, SLEE Medical), iii) cortes en rebanadas de 5 μm de grosor (Rotatory Microtome, CUT 6062, SLEE medical) y iv) tinción usando un procedimiento estándar de hematoxilina y eosina. El grado de inflamación fue evaluado por un histopatólogo con un protocolo de análisis a ciegas. El sistema de evaluación fue el siguiente: Sin inflamación, Nivel-Bajo de inflamación

(infiltración de células blancas por encima de los animales control), Nivel-Intermedio de inflamación (presencia de macrófagos y bajo nivel de daño epitelial) y Nivel-Alto de inflamación (adelgazamiento de la pared, infiltración transmural). Las imágenes fueron tomadas con una cámara AxioCam Color (Zeiss) integrada a un microscopio ZEISS (Imager M2) y usando prima DIC.

Análisis de datos

La actividad aferente multiunitaria fue cuantificada como aquellos eventos con una amplitud más alta que dos veces el ruido. Las respuestas a los fármacos fueron evaluadas como la media del cambio en la actividad aferente sobre un periodo de 60 s (pico) menos la frecuencia basal medida durante un periodo de 100 s. Respuestas a distensión fueron medidas como el cambio en la frecuencia de disparo cada 2 mmHg substrayendo la frecuencia basal. Se realizaron comparaciones múltiples usando ANOVA de una o dos vías con una *post hoc* de Bonferroni, igualmente, para obtener las diferencias entre dos grupos se realizó una T de Student. Los datos fueron expresados como la media \pm Error Estándar de la Media (S.E.M.). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P \leq 0.05$.

Fármacos

Todos los fármacos fueron comprados en Sigma Aldrich. Las soluciones stock para hexametonio (1 M) fueron preparadas con agua destilada y para atropina (100 mM) con DMSO como solvente.

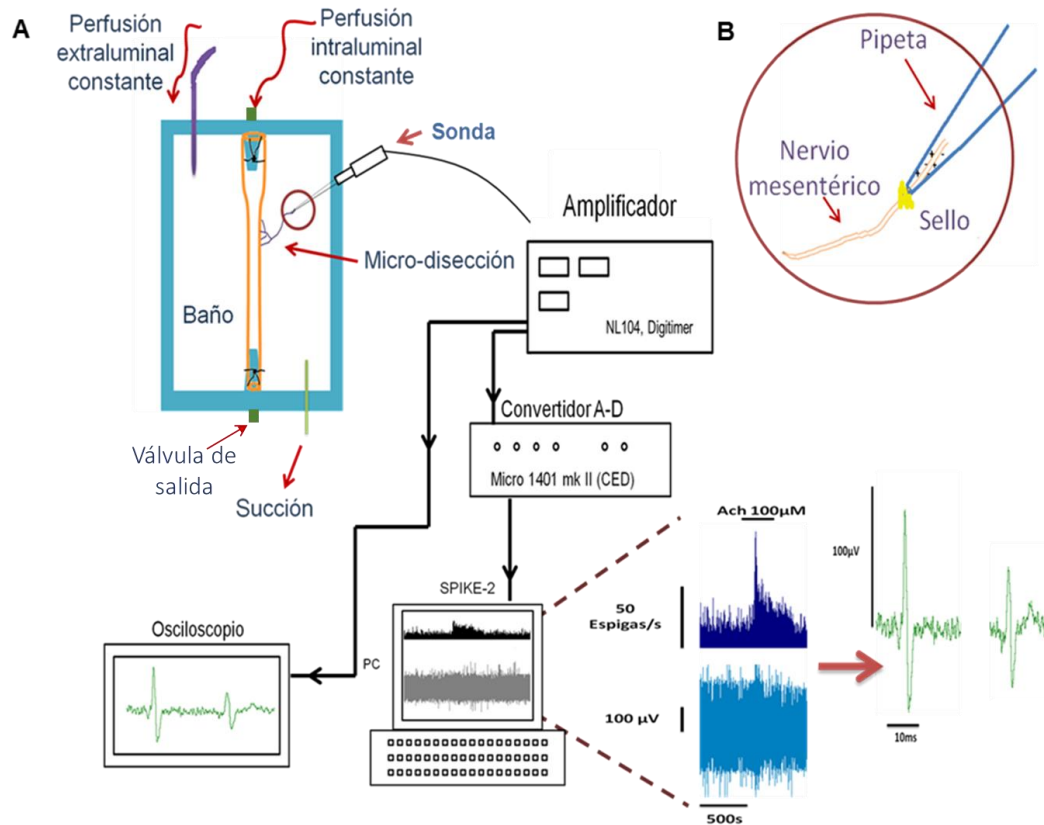


Figura 5. Esquema representativo del equipo utilizado para la obtención de registros multiunitarios. A) En la parte superior se puede observar la cámara de registro (rectángulo azul), la cual consta de una perfusión intraluminal, perfusión extraluminal, válvula de salida y succión. El intestino se ata a las terminaciones del tubo (azul) y se deja perfundir intra ($150 \mu\text{L/s}$) y extraluminalmente (7 mL/s). Se realiza una microdissección de los nervios mesentéricos y se succiona con una micropipeta de vidrio, la cual está conectada a una sonda (NL 100, Digitimer Ltd), que a su vez se conecta con el amplificador (NL104, Digitimer Ltd), este se conecta con el osciloscopio y el convertidor (Micro 1401 mk II CED). El convertidor digitaliza la señal para que pueda ser procesada por la computadora. El software SPIKE2 (Cambridge Electronic Design) nos ayuda a registrar y analizar los potenciales de acción espontáneos del nervio y en la presencia de los fármacos problema. **B)** Representación gráfica del sello entre la micropipeta de vidrio, tejido adiposo y el nervio.

RESULTADOS

Identificación morfológica y molecular de los gusanos

Los nematodos fueron identificados por su morfología como miembros de la familia Heteroxynematidae, y del género *Aspiculuris*. Este nematodo presenta un dimorfismo sexual (macho más pequeño que la hembra), posee cuerpo cilíndrico y de tamaño mediano, es caracterizado por un ala cervical distintiva la cual comienza inmediatamente posterior a la vesícula cefálica y es abruptamente interrumpida a nivel del bulbo esofágico, formando un ángulo agudo (**Fig. 6**). La terminal anterior del cuerpo tiene una región prominente, la cual representa la vesícula cefálica. Los machos tienen tres pares de alas en la cola^{70,71}.

Usando las regiones de secuencia parcial del DNA ribosomal; ITS1, 5.8S e ITS2. Se logró corroborar que los ratones fueron infectados con la especie *Aspiculuris tetraptera*. El alineamiento fue de 1,338 pb de longitud sin inserciones. Las dos secuencias obtenidas fueron 99.9% similares a la secuencia (EF464551.1) de *A. tetraptera* disponible en GenBank (**Tabla 2**). Las regiones analizadas fueron altamente conservadas y proveyeron suficiente información para confirmar la identificación del parásito. Existe solo un cambio en la secuencia EF464551.1 con respecto a la obtenida por nosotros, localizado en la posición 836 de la región ITS2 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Alineamiento de las dos secuencias de *A. tetraptera* (EF464551.1) basado en el espaciador transcrito interno 1 (1 to 662 pb), mRNA ribosomal 5.8S (663 to 822 pb), y espaciador transcrito interno 2 (823 to 1338 pb). El recuadro rojo indica diferencia en nucleótido y los puntos indican nucleótidos idénticos.

| | | | | | | | | |
|------------|---|---|---|-----|---|---|---|---|
| | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 |
| EF464551.1 | | TCTGGCTGAGACTCGAAATCTAAAAATACTCTTTGACGCATACACACATACACACCGTATATGTGTTGCACATCGGCTC | | A | | | | |
| 1571 | | | | A | | | | |
| 1572 | | | | A | | | | |

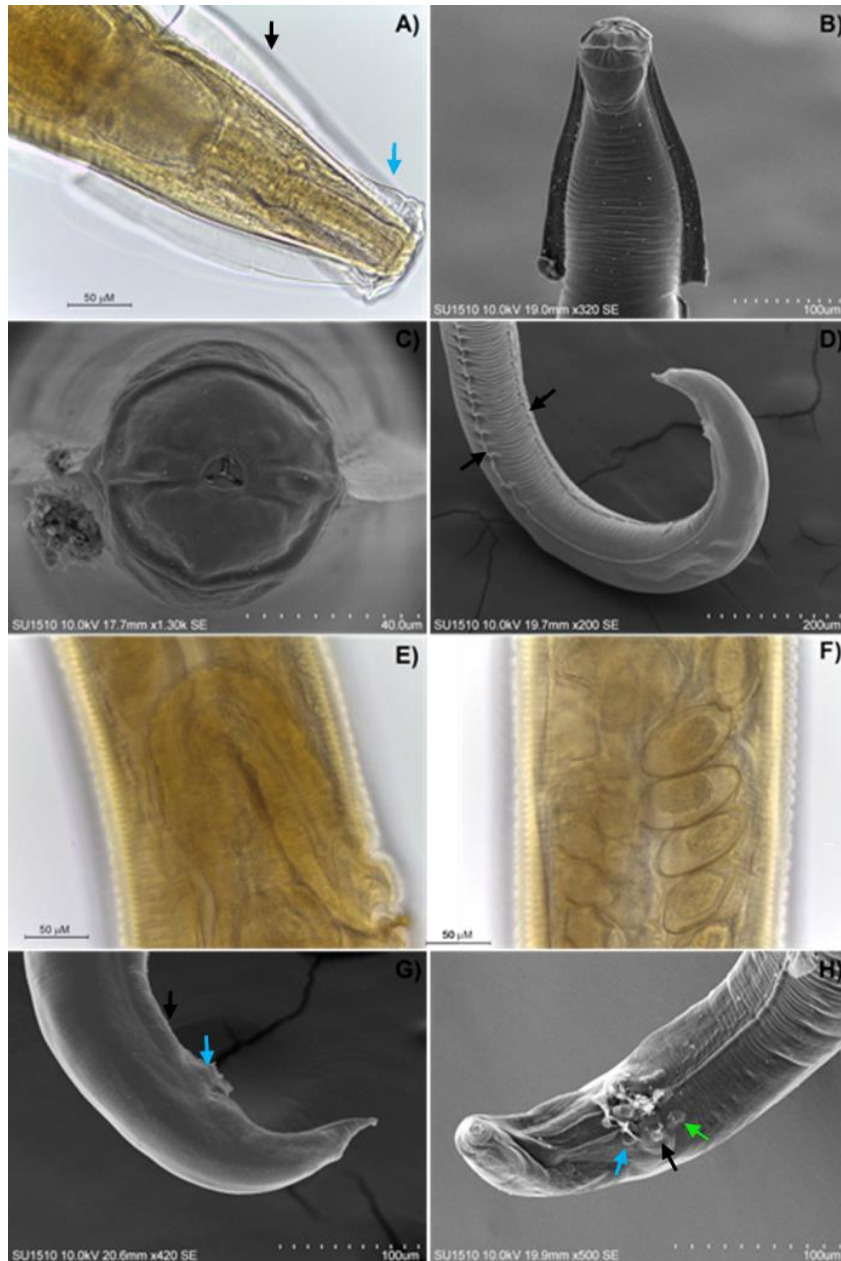


Figura 6. Estructuras características del género *A. tetraptera*. **A)** Extremo anterior observado con microscopio óptico. Flecha azul señala la vesicular cefálica. Flecha negra indica el ala cervical la cual comienza inmediatamente después de la vesícula cefálica y es abruptamente interrumpida al nivel del bulbo esofagal, formando un ángulo agudo. **B)** Extremo anterior del cuerpo vista en SEM. **C)** Vista apical de la boca, con 3 labios. **D)** Vista ventral, ala lateral en ambos lados (flecha negra) **E)** Región de la vulva de la hembra, vista lateral. **F)** Huevo ovoide y simétrico. **G)** Cola del macho, vista lateral. Flecha negra señala el ala pre-cloacal. Flecha azul señala la papila pre-cloacal. **H)** Vista posterior del macho, arreglo de la papila caudal. Flecha azul señala la papila post-cloacal. Flecha negra apunta la papila ad-cloacal. Flecha verde señala la papila pre-cloacal.

Mayor actividad espontánea del nervio mesentérico en los ratones infectados con A. tetraptera

Observamos que la actividad espontánea del nervio mesentérico es significativamente mayor en el grupo infectado con respecto al grupo control, el promedio de los valores fue 50 ± 3 y 34 ± 2.7 espigas/s, respectivamente (**Fig. 7**).

Como ya se mencionó antes, la acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores en el intestino de los mamíferos y juega un papel importante en la modulación de las funciones gástricas, misma que puede ser alterada durante condiciones de inflamación⁴⁵. Es por esto que decidimos investigar el papel de la señalización colinérgica en los ratones controles e infectados. Para esto medimos la actividad aferente mesentérica antes y durante la aplicación de una concentración máxima de hexametonio (un bloqueador de los nAChRs; 1 mM), y en co-aplicación de éste con atropina (1 μ M), un potente inhibidor de los receptores muscarínicos que también bloquea los receptores nicotínicos⁴⁴.

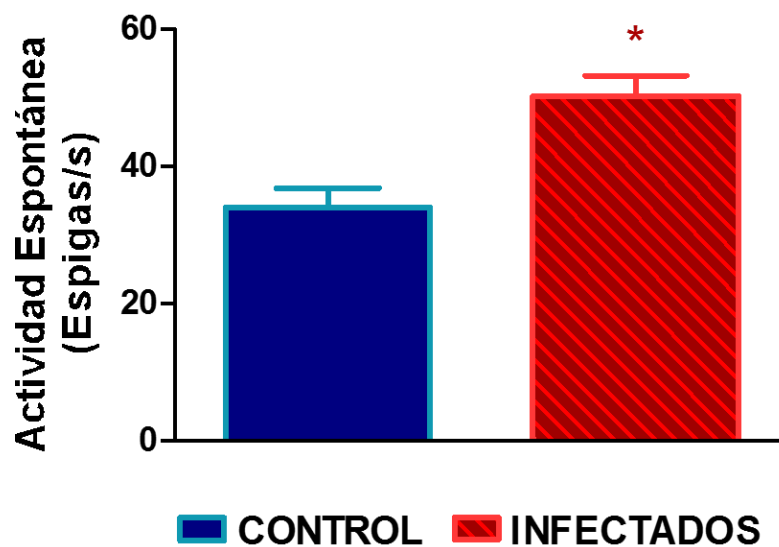


Figura 7. La actividad espontánea del nervio incrementa en el ratón infectado. La gráfica muestra la actividad espontánea del nervio mesentérico de yeyuno de ratón en los animales control e infectados. En el grupo infectado, esta actividad fue significativamente más alta comparada con el control ($P < 0.001$, control $n=24$, infectado $n=23$), las barras representan la media \pm S. E. M.

El incremento en la actividad espontánea en el grupo infectado es probablemente independiente de la actividad motora y la función colinérgica, esto debido a que la actividad espontánea de ambos grupos disminuyó en una proporción similar cuando se aplicó nifedipina 3 μ M (bloqueador de los canales de calcio tipo L) para eliminar la contracción (**Fig. 8**). Igualmente, en ambos grupos se observó una disminución de la actividad espontánea cuando se aplicó hexametonio (1 mM), no obstante, hexametonio más atropina (1 μ M) no generó ningún cambio adicional (con respecto al inducido por hexametonio) (**Fig. 9**). Esto sugiere que tanto en el grupo control como en el infectado hay una liberación tónica de ACh que modula la actividad aferente espontánea de los nervios mesentéricos de yeyuno de ratón, mayormente activando los receptores nicotínicos y además la actividad motora no cambia entre los animales control e infectados.

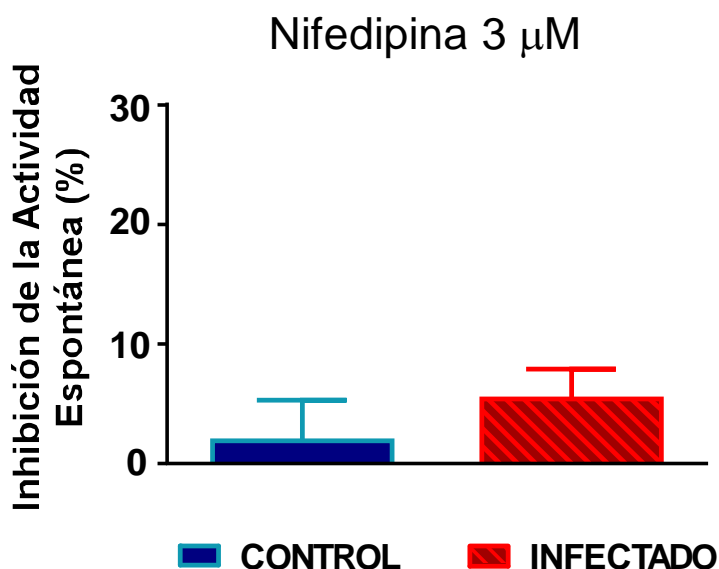


Figura 8. La inhibición de la contracción no tiene un efecto diferencial en la actividad espontánea del nervio entre el grupo control e infectado. Inhibición de la actividad espontánea del nervio mesentérico inducida por nifedipina (3 μ M) en ratones control (n=4) e infectados (n=6). Las barras representan la media \pm S.E.M.

