

ANTAGONISMO ENTRE COLIMICINA Y NEOSTIGMINA SOBRE MUSCULO ESQUELETICO

Dr. PLUTARCO NARANJO y Dra. ENRIQUETA DE NARANJO

Facultad de Medicina, Universidad Central y Laboratorios «Life», Quito

En un trabajo anterior (de Naranjo y Naranjo¹) encontramos que se producía una mutua potenciación entre la succinilcolina y la colimicina, en el efecto bloqueante neuromuscular de estas drogas. Aunque el efecto bloqueante de la colimicina podía deberse a una acción directa de este antibiótico sobre los receptores de la placa motriz, la fuerte potenciación del efecto de la succinilcolina, parecía depender más bien de un posible bloqueo de la colinesterasa verdadera.

Adamson y colaboradores², han demostrado que el efecto bloqueante de la colimicina, observado en las preparaciones de ciático-gastrocnemio de conejos y pollos, no era antagonizado por la neostigmina. En cambio, no ha sido estudiado si el efecto de la neostigmina es antagonizado por la colimicina. Además, cuando se investiga la acción conjunta de dos drogas es necesario que el tiempo-curso de efecto de las dos coincida, por lo menos en parte. De lo contrario el efecto aditivo, sea isoaditivo, hipo o hiperaditivo, no aparece.

En el caso de la neostigmina y la

colimicina, la primera tiene un período de latencia muy corto, en cambio que la colimicina, como lo hemos demostrado en otro trabajo¹, produce bloqueo muscular sólo después de un largo período de latencia.

Bajo la hipótesis de que la colimicina tiene cierta actividad anticolinesterásica, se llevó a cabo el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Las experiencias se efectuaron en cobayos machos de 490 a 520 gm. de peso corporal. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de uretano (600 mg/kg) y pentobarbital sódico (10 mg/kg) inyectada por vía intraperitoneal.

La tráquea fue canulada para dar respiración artificial y una manguera de polietileno se introdujo en una vena yugular externa para inyectar fácilmente las drogas.

Se montó la preparación ciático-tibial anterior, en la forma convencional, utilizando un miógrafo Brown

Schuster. El tendón del músculo tibial anterior fue seccionado y ligado al correspondiente resorte de la palanca inscriptora. Las contracciones musculares se registraron sobre papel ahumado.

Se disecó así mismo el nervio ciático, en un amplio segmento y se separó la rama motora del músculo tibial.

Para estimular eléctricamente se utilizaron electrodos de platino, conectados con el nervio tibial. La estimulación se hizo mediante ondas cuadradas, de 0,2 mseg. de duración y frecuencia de 60 por minuto, provenientes de un estimulador electrónico (American Electronic Labs., Inc., modelo 751). Se utilizó como estándar la estimulación umbral, la cual osciló entre 0,2 y 0,4 V., según el animal. Cada tipo de experiencia se efectuó en un grupo de 5 a 10 animales.

Las drogas utilizadas fueron: colimicina, en forma de metansulfonato y neostigmina en forma de cloruro. La colimicina, como puede verse en la Fig. 1, es una cadena cíclica polipeptídica³ formada por 5 moléculas del ácido L-diaminobutírico y una de cada uno de los ácidos: 6-metiloctanoico, L-treonina y L y D-leucina. Las drogas se utilizaron en solución salina.

Se efectuaron dos series de experiencias. En la primera, después de ensayos preliminares para estandarizar la dosis de neostigmina, se ensayó esta droga a la dosis de 30 mcg/kg, repetida cada 10 minutos. En la segunda, se administró una dosis única de colimicina (250 mg/kg, de un lote en el cual 1 mg = 13.500 U) y después de intervalos, previamente establecidos, se administró la dosis estándar de neostigmina.

