

Actividades relativas de varios ésteres de la colina en recto abdominal de *L. ocellatus*¹

CAROLINA M. WIEDER, SELVA GARCÍA POMÉS y RAQUEL WORONA²

(Recibido: 23 de junio, 1971)

RESUMEN

Se determinan las actividades relativas de los ésteres de la colina (formil, acetil, propionil, butiril y pentanoilcolina) ensayados en músculo recto abdominal de batracio (*Leptodactylus ocellatus*).

La sensibilidad de diferentes músculos es variable tanto para acetilcolina como para las actividades relativas de los otros ésteres. Al usar un músculo sin agregar eserina al baño, su sensibilidad aumenta progresivamente en los cuatro primeros ésteres nombrados, siendo la actividad de pentanoilcolina similar a la de propionilcolina.

El valor k (definido como razón de la concentración de Ach y del otro agonista que producen igual magnitud de respuesta) varía con la sensibilidad propia de cada músculo y se modifica fundamentalmente al reobtener las curvas dosis respuesta después de eserinizarse el músculo.

Para que k resulte una medida única de la actividad relativa de dos ésteres se requiere que sean paralelas las curvas dosis respuestas de los agonistas que se comparan; en caso contrario, la variabilidad de k puede ser considerable.

SUMMARY

Relative activities of various choline esters (formyl, acetyl, propionyl, butyryl, and pentanoylcholine) are tested by bioassay on the rectus abdominis muscle of batracious (*Leptodactylus ocellatus*).

The sensitivity of each muscle varies for acetylcholine as for the relative activities of the other esters. Increasing activities of the first four esters and similar activities of pentanoyl and propionylcholine were found when assayed on the same uneserinized muscle.

The k value (ratio dose of acetylcholine and dose of the other agonist giving same response) varies according to the sensitivity of each muscle and changes essentially if eserine is added to the bath and the dose-response curves are reobtained.

Parallel dose-response curves of both agonistes are required in order to obtain k as a single value, otherwise the variability of k might be considerable.

¹ Los resultados experimentales de este trabajo fueron parcialmente comunicados en la III^a. Reunión Internacional de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental, Dic. 1970.

² Profesora asociada a cargo de la cátedra, Jefa de trabajos prácticos y Ayudante primera, respectivamente, Departamento de Materias Básicas, orientación Física Biológica Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Buenos Aires.

INTRODUCCION

Las sustancias trasmisoras del sistema nervioso y en especial los colinérgicos manifiestan sus actividades en concentraciones muy pequeñas; dada la sensibilidad de numerosos bioensayos éstos han sido empleados para el dosaje de neurotransmisores de acción similar a la acetilcolina (Ach).

Recientemente se han desarrollado métodos de cromatografía en fase gaseosa cuya sensibilidad es

comparable a la de los bioensayos (JENDEN et al. 1968; HAMMAR et al. 1968; SCHMIDT et al. 1970); no obstante, para dosar las actividades de sustancias del tipo acetilcolina de extractos de tejido suele ser preferible recurrir a estos últimos especialmente para detectar sustancias de composición desconocida.

El cuadro 1 presenta una nómina de diversos bioensayos para la acetilcolina que utilizan órga-

CUADRO 1

Bioensayo empleado	Sensibilidad para acetilcolina	
	Sin eserina	Con eserina
Músculo de Sanguijuela :		
<i>Diplopdella brasiliensis</i>	$3 \cdot 10^{-8}$ M (1)	
	$3 \cdot 10^{-9}$ M (2)	
Corazón de almeja :		
<i>Tapes turgida</i>	$1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-12}$ (3)	
<i>Venus mercenaria</i>	$1 \cdot 10^{-9}$ (4)	
Recto de almeja :		
<i>Mercenaria mercenaria</i>	$1 \cdot 10^{-6}$ - $3 \cdot 10^{-9}$ M (5)	
Corazón de batracio :		
<i>Bufo arenarum</i>	$1 \cdot 10^{-7}$ (6)	
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	$1 \cdot 10^{-6}$ (6)	
Rana temporaria	$1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-10}$ (7)	
Recto de batracio :		
<i>Leptodactylus ocellatus</i> ...	$5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-8}$ (8)	$5 \cdot 10^{-8}$ - $5 \cdot 10^{-9}$ (8)
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	$5 \cdot 10^{-8}$ (8)	$2,5 \cdot 10^{-8}$ (8)
<i>Bufo crucifer</i>	$1 \cdot 10^{-6}$ - $7,5 \cdot 10^{-8}$ (8)	$5 \cdot 10^{-8}$ - $1,6 \cdot 10^{-8}$ (8)
<i>Bufo ictericus spix</i>	$1 \cdot 10^{-8}$ (9)	
Ileón de cobayo	$1 \cdot 10^{-6,5}$ M (10)	
	$2 \cdot 10^{-7}$ (11)	
<i>Taenia - caeci</i> - del cobayo	$1 \cdot 10^{-7}$ (11)	
Esófago del cobayo	5-40 (mg/ml) (12)	
Estómago humano :		
Antro	0,05 - 0,8 (mg/ml) (13)	
Corpus	0,1 - 0,8 (mg/ml) (13)	
Píloro	1 - 10 (mg/ml) (13)	