Papel de los receptores colinérgicos en las respuestas mecanosensoriales

La actividad aferente incrementó en respuesta al aumento de la presión intraluminal del yeyuno en ambos grupos. Este incremento es típicamente bifásico y su patrón de respuesta no fue diferente entre ambos grupos de

ratones (**Fig. 10**). Lo cual implica que la actividad mecanosensorial no se modifica en los ratones infestados.

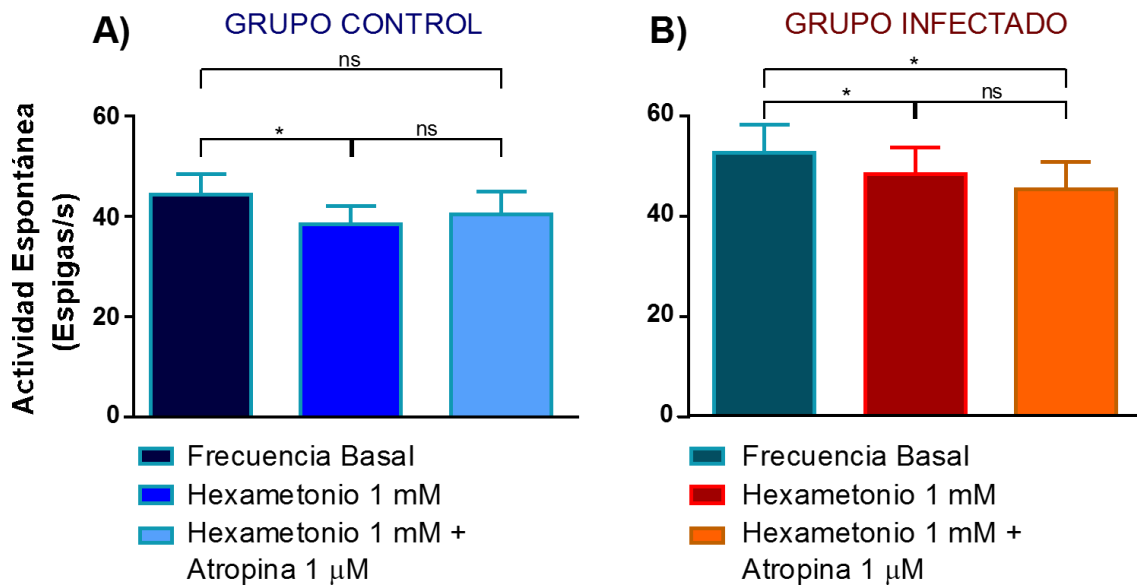


Figura 9. Una pequeña proporción de la actividad espontánea del nervio involucra receptores nicotínicos, pero no muscarínicos, en ambos grupos. La frecuencia de las espigas disminuye cuando hexametonio (1 mM) se aplica, pero no se encontraron efectos adicionales cuando el yeyuno fue perfundido con atropina (1 µM) (control n=10, infectado n=13). Las barras representan la media ± S.E.M (*, P<0.05).

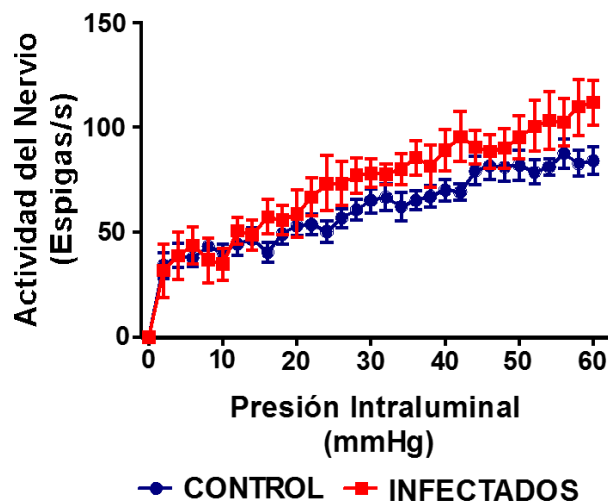


Figura 10. La respuesta mecanosensorial es similar entre el grupo control y el infectado. La gráfica muestra cambios en la actividad del nervio como función de la presión intraluminal en el grupo control e infectado. La actividad del nervio incrementa conforme la presión aumenta en una manera similar en ambos grupos. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control (n=10) e infectado (n=8). Cada punto representa la media ± S.E.M.

Al aplicar los antagonistas colinérgicos antes mencionados, la actividad de disparo inducida por distensión no se modificó en los ratones control. Sin embargo, atropina más hexametonio disminuyeron significativamente la respuesta a distensión en ratones infectados (**Fig. 11**). Esto indica que los receptores muscarínicos están involucrados en la respuesta a distensión en los ratones infectados.

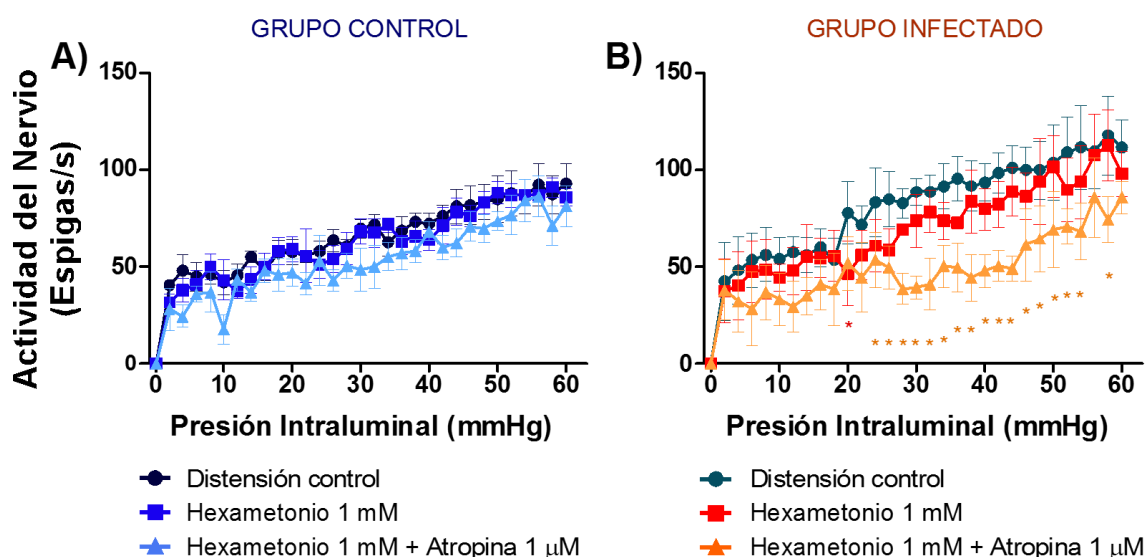


Figura 11. Los receptores muscarínicos están involucrados en la respuesta a distensión, pero solo en el grupo infectado. **A)** La actividad del nervio en función de la presión intraluminal en el ratón control (n=5), no cambia en presencia de hexametonio o hexametonio más atropina. **B)** En el grupo infectado (n=5), disminuyó significativamente la respuesta a distensión en presencia de hexametonio más atropina, pero solo a presiones mayores a 20 mmHg (*, P<0.05).

Antagonista muscarínico disminuye la respuesta a distensión de las espigas de alto-umbral en los ratones infectados

Basado en la morfología de las espigas se realizó un análisis de espiga única. Cada una de las espigas obtenidas se clasificó de acuerdo a su perfil de respuesta a distensión. Esta maniobra nos permitió examinar los efectos de los fármacos en fibras individuales. En la **Fig. 12** se puede observar, en fibras individuales, los tres tipos de respuesta a distensión obtenidas de segmentos de yeyuno de un ratón control (**Fig. 12A**) y un infectado (**Fig. 12B**); las espigas de bajo umbral (Low) responden con un incremento rápido de la actividad del

nervio a presiones bajas, las espigas de amplio umbral (WDR) responden más lento con un incremento directamente proporcional a la presión, las espigas de alto umbral (High) responden con un incremento gradual a presiones mayores a 15 mmHg⁶⁹. Al separar las espigas, encontramos un incremento significativo en la frecuencia espontánea relativa de las espigas únicas, en los animales infectados (**Tabla 3**), lo cual correlaciona con el incremento en la frecuencia de disparo de la actividad espontánea del nervio mesentérico completo, en ratones infectados (véase más arriba).

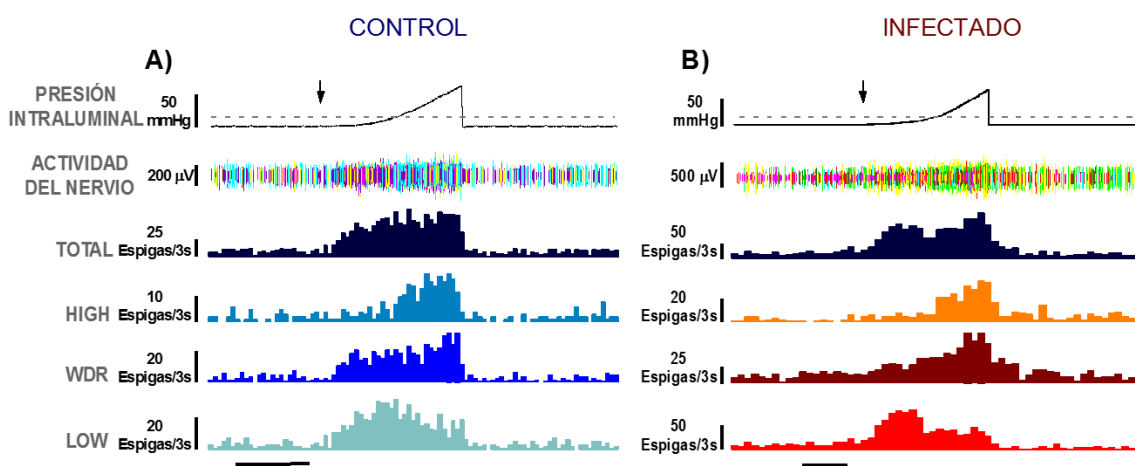


Figura 12. Las espigas se clasificaron por su morfología y su respuesta al incremento en la presión intraluminal. En el panel superior (PRESIÓN INTRALUMINAL) se muestra el incremento en la presión intraluminal cuando se aplica un protocolo de distensión a segmentos de yeyuno. El segundo panel (ACTIVIDAD DEL NERVI) muestra todas las espigas clasificadas por su morfología, en un ratón control **A)** y uno infectado **B)**. Cada color representa un tipo de espiga diferente. El tercer panel (TOTAL) es un histograma de frecuencia de todas las espigas. Los siguientes paneles hacia abajo muestran los histogramas de frecuencia de las espigas de alto umbral (HIGH), de amplio rango dinámico (WDR), y de bajo umbral (LOW). Las espigas HIGH fueron clasificadas como aquellas que responden menos del 20% antes de 15 mmHg (de la respuesta observada entre 50 a 60 mmHg). Las WDR como aquellas que responden a presiones en un intervalo amplio, con más del 20%, pero menos del 55% antes de 15 mmHg. Las espigas LOW son aquellas que responden más del 55% antes de 15 mmHg.

En los ratones control, los antagonistas de los receptores colinérgicos (hexametonio 1 mM solo o junto con atropina 1 µM) no cambian la actividad

inducida por las rampas de distensión en ninguno de los tres tipos de fibras (**Fig. 13A1-A3**). Sin embargo, en los ratones infectados (**Fig. 13B1-B3**), hexametonio (1 mM) más atropina (1 μ M) disminuyeron significativamente la respuesta a distensión en las espigas de alto umbral (**Fig. 13B3**). El hexametonio por sí solo no afectó la actividad unitaria de las diferentes fibras en ninguno de los grupos. Estas observaciones sugieren que los receptores muscarínicos son, al menos en parte, responsables de la actividad de las fibras High durante la distensión, pero solo en el grupo infectado.

Tabla 3. Actividad espontánea multiunitaria y unitaria en ratones control e infectados.

| | Segmentos | Espigas/s | Valor P |
|--------------------------------|-----------|----------------|---------|
| Intestinales (n) | | | |
| Actividad Multiunitaria | | | |
| CONTROL | 24 | 34.4 \pm 2.7 | <0.001 |
| INFECTADO | 23 | 50.3 \pm 3.0 | |
| Actividad Unitaria | | | |
| CONTROL | 10 | 4.2 \pm 0.4 | <0.03 |
| INFECTADO | 8 | 5.9 \pm 0.4 | |

La infección por parásitos incrementa la expresión de citocinas pro-inflamatorias, pero no genera cambios histológicos evidentes

Las infecciones crónicas por helmintos han sido asociadas con la activación de la respuesta inmune innata. *T. spiralis*, *S. mansoni*, y *N. brasiliensis* pueden inducir la respuesta tipo Th2 y Th1. Ésta última es inducida principalmente por el daño causado en las células epiteliales. Opuesto a estos hallazgos, *S. obvelata* no induce inflamación, hiperplasia o respuesta de las células caliciformes del colon donde coloniza. En el presente estudio analizamos histológicamente, secciones de yeyuno y el colon de animales control y de animales infectados con *A. tetraptera* (**Fig. 14**). Observamos que no hay

diferencias histológicas entre los ratones infectados comparados con los ratones control. Lo que indica que en una infección crónica por *A. tetraoptera* no hay daño, ni inflamación aparente en el colon donde habita, ni en la región libre de parásitos (yeyuno), aunque sí se encontraron cambios fisiológicos en la sensibilidad de esta región.

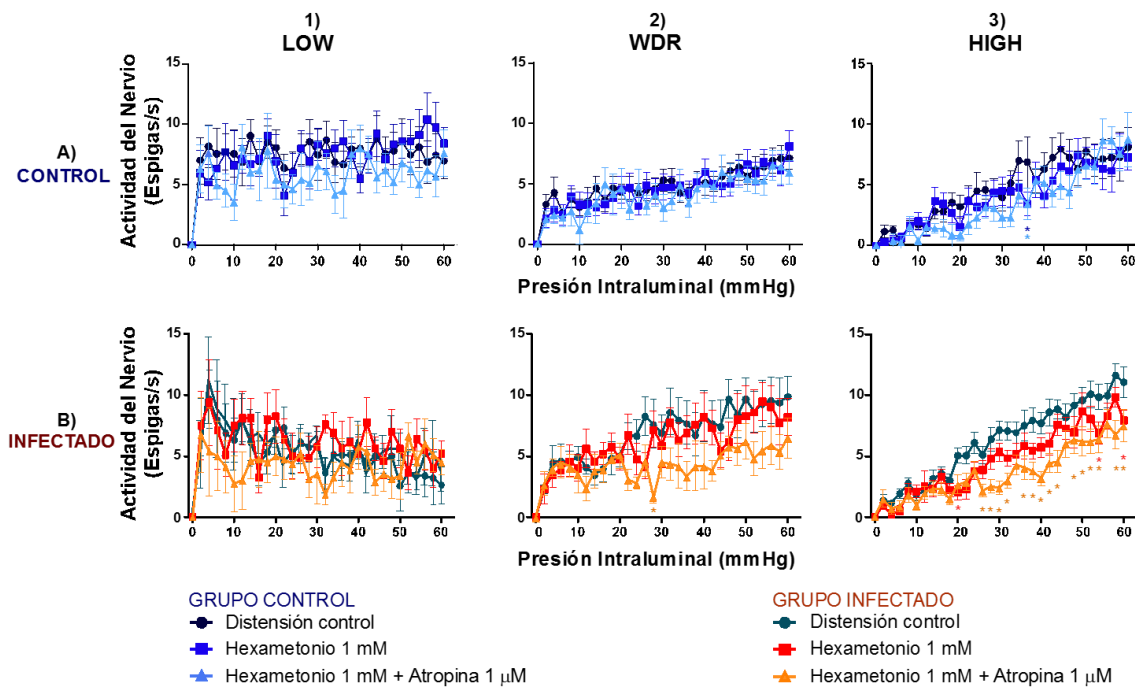


Figura 13. En el ratón infectado, los receptores muscarínicos están involucrados en la respuesta a distensión de las fibras de alto umbral en nervios mesentéricos de yeyuno. En las gráficas se puede observar el perfil de respuesta a distensión de cada grupo de fibras clasificadas. **A)** Actividad aferente en respuesta a distensión en el ratón control (n=5). Respuesta a distensión, antes y durante la aplicación de antagonistas colinérgicos, de las fibras de: **A1)** Bajo umbral (LOW), **A2)** Amplio rango (WDR) y **A3)** Alto umbral (HIGH). **B)** Actividad aferente en respuesta a distensión en el ratón infectado (n=5). Respuesta a distensión, antes y durante la aplicación de antagonistas colinérgicos, de las fibras de: **B1)** Bajo umbral (LOW), **B2)** Amplio rango (WDR) y **B3)** Alto umbral (HIGH). Cada punto representa la media \pm S.E.M. La respuesta de las fibras HIGH a distensión se ve disminuida significativamente en presencia de hexametonio más atropina (*, $P < 0.05$).