RESULTADOS

1. **Efecto de la neostigmina.**—La administración de la neostigmina dio por resultado un aumento de la amplitud de la contracción del músculo tibial anterior, cuyo nervio estuvo sometido a la estimulación estándar. Si la droga volvió a administrarse con el intervalo de 10 minutos, este efecto facilitador de la contracción muscular fue progresivamente en aumento (Fig. 2 y Tabla I). Con la tercera dosis, la amplitud del registro de la contracción, fue 3,85 veces mayor que la contracción estándar.

2. **Efecto de la colimicina y la neostigmina.**—Cuando se administró la

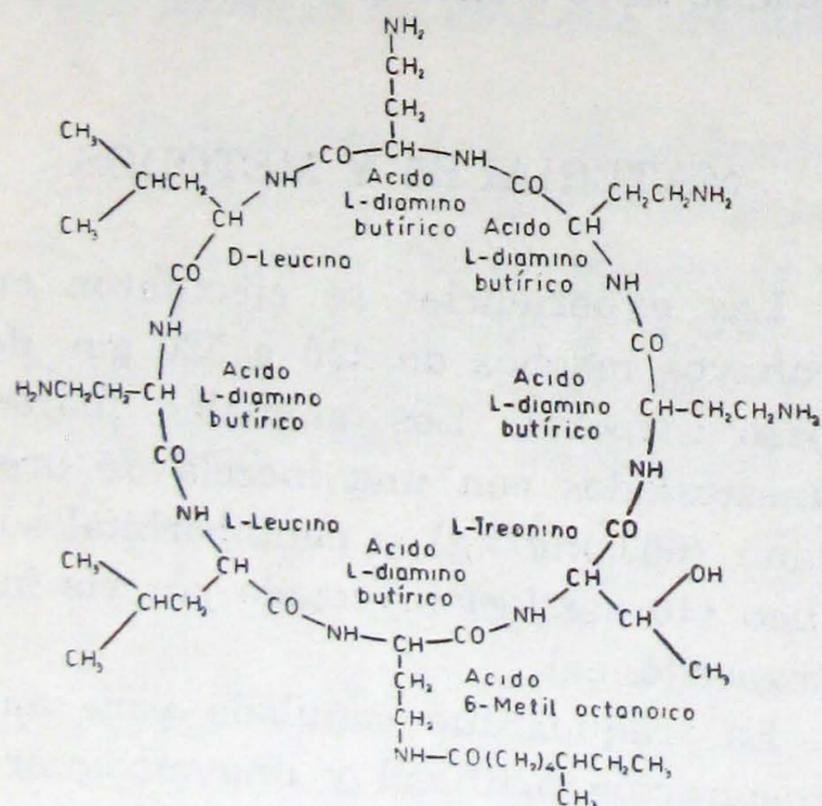


Fig. 1.—Estructura química de la colimicina. La parte superior derecha, es decir la correspondiente a la sucesión de los 3 ácidos diamino butíricos, sería la que, más probablemente, intervendría en el efecto antagónico con la neostigmina.

