

Acción ganglionar de la neostigmina en el íleon aislado de cobayo

H. PÉREZ SAAD Y M. GARCÍA RODRÍGUEZ

Centro Nacional de Investigaciones Científicas e Instituto de Ciencias Básicas y Pre-Clínicas "Victoria de Girón", La Habana

Recibido: 20 de enero de 1976

ABSTRACT. The effect of neostigmine on the isolated guinea pig ileum was studied under the following experimental conditions: in presence of hexamethonium, morphine, or a combination of both, with the ileum denervated mechanically or by cooling, in poor sodium solution, and under nicotinic blockade. Findings reported by other authors concerning the ganglionic stimulating action of neostigmine were confirmed. Participation of ganglionic non nicotinic receptors was also demonstrated.

RESUMEN. Se estudió el efecto de la neostigmina en el íleon aislado de curiel en las siguientes condiciones experimentales: en presencia de hexametonio, morfina o la combinación de ambos; en el íleon desnervado mecánicamente o por enfriamiento; en solución pobre en sodio, y durante la desensibilización nicotínica. Se comprueba lo ya reportado por otros autores sobre la acción estimulante ganglionar de la neostigmina y se demuestra además la participación en su efecto de receptores no nicotínicos ganglionares.

INTRODUCCION

Los efectos de la neostigmina se han estudiado en diferentes preparaciones farmacológicas, habiéndose reportado diferentes modos de acción: una acción anticolinesterásica (Aeschlimann y Reinert, 1931); estimulación de sitios no muscarínicos en el amnios de pollo (Cuthbert, 1962); una acción directa sobre receptores muscarínicos (Harry, 1962); una acción liberadora de acetilcolina en la tráquea de curiel (Carlyle, 1963) y una acción estimulante ganglionar (Takeshige y Volle, 1963).

Sharma y cols. (1964) también reportaron una acción estimulante de la droga en el íleon aislado de cobayo, bloqueable por hexametonio, indicando que su sitio receptor es el nicotínico.

En este sentido nosotros hemos realizado algunos experimentos en los cuales no hemos tenido los mismos resultados aún cuando la concentración de hexametonio fue mayor y la de neostigmina menor que las utilizadas por Sharma. Esta contradicción nos indujo a explorar aún más el mecanismo de acción ganglionar de esta última droga.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron curieles adultos de 350 a 500 gramos de peso. Se tomaron fragmentos de íleon terminal de 3-4 cm de longitud, los cuales fueron suspendidos en un baño de órganos de 20 ml de capacidad, conteniendo solución Krebs modificada (*Eccles, 1952*) con los siguientes componentes en gramos por mililitro: ClNa , 7.19; ClK , 0.46; Cl_2Ca anhidro, 0.3; $\text{CO}_3\text{HNa} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.17; y $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.14; burbujeada con una mezcla de O_2 (95%) y CO_2 (5%) y a una temperatura de 37°C . Se realizó registro quimográfico de las contracciones en papel ahumado mediante una palanca isotónica frontal ejerciendo una tensión de 1.5 gramos y con una ampliación $\times 8$. En algunos experimentos se utilizaron fragmentos de íleon refrigerados durante 20 horas a 10°C .

Desnervación aguda por enfriamiento.

Se realizó disminuyendo la temperatura del baño a 15°C durante 30 minutos, consiguiéndose una buena desnervación funcional de carácter reversible (*Harry, 1962* y *Day y Vane, 1963*) lo cual permitió hacer controles antes y después del enfriamiento.

Desnervación mecánica del íleon.

Se realizó con el fin de obtener las fibras musculares longitudinales desprovistas del plexo de Auerbach. Se tomaron fragmentos de 5 a 6 cm de longitud, los cuales se abrían longitudinalmente, fijándolos por los extremos sobre la superficie de una lámina de plástico incluida en una placa de Petri conteniendo solución Krebs. Se realizó el raspado de la mucosa y de las fibras musculares transversales, utilizando un pequeño bisturí y bajo visualización estereoscópica (*Ambache, 1954*). Esta preparación respondía adecuadamente a la acetilcolina, siendo insensible a la nicotina y la estimulación eléctrica transmural (0.1 msec; 0.1 Hz y 20 a 30 V).

Solución pobre en sodio.

El contenido normal de ClNa en la solución Krebs se redujo en un 50% sustituyéndolo por una cantidad equiosmótica de sucrosa.