Por medio de un análisis semi-cuantitativo en ambos grupos, se midió la expresión de mRNAs de tres citocinas pro-inflamatorias conocidas (IL-1 β , IL-6

e INF γ). Utilizando el gen de GAPDH como control, encontramos que los niveles relativos de mRNA de INF γ incrementaron significativamente, tanto en el yeyuno como en el colon de ratones infectados (**Fig. 15**), mientras que el mRNA de IL-6 solo aumentó significativamente en el colon de ratones infectados, comparado con el grupo control. La expresión de IL-1 β en el colon y en yeyuno, no se vio afectada por la infección. Esto sugiere que, a pesar de no haber una inflamación aparente, la infección por *A. tetraptera* genera cambios a nivel humoral en el hospedero.

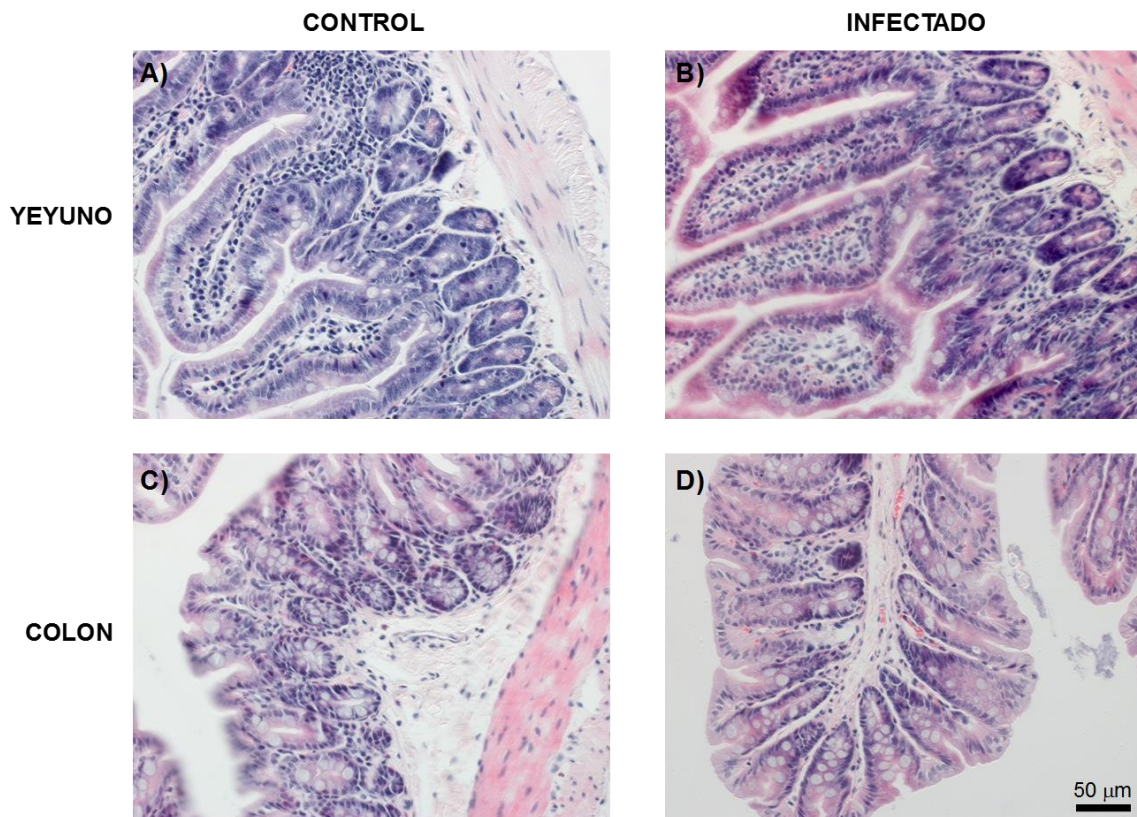


Figura 14. No se encontraron diferencias significativas en el grado de inflamación del yeyuno y del colon entre ambos grupos. Microfotografías de laminillas teñidas con Hematoxilina y eosina de (A y B) yeyuno y (C y D) colon de ratones (A y C) control e (B y D) infectados. No se observaron diferencias en el grado de inflamación entre los animales infectados y control.

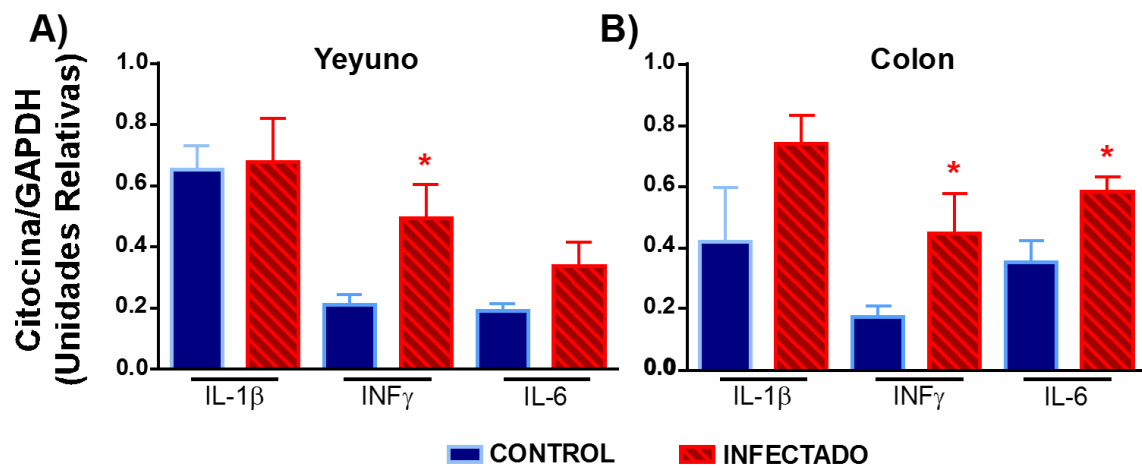


Figura 15. Incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias en el yeyuno y colon de ratones infectados. RT-PCR semi-cuantitativa de mRNA extraído de **A)** yeyuno o **B)** colon de ratones control e infectados. EL nivel de expresión fue cuantificado por análisis de densitometría en geles. La expresión relativa de transcritos de citocinas se muestra como una fracción de la expresión de GAPDH (n=4 por cada grupo). Las barras y líneas representan la media \pm S. E. M. (*, P<0.05), respectivamente.

DISCUSIÓN

Las observaciones de este estudio amplían nuestro conocimiento respecto a cómo la señalización aferente neuronal es modificada por la infección intestinal con *A. tetraoptera* en ratón. La infección crónica con estos gusanos incrementa la actividad espontánea aferente del intestino y la participación de los receptores muscarínicos en la respuesta a distensión de las fibras de alto umbral. Estos cambios en el nervio mesentérico son vistos en el yeyuno, un segmento libre de gusanos, ya que *A. tetraoptera* coloniza el colon.

Análogo a lo que nosotros encontramos, estudios previos documentaron alteraciones en las funciones gastrointestinales en regiones libres de parásitos en animales infectados con *T. spiralis*. Marzio *et al.*, 1990 observó una hipercontratibilidad inducida por carbacol (un agonista de los receptores ACh) en segmentos intestinales-libres de parásitos⁷², resultados similares se obtuvieron en un estudio más reciente⁵⁹, donde se observó una mayor respuesta contráctil inducida por KCl y ACh en áreas intestinales inflamadas y no inflamadas en ratas. Tales cambios ocurren en ausencia de infiltrados celulares en plexo mientérico y plexo submucoso, sin embargo, se encontró que la iniciación del estado de hipercontractilidad requiere de células CD4 y de citocinas Th2 actuando a través de la vía STAT6⁷³, esto puede indicar que la alteración de las funciones en áreas no-inflamadas es el resultado de una respuesta generalizada a la infección. Así, el incremento en la actividad espontánea y la mayor participación de los receptores muscarínicos en la respuesta a distensión, observada aquí, es probablemente el resultado de una respuesta generalizada del hospedero debido a la interacción con *A. tetraoptera* en el colon. En apoyo de esta hipótesis, los ratones infectados con *S. obvelata* presentan una respuesta inmune tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), una elevación de los reticulocitos en sangre, alteraciones en varios linajes de células blancas de la médula ósea y en la sensibilidad a IL-17⁷³, un fenotipo severo de anafilaxis experimental³⁹, y una depresión en el comportamiento exploratorio de ratones⁴³.

Al igual que *S. obvelata*, otros parásitos, como *T. spiralis*, *S. mansoni* y *N. brasiliensis*, pueden inducir una respuesta inmune tipo Th2, caracterizada por una elevación en las interleucinas IL-5, IL-4 e IL-13. Se ha observado que estas dos últimas interleucinas incrementan la contractilidad en la muscularis externa y disminuyen la liberación de ACh^{58,74,75}. Infecciones crónicas con helmintos están asociadas con la activación de la respuesta inmune innata, esta regulación tiene un papel importante en la expulsión del parásito⁷⁶. Sin embargo, *T. spiralis*, *S. mansoni*, y *N. brasiliensis* pueden también inducir la respuesta inmune tipo Th1, mayormente causando daño en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Contrariamente a estos parásitos, se ha visto que *S. obvelata* no induce inflamación o hiperplasia de las células caliciformes, incluso en el colon donde coloniza⁷⁷. Nosotros obtuvimos hallazgos similares a los obtenidos con *S. obvelata*, ya que no se observaron diferencias histológicas en el grado de inflamación del yeyuno o del colon, en los animales infectados con *A. tetraoptera* vs control, incluso tomando en cuenta que el colon es el lugar donde coloniza. Sin embargo, de manera interesante, los niveles de mRNA de las interleucinas Th1; INF γ e IL-6, incrementaron en el colon de ratones infectados. Mientras que solo INF γ incrementó en yeyuno de ratones infectados. Estudios previos han demostrado que el INF γ es capaz de generar alodinia y de modificar la excitabilidad de las neuronas mediante la modulación de la actividad de receptores como GABA_A, NMDA y AMPA^{78,79}. Así mismo, la IL-6 se ha visto involucrada en activación de la glía, en la regulación de la expresión de neuropéptidos, en la generación de hiperexcitabilidad en modelos de inflamación por LPS y es capaz de originar alodinia táctil en ratas control^{80,81}. Debido a que tanto el INF γ como la IL-6 son capaces de alterar la excitabilidad de las neuronas sensoriales, es probable que el incremento en la expresión de éstas observado aquí, modifique o altere la actividad aferente mesentérica.

En el presente estudio, encontramos un incremento en la actividad espontánea de los nervios mesentéricos en ratones con infección crónica por *A. tetraoptera*. Hallazgos similares se reportaron en ratones con 1 a 2 meses de haber sido infectados con *T. spiralis*, tiempo al cual la respuesta inflamatoria inducida por este parásito ya había cedido⁵⁶. Igualmente, se ha reportado una

hiperexcitabilidad de las neuronas del DRG, NG, y del plexo mientérico en animales infectados con *T. spiralis* y *N. brasiliensis*^{56,82,83}. También, en otros modelos post infección, como *Citrobacter rodentium*, se ha demostrado un incremento en la frecuencia aferente espontánea y una hiperexcitabilidad de las neuronas del DRG^{84,85}, no obstante, la respuesta inmune inducida por esta bacteria es diferente que la inducida por gusanos intestinales⁸⁶.

La infección por *A. tetraoptera* no cambio la respuesta aferente inducida por distensión comparado con el grupo control, lo cual concuerda con la falta de efectos en la mecanosensibilidad del yeyuno de ratón (BALB/c), previamente infectado con *N. brasiliensis*⁸². En contraste, otros estudios han reportado un incremento en la sensibilidad mecánica. Como el aumento de la presión sanguínea observado al distender el yeyuno de ratones infectados con *N. brasiliensis*⁵⁵ y el incremento en la respuesta mesentérica inducida por rampas de distensión en ratones con 4 a 8 semanas post-infección con *T. spiralis*⁸³. Además, también se ha reportado un incremento en la sensibilidad visceral provocado por la distensión colon-rectal en ratones infectados con *T. spiralis*⁸⁷.

Por primera vez, encontramos que los receptores muscarínicos son responsables, al menos en parte, de la respuesta a distensión del nervio mesentérico en el grupo infectado, pero no en los controles. Nuestros datos muestran que las fibras de alto umbral son las que median estos cambios en la respuesta a distensión. En estudios previos, se ha relacionado a estas fibras con dolor⁸⁸. Por su parte, los receptores nicotínicos parecen no estar involucrados en la respuesta a distensión porque la sola aplicación de hexametonio no produce ningún cambio tanto en animales infectados como en control. En la vejiga de ratones control la respuesta sensorial inducida por distensión parece ser modulada por los receptores muscarínicos de una manera diferente a la observada en el yeyuno⁵⁰. En la vejiga, los agonistas de los receptores muscarínicos, disminuyen la respuesta mesentérica mecanosensorial⁵⁰, mientras que, en el yeyuno, la activación endógena de los receptores muscarínicos facilita esta respuesta en los ratones infectados, aunque, estos receptores parecen no estar involucrados en el grupo control.

Análogo a lo que hemos reportado, la atropina no afecta la respuesta a distensión en la vejiga de los ratones control. Claramente, más investigación es necesaria para identificar los mecanismos y el tipo de receptores muscarínicos que ajustan la respuesta mecanosensorial en el grupo infectado. Nosotros hipotetizamos, que uno de los mecanismos es a través de la modulación de los canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRPs), los cuales son modulados por los receptores muscarínicos⁸⁹⁻⁹². En apoyo con esta hipótesis, se han encontrado transcritos que codifican para varios receptores musculares en las neuronas del DRG⁹³, incluyendo aquellas que expresan TRPV1. Sin embargo, estos y otros posibles mecanismos, requieren ser investigados experimentalmente.

El hecho de que los receptores nicotínicos, pero no los muscarínicos, modulen parte de la actividad espontánea del nervio y que los receptores muscarínicos, pero no nicotínicos, modulen parte de las fibras de alto umbral, sugiere que estos dos receptores colinérgicos están localizados en distintas poblaciones de axones. Esta interpretación es apoyada por estudios donde se muestra que la actividad espontánea del nervio es mayormente dependiente del disparo de las aferentes vagales⁶⁹, mientras que las fibras de alto-umbral son mayormente aferentes espinales, relacionadas con nocicepción⁸⁸.

CONCLUSIONES

- Por primera vez se demostró, en segmentos de yeyuno de ratón libres de parásitos, una actividad espontánea alterada, de los nervios mesentéricos en animales con infección por *A. tetraoptera*.
- Este cambio en actividad espontánea es independiente de la función colinérgica y de la actividad motora.
- Los receptores nicotínicos, pero no los muscarínicos, afectan la actividad espontánea de una manera similar en los animales control y los infectados.
- La actividad total mecanosensorial del yeyuno no cambia entre el grupo control y el infectado. Sin embargo, parte de esta respuesta depende de la activación de los receptores muscarínicos en animales infectados con este gusano.
- Solo en el grupo infectado los receptores muscarínicos, pero no los nicotínicos, modulan la actividad de las fibras de alto umbral, estas son principalmente aferentes espinales y juegan un importante papel en la nocicepción.
- La infección inducida por *A. tetraoptera* no genera cambios histopatológicos visibles, sin embargo, si existe un incremento en la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias en el colon e inclusive en el yeyuno (área libre de gusanos).