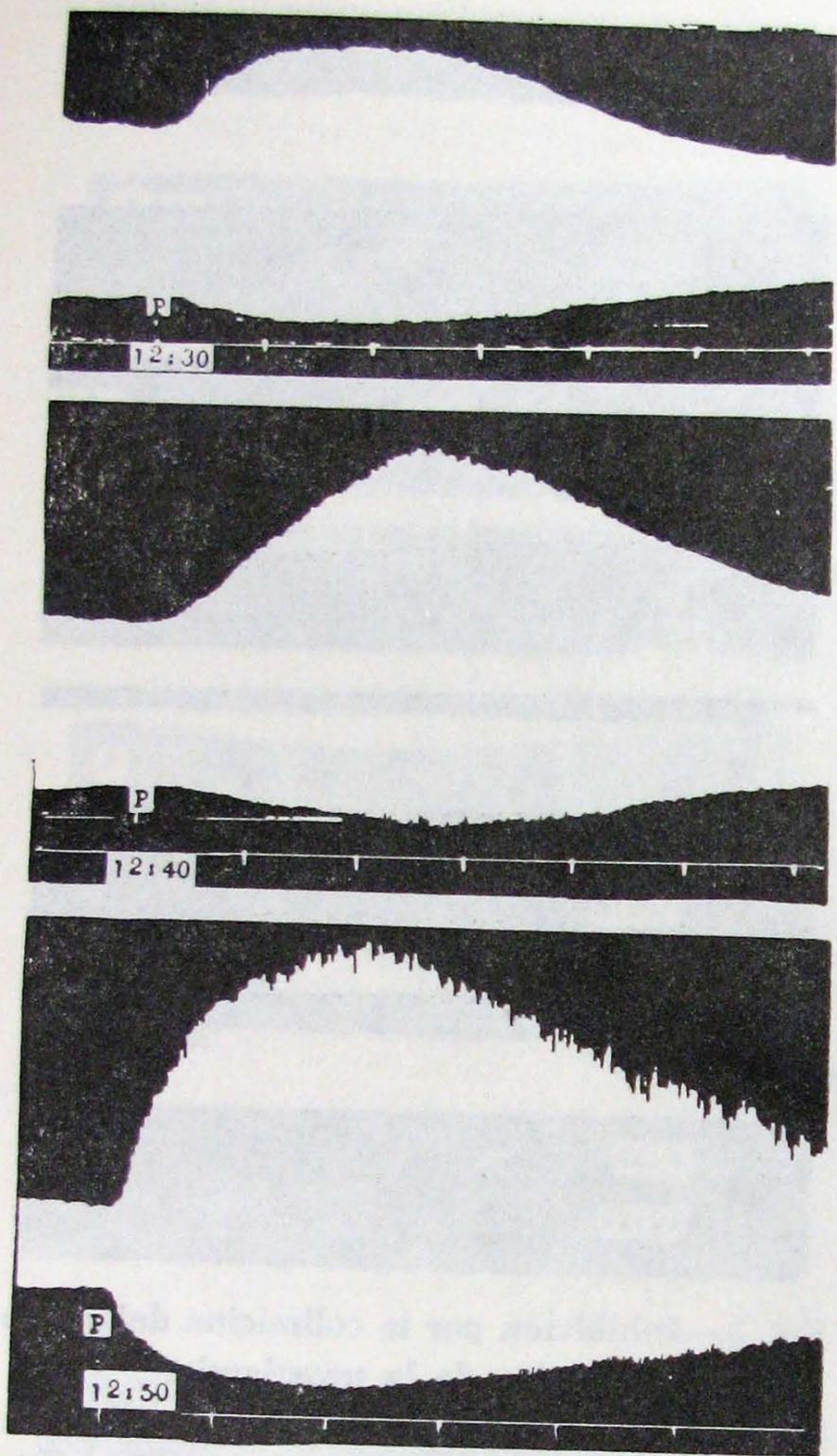


Fig. 2.—Facilitación de la contracción muscular por neostigmina

Cobayo de 500 gm; estimulación mediante electrodos colocados en el nervio ciático, con descargas cada segundo; registro gráfico de la contracción de Imúsculo tibial anterior. Registro de tiempo: 1 minuto (línea inferior). A, B y C, dosis sucesivas de neostigmina (30 mcg/kg, intravenosamente). La amplitud de la contracción muscular, aumentó con cada nueva dosis.

colimicina, en primer lugar, hubo ligera disminución de la amplitud de la contracción, equivalente en promedio a $11,5\% \pm 1,8\%$ de la contracción estandar. En segundo lugar, este efecto inhibitorio se inició después de 5 mi-

Tabla I

A AUMENTO DE LA CONTRACCION MUSCULAR POR NEOSTIGMINA

Condición	Contracción
Sin droga	$29,4 \pm 4,3$ mm.