Desensibilización nicotínica.

Se realizó utilizando nicotina a una concentración de 40 mcg/ml (*Brownlee y Johnson, 1964*).

Medicamentos utilizados en mcg/ml.

Clorhidrato de hexametonio, 200; clorhidrato de morfina, 0.5; bromuro de neostigmina, 0.1; clorhidrato de acetilcolina, 0.01; bitartrato de nicotina, 40 (dosis de desensibilización) y 5.

El tiempo de contacto del íleon con los antagonistas fue de 15 minutos.

Los resultados son la expresión de un mínimo de cuatro experimentos por cada diseño experimental.

RESULTADOS

La contracción inducida por neostigmina en la mayoría de los experimentos se caracterizó por dos componentes: el primero, de ascenso rápido en forma de espiga, que caía rápidamente, apareciendo a continuación un segundo componente de ascenso lento y progresivo.

En el íleon fresco el hexametonio y la morfina aplicados aisladamente no modificaron sustancialmente la respuesta contráctil del íleon a la neostigmina, aunque en algunos experimentos se observó una potenciación. Sin embargo, cuando ambos antagonistas se aplicaron simultáneamente el primer componente de la contracción fue bloqueado totalmente, sin modificación del segundo (Fig. 1).

En el íleon refrigerado durante 20 horas a 10°C el hexametonio y la morfina juntos sí bloquearon totalmente el efecto de la neostigmina (Fig. 2).

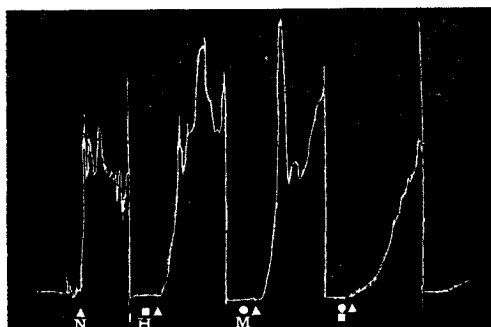


Fig. 1

Fig. 1. Efecto de la neostigmina, 0.1 mcg/ml (Δ) en el íleon aislado de curiel, en ausencia y presencia de hexametonio, 200 mcg/ml ($\square$); morfina, 0.5 mcg/ml ($\circ$) y la combinación de ambos antagonistas.

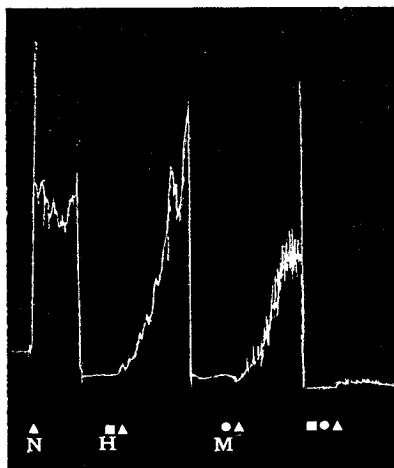


Fig. 2

Fig. 2. Efecto de la neostigmina, 0.1 mcg/ml (Δ) en el íleon aislado de curiel, refrigerado a 10°C durante 20 horas, en ausencia y presencia de hexametonio, 200 mcg/ml ($\square$) morfina, 0.5 mcg/ml ($\circ$) y la combinación de ambos antagonistas.

Desnervación aguda por enfriamiento.

El enfriamiento a 15°C produjo una abolición total del efecto de la neostigmina. La acción de la acetilcolina no fue abolida, observándose sólo una disminución en la amplitud de la contracción y una demora en alcanzarse el efecto máximo, características de la preparación refrigerada.

El efecto de la nicotina fue bloqueado aunque no completamente (Fig. 3).

Desnervación mecánica del íleon.

En esta preparación la acción de la neostigmina se manifestó por un incremento lento y progresivo del tono, similar al segundo componente,

que no fue abolido por hexametonio ni morfina, aplicados aislada o simultáneamente, observándose más bien una potenciación con este último antagonista (Fig. 4), probablemente debido a su acción anticolinesterásica (Grodma y Gilman, 1970).