BIBLIOGRAFIA

1. Stokes, C. . & Bailey, M. The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation? *J. Biotechnol.* **83**, 51–55 (2000).
2. Grundy, D. & Brookes, S. *Neural Control of Gastrointestinal Function. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* **3**, (2011).
3. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 (2016).
4. Nishiyama, K., Sugiyama, M. & Mukai, T. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms* **4**, 34 (2016).
5. Willemze, R. A., Luyer, M. D., Buurman, W. A. & de Jonge, W. J. Neural reflex pathways in intestinal inflammation: hypotheses to viable therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 353–362 (2015).
6. Grundy, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* **51**, i2–i5 (2002).
7. Brookes, S. J. H., Spencer, N. J., Costa, M. & Zagorodnyuk, V. P. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 286–296 (2013).
8. Blackshaw, L. A., Brookes, S. J. H., Grundy, D. & Schemann, M. Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* **19**, 1–19 (2007).
9. Vanner, S. J. *et al.* Fundamentals of neurogastroenterology: Basic science. *Gastroenterology* **150**, 1280–1291 (2016).
10. Raffals, L. & Camilleri, M. Visceral hypersensitivity and IBD. *Inflamm. Bowel Dis. Monit.* **13**, 85–91 (2013).
11. Zagorodnyuk, V. P., Chen, B. N. & Brookes, S. J. H. Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *J. Physiol.* **534**, 255–268 (2001).
12. Yu, S., Udem, B. J. & Kollarik, M. Vagal afferent nerves with nociceptive properties in guinea-pig oesophagus. *J. Physiol.* **563**, 831–42 (2005).
13. Tassicker, B. C., Hennig, G. W., Costa, M. & Brookes, S. J. Rapid anterograde and retrograde tracing from mesenteric nerve trunks to the

- guinea-pig small intestine in vitro. *Cell Tissue Res.* **295**, 437–52 (1999).
14. Zagorodnyuk, V. P., Chen, B. N., Costa, M. & Brookes, S. J. H. Mechanotransduction by intraganglionic laminar endings of vagal tension receptors in the guinea-pig oesophagus. *J. Physiol.* **553**, 575–87 (2003).
 15. Lynn, P. A., Olsson, C., Zagorodnyuk, V., Costa, M. & Brookes, S. J. . Rectal intraganglionic laminar endings are transduction sites of extrinsic mechanoreceptors in the guinea pig rectum. *Gastroenterology* **125**, 786–794 (2003).
 16. Berthoud, H. R., Blackshaw, L. A., Brookes, S. J. H. & Grundy, D. Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* **16**, 28–33 (2004).
 17. Berthoud, H.-R. & Powley, T. L. Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: Morphological characterization of the gastric tension receptor. *J. Comp. Neurol.* **319**, 261–276 (1992).
 18. Powley, T. L. & Phillips, R. J. Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs? *Neuroscience* **186**, 188–200 (2011).
 19. Spencer, N. J. *et al.* Identification of functional intramuscular rectal mechanoreceptors in aganglionic rectal smooth muscle from piebald lethal mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, (2008).
 20. Spencer, N. J. *et al.* Identification of capsaicin-sensitive rectal mechanoreceptors activated by rectal distension in mice. *Neuroscience* **153**, 518–534 (2008).
 21. Berthoud, H.-R., Kressel, M., Raybould, H. & Neuhuber, W. Vagal sensors in the rat duodenal mucosa: distribution and structure as revealed by in vivo Dil-tracing. *Anat. Embryol. (Berl)*. **191**, 203–212 (1995).
 22. Paintal, A. S. Responses from mucosal mechanoreceptors in the small intestine of the cat. *J. Physiol.* **139**, 353–68 (1957).
 23. Steinert, R. E. Nutrient sensing in the gut: interactions between chemosensory cells, visceral afferents and the secretion of satiation peptides. *Physiol. Behav.* **105**, 62–70 (2011).
 24. Gershon, M. D. & Tack, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders.

- Gastroenterology* **132**, 397–414 (2007).
25. Hicks, G. A. *et al.* Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT₃ receptors. *J. Physiol.* **544**, 861–869 (2002).
 26. Zagorodnyuk, V. P., Brookes, S. J. H. & Spencer, N. J. Structure-function relationship of sensory endings in the gut and bladder. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **153**, 3–11 (2010).
 27. Morrison, J. F. Splanchnic slowly adapting mechanoreceptors with punctate receptive fields in the mesentery and gastrointestinal tract of the cat. *J. Physiol.* **233**, 349–61 (1973).
 28. Brunnsden, A. M., Brookes, S. J. H., Bardhan, K. D. & Grundy, D. Mechanisms underlying mechanosensitivity of mesenteric afferent fibers to vascular flow. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, (2007).
 29. Longhurst, J. C. & Dittman, L. E. Hypoxia, bradykinin, and prostaglandins stimulate ischemically sensitive visceral afferents. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **253**, (1987).
 30. Brunnsden, A. M., Jacob, S., Bardhan, K. D. & Grundy, D. Mesenteric afferent nerves are sensitive to vascular perfusion in a novel preparation of rat ileum in vitro. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, (2002).
 31. Pinto, R. M., Vicente, J. J., Noronha, D., Goncalves, L. & Gomes, D. C. Helminth Parasites of Conventionally Maintained Laboratory Mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **89**, 33–40 (1994).
 32. Chen, X.-M. *et al.* Pinworm infection in laboratory mice in southern China. *Lab. Anim.* **45**, 58–60 (2011).
 33. Hayashimoto, N. *et al.* Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan. *Exp Anim* **62**, 41–48 (2013).
 34. Abdel-Gaber, R. *Syphacia obvelata* (Nematode, Oxyuridae) infecting laboratory mice *Mus musculus* (Rodentia, Muridae): phylogeny and host-parasite relationship. *Parasitol. Res.* **115**, 975–985 (2016).
 35. Perec-Matysiak, A., Okulewicz, A., Hildebrand, J. & Zalesny, G. Helminth parasites of laboratory mice and rats. *Wiad. Parazytol.* **52**, 99–102 (2006).
 36. Bazzano, T., Restel, T. I., Pinto, R. M. & Gomes, D. C. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*

- 97**, 847–851 (2002).
37. Tanideh, N., Sadjjadi, S. M., Mohammadzadeh, T. & Mehrabani, D. Helminthic Infections of Laboratory Animals in Animal House of Shiraz University of Medical Sciences and the Potential Risks of Zoonotic Infections for Researchers. *Iran. Red Crescent Med. J.* **12**, 151–157 (2010).
 38. Pritchett, K. R. & Johnston, N. A. A Review of Treatments for the Eradication of Pinworm Infections from Laboratory Rodent Colonies. *Contemp. Top. by Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **41**, 36–46 (2002).
 39. Michels, C., Goyal, P., Nieuwenhuizen, N. & Brombacher, F. Infection with *Syphacia obvelata* (pinworm) induces protective Th2 immune responses and influences ovalbumin-induced allergic reactions. *Infect. Immun.* **74**, 5926–5932 (2006).
 40. Taffs, L. F. Pinworm infections in laboratory rodents: a review. *Lab. Anim.* **10**, 1–13 (1976).
 41. Sato, Y., Ooi, H. K., Nonaka, N., Oku, Y. & Kamiya, M. Antibody Production in *Syphacia* Infected Mice. *J. Parasitol.* **81**, 559–562 (1995).
 42. Bugarski, D. *et al.* Hematopoietic changes and altered reactivity to IL-17 in *Syphacia obvelata*-infected mice. *Parasitol. Int.* **55**, 91–97 (2006).
 43. McNair, D. M. & Timmons, E. H. Effects of *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata* on exploratory behavior of an inbred mouse strain. *Lab. Anim. Sci.* **27**, 38–42 (1977).
 44. Barajas-López, C., Karanjia, R. & Espinosa-Luna, R. 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **414**, 113–123 (2001).
 45. Galligan, J. J. & North, R. A. Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* **16**, 64–70 (2004).
 46. Harrington, A. M., Hutson, J. M. & Southwell, B. R. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog. Histochem. Cytochem.* **44**, 173–202 (2010).
 47. Eglen, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **26**, 219–233 (2006).
 48. Stadelmann, a M., Walgenbach-Telford, S., Telford, G. L. & Koch, T. R.

- Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat small intestine. *J. Surg. Res.* **80**, 320–5 (1998).
49. Kondo, T. *et al.* Muscarinic receptor subtypes involved in regulation of colonic motility in mice: Functional studies using muscarinic receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* **670**, 236–243 (2011).
 50. Daly, D. M., Chess-Williams, R., Chapple, C. & Grundy, D. The Inhibitory Role of Acetylcholine and Muscarinic Receptors in Bladder Afferent Activity. *Eur. Urol.* **58**, 22–28 (2010).
 51. Garza, A., Huang, L. Z., Son, J.-H. & Winzer-Serhan, U. H. Expression of nicotinic acetylcholine receptors and subunit messenger RNAs in the enteric nervous system of neonatal rat. *Neuroscience* **158**, 1521–1529 (2009).
 52. Mao, D., Yasuda, R. P., Fan, H., Wolfe, B. B. & Kellar, K. J. Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose ganglia. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1693–1699 (2006).
 53. Hone, A. J., Meyer, E. L., McIntyre, M. & McIntosh, J. M. Nicotinic acetylcholine receptors in dorsal root ganglion neurons include the $\alpha 6\beta 4^*$ subtype. *FASEB J.* **26**, 917–26 (2012).
 54. Rau, K. K., Johnson, R. D. & Cooper, B. Y. Nicotinic AChR in Subclassified Capsaicin-Sensitive and -Insensitive Nociceptors of the Rat DRG. *J. Neurophysiol.* **93**, 1358–1371 (2004).
 55. McLean, P. G. *et al.* Effects of nematode infection on sensitivity to intestinal distension: Role of tachykinin NK2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **337**, 279–282 (1997).
 56. Keating, C. *et al.* Afferent hypersensitivity in a mouse model of post-inflammatory gut dysfunction: role of altered serotonin metabolism. *J. Physiol.* **586**, 4517–30 (2008).
 57. Moreels, T. O. M. G. *et al.* Effect of *Schistosoma mansoni* -induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, 1030–1042 (2001).
 58. Zhao, A. *et al.* Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J. Immunol.* **171**, 948–54 (2003).
 59. Tanović, A., Fernández, E. & Jiménez, M. Alterations in intestinal

- contractility during inflammation are caused by both smooth muscle damage and specific receptor-mediated mechanisms. *Croat. Med. J.* **47**, 318–326 (2006).
60. Collins, S. M., Blennerhassett, P. A., Blennerhassett, M. G. & Vermillion, D. L. Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella* infected rats. *Am. J. Physiol.* **257**, G898–G903 (1989).
 61. Halliez, M. C. M. & Buret, A. G. Gastrointestinal Parasites and the Neural Control of Gut Functions. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 452 (2015).
 62. De Man, J. G. *et al.* Disturbance of the prejunctional modulation of cholinergic neurotransmission during chronic granulomatous inflammation of the mouse ileum. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 695–707 (2001).
 63. De Man, J. G. *et al.* Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 172–84 (2003).
 64. Davis, K. A., Masella, J. & Blennerhassett, M. G. Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Exp. Neurol.* **152**, 251–258 (1998).
 65. Gay, J., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R. & Buéno, L. Enhanced intestinal motor response to cholecystikinin in post-*Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats: Modulation by CCK receptors and the vagus nerve. *Neurogastroenterol. Motil.* **13**, 155–162 (2001).
 66. Luton, K., Walker, D. & Blair, D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 323–327 (1992).
 67. Tkach, V., Pawlowski, J. & Mariaux, J. Phylogenetic analysis of the suborder plagiorchata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial *lsrDNA* sequences. *Int. J. Parasitol.* **30**, 83–93 (2000).
 68. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–80 (1994).
 69. Booth, C. E. *et al.* Influence of the pattern of jejunal distension on mesenteric afferent sensitivity in the anaesthetized rat.

- Neurogastroenterol. Motil.* **20**, 149–158 (2008).
70. Falcón-Ordaz, J., Pulido-Flores, G. & Monks, S. New species of *Aspicularis* (Nematoda: Heteroxynematidae), parasite of *Mus musculus* (Rodentia: Muridae), from Hidalgo, Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* **81**, 669–676 (2010).
 71. Liu, B., Bu, Y. & Zhang, L. A new species of *Aspicularis* Schulz, 1924 (Nematoda, Heteroxynematidae) from the gray-sided vole, *Clethrionomys rufocanus* (Rodentia, Cricetidae), from Tianjin, China. *Acta Parasitol.* **57**, 311–315 (2012).
 72. Marzio, L. *et al.* Altered smooth muscle function in worm-free gut regions of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* **259**, G306-13 (1990).
 73. Mayer, E. A. & Collins, S. M. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* **122**, 2032–2048 (2002).
 74. Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y. & Collins, S. M. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**, G226–G232 (2002).
 75. Hewitson, J. P., Grainger, J. R. & Maizels, R. M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 1–11 (2009).
 76. Moncada, D. M., Kammanadiminti, S. J. & Chadee, K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol.* **19**, 305–311 (2003).
 77. Marillier, R. G. *et al.* IL-4/IL-13 independent goblet cell hyperplasia in experimental helminth infections. *BMC Immunol.* **9**, 11 (2008).
 78. Vikman, K. S., Hill, R. H., Backström, E., Robertson, B. & Kristensson, K. Interferon- γ induces characteristics of central sensitization in spinal dorsal horn neurons in vitro. *Pain* **106**, 241–251 (2003).
 79. Sonekatsu, M. *et al.* Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia-neuron interaction. *Mol. Pain* **12**, (2016).
 80. Zhang, J.-M. & An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **45**, 27–37 (2007).

81. Garcia-Oscos, F. *et al.* Vagal nerve stimulation blocks interleukin 6-dependent synaptic hyperexcitability induced by lipopolysaccharide-induced acute stress in the rodent prefrontal cortex. *Brain. Behav. Immun.* **43**, 149–158 (2015).
82. Aerssens, J. *et al.* Alterations in the Brain-Gut Axis Underlying Visceral Chemosensitivity in *Nippostrongylus brasiliensis*-Infected Mice. *Gastroenterology* **132**, 1375–1387 (2007).
83. Rong, W., Keating, C., Sun, B., Dong, L. & Grundy, D. Purinergic contribution to small intestinal afferent hypersensitivity in a murine model of postinfectious bowel disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **21**, (2009).
84. Ibeakanma, C. *et al.* BrainGut interactions increase peripheral nociceptive signaling in mice with postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **141**, 2098–2108.e5 (2011).
85. Ibeakanma, C. *et al.* *Citrobacter rodentium* colitis evokes post-infectious hyperexcitability of mouse nociceptive colonic dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* **587**, 3505–21 (2009).
86. Patel, N., Kreider, T., Urban, J. F. & Gause, W. C. Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *Int. J. Parasitol.* **39**, 13–21 (2009).
87. Yang, X., Sheng, L., Guan, Y., Qian, W. & Hou, X. Synaptic plasticity: The new explanation of visceral hypersensitivity in rats with trichinella spiralis infection? *Dig. Dis. Sci.* **54**, 937–946 (2009).
88. Grundy, D. Signalling the state of the digestive tract. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **125**, 76–80 (2006).
89. Woo, D. H. *et al.* Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol. Pain* **4**, 42 (2008).
90. Adapala, R. K. *et al.* PKC α mediates acetylcholine-induced activation of TRPV4-dependent calcium influx in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H757–H765 (2011).
91. Bavencoffe, A. *et al.* Complex regulation of the TRPM8 cold receptor channel: Role of arachidonic acid release following M3 muscarinic receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* **286**, 9849–9855 (2011).
92. Birrell, M. A. *et al.* Tiotropium modulates transient receptor potential V1

- (TRPV1) in airway sensory nerves: A beneficial off-target effect? *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, (2014).
93. Tata, A. M., Vilaró, M. T. & Mengod, G. Muscarinic receptor subtypes expression in rat and chick dorsal root ganglia. *Mol. Brain Res.* **82**, 1–10 (2000).
 94. Srinivasan, V. *et al.* Potential use of melatonergic drugs in analgesia: Mechanisms of action. *Brain Res. Bull.* **81**, 362–371 (2010).
 95. Chen, W., Zhang, X. & Huang, W. Pain control by melatonin: Physiological and pharmacological effects (Review). *Exp. Ther. Med.* 1963–1968 (2016). doi:10.3892/etm.2016.3565
 96. Masana, M. I. & Dubocovich, M. L. Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Sci. Signal.* **2001**, (2001).
 97. Carpentieri, A., Díaz De Barboza, G., Areco, V., Peralta López, M. & Tolosa De Talamoni, N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol. Res.* **65**, 437–444 (2012).
 98. Mathes, A. M. Hepatoprotective actions of melatonin: Possible mediation by melatonin receptors. *World J. Gastroenterol.* **16**, 6087–6097 (2010).
 99. Anisimov, S. V. & Popovic, N. Genetic Aspects of Melatonin Biology. *Rev. Neurosci.* **15**, 209–230 (2004).
 100. Carlberg, C. Gene Regulation by Melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 387–396 (2006).
 101. Chen, C. Q., Fichna, J., Bashashati, M., Li, Y. Y. & Storr, M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J. Gastroenterol.* **17**, 3888–3898 (2011).
 102. Moore MD, R. Y. CIRCADIAN RHYTHMS: Basic Neurobiology and Clinical Applications. *Annu. Rev. Med.* **48**, 253–266 (1997).
 103. Srinivasan, V. *et al.* Melatonin, immune function and aging. *Immun. Ageing* **2**, 17 (2005).
 104. Elmegeed, G. A., Baiuomy, A. R. & Abdel-Salam, O. M. E. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of novel synthesized melatonin analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **42**, 1285–1292 (2007).
 105. Arangino, S. *et al.* Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am. J. Cardiol.* **83**, 1417–9 (1999).