Referencias : (1) Xavier, 1940 ; (2) Valle, 1941 ; (3) Florey, 1967 ; (4) Ladd, 1955 ; (5) Greemberg, 1963 ; (6) Lanari, 1934 ; (7) Zapata, 1967 ; (8) Moussatche, 1945 ; (9) Xavier, 1964 ; (10) Schneider, 1957 ; (11) Akubue, 1966 ; (12) Deshpande, 1965 ; (13) Bennett, 1966.

nos de invertebrados y vertebrados cuyas sensibilidades cubren varios órdenes de magnitud.

BLABER (1961) obtuvo en intestino aislado de cobayo sensibilizado con isopropilfosfofluoridato, una sensibilidad de $6,25 \cdot 10^{-15}$.

BIRMINGHAM (1961) usando ileon aislado de cobayo sensibilizado con Mipafox, logró una sensibilidad de $1 \cdot 10^{-12}$.

BROWNEE (1963) ensayó por separado el músculo longitudinal y el circular del intestino del cobayo, encontrando que el longitudinal es mucho más sensible a la acción de la Ach que el circular.

FLOREY (1967) cita como adecuadas para ensayar Ach los siguientes géneros de almejas: Tapes, Mya, Cyprina, Ostrea, con una sensibilidad de $1 \cdot 10^{-9}$ a $1 \cdot 10^{-12}$. SCHNEIDER, TIMMS (1957) trabajando con intestino de cobayo encontraron que las concentraciones de acetil, propionil y butirilcolina para producir respuesta eran respectivamente $1 \cdot 10^{-6,5}$, $1 \cdot 10^{-4,7}$ y $1 \cdot 10^{-3,6}$.

No obstante la gran diversidad de bioensayos que dosan Ach y otros ésteres de la colina y la amplia gama de sensibilidades que los mismos abarcan, no se encontró en la bibliografía consultada una sistematización de las actividades relativas de homólogos de Ach tales como formil, propionil, butiril y pentanoilcolina y de las curvas dosis respuesta respectivas relacionadas con la de Ach.

En un intento por obtener esta sistematización y determinar las actividades relativas se eligió para el bioensayo una especie única; *Leptodactylus ocellatus* cuyo recto abdominal presenta la conveniencia de la reproducibilidad de las respuestas, la relajación relativamente rápida y una sensibilidad que permite ensayar soluciones patrones de estos fármacos como también de extractos de tejidos que los contengan en concentración adecuada.

Las características del recto abdominal de *Leptodactylus ocellatus* hace posible fijar condiciones experimentales adecuadas para la obtención de curvas dosis respuesta cuyo estudio comparativo y tratamiento matemático de las funciones que se obtienen son objeto de este trabajo.

Generalmente el recto abdominal de batracio usado para dosar Ach y sus ésteres (CHANG y GADDUM, 1933; HANIN y JENDEN, 1966) es previamente eserinizado.

Con el propósito de determinar las ventajas de

este método se obtuvieron y compararon las curvas dosis respuesta de los ésteres de la colina en presencia y ausencia de eserina.

MATERIALES Y METODOS

Los registros gráficos se hicieron con quimógrafos de avance lento (2 cm por minuto, aproximadamente) sobre papel satinado blanco, mediante dispositivo inscriptor a tinta.

La palanca inscriptora se dispuso tangencialmente, guardando sus brazos una razón de cinco aproximadamente.

Al músculo se aplicó una tensión de 800 mg, dejándolo en reposo 30 minutos en el baño.

El baño es de 5 cc a temperatura ambiente con burbujeo de oxígeno en solución Ringer Batracio (6,50 g ClNa, 0,30 g ClK, 0,22 g Cl₂Ca, 0,35 g CO₂ H Na, 0,78 g glucosa para un litro de agua).