B

Después de Neostigmina:	Aumento:
1ª dosis	$0,14 \pm 0,01$ veces
2ª "	$1,65 \pm 0,18$ "
3ª "	$3,85 \pm 0,41$ "

C minutos de la administración intravenosa de la droga y llegó a su máximo entre los 25 y 30 minutos después de dicha administración.

Si la neostigmina se administró 5 minutos después de la colimicina, y con intervalo de 10 minutos se inyectaron nuevas dosis, se encontró que el efecto facilitador de la neostigmina era menor y este efecto antagónico era proporcionalmente superior mientras mayor tiempo había transcurrido desde la administración de la colimicina.

Si la primera dosis de neostigmina se administró 15 minutos después de la colimicina y luego se repitió cada 10 minutos, con la primera dosis hubo ligero efecto facilitador, mientras fue nulo con las dosis siguientes (Fig. 2, Tabla II). Finalmente, si la primera dosis se administró 40 o 50 minutos después de la colimicina, la neostigmina no produjo el efecto facilitador de la contracción muscular; en otros tér-

Tabla II

LAS CONTRACCIONES MUSCULARES DESPUES DE COLIMICINA Y NEOSTIGMINA

Condición	Contracción
Neostigmina después de colimicina, a los:	Aumento:
5 min. (1ª dosis)	0,13 ± 0,01 veces
15 min. (2ª dosis)	1,21 ± 0,13 veces
25 min. (3ª dosis)	2,48 ± 0,28 veces
30 min. (1ª dosis)	0,11 ± 0,01 veces
40 min. (2ª dosis)	0,05 ± 0,01 veces
50 min. (3ª dosis)	0 veces

minos, en estas condiciones el antagonismo, entre las dos drogas fue completo.

Después de dos horas de la administración de la colimicina, su efecto antagonístico de la neostigmina, comenzó a desaparecer. A las tres horas no hubo ya efecto antagonístico.

DISCUSION

Los resultados descritos revelan que la colimicina puede antagonizar totalmente el efecto facilitador de la neostigmina, de la contracción de la fibra estriada, si las drogas se administran en la dosis e intervalos apropiados. Como es sabido, la neostigmina aunque por sí misma puede estimular los receptores de acetilcolina, su principal

