

ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LA CONCENTRACION Y EL EFECTO DE ALGUNOS FARMACOS DEPRESORES DE LA CONDUCCION SOBRE LOS POTENCIALES DE ACCION DE FIBRAS NERVIOSAS AISLADAS

Study of the concentration - effect relationship of some conduction blocking drugs upon action potentials of the desheathed nerve preparation.

SERGIO GUERRERO

Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Great Britain ()*

Recibido para su publicación el 30 de Octubre de 1964

RESUMEN

Se estudia el efecto de diversas sustancias que inhiben la conducción nerviosa sobre los potenciales de acción de nervios desprovistos de la vaina de tejido conjuntivo. Se utilizó el nervio ciático de rana, que era colocado en una cámara cerrada, después de haber extraído el perineurio cuidadosamente bajo microscopio. los electrodos de estimulación y de registro, colocados sobre el conjunto de fibras nerviosas, podían ajustarse desde el exterior. La estimulación se hacía con intensidad supramáxima y los potenciales de acción eran registrados en un osciloscopio.

Los fármacos que se estudiaron, clorhidrato y trimetilyoduro de procaína, alcohol bencílico y saligenina, eran colocados en contacto con la preparación y su acción se valoró en relación a los cambios de voltaje de los potenciales de acción. Se demostró que existe una relación lineal entre la disminución del voltaje y el logaritmo de la concentración de estos fármacos. Se estableció igualmente la relación de actividad entre ellos y se encontró que la forma catiónica de la procaína es la más activa, mientras que los otros muestran una actividad mucho menor.

INTRODUCCIÓN

Desde los trabajos de Bennet *et al.* (1), diversos autores han utilizado la preparación de nervio ciático de batracio para estudiar cuantitativamente el efecto de fármacos que bloquean la conducción del impulso nervioso (2, 3, 4). Estos estudios se han basado en los trabajos electrofisiológicos de Gasser y Erlanger (5), quienes mostraron que los potenciales de acción que pueden registrarse en un osciloscopio de rayos catódicos, dan una indicación de la actividad de un nervio perifé-

rico. Todos los investigadores que han utilizado este método están de acuerdo en considerar que la corriente de acción registrada desde un nervio es la resultante de los cambios eléctricos que ocurren en cada una de las numerosas fibras que lo componen, y que la disminución del voltaje de estos potenciales de acción se asocia al bloqueo de la conducción en ese nervio. Según los autores citados (1, 2, 3, 4), la magnitud de los cambios de voltaje que se registran desde un tronco nervioso aislado en contacto con fármacos que deprimen la conducción, es la consecuencia de la penetración y del efecto que ellos producen en la membrana celular o en el axoplasma y que la disminución del potencial de acción es función de la concentración del fármaco y del tiempo que éste permanece en contacto con la fibra nerviosa.

(*) Miembro del Instituto de Farmacología, Sección Odontología, Universidad de Chile. La presente investigación se realizó durante su permanencia en el Departamento de Farmacología, Universidad de Edimburgo, Gran Bretaña, en goce de una beca Riker.

En los trabajos mencionados se han utilizado nervios ciáticos de rana intactos, preparación que tiene el inconveniente, señalado por Bennet *et al.* (1), de que las envolturas externas constituyen una barrera física para la entrada del anestésico, circunstancia que dificulta la determinación de las concentraciones mínimas efectivas en contacto con la fibra. Con el objeto de evitar este inconveniente, hemos utilizado troncos nerviosos desprovistos de su vaina de tejido conjuntivo, de tal manera que los fármacos en estudio eran colocados directamente sobre fibras desnudas y disociadas en ramilletes.