106. Cagnacci, A. *et al.* Potentially beneficial cardiovascular effects of melatonin administration in women. *J.Pineal Res.* **22**, 16–19 (1997).
107. Ismail, S. A. & Mowafi, H. A. Melatonin provides anxiolysis, enhances analgesia, decreases intraocular pressure, and promotes better operating conditions during cataract surgery under topical anesthesia. *Anesth. Analg.* **108**, 1146–1151 (2009).
108. Esmat, I. M. & Kassim, D. Y. Comparative study between transdermal nicotine and melatonin patches on postoperative pain relief after laparoscopic cholecystectomy, a double-blind, placebo-controlled trial. *Egypt. J. Anaesth.* **32**, 299–307 (2016).
109. Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J. & Reiter, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* **42**, 28–42 (2007).
110. Shavali, S. *et al.* Melatonin exerts its analgesic actions not by binding to opioid receptor subtypes but by increasing the release of β -endorphin an endogenous opioid. *Brain Res. Bull.* **64**, 471–479 (2005).
111. Morris, R. W. & Lutsch, E. F. Daily Susceptibility Rhythm to Morphine Analgesia. *J. Pharm. Sci.* **58**, 374–376 (1969).
112. Arreola-Espino, R. *et al.* Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **577**, 203–210 (2007).
113. Ambriz-Tututi, M. & Granados-Soto, V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain* **132**, 273–280 (2007).
114. Golombek, D. A., Escolar, E., Burin, L. J., De Brito Sánchez, M. G. & Cardinali, D. P. Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* **194**, 25–30 (1991).
115. Yu, C. X., Zhu, B., Xu, S. F., Cao, X. D. & Wu, G. C. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **403**, 49–53 (2000).
116. Li, S. R. *et al.* Melatonin enhances antinociceptive effects of δ -, but not μ -opioid agonist in mice. *Brain Res.* **1043**, 132–138 (2005).

117. Mantovani, M., Pértile, R., Calixto, J. B., Santos, A. R. S. & Rodrigues, A. L. S. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.* **343**, 1–4 (2003).
118. Uz, T. *et al.* The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Mol. Brain Res.* **136**, 45–53 (2005).
119. Srinivasan, V. *et al.* Melatonin in antinociception: its therapeutic applications. *Curr. Neuropharmacol.* **10**, 167–178 (2012).
120. Bubenik, G. A. Localization of Melatonin in the Digestive Tract of the Rat. *Horm. Res.* **12**, 313–323 (1980).
121. Bubenik, G. A., Ball, R. O. & Pang, S.-F. The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J. Pineal Res.* **12**, 7–16 (1992).
122. Mawe, G. M., Strong, D. S. & Sharkey, K. A. Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and postinflamed gut. *Neurogastroenterol. Motil.* **21**, 481–491 (2009).
123. Song, G. H. Melatonin improves abdominal pain in irritable bowel syndrome patients who have sleep disturbances: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* **54**, 1402–1407 (2005).
124. Lu, W. Z., Song, G. H., Gwee, K. A. & Ho, K. Y. The effects of melatonin on colonic transit time in normal controls and IBS patients. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 1087–1093 (2009).
125. Lu, W. Z., Gwee, K. A., Moolhalla, S. & Ho, K. Y. Melatonin improves bowel symptoms in female patients with irritable bowel syndrome: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**, 927–934 (2005).
126. Reyes-Vázquez, C., Naranjo-Rodríguez, E. B., García-Segoviano, J. a, Trujillo-Santana, J. T. & Prieto-Gómez, B. Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle. *J. Pineal Res.* **22**, 1–8 (1997).
127. Storr, M., Schusdziarra, V. & Allescher, H. D. Inhibition of small conductance K⁺ -channels attenuated melatonin-induced relaxation of serotonin-contracted rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* **78**,

- 799–806 (2000).
128. Barajas-López, C., Peres, A. L., Espinosa-Luna, R., Reyes-Vázquez, C. & Prieto-Gómez, B. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *Eur. J. Pharmacol.* **312**, 319–325 (1996).
 129. Soreq, H. & Seidman, S. Acetylcholinesterase [[mdash]] new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 294–302 (2001).
 130. Cooper, E. Nicotinic acetylcholine receptors on vagal afferent neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **940**, 110–118 (2001).
 131. Sharples, C. G. V & Wonnacott, S. Neuronal Nicotinic Receptors. *Tocris Rev.* **19**, (2001).

ANEXO 1

LA MELATONINA DISMINUYE LA RESPUESTA MECANOSENSORIAL Y LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EN NERVIOS MESENTÉRICOS DE YEYUNO DE RATÓN

INTRODUCCIÓN:

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) es una neurohormona sintetizada a partir de la serotonina (5-Hidroxitriptamina) por medio de dos enzimas bien caracterizadas, la N-acetiltransferasa (AANAT), la cual convierte la serotonina en N-acetilserotonina y la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), que convierte a la N-acetilserotonina en melatonina. La principal enzima limitante para la síntesis de melatonina es AANAT. La melatonina es sintetizada y secretada, en forma circádica, principalmente por la glándula pineal, siguiendo ciclos de luz y oscuridad, llegando a su nivel más alto durante la noche. Una vez sintetizada es liberada al torrente sanguíneo o al fluido cerebroespinal, donde esta hormona llega a los tejidos diana.^{94,95}.

Los efectos de la melatonina son llevados a cabo mediante la activación de los receptores de membrana específicos, denominados MT1, MT2 y MT3⁹⁶. MT1 y MT2 son miembros de la familia de los receptores con 7 dominios transmembranales unidos a proteínas G (GPCR). Ambos están clasificados en el grupo A de los receptores GPCR parecidos a rodopsina. Estos dos receptores están formados por 350 y 362 aminoácidos y sus pesos calculados son de 39 y 40 kDa respectivamente⁹⁷. Ambos receptores están involucrados en la señalización a través de la inhibición de la formación de AMP cíclico y de la actividad de la proteína cinasa A, así como efectos en la fosfolipasa A2 y C y en los canales de calcio y potasio⁹⁸. El sitio de unión de la melatonina, denominado MT3 es una quinona reductasa 2 (QR2) que participa en la reducción del estrés oxidativo, esta enzima es capaz de recibir y donar electrones, puede llegar a transferir de 1 a 4 electrones dependiendo de la

naturaleza del sustrato⁹⁹. La melatonina actúa también a nivel nuclear por medio de la activación de los receptores nucleares denominados RZR (Retinoid Z Receptor) o ROR (Retinoid Orphan Receptor), asimismo la melatonina puede unirse de manera directa a calmodulina, calreticulina o tubulina^{100,101}.

Debido que la melatonina puede alcanzar varios tejidos y tiene varios sitios de activación con diferentes cascadas de señalización, participa en un gran número de procesos fisiológicos; regula el ciclo de sueño-vigilia¹⁰², participa en la inmunomodulación^{103,104}, regula la presión sanguínea y la intraocular¹⁰⁵⁻¹⁰⁸, participa en la eliminación de radicales libres¹⁰⁹, regula la liberación de β -endorfinas por la pituitaria¹¹⁰, produce un efecto antinociceptivo y anestésico, entre otros^{95,104}.

El primer reporte del efecto antinociceptivo de la melatonina fue realizado por Morris y Lutsch en 1969¹¹¹. Ellos reportaron que los animales eran menos susceptibles a dolor durante la noche, cuando los niveles de melatonina son más altos. Desde entonces varios experimentos se han realizado alrededor de esto. Actualmente se sabe que la melatonina tiene un efecto antinociceptivo en dolor inflamatorio y neuropático, sin embargo, la manera en la que la melatonina lleva a cabo este papel, aún sigue sin elucidarse.

Varios estudios han demostrado que al administrar melatonina vía espinal, cerebral e intraperitoneal induce un efecto antinociceptivo el cual es bloqueado por los antagonistas de los receptores membranales MT1 y MT2, y principalmente por el antagonista selectivo de MT2, 4-PPDOT^{112,113}. Aunque, también se ha observado que el efecto antinociceptivo de la melatonina es bloqueado por antagonistas de los receptores opioides¹¹²⁻¹¹⁶, GABA_A¹¹⁴, NMDA¹¹⁷, dopaminérgicos¹¹⁸ y adrenérgicos¹¹⁹. Sin embargo, estudios de afinidad de la melatonina han demostrado que la melatonina, sus agonistas y sus antagonistas no tienen afinidad por los receptores opioides¹¹⁰. Esto sugiere fuertemente que la melatonina a través de la activación de los receptores melatoninérgicos puede regular la función de otros receptores involucrados en

nocicepción y que esta actividad antinociceptiva puede ser tanto a nivel central como a nivel periférico.

La melatonina también es sintetizada por fuentes extrapineales, como lo es el tracto gastrointestinal (GI) donde se encuentra en concentraciones 400 veces más altas que la concentración en el sistema circulatorio. En varias especies se ha encontrado una distribución diferencial de la melatonina a lo largo del intestino, con altos niveles en recto y colon, y niveles más bajos en yeyuno e íleon. La producción de melatonina en el tracto gastrointestinal no sigue un ritmo circadiano como ocurre en la glándula pineal, pero responde a la periodicidad de la ingesta de comida rica en triptófano^{95,120,121}.

Modelos de nocicepción visceral han demostrado que la administración de melatonina reduce el número de contracciones abdominales inducidas por ácido acético, disminución de la respuesta motora inducida por distensión colorrectal en ratas con hiperalgesia por TNBS¹²². También se ha reportado una disminución de los síntomas ocasionados por el síndrome del intestino irritable (IBS) en humanos, los efectos han sido tanto en el mejoramiento de los periodos de diarrea y estreñimiento como disminuyendo la hipersensibilidad visceral¹²³⁻¹²⁵. Considerando que el IBS afecta entre el 11 y el 20% de la población adulta, la posibilidad de que la melatonina tenga roles fisiológicos o farmacológicos en el control del dolor es de mucha importancia⁹⁵.

En la búsqueda de los mecanismos por los cuales la melatonina produce efectos antinociceptivos viscerales, han sido detectados los receptores MT1, MT2 y MT3 tanto en íleon como en colon de varios roedores, también se ha observado la presencia de MT1 en la mucosa y de MT2 en la *muscularis mucosae*, en la submucosa y en la *muscularis propria* en rata⁹⁷. Se ha propuesto que la melatonina altera la motilidad del GI posiblemente a través de la activación de los receptores membranales MT (MT1, MT2 y MT3) en células musculares lisas¹⁰¹. En este contexto, Reyes-Vázquez *et al.*, 1997 y Storr *et al.*, 2000^{126,127} reportaron que la contracción producida por serotonina y agonistas colinérgicos en el estómago e íleon se ve disminuida por melatonina y que este efecto está relacionado con los canales de K⁺ activados por Ca²⁺. Sin embargo,

la motilidad, sensibilidad y otras funciones del tracto gastrointestinal también podrían ser afectadas vía el efecto inhibitorio de la melatonina sobre los canales nicotínicos presentes en las neuronas entéricas como ha sido demostrado por nuestro laboratorio¹²⁸. Es por esto que el objetivo de nuestro trabajo es investigar algunos de los posibles mecanismos por los cuales se genera esta disminución en la sensibilidad visceral. Por medio de registros multiunitarios de nervios mesentéricos de yeyuno de ratón, se evaluará el efecto de la melatonina sobre los receptores colinérgicos, así como el efecto directo de la melatonina sobre la actividad mecanosensorial.

MÉTODOS

La metodología fundamental ha sido descrita arriba, y aquí nos limitamos a mencionar algunas diferencias de las técnicas utilizadas.

Animales

Ratones machos de la cepa C57BL/6 fueron obtenidos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Estado de México. Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con el comité de ética de del *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica*, apegándose a la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Preparación del tejido para registro multiunitario

(Véase pág. 17)

Registro multiunitarios

(Véase pág. 17-18 y **Fig. 4**)

Análisis de espiga única

(Véase pág. 18)

Análisis de datos

La actividad aferente multiunitaria fue cuantificada como aquellos eventos con una amplitud más alta que dos veces el ruido. Las respuestas a los fármacos fueron evaluadas como la media del cambio en la actividad aferente sobre un periodo de 100 s (pico) menos la frecuencia basal medida durante un periodo de 100 s. Las respuestas a distensión intraluminal fueron medidas como el cambio en la frecuencia de disparo cada 5 mmHg substrayendo la frecuencia basal. Se realizaron comparaciones múltiples usando ANOVA de una o dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett. Los datos fueron expresados como la media \pm Error Estándar de la Media (S.E.M.). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P \leq 0.05$.

Fármacos

Todos los fármacos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Las soluciones stock para hexametonio (1 M), acetilcolina (1 M), carbacol (1 M) y nicotina (1M) fueron preparadas con agua destilada. Atropina (100 mM) y melatonina (100 mM) con DMSO como solvente.

RESULTADOS

La melatonina reduce la respuesta de los agonistas colinérgicos

Como primera instancia, se investigó el efecto de la melatonina sobre la actividad espontánea del nervio mesentérico, para esto se aplicaron diferentes concentraciones de melatonina (0.01-1000 μM) sobre la actividad espontánea del nervio, con el objeto de evaluar el efecto directo de ésta sobre la actividad mesentérica del yeyuno. Se observó que la melatonina no tiene efecto sobre actividad espontánea (**Fig. 16**), ya que ésta no cambia.

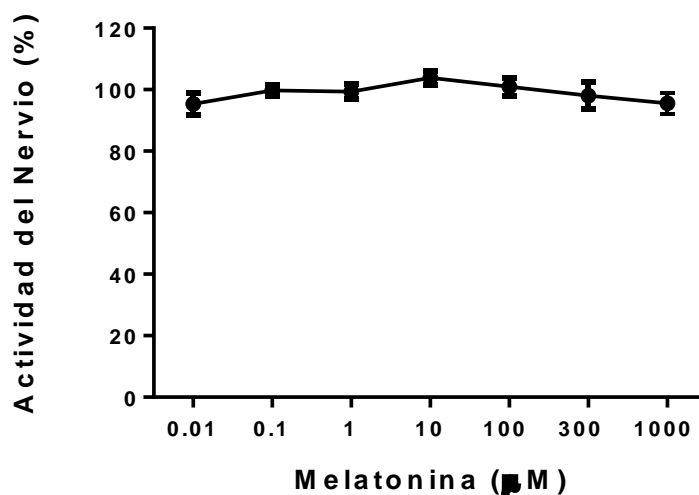


Figura 16. La melatonina no tiene efecto sobre la actividad aferente espontánea del yeyuno de ratón. Efecto de la aplicación de melatonina (0.01-1000 μM) sobre la actividad basal del nervio (100%) Cada punto representa la media \pm S.E.M. n=4-13.

Después se procedió a evaluar el efecto de la acetilcolina (ACh) sobre la actividad de los nervios mesentéricos, la cual es principal neurotransmisor del sistema nervioso periférico (PNS) y está involucrada en muchas funciones gastrointestinales a través de la activación de los receptores nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs)^{44,45}. La aplicación de este neurotransmisor (1-10000 μM) incrementó la frecuencia de disparo del nervio de manera dependiente de la concentración (**Fig. 17**), indicando que la actividad de los nervios mesentéricos del yeyuno puede ser modulada por la activación de los receptores colinérgicos.

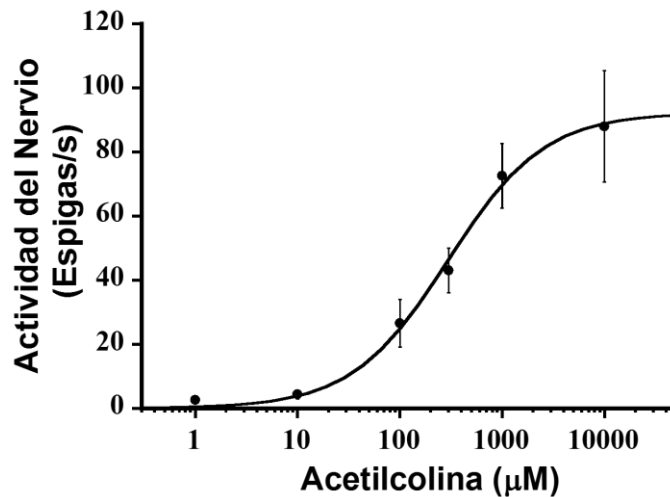


Figura 17. La acetilcolina incrementó la frecuencia de disparo de los nervios aferentes en una manera concentración dependiente. Incremento en la actividad del nervio mesentérico inducido por la aplicación extraluminal de acetilcolina en yeyuno de ratón. Cada círculo representa la media y las líneas asociadas a cada círculo es el S.E.M. n=3-5.