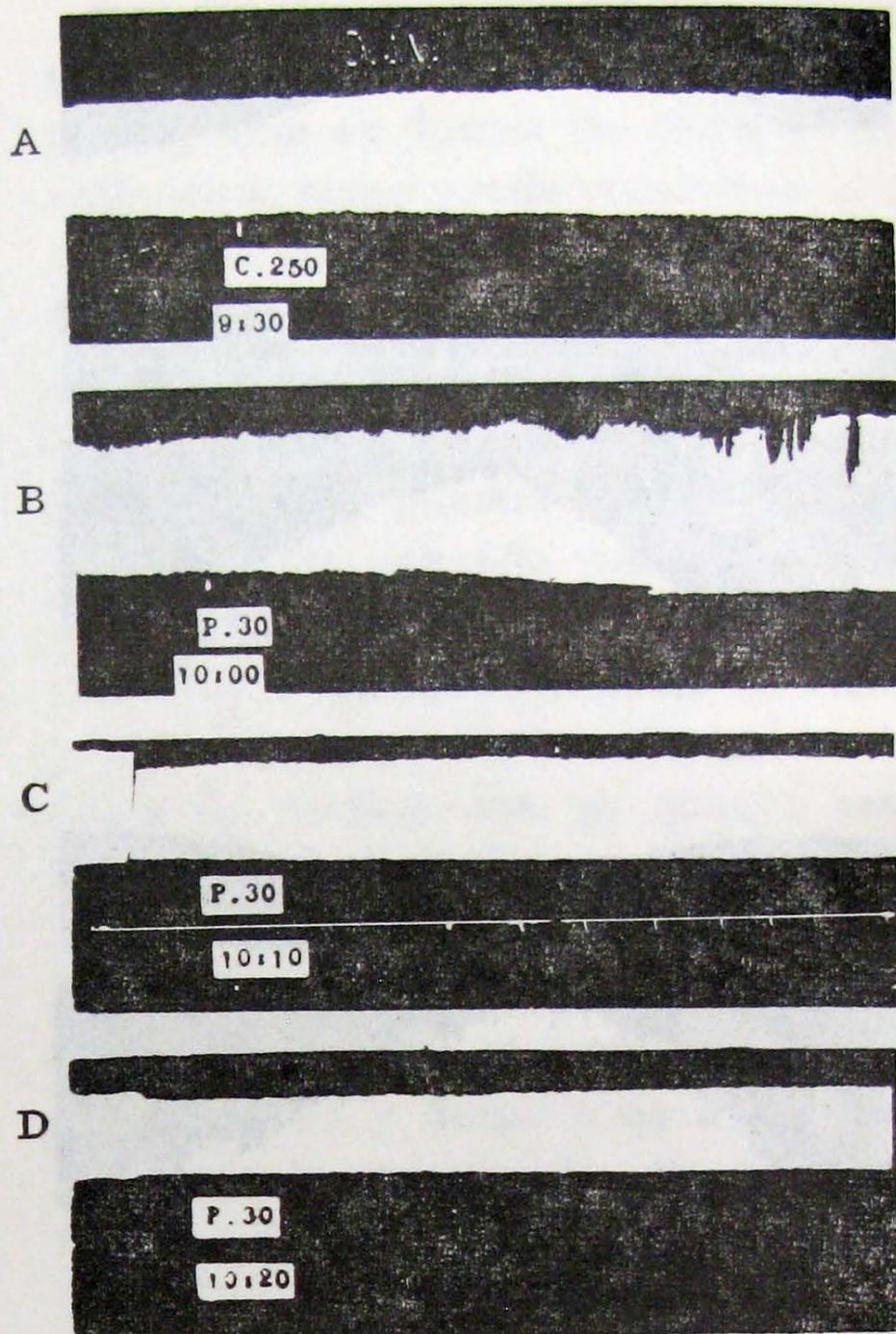


Fig. 3.—Inhibición por la colimicina del efecto facilitador de la neostigmina.

Cobayo de 490 gm; la contracción muscular del tibial anterior se produjo mediante estimulación umbral del nervio ciático; estimulación cada segundo.

En A inyección intravenosa de colimicina (250 mg/kg). En B, C y D, 3 dosis sucesivas de neostigmina (30 mcg/kg). Hubo completa supresión del efecto facilitador de esta última droga.

mecanismo de acción es el de inhibir a la colinesterasa, con lo que permite que un mayor número de moléculas de acetilcolina, actúe por más tiempo a nivel de los receptores.

Podría suponerse, en un primer momento, que si una droga como la colimicina, bloquea a la colinesterasa, debería sumar su actividad a la de la ne-