Con este método se estudió la relación entre la concentración y el efecto de las siguientes sustancias: clorhidrato de procaína, trimetilyoduro de procaína, alcohol bencilico y saligenina (salicil-alcohol), así como también la relación de actividad entre estos fármacos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron nervios ciáticos de ranas (*Rana pipiens* y *Rana temporaria*), los que fueron disecados desde la columna vertebral, en una extensión de 4 a 6 cm y colocados en solución de Ringer. La envoltura de tejido conjuntivo de los troncos nerviosos fue extraída cuidadosamente bajo microscopio con ayuda de pinzas finas. La preparación así obtenida era mantenida en reposo en solución de Ringer a temperatura ambiente durante 2 a 4 horas antes de realizar los experimentos.

El conjunto de filetes nerviosos desnudos fue atado en sus extremos con hilo de seda y colocado en una cámara transparente de material plástico, herméticamente cerrada y saturada de humedad. Tanto los electrodos de estimulación como los de registro eran de platino, contruidos de tal manera que podían ser movidos y ajustados desde el exterior de la cámara. Los electrodos de estimulación eran conectados a un estimulador mediante un transformador de aislación. Uno de los electrodos de registro estaba conectado a la entrada del preamplificador de un osciloscopio Tektronix, mientras que el otro estaba unido a tierra a través de un calibrador.

La preparación era estimulada con intensidad ligeramente supramáxima con pulsos de 0,4 mseg de duración y con una frecuencia de 1 pulso por seg. La frecuencia de estimulación era comandada por un oscilador Siemens Tipo R 2125 conectado al estimulador.

El calibrador permitía introducir en la pantalla del osciloscopio una señal con la cual se podía medir en milivoltios los potenciales de acción y fotografiarlos mediante una cámara Cossor adosada a la pantalla. La altura de los potenciales de acción era registrada antes de colocar el fármaco, 1 minuto después de agregado y luego cada 5 min por un periodo de 15 a 20 minutos.

Las sustancias eran colocadas en contacto con un pequeño segmento de la preparación ubicado entre los electrodos de estimulación y de registro, en una depresión del bloque de parafina sólida donde estaba colocado el nervio. Una vez registrado el efecto, se lavaba la preparación con solución fisiológica y se esperaba 20 a 35 minutos hasta la recuperación completa de la actividad eléctrica inicial antes de practicar una nueva prueba. Se incluyeron en los resultados sólo aquellas pruebas en que de este modo se consiguió una recuperación completa del voltaje. Cada preparación fue usada en no más de 6 pruebas. Todos los fármacos fueron disueltos en solución de NaCl al 0,9% (pH 6,8-7,2) y los experimentos fueron realizados a la temperatura ambiente (17-23°C).

El efecto de las sustancias estudiadas fue expresado en porcentaje de disminución del voltaje con respecto al inicial, 10 minutos después de su agregación.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de la acción de 2 μ moles de clorhidrato de procaína sobre un manojito de fibras aisladas del nervio ciático de rana. En ella puede observarse que el voltaje vuelve a su magnitud inicial después de remover la procaína y de lavar convenientemente la preparación.

Los resultados obtenidos con cada una de las concentraciones en las 4 sustancias estudiadas se expresaron en porcentajes de disminución del voltaje con respecto al observado inicialmente.

Las concentraciones efectivas mínimas encontradas fueron las siguientes, expresadas en μ moles/ml: clorhidrato de pro-

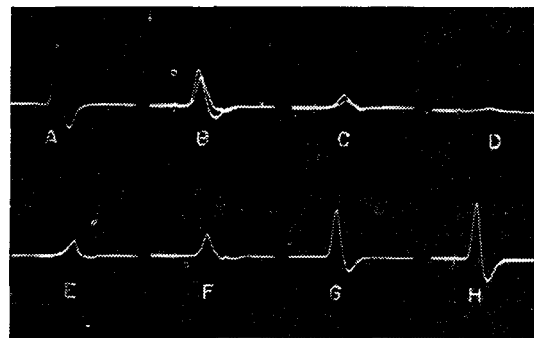


FIG. 1. Efecto de la agregación de procaína HCl (2 μ M/ml) a un manojito de fibras aisladas del ciático de rana. En A. potencial de acción antes de colocar el anestésico. En B, C, D. registro en presencia de procaína (fotografías cada 3 minutos). En E, F, G y H. potenciales de acción fotografiados cada 5 minutos después de lavar. Se observa la recuperación de la actividad.