Utilizando acetilcolina 100 µM y 1 mM, se probó el efecto de la melatonina sobre la actividad del nervio inducida por este agonista colinérgico. Para esto, se pre-aplico la melatonina por 5 min, antes de aplicar acetilcolina más la melatonina. La melatonina disminuyó la respuesta a acetilcolina de una manera dependiente de la concentración (**Fig. 18**). Este efecto inhibitorio de la melatonina fue muy similar en ambas concentraciones, aunque fue ligeramente mayor en acetilcolina 1 mM (**Fig. 18B**), debido a que melatonina 1 mM, redujo aproximadamente el 60% de la respuesta inducida por acetilcolina 100 µM (**Fig. 18A**), mientras que esta misma concentración de melatonina inhibió cerca del 70% de la respuesta inducida por acetilcolina 1 mM.

La acetilcolina puede ser degradada por acetilcolinesterasas y esto generar cambios en la concentración de este neurotransmisor¹²⁹. Para evitar la degradación del agonista decidimos usar carbacol, el cual no es metabolizado por la acción de estas enzimas. Al igual que con la acetilcolina, diferentes concentraciones de carbacol generaron un incremento en la respuesta multiunitaria, de forma dependiente de la concentración (**Fig. 19A**). El incremento que se generó por carbacol 600 µM disminuyó al aplicar melatonina a diferentes concentraciones (**Fig. 19B**), con un máximo de inhibición del 60%

con melatonina 1 mM. Con esto se comprobó que 1 mM de melatonina inhibe entre el 60 y 70% de la respuesta inducida por acetilcolina o carbacol. Esto sugiere que la melatonina modula un solo tipo de receptor colinérgico o una fracción de ambos receptores colinérgicos.

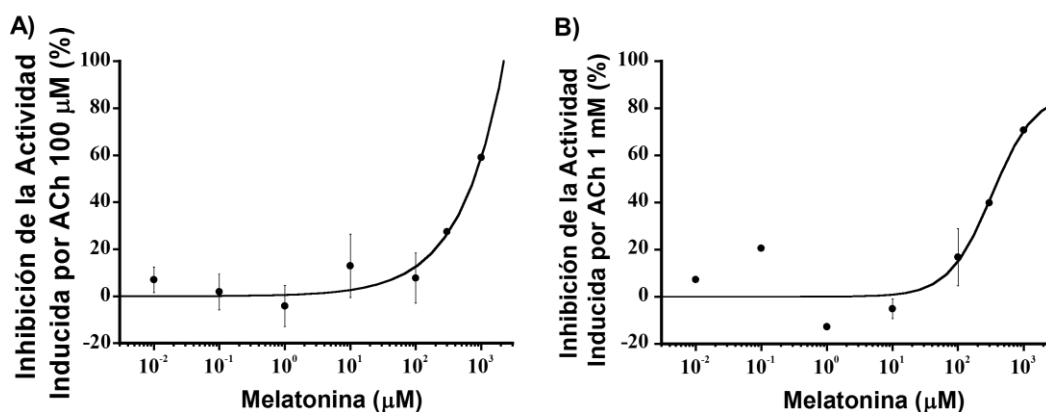


Figure 18. La melatonina inhibe la respuesta inducida por acetilcolina. A) Porcentaje de inhibición generado por melatonina (0.01-1000 μM) sobre la respuesta inducida por acetilcolina 100 μM. La concentración máxima de melatonina no fue suficiente para calcular la IC₅₀. La inhibición a 1 mM de melatonina fue del 59%. n=2-3. **B)** Porcentaje de inhibición generado por melatonina (0.01-1000 μM) sobre la respuesta inducida por acetilcolina 1 mM. La inhibición a 1 mM de melatonina fue del 71%. n=2-4. Cada punto representa la media ± S.E.M.

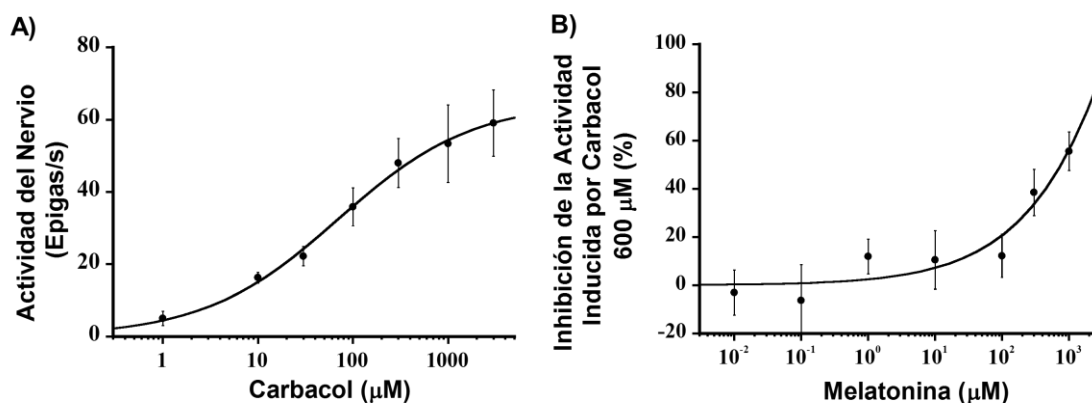


Figure 19. La melatonina inhibe la respuesta inducida por carbacol. A) Cambio en la frecuencia de disparo de los nervios mesentéricos en respuesta a diferentes concentraciones de carbacol (1-1000 μM) en el yeyuno de ratón. n=6-7. **B)** Porcentaje de inhibición inducido por diferentes concentraciones de melatonina (0.01-1000 μM) sobre la respuesta inducida por carbacol 600 μM. La melatonina 1 mM inhibe cerca del 60% de la respuesta inducida por carbacol. n=3-8. Cada circulo representa la media y las líneas asociadas a cada circulo es el S.E.M.

La melatonina inhibe la respuesta colinérgica a través de los receptores nicotínicos.

Para poder discriminar entre los dos tipos de receptores colinérgicos utilizamos hexametonio 1 mM (bloqueador los nAChRs) y/o hexametonio 1 mM más atropina 1 μ M (inhibidor no específico de los mAChRs). Se obtuvo que receptores nicotínicos, representan un 60% de la respuesta inducida por ACh 1 mM (**Fig. 20A**), y un 75% de la respuesta inducida por carbacol 1 mM (**Fig. 20B**). En ambos casos hay una mayor proporción de la respuesta que depende los nAChRs que de los mAChRs, estos últimos median el 30% de la respuesta a acetilcolina 1 mM y el 25% de la respuesta a carbacol 1 mM. Si la melatonina inhibe entre el 60 y el 70% de la respuesta a los agonistas colinérgicos, esto nos sugiere que probablemente el efecto de la melatonina sea a través de los receptores nicotínicos.

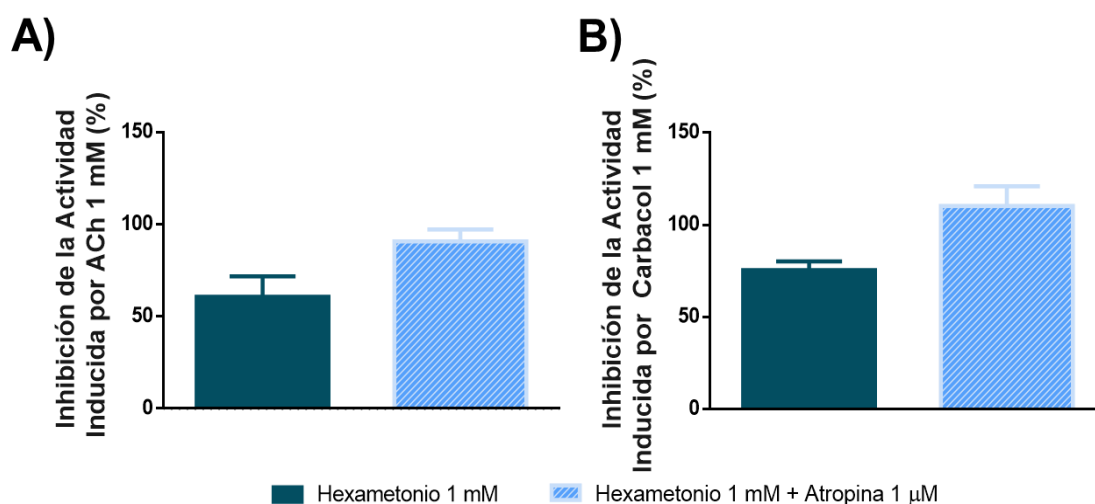


Figura 20. Proporción de los receptores muscarínicos y nicotínicos que responden a agonistas colinérgicos. A) Hexametonio 1 mM inhibe el 60% de la respuesta inducida por acetilcolina 1 mM, mientras que hexametonio 1 mM más atropina 1 μ M inhibe el 90% del total de la respuesta. n=3. **B)** Hexametonio 1 mM inhibe el 75% de la respuesta inducida por carbacol 1 mM, pero hexametonio 1 mM más atropina 1 μ M inhiben la totalidad de la respuesta inducida por carbacol. n=7-8. Las gráficas están expresadas en porcentaje de inhibición de la respuesta inducida por agonistas colinérgicos. Las barras y líneas representan la media \pm S.E.M.

La aplicación de nicotina 10 μM también indujo un incremento en la frecuencia de disparo de los nervios mesentéricos. Este fármaco es un agonista específico de los nAChRs, especificidad que se comprobó al agregar hexametonio 1 mM y obtener el 100% de inhibición (**Fig. 21**). Sin embargo, la melatonina 300 y 1000 μM inhibieron el 55 y 75%, respectivamente, de la respuesta inducida por nicotina 10 μM . Lo cual nos sugiere que la melatonina efectivamente inhibe la respuesta de los nAChRs, sin embargo, se necesita hacer más experimentos a fin de encontrar el mecanismo por el cual es capaz de inhibir la actividad de los nAChRs

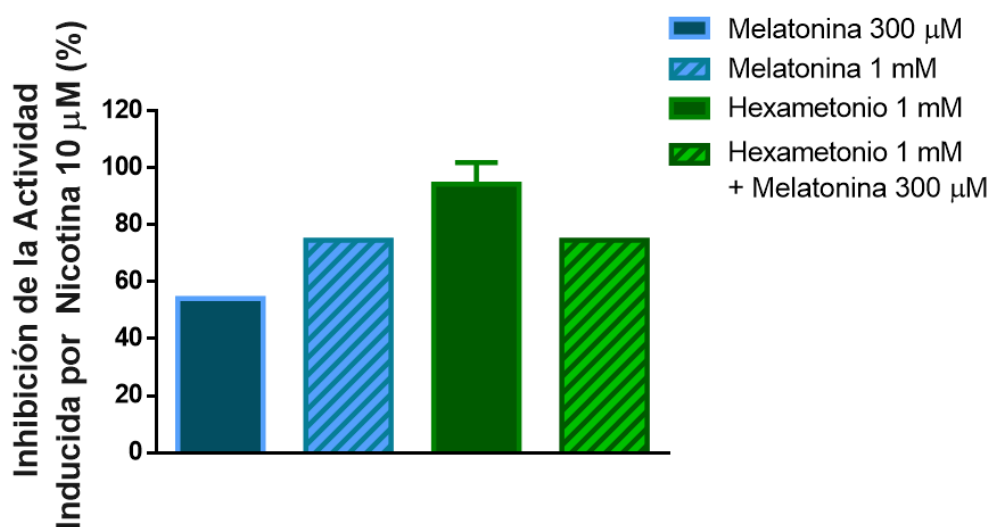


Figura 21. La melatonina inhibe la respuesta inducida por los receptores nicotínicos. La melatonina 300 μM y 1 mM inhiben el 54 y 74%, respectivamente, de la respuesta inducida por nicotina. Por su parte, hexametonio 1 mM inhibe el 100% de la respuesta, pero, hexametonio 1 mM + melatonina 300 μM inhiben el 74% de la respuesta inducida por nicotina 10 μM . n=2-3. Las barras y líneas representan la media \pm S.E.M.

La melatonina inhibe la respuesta de los nervios mesentéricos inducida por la distensión intraluminal en el yeyuno de ratón

Hasta ahora se sabe que los receptores colinérgicos pueden activar las aferentes mesentéricas del yeyuno, principalmente mediante la activación de los nAChRs, y la actividad de estos receptores puede ser modulada por melatonina. Para evaluar el efecto de la melatonina sobre la actividad aferente

mecanosensorial, realizamos rampas de distensión. La melatonina (0.01-1000 μM) fue aplicada 5 min antes y durante la distensión. La melatonina redujo la actividad inducida por distensión, disminución que comenzó a ser evidente a partir de 100 μM , con una mayor reducción a 1 mM (**Fig. 22**). Esta disminución en la respuesta mecanosensible no se observa en los controles con el vehículo (DMSO), comprobando que el efecto es debido a la melatonina (**Fig. 23**).

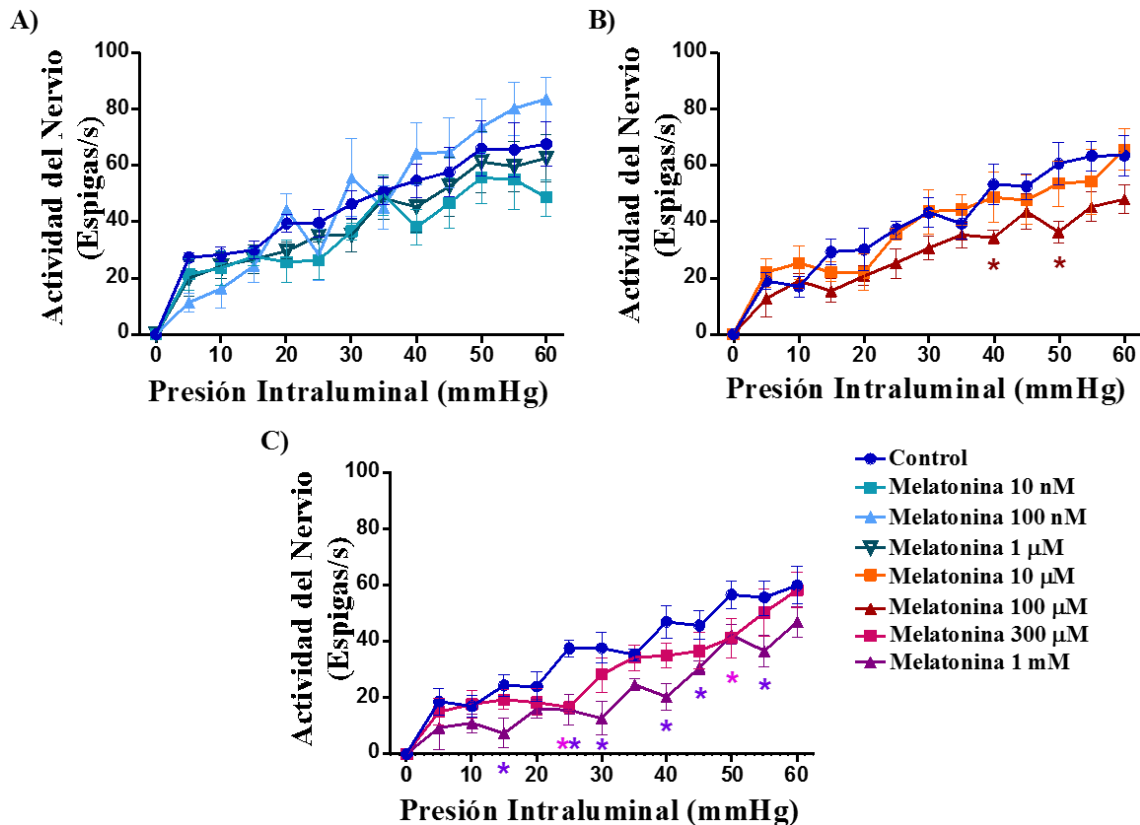


Figure 22. La melatonina tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta mecanosensorial de los nervios mesentéricos. Las gráficas muestran un incremento en la actividad del nervio inducida por distensión y el efecto de la melatonina sobre ella **A)** Efecto de la melatonina a bajas concentraciones (0.01-1 μM) sobre la actividad mecanosensorial. n=4-7. **B)** Efecto de la melatonina a 10 y 100 μM durante la respuesta a distensión. n=5-8. **C)** Efecto de la melatonina a concentraciones altas (300-1000 μM) sobre la actividad mecanosensorial, n=5-6. La melatonina 1 mM redujo significativamente la respuesta a distensión. Cada símbolo representa la media y las líneas la S.E.M. *, P<0.05.