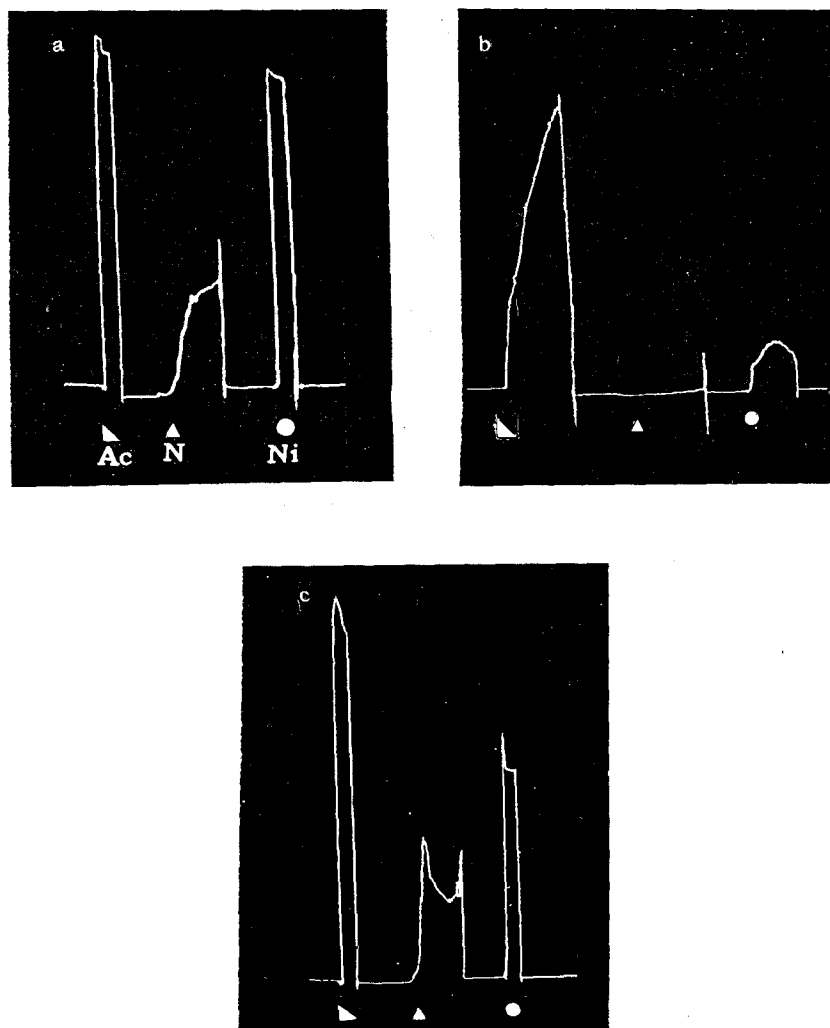


Fig. 3. Efecto de la acetilcolina, 0.01 mcg/ml (∇); neostigmina, 0.1 mcg/ml (Δ) y nicotina, 5 mcg/ml ($\circ$), antes (a), durante (b) y después (c) del enfriamiento a 15°C.

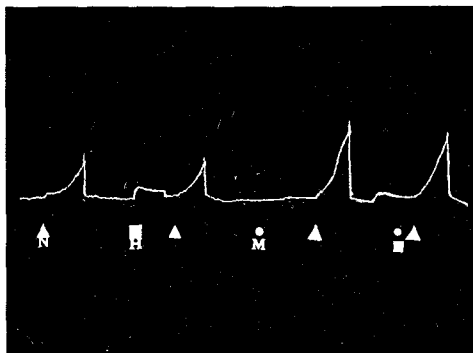


Fig. 4. Efecto de la neostigmina, 0.1 mcg/ml (Δ) sobre el músculo longitudinal del ileon de curiel desnervado mecánicamente, en ausencia y presencia de hexametonio, 200 mcg/ml ($\square$); morfina, 0.5 mcg/ml ($\circ$) y la combinación de ambos antagonistas.

Solución pobre en sodio.

La reducción de la concentración normal de ClNa en la solución nutriticia en un 50% abolió el efecto contrácturante de la neostigmina, pero no su capacidad para potenciar la acetilcolina exógena (Figs. 5 y 6).