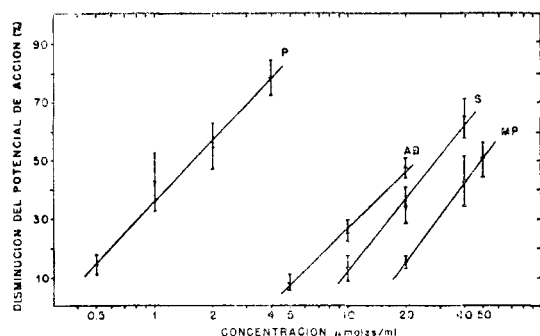


FIG. 2. Relación entre la concentración local y el efecto de distintos fármacos de acción depresora de la conducción, aplicados sobre manojos de fibras aisladas del nervio ciático de rana. En las abscisas, concentración en $\mu\text{moles/ml}$. En las ordenadas, disminución del voltaje del potencial de acción con respecto al inicial. P, clorhidrato de procaina; AB, alcohol bencílico; S, saligenina y MP, trimetilyoduro de procaina.

caína: 0,5; alcohol bencílico: 5,0; saligenina: 10,0 y trimetilyoduro de procaina: 20,0.

Como se puede observar en la Fig. 2, en la cual las ordenadas representan el efecto y las abscisas en escala logarítmica la concentración micromolar, las cuatro drogas presentan una relación lineal entre el porcentaje de disminución del voltaje y el logaritmo de la concentración, aún cuando tienen entre sí diferente actividad. En efecto, el clorhidrato de procaina fue el más activo y su derivado trimetilyodado, que contiene un N cuaternario en su molécula, fue mucho menos activo, siendo su actividad relativa de $1/30$ con respecto al clorhidrato. Asimismo, se observa que la saligenina y el alcohol bencílico, compuestos que son eléctricamente neutros, tienen una actividad del orden de $1/20$ de la que muestra el clorhidrato de procaina.

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación muestran que la ausencia de la envoltura de tejido conjuntivo (epineurio y perineurio) determina un aumento en la sensibilidad de este método de acuerdo a lo sostenido por Krnjvic (6). Así, mientras otros autores (1) encuentran que la concentración efectiva mínima para la procaina en la preparación de nervio in-

tacto es de 1 a $1,5 \mu\text{M/ml}$, en nuestros experimentos la concentración mínima efectiva de esta sustancia fue de $0,5 \mu\text{M/ml}$.

La acción anestésica del alcohol bencílico había sido estudiada por Macht (7) en el animal entero (córnea del conejo, piel de rana y nervio ciático de rana *in situ*) y en la mucosa bucal de seres humanos. Este autor encontró efecto anestésico local con soluciones al 1%, o sea, con $92,3 \mu\text{M/ml}$. Con nuestra preparación, constituida por haces de fibras nerviosas de un nervio mixto, hemos encontrado una concentración efectiva mínima de $5 \mu\text{M/ml}$, mientras que concentraciones de 1 mM/ml y superiores a ésta, produjeron un efecto irreversible.

Con respecto a la acción de la saligenina como bloqueador de la conducción nerviosa, ésta había sido demostrada en preparaciones *in situ* por Hirschfelder *et al.* en 1920 (8), pero no en este tipo de prueba.

Nuestros resultados son concordantes con los descritos por Jefferson (3) para la xilocaina en el nervio ciático intacto de rana, en cuanto a la relación lineal existente entre el logaritmo de la concentración y el efecto.