La melatonina inhibe principalmente a las fibras WDR y a las de alto umbral.

Con el mismo criterio de discriminación morfológica de las espigas mencionado con anterioridad realizamos el análisis de espiga única. Cada una de las espigas obtenidas se clasificó de acuerdo a su perfil de respuesta a distensión. La melatonina no modificó actividad mecanosensorial de las espigas Low (**Fig. 24**), sin embargo, disminuyó tanto las fibras WDR (**Fig. 25**) como las High (**Fig. 26**). En ambos casos se comienza a observar esta disminución a partir de la aplicación de melatonina 100 μM con un máximo de inhibición observado a melatonina 1 mM. Además, es importante resaltar que en las

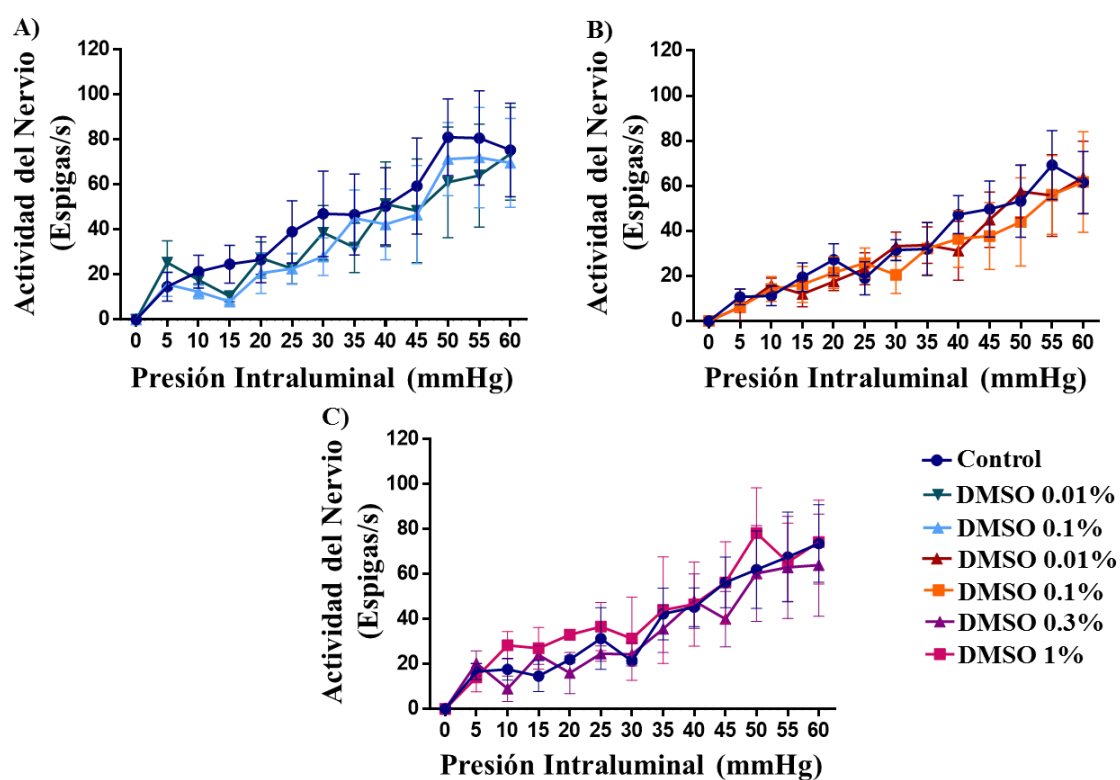


Figure 23. El DMSO no afecta la actividad mecanosensorial. Las gráficas muestran un incremento en la actividad del nervio inducida por distensión y el efecto del vehículo (DMSO) sobre ella. **A)** Respuesta mecanosensorial del nervio completo a concentraciones de DMSO usadas durante la aplicación 0.1 y 1 μM de melatonina. **B)** Respuesta mecanosensorial del nervio completo a concentraciones de DMSO usadas durante la aplicación de 10 y 100 μM de melatonina **C)** Efecto del vehículo sobre la actividad del nervio completo, a concentraciones usadas durante la aplicación de 300 y 1000 μM de melatonina. (n=4). No se observaron cambios en la actividad total mecanosensorial del nervio. Cada símbolo representa la media \pm S.E.M.

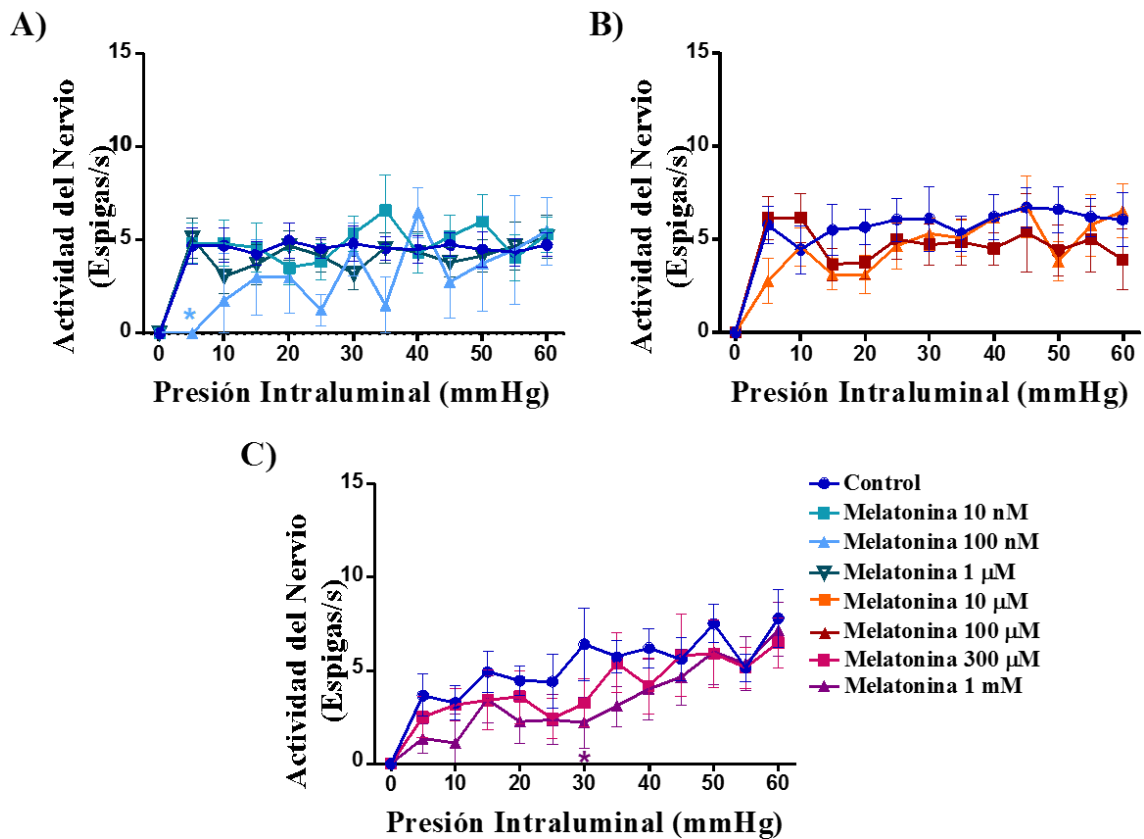


Figure 24. La mecanosensibilidad de las espigas de bajo umbral no se ve afectada por la aplicación de melatonina. Las gráficas muestran la actividad del nervio inducida por distensión en espigas clasificadas como de bajo umbral (Low). **A)** Respuesta mecanosensorial de las espigas Low a concentraciones de 0.1-1 μM de melatonina ($n=5$, $n^*=5-18$). **B)** Respuesta mecanosensorial de las espigas Low a concentraciones de 10 y 100 μM de melatonina ($n=5$, $n^*=15-21$). **C)** Efecto de la melatonina a altas concentraciones (300-1000 μM) sobre la respuesta inducida por distensión en espigas Low ($n=5$, $n^*=13-17$). No se observaron cambios en la actividad mecanosensorial de las espigas de bajo umbral. Cada símbolo representa la media \pm S.E.M. *, $P<0.05$. n = número de repeticiones, n^* =número de espigas.

fibras High, disminuye la distensión control conforme se aumenta la concentración de melatonina. Es decir, pareciera que aplicaciones previas de melatonina a bajas concentraciones tiene un efecto acumulativo en la respuesta a distensión de las fibras High. No obstante, esto debe de ser estudiado más a fondo.

Similar a lo obtenido con melatonina, el vehículo (DMSO) no fue capaz de disminuir la respuesta mecanosensorial en las espigas Low (**Fig. 27**).

Contrario a melatonina, el DMSO no disminuyó de manera significativa la respuesta mecanosensorial en fibras WDR (**Fig. 28**) ni en espigas High (**Fig. 29**). Sin embargo, se debe incrementar el número de repeticiones control con DMSO.

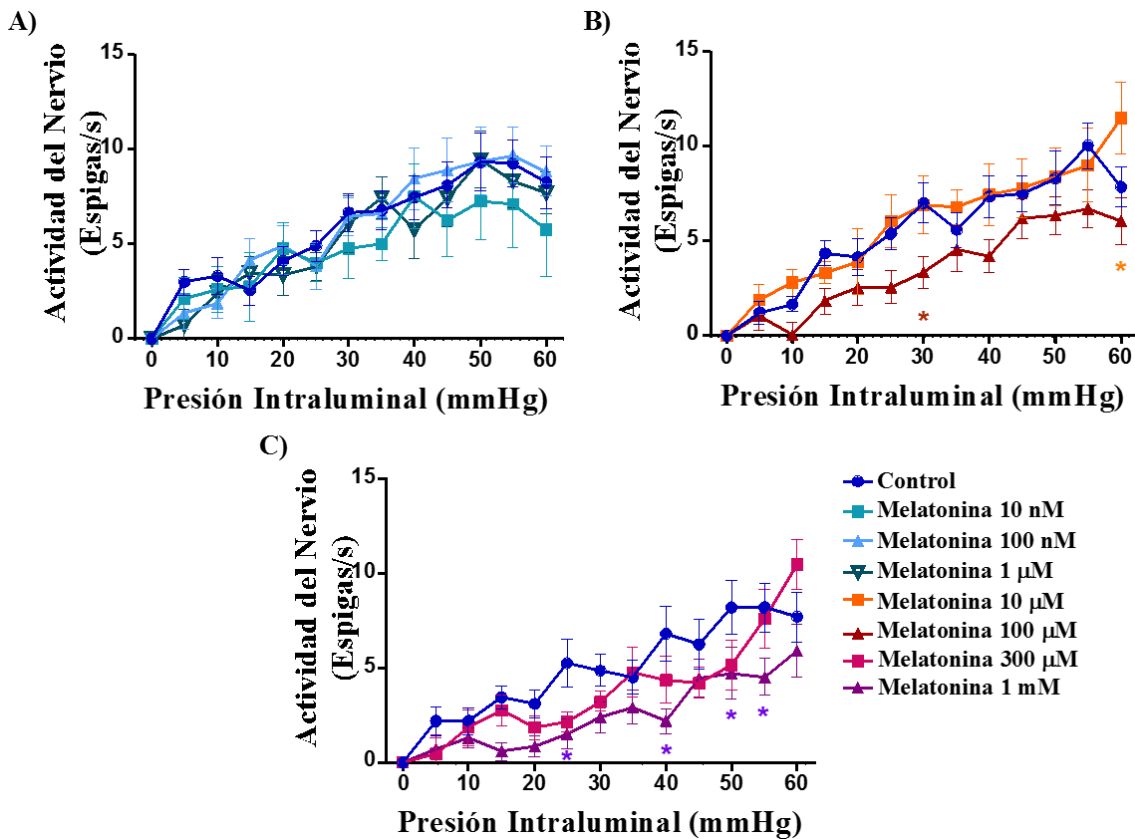


Figura 25. Las espigas de amplio rango reducen su respuesta a distensión cuando se aplica melatonina. Las gráficas muestran la actividad del nervio inducida por distensión en espigas clasificadas como amplio rango dinámico (WDR). **A)** Respuesta a la aplicación de 0.01-1 μM de melatonina sobre la actividad del nervio inducida distensión de las espigas WDR (n=7, n*=8-18). **B)** Efecto de 10 y 100 μM de melatonina sobre la respuesta a distensión (n=7, n*=13-21). **C)** Actividad de los nervios mesentéricos en respuesta a distensión y a la aplicación de 300 y 1000 μM de melatonina en las espigas WDR (n=7, n*=12-15). A partir de 100 μM de melatonina se comienza a observar una disminución en la respuesta a distensión. Cada símbolo representa la media y las líneas, el S.E.M. *, P<0.05. n= número de repeticiones, n*=número de espigas.

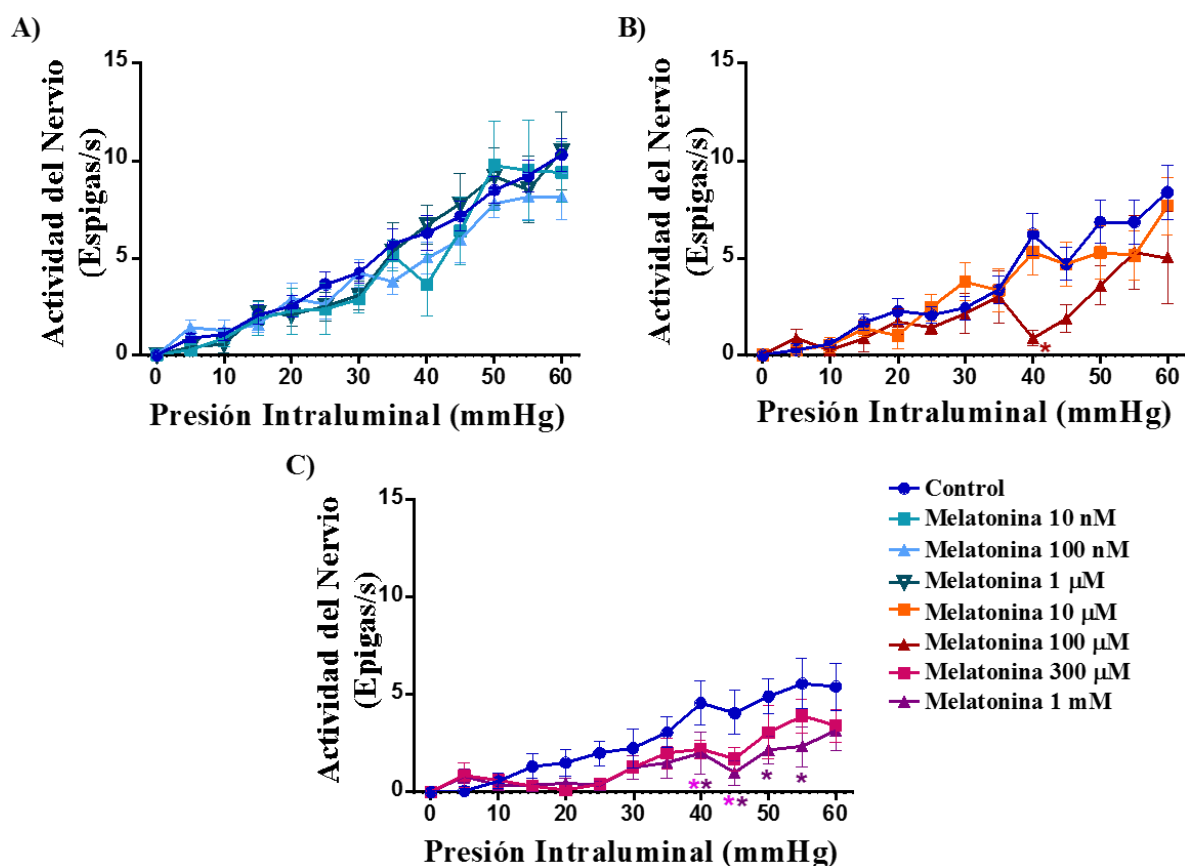


Figura 26. La melatonina disminuye la respuesta a distensión de las fibras de alto umbral en yeyuno de ratón. Las gráficas muestran la actividad del nervio inducida por distensión en espigas clasificadas como de alto umbral (High). **A)** Respuesta mecanosensorial de las espigas High en presencia de 0.01-1 μM de melatonina (n=6, n*=8-17). **B)** Respuesta mecanosensorial de las espigas High en presencia de 10 y 100 μM de melatonina (n=7, n*=6-19). **C)** Efecto de 300 y 1000 μM de melatonina sobre la respuesta mecanosensorial de las espigas High (n=6, n*=10-12). Cada símbolo representa la media y las líneas la S.E.M. *, P<0.05. n= número de repeticiones, n*=número de espigas.