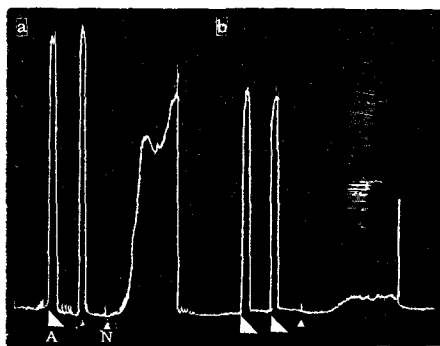


Fig. 5. Efecto de la acetilcolina, 0.01 mcg/ml (A) y la neostigmina, 0.1 mcg/ml (N) en el ileon aislado de curiel, en solución Krebs normal (a) y Krebs pobre en sodio (b).

Desensibilización por nicotina.

Durante la primera fase del bloqueo nicotínico o fase de despolarización ganglionar (*Paton y Perry, 1953*) la neostigmina no produjo contracción del íleon, observándose por el contrario una relajación brusca. Tras el lavado continuo con solución nutriticia conteniendo nicotina a la misma concentración que en la aplicación inicial, y 5 minutos después (fase de bloqueo competitivo) la neostigmina volvió a contraer el íleon con la misma o mayor intensidad que el control (Fig. 7).

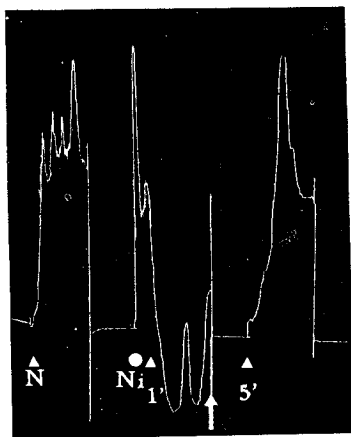


Fig. 6

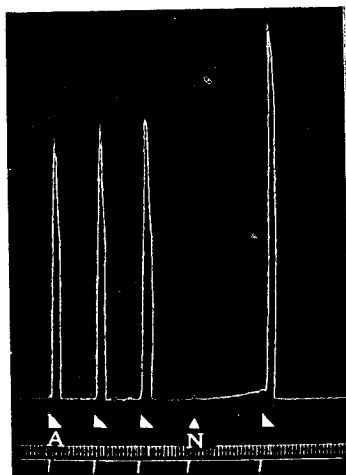


Fig. 7

Fig. 6. Efecto de la neostigmina, 0.1 mcg/ml (Δ) en el íleon aislado, en solución Krebs 50% ClNa y modificación por esta droga de la contracción inducida por acetilcolina, 0.01 mcg/ml (∇).

Fig. 7. Efecto de la neostigmina, 0.1 mcg/ml (Δ) aislado de curiel durante la desensibilización por nicotina, 40 mcg/ml ($\circ$), en el primer minuto (fase de bloqueo despolarizante) y a los 5 minutos (fase de bloqueo competitivo). La flecha indica el lavado con solución conteniendo nicotina a la misma concentración.

DISCUSION

En nuestros experimentos hemos utilizado la morfina con vista a la detección de una acción ganglionar de la neostigmina a través de receptores no nicotínicos, ya que se ha reportado que la misma es capaz de bloquear el efecto de diversos estimulantes ganglionares que actúan a través de éstos y que sin embargo no son antagonizados por el hexametonio (*Trendelenburg, 1961*).

El hecho de que la morfina y el hexametonio, a las dosis utilizadas y aplicados aisladamente no antagonicen el efecto de la neostigmina, produciendo más bien una potenciación del mismo, y que por otra parte la aplicación simultánea de éstos haya abolido la fase de ascenso rápido de la contracción, es una evidencia indirecta del efecto ganglionar de la droga, más aún si se considera que esa primera contracción en forma de espiga puede corresponderse con el momento de la despolarización ganglionar (*Axelsson, 1970*). La modificación del segundo componente se explicaría por la acción anticolinesterásica de la neostigmina, con acumulación de la acetilcolina liberada espontáneamente en la terminación nerviosa (*Paton y Vizi, 1969*).

La diferencia de nuestros resultados con los de Sharma se explicaría por el hecho de que en nuestros experimentos el tiempo durante el cual se registró el efecto de la neostigmina fue mucho más prolongado, lo cual nos permitió observar que en presencia de hexametonio sólo existía un retardo en el desarrollo de la contracción.

El bloqueo total del efecto de la neostigmina producido por la acción simultánea de ambos antagonistas en el íleon refrigerado, sin la aparición del aumento del tono observado en el íleon fresco, podría deberse a una reducción en la capacidad del íleon para liberar acetilcolina espontáneamente, lo cual habría que corroborar experimentalmente.