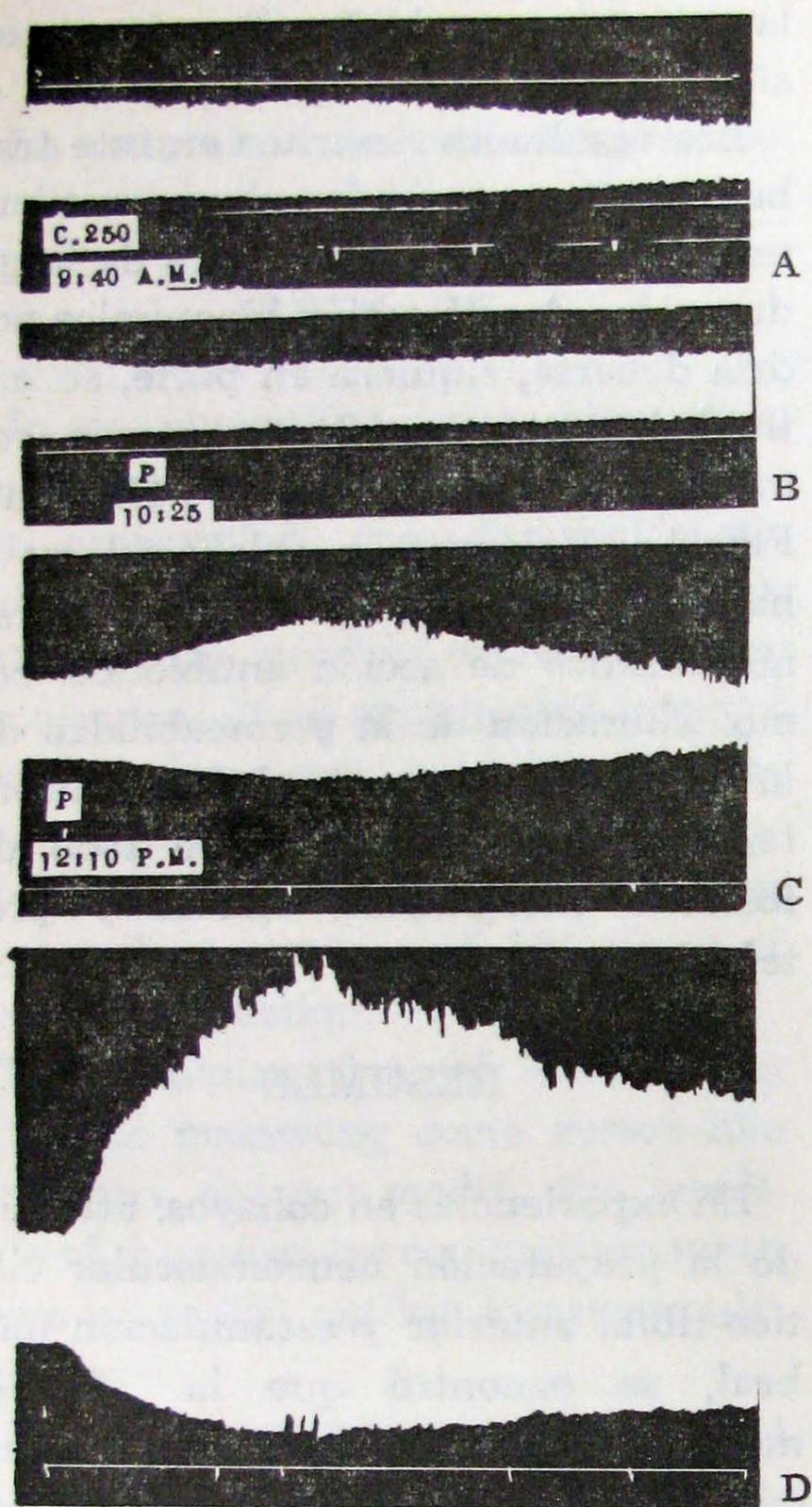


Fig. 4.—Recuperación del efecto facilitador de la neostigmina.

Cobayo de 480 gm (los demás detalles de la preparación, como en la Fig. 3).

En A, inyección intravenosa de colimicina (250 mg/kg). En B, C y D, 3 dosis sucesivas de neostigmina (30 mcg/kg) después de 45 minutos de la inyección de colimicina.

neostigmina y por consiguiente producirse alguno de los casos de sinergismo (iso, hipo o hiperaditivismo). Los datos experimentales demuestran lo contrario, es decir que se produce antagonismo.