Aun cuando la presente investigación no fue proyectada para aclarar aspectos del mecanismo de acción de fármacos que deprimen la actividad eléctrica de las fibras nerviosas, la relación de actividad entre las sustancias estudiadas indica que, en nuestras condiciones experimentales, la mayor actividad está presente en aquellos agentes cuya molécula se disocia. Así, la actividad del alcohol bencílico y de la saligenina, sustancias que son eléctricamente neutras, es de $1/20$ de la del clorhidrato de procaina. Del mismo modo, nuestros resultados establecen claramente que la forma de la procaina que presenta mayor actividad es la ionizable y cargada positivamente, por cuanto el trimetilyoduro, compuesto cuaternario no ionizable presentó una actividad 30 veces menor que el clorhidrato. Estos hechos confirman las experiencias de Ritchie y Greengard (9), quienes demostraron en pruebas *in vitro* con fibras amielínicas del nervio vago del conejo que la forma activa de varias sustancias bloqueadoras de la conducción del impulso nervioso es la parte de la molécula cargada positivamente.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer al Prof. W. L. M. Perry por su hospitalidad durante su permanencia en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Edimburgo, así como también a los Dres. B. L. Ginsborg por su valiosa ayuda en esta investigación y R. B. Barlow por haber sintetizado y proporcionado el trimetilyoduro de procaina.

SUMMARY

Some authors have shown that local anesthetics produce a decrease in voltage of the action potentials recorded from isolated axons, this effect being quantitatively related to the activity of the drug. In the present paper the effect of different substances have been studied, but instead of intact isolated nerves, desheathed nerve preparations were used, allowing a direct contact of the drug with the bundles of fibers.

Sciatic nerves of frogs of both sexes (*rana temporaria* and *rana pipiens*) were used. The connective-tissue sheath was carefully stripped off under microscope and the preparation was placed in a closed perspex chamber.

The stimulating and recording platinum electrodes could be adjusted from outside the chamber and were kept in the same position during all the experiment.

Square waves just of supramaximal intensity of 0.4 msec duration at a rate of 1 per sec were used for stimulation. The action potentials were measured either directly on the screen of a Tektronix oscilloscope or on the photographed records, before and after the drug action.

Each preparation was used for 4 to 6 determinations, by washing the drug out and waiting for the complete recovery of

the action potential voltage before adding a new drug. The minimum effective concentrations for procaine hydrochloride, procaine methiodide, benzyl alcohol and saligenin at pH 6.8-7.2 were initially determined, and then the dose-response relationship for these drugs was also determined. The results, expressed as per cent of voltage decrease after ten minutes of exposure to these local anaesthetics are shown in figure 2. It was shown that there is a linear relationship between the drug concentration logarithm and the per cent decrease of action potentials. Procaine hydrochloride was the most active of the drugs tested, while procaine methiodide was about 30 times less active than the former. Benzyl alcohol and saligenin activity were about 1/20 that of procaine HCl. These results indicate that electrically neutral substances are less active in depressing the action potential of the nerve.

REFERENCIAS

- 1.—BENNETT, A. L.; WAGNER, J. C. y MCINTYRE, A. R.—*J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 75:125, 1942.
- 2.—ASTROM, A. y PERSSON, N. H.—*Brit. J. Pharmacol.* 16:32, 1961.
- 3.—JEFFERSON, G. C.—*J. Pharm. Pharmacol.* 15:92, 1963.
- 4.—BENNETT, A. L. and CHINBURG, K. G.—*J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 88:72, 1946.
- 5.—GASSER, H. S. y ERLANGER, J.—*J. Physiol.* 62:496, 1922.
- 6.—KRNJVIC, K.—*Quart. J. exptl. Physiol.* 39:55, 1954.
- 7.—MACHT, D. I.—*J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 11:263, 1918.
- 8.—HIRSCHFELDER, A. D.; LUNDHOLM, A. and NORRGAARD, H.—*J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 15:261, 1920.
- 9.—RITCHIE, I. M. and GREENGARD, P.—*J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 133:241, 1961.