El aumento de tono en el íleon desnervado mecánicamente pudiera corresponderse con una acción directa de la neostigmina o con la protección de la acetilcolina liberada por terminaciones nerviosas postganglionares remanentes, no eliminadas por el proceso de desnervación. El hecho de que este aumento de tono no haya sido deprimido o bloqueado por los antagonistas, solos o combinados, sugiere que en el antagonismo observado en el íleon íntegro no existe un componente sinergista periférico.

Los resultados obtenidos con el enfriamiento agudo también constituyen una evidencia de la acción neural de la droga, aunque no puede afirmarse categóricamente un sitio ganglionar de acción, ya que las fibras postganglionares también se encuentran afectadas (*Day y Vane, 1963*).

Los experimentos realizados con solución pobre en sodio demuestran que este ion tiene una participación importante en la contracción inducida por neostigmina, sugiriendo una acción despolarizante de la droga sobre las células ganglionares.

Por último, el hecho de que la neostigmina no actúe durante la primera fase del bolqueo nicotínico y sí durante la fase de bloqueo competitivo, es una fuerte evidencia del sitio ganglionar de la droga y de la participación de receptores no nicotínicos, en consideración a los criterios establecidos por otros autores para las drogas estimulantes ganglionares (*Trendelenburg, 1961 y Brownlee y Johnson, 1963*).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren una acción estimulante de la neostigmina a través de receptores nicotínicos y no nicotínicos ganglionares en el íleon aislado de curiel.

La cuantificación de la acetilcolina liberada en las diversas condiciones experimentales presentadas, así como estudios cuantitativos más detallados, serían de utilidad y ayudarían a dilucidar algunos aspectos aún oscuros.

REFERENCIAS

- AESCHLIMANN J. A. AND REINERT M. Pharmacological action of analogues of physostigmine. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 43, 413, 1931.
- AMACHE N. Separation of the longitudinal muscle of the rabbits ileum as a broad sheet. *J. Physiol.*, 125, 53, 1954.
- AXELSSON J. Mechanical properties of smooth muscle, and the relationship between mechanical and electrical activity. *Smooth Muscle* 289-315, Edit. by Bülbbring, Edward Arnold (Publishers) Ltd. (London), 1970.
- BROWNLEE G. AND JOHNSON E. S. The site of 5-hydroxytryptamine receptor on the intramural nervous plexus of guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.*, 22, 527, 1964.

- CARLYLE R. F. The mode of action of neostigmine and physostigmine on the guinea pig traquealis muscle. *Brit. J. Pharmacol.*, 21, 137, 1963.
- CUTHBERT A. W. Actions of some anticholinesterases on the smooth muscle of the chick amnion. *Brit. J. Pharmacol.*, 18, 550-562, 1962.
- DAY M. AND VANE J. R. An analysis of the direct and indirect actions of drugs on the isolated guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.*, 20, 150, 1963.
- ECCLES R. M. Responses of the isolated curarized sympathetic ganglion. *J. Physiol. (London)* 117, 181, 1952.
- GOODMAN L. S. AND GILMAN A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 238 4th. Ed. Mc. Millan, London, 1970.
- HARRY J. Effects of cooling, local anaesthetic compounds and botulinum toxin on the response of and the acetylcholine out put from the electrically transmurally stimulated isolated guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 19, 42, 1962.
- PATON W. D. M. AND PERRY W. L. M. The relationship between despolarization and block in the cat's superior cervical ganglion. *J. Physiol. (London)* 119, 13, 1953.
- PATON W. D. M. AND VIZI E. S. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine out put by guinea-pig longitudinal muscle strip. *Br. J. Pharmac.* 35, 10, 1969.
- SHARMA M. L., DASHPUTRA P. G. AND GREWAL R. S. Effects of parasympathomimetic drugs on guinea-pig ileum. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 147, 408-415, 1964.
- TAKESHIGE C. AND VOLLE R. L. Asynchronous postganglionic firing from the cat superior cervical sympathetic ganglion treated with neostigmine. *Brit. J. Pharmacol.* 20, 214, 1963.
- TRENDELENBURG U. Observations on the mode of action of some nondepolarizing ganglion blocking substances. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 241, 452, 1961.