El particular diseño de la presente experiencia deja poco margen para las

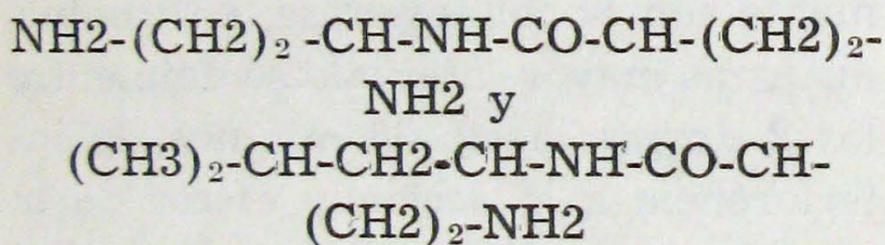
hipótesis interpretativas. De trabajos anteriores, y el actual que confirma, parcialmente, se concluye que la colimicina, por una parte, tiene cierta actividad directa sobre la fibra estriada y por otra, sobre la unión mioneural y por ende, sobre los receptores de acetilcolina de la placa motora. Por último, sería capaz de bloquear la colinesterasa. La unión de colimicina y colinesterasa sería lenta, y llegando a su máximo entre 25 y 60 minutos sería de tipo irreversible o lentamente reversible. Por esto, si la neostigmina es inyectada después de pocos minutos de la administración de la colimicina, es decir antes de que comience a unirse con la colinesterasa, no hay interferencia a la actividad de la neostigmina, que se conjuga más selectiva y rápidamente con la colinesterasa; en cambio, mientras mayor intervalo se deja entre las 2 drogas, hasta 30 minutos, la interferencia a la acción y efecto de la neostigmina va en aumento, hasta llegar a ser total a partir de un cierto límite de tiempo.

Como se ha demostrado anteriormente¹, la colimicina por sí misma, inhibe la contracción de la fibra estriada, tanto cuando se estimula a ésta directamente que cuando se estimula el nervio motor. De no tener esta propiedad también, y si sólo bloquearía a la colinesterasa, debería producir un efecto facilitativo de la contracción muscular, es decir producir un efecto parecido al de la neostigmina.

La lenta conjugación de la colimicina con la colinesterasa se evidenció también en la experiencia a la que hemos

hecho referencia, de potencialización de la succinilcolina. Efectivamente la potenciación se inició 20 o más minutos después de la inyección de colimicina y determinó no sólo el aumento de intensidad del bloqueo mioneural, sino sobre todo de duración del efecto de la succinilcolina, el mismo que aumenta en 15,3 veces.

En base a los resultados obtenidos por McCarthy y Chenoweth⁴, quienes han demostrado que los poliglicoles diamínicos son capaces de producir efectos curarizantes, se puede especular sobre la posibilidad de que la actividad anticolinesterásica de la colimicina pueda deberse a uno o ambos de los dos siguientes segmentos moleculares:



Cohen y colaboradores⁵ han encontrado que la polimixina B, un antibiótico de estructura química parecida a la de la colimicina (Wilkinson⁶, considera, inclusive, que la polimixina E, es la misma sustancia que la colimicina) es capaz de inhibir la actividad esterásica de algunos microorganismos. Posteriormente, Mohan y Pianotti⁷, han observado que la colimicina, a ciertas dosis, inhibe el metabolismo oxidativo del 2-ceto-gluconato, del acetato y del oxalato, pero no de la glucosa. Mohan y colaboradores, concluyen de estas observaciones que el sitio bioquímico más sensible a la acción de

la colimicina en la *Ps. aeruginosa*, es el acetato.

Los resultados descritos en este trabajo confirman que la colimicina tiene una acción anticolinesterásica de larga duración. A esta acción bioquímica podría deberse, siquiera en parte, su actividad antibiótica. Otros autores, como Mohan y colaboradores⁸, Newton⁹, Few¹⁰ y Valentini y colaboradores¹¹, han sugerido también otros posibles mecanismos de acción antibiótica, como: alteración de la permeabilidad de la membrana celular y pérdida del contenido citoplasmático, sobre todo de fosfatos inorgánicos, azúcar y proteínas.