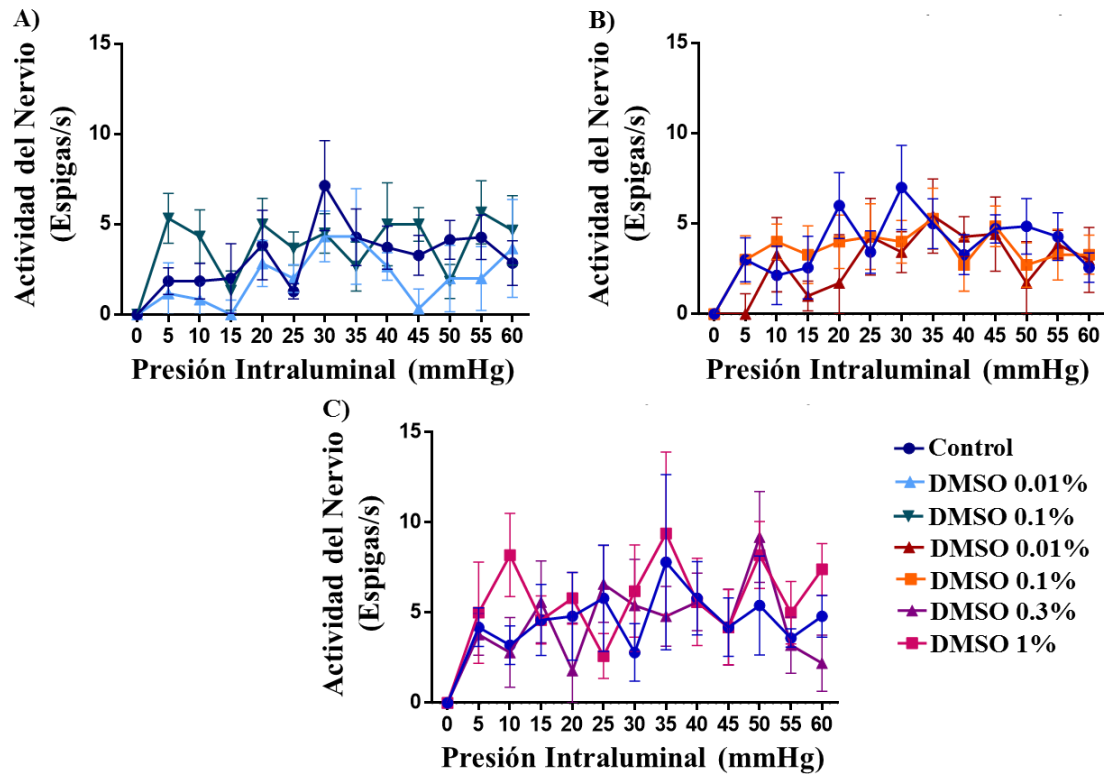


Figure 27. La mecanosensibilidad de las espigas de bajo umbral no se ven afectadas por la aplicación de DMSO. Las gráficas muestran la actividad del nervio inducida por distensión en espigas clasificadas como de bajo umbral (Low). **A)** Actividad mecanosensorial de las espigas Low a concentraciones de DMSO usados durante la aplicación de 0.1 y 1 μ M de melatonina (n=4, n*=6). **B)** Respuesta mecanosensorial de las espigas Low a concentraciones de DMSO usadas durante la aplicación de 10 y 100 μ M de melatonina (n=4, n*=7). **C)** Efecto de DMSO a concentraciones usadas durante la aplicación de 300-1000 μ M de melatonina sobre la respuesta inducida por distensión en espigas Low (n=4, n*=5). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las aplicaciones. Cada símbolo representa la media \pm S.E.M. n= número de repeticiones, n*=número de espigas

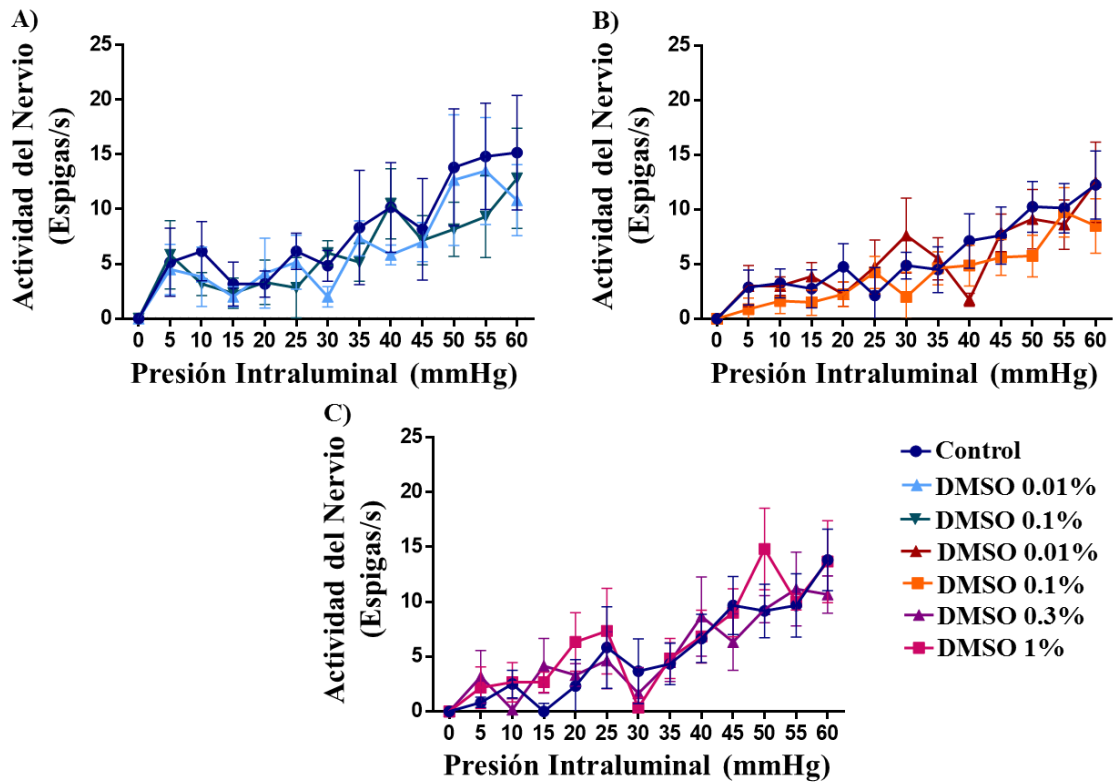


Figura 28. Las espigas de amplio rango no son afectadas por DMSO. Las gráficas representan la actividad del nervio inducida por distensión en espigas clasificadas como amplio rango dinámico (WDR). **A)** Respuesta a concentraciones de DMSO usadas durante la aplicación de melatonina (0.1-1 μM) sobre la actividad del nervio inducida distensión de las espigas WDR (n=4, n*=6). **B)** Efecto del vehículo usado durante la aplicación de melatonina a (10-100 μM) sobre la respuesta a distensión. (n=4, n*=8). **C)** Actividad de los nervios mesentéricos en respuesta a distensión y a la aplicación del vehículo usado durante la aplicación de melatonina (300-1000 μM) en las espigas WDR (n=4, n*=6). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las aplicaciones. Cada símbolo representa la media y las líneas, el S.E.M. n= número de repeticiones, n*=número de espigas.

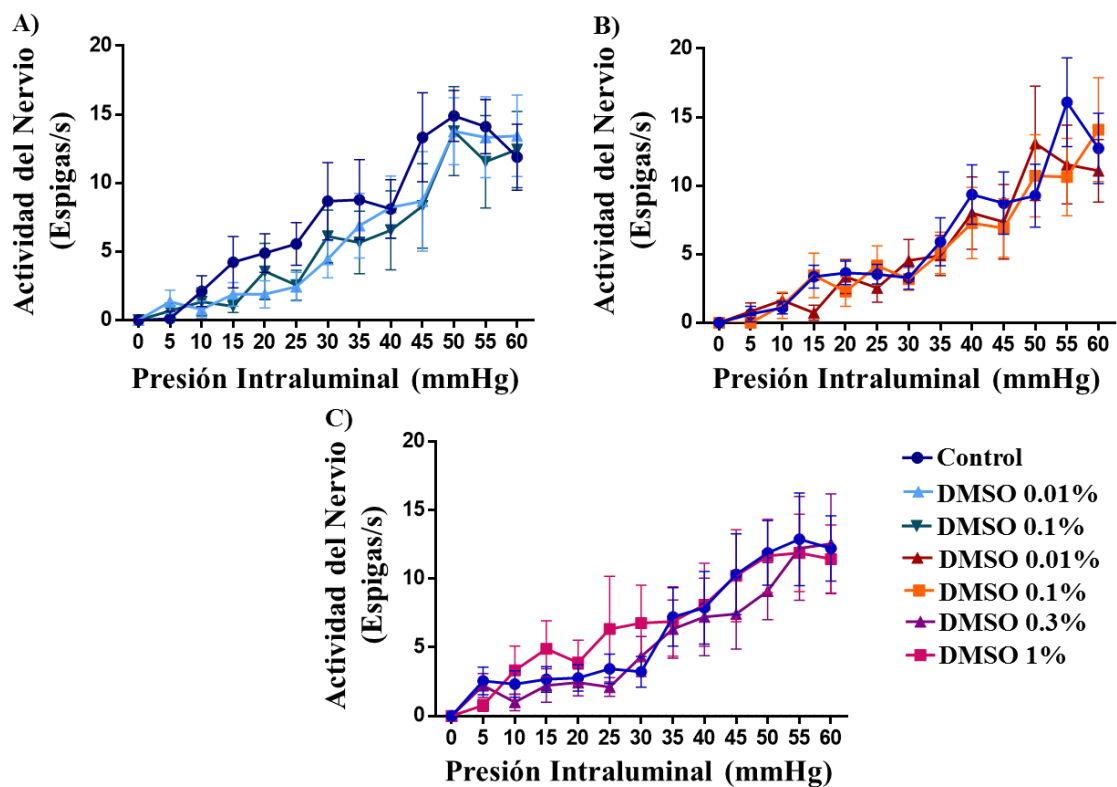


Figura 29. La actividad mecanosensorial de las fibras de alto umbral en yeyuno de ratón no se ve afectada por la aplicación de DMSO. Las gráficas muestran la actividad del nervio inducida por distensión en espigas clasificadas como de alto umbral (High). **A)** Respuesta mecanosensorial de las espigas High en presencia del vehículo usado durante la aplicación de 0.1 y 1 μM de melatonina ($n=4$, $n^*=9$). **B)** Respuesta mecanosensorial de las espigas High en presencia del vehículo usado durante la aplicación de 10 y 100 μM de melatonina ($n=4$, $n^*=11$). **C)** Efecto del DMSO usado para la aplicación de 300 y 1000 μM de melatonina sobre la respuesta mecanosensorial de las espigas High ($n=4$, $n^*=9$). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las aplicaciones. Cada símbolo representa la media y las líneas la S.E.M. n = número de repeticiones, n^* =número de espigas.

DISCUSIÓN

Los hallazgos encontrados hasta ahora apoyan la idea del uso de la melatonina como un antinociceptivo natural para el tratamiento de dolores viscerales. Nuestras observaciones confirman que la melatonina puede modular las respuestas mediadas por receptores nicotínicos, lo cual parece relevante cuando se considera que tales receptores juegan un papel muy importante en la modulación de la motilidad intestinal y en la sensibilidad de las neuronas entéricas⁴⁵. Adicionalmente, por primera vez se demostró el efecto inhibitorio directo de la melatonina sobre las fibras aferentes de los nervios mesentéricos, actuando sobre las fibras de amplio rango dinámico y principalmente sobre las de alto umbral.

Opuesto a lo que se ha encontrado en los nervios de vejiga⁵⁰, nosotros obtuvimos un incremento en la frecuencia de disparo de los nervios mesenterios cuando aplicamos acetilcolina, carbacol y nicotina, mismo que fue dependiente de la concentración. Varios estudios han demostrado la presencia de nAChRs y mAChRs en las neuronas primarias ubicadas en el ganglio nodoso y en el ganglio de la raíz dorsal, igualmente en neuronas entéricas^{47-49,51-53} (como se discute en el capítulo anterior). Los receptores nAChRs y los mAChRs son capaces de mediar respuestas excitatorias tanto en las neuronas aferentes primarias (presente estudio) como en células entéricas^{44,46,130}. De hecho, los receptores colinérgicos participan en la actividad sensorial de neuronas intrínsecas al intestino⁶.

Al igual que la inhibición de la contracción muscular intestinal inducida por carbacol y la inhibición de los potenciales de acción rápidos de las neuronas entéricas, reportados anteriormente¹²⁶⁻¹²⁸. La melatonina inhibió de una manera dependiente de la concentración, la respuesta inducida por los agonistas colinérgicos, llegando a inhibir (con melatonina 1 mM) entre el 60 y 70% de la respuesta inducida por acetilcolina o por carbacol.

Para elucidar que tipo de receptor está involucrado en la respuesta a los agonistas colinérgicos, utilizamos los antagonistas hexametonio y atropina,

cuyas propiedades farmacológicas fueron descritas en el capítulo anterior. Se obtuvo una mayor participación de los nAChRs que de los mAChRs en las respuestas inducidas por acetilcolina o carbacol. La proporción de los receptores muscarínicos que responden a estos dos agonistas, es muy similar. Aunque, la proporción de los nAChRs es ligeramente diferente, esto puede deberse a dos razones; los receptores nicotínicos tienen diferentes afinidades a estos dos agonistas¹³¹ o debido a que la acetilcolina puede ser degradada por la acetilcolinesterasa, no alcanzan la concentración necesaria para activar todos los receptores¹²⁹.

Como los receptores nicotínicos median una mayor proporción de efectos y la melatonina es capaz de inhibir más de la mitad de la respuesta a los agonistas colinérgicos, se procedió a sólo activar la población de nAChRs con nicotina, agonista específico de los nAChRs¹³¹. Con esta maniobra pudimos comprobar que la melatonina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de los nAChRs, obteniendo el 74% de inhibición con melatonina 1 mM. Esto es muy similar a lo observado por Barajas-López *et al.*, 1996, donde obtienen una inhibición del 80% de las corrientes nicotínicas inducidas por ACh, en neuronas del plexo submucoso de cobayo¹²⁸. No obstante, se necesita realizar más experimentos con el fin de elucidar los mecanismos de acción de la melatonina sobre los nAChRs y si algunos de estos receptores conforman un subtipo más, o menos susceptible a melatonina.

Por último, la melatonina ejerció un efecto inhibitorio sobre la actividad aferente mecanosensorial de los nervios mesentéricos de yeyuno. Efecto que no se observó cuando se aplicó el vehículo (DMSO). Este efecto inhibitorio de la melatonina sólo se observó en fibras que responden a umbrales que van desde fisiológicos a nocivos, y en fibras de umbrales de activación altos, principalmente nocivos⁶. Esto podría explicar en parte el efecto antinociceptivo de la melatonina observado en pacientes con IBS¹²³⁻¹²⁵. Se requieren más experimentos para identificar posibles mecanismos de acción de la melatonina y receptores mecanosensoriales que potencialmente puedan ser modulados por esta hormona para fines terapéuticos.

CONCLUSIONES

- Los agonistas colinérgicos incrementan la frecuencia de disparo de las fibras aferentes de los nervios mesentéricos de yeyuno de ratón.
- La melatonina es capaz de inhibir parcialmente la acción de los agonistas colinérgicos, mediante la inhibición de los receptores nicotínicos.
- La melatonina disminuye la actividad aferente inducida por distensión en los nervios mesentéricos de yeyuno.
- El efecto inhibitorio de la melatonina sobre la actividad mecanosensorial es a través de las fibras de amplio rango y las de alto umbral.
- El vehículo no afectó la respuesta mecanosensorial total del nervio, ni de las fibras de bajo umbral, WDR y alto umbral.

ANEXO 2

PRODUCTOS OBTENIDOS

Villalobos-Hernández, EC., Barajas-López, C., Martínez-Salazar, EA., Salgado-Delgado, RC., Miranda-Morales, M. (2017). Cholinergic Signaling Plasticity Maintains Viscerosensory Responses During *Aspiculuris tetraptera* Infection in Mice Small Intestine. *Auton. Neurosci. Basic. Clinic.* (In press). DOI: 10.1016/j.autneu.2017.06.001.