RESUMEN

En experiencias en cobayos, utilizando la preparación neuromuscular ciático-tibial anterior y estimulación umbral, se encontró que la neostigmina determina una contracción muscular más intensa. Cuando se repitieron dosis de esta sustancia a intervalos cortos, el efecto facilitativo fue, progresivamente, acumulativo. Con la tercera dosis, la amplitud de la contracción llegó a ser 3,85 veces mayor que antes de la prostigmina.

La colimicina, antibiótico que produce un efecto de tipo curárico, por sí misma, hasta dosis de 250 mg/kg, intravenosamente, no ocasionó modificación de la amplitud de las contracciones musculares.

Cuando la neostigmina se administró después de colimicina, esta sustancia inhibió completamente el efecto facilitador de la contracción, propio de la

neostigmina. También se anuló el efecto acumulativo.

La naturaleza de este antagonismo se discute en la sección respectiva.

SUMMARY

In experiments on guinea pigs, using the sciatic nerve-tibialis anterior muscle preparation and threshold stimulation it was found that neostigmine enhanced the strength of the muscular contraction. If an appropriated interval between doses was used the facilitative effect of neostigmine was progressively accumulative. The third dose produced an increase of 3.85 times of the test contraction.

The administration of colistin, an antibiotic possessing some curare-like properties, did not modify the amplitude of the muscular contractions when doses up to 250 mg/kg, intravenously, were used.

If neostigmine was administered not later 5 minutes of the injection of colistin, its facilitative effect of the muscular contraction was only slightly diminished, but if the time elapsed between the administration of the two drugs was 10 to 20 minutes the effect of neostigmine was entirely antagonized by colistin. Even the accumulative effect failed to appear after a single dose of colistin.

The nature of the antagonistic effect of colistin and its slow appearance is discussed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1) DE NARANJO, E., y NARANJO, P., Reciprocal potentiation between suc-

cinylcholine and colistin in the neuromuscular blockade. En: IIIrd International Congress of Chemotherapy Proceedings 4: 305, 1964.

- 2) ADAMSON, R. H., MARSHALL, F. N., and LONG, P. J.: Neuromuscular blocking properties of various polypeptide antibiotics Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 105: 494, 1960.
- 3) SCHWARTZ, B. S., WARREN, M. R., BARKLEY, F. A., and LANDIS, L.: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistinmethanesulfonate. Antibiotics Annual 41, 1960.
- 4) McCARTHY, L. P., and CHENOWETH, M. B.: Curare-like activity of polypropylene glycol products. J. Pharmacol. & Exper. Therap. 138: 315, 1962.
- 5) COHEN, S., PURDY, C. V., and KUSHNICK, J. B.: Inhibition of mycobacterial esterases by polymyxin B. Antibiotics & Chemotherapy 4: 18, 1954.
- 6) WILKINSON, S.: Identity of colistin and polymyxin E. Lancet I: 922, 1963.
- 7) MOHAN, R. R., and PIANOTTI, R. S.: Studies on the mode of action of colistin sulfate (Coly-Mycin S) on *Pseudomonas aeruginosa* ATCE 9027. Bacteriol. Proc. 99, 1960.
- 8) MOHAN, R. R., PIANOTTI, R. S., LEVERETT, R., and SCHWARTZ, B. S.: Effect of colistin on the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 811, 1962.
- 9) NEWTON, B. A.: The release of soluble constituents from washed cells of *Pseudomonas aeruginosa* by the action of polymyxin. J. Gen. Microbiol. 9: 54, 1953.
- 10) FEW, A. V.: Electron microscopy of disrupted bacteria treated with polymyxin E. J. Gen. Microbiol. 10: 304, 1964.
- 11) VALENTI, S. DE PALMA, M., TREVES, B., and MAGGINI, P.: Studio microbiologico sulla colimicina al microscopio elettronico ed al manometro di Warburg. Min. Med. 49: 4498, 1958.