Las sucesivas dosis de agonistas agregadas al baño no sobrepasaron el volumen de 100 microlitros, aplicadas mediante micro-jeringas Hamilton, registrándose la contracción durante 2 minutos. A continuación de cada ensayo se lavó 3 veces y se esperó 5 minutos hasta el ensayo siguiente.

Para determinar cuantitativamente la potenciación de Ach por efecto de la eserina se procedió de la siguiente manera: después de dejar el músculo durante 30 minutos en solución Ringer sin eserina se obtuvo la curva dosis-respuesta (CDR) con unas cuatro dosis crecientes de Ach. Después de agregar eserina $1 \cdot 10^{-5}$ como concentración final en el baño se esperó 30 minutos repitiendo la obtención de la CDR de Ach con aproximadamente otras 4 dosis crecientes convenientemente ajustadas a la sensibilidad del músculo bajo estas condiciones; se repitió aumentando progresivamente las concentraciones de eserina. Se determinó así la concentración de eserina que produce la mayor potenciación de Ach.

Con el objeto de estudiar el efecto de la eserina sobre la actividad de formilcolina (Fch), propionilcolina (Pch), butirilcolina (Bch) y pentanoilcolina (Pech) se procedió en forma análoga. Por ejemplo, para la Bch se obtuvieron primero las CDR de Ach y Bch (ambas sin eserina) y luego las mismas con eserina en sucesivas concentraciones crecientes.

RESULTADOS

La curva dosis respuesta de acetilcolina y su modificación por efecto de la eserina. La CDR de Ach obtenida en solución Ringer sin eserina resulta una curva logarítmica para cierto rango de las x como lo indica la Fig. 1.

Su expresión analítica es:

$$y_A = a \log x$$

donde x es la dosis de Ach y a la pendiente de la curva (incremento de la curva para un ciclo de la escala logarítmica).

En esta expresión se considera que la CDR pasa por el origen $x = 1$; para una expresión más general habrá que tener en cuenta la ordenada al origen h' que por conveniencia se escribirá:

$$h' = a \log h$$

de donde:

$$h = \text{antilog} \frac{h'}{a}$$

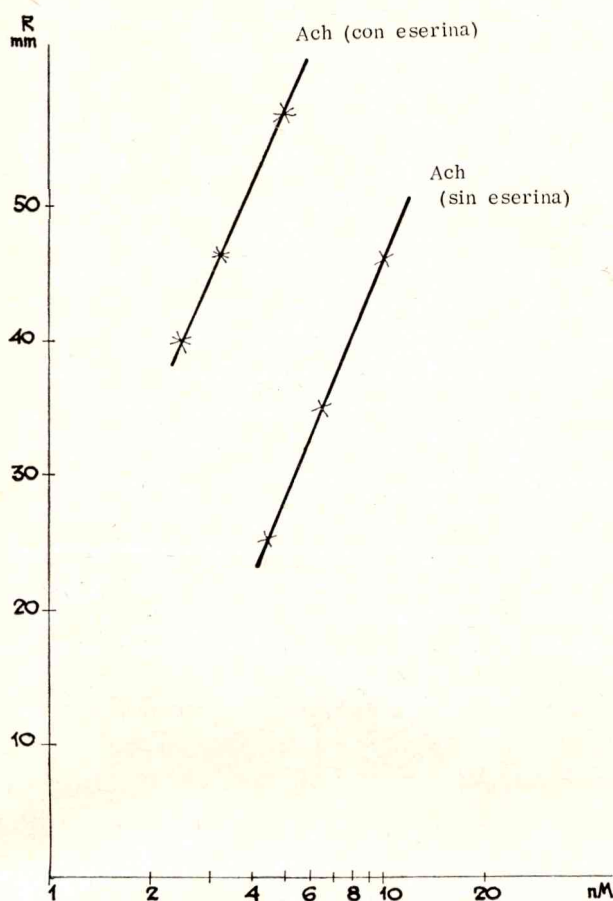


Fig. 1. — Efecto potenciador de la eserina: la curva de Ach se desplaza hacia la izquierda

resultando:

$$y_A = a \log (h \cdot x)$$

En presencia de eserina la curva se desplaza a la izquierda manteniéndose paralela a la anterior. El efecto más pronunciado se obtuvo con $2 \cdot 10^{-5}$ a $4 \cdot 10^{-5}$ de eserina.

Un aumento ulterior de la concentración de eserina no acentúa la potenciación, sino la disminuye.

Cuando se tienen dos CDR de Ach sin y con eserina se puede calcular la potenciación que es la razón de dos dosis que producen igual magnitud de respuesta.

$$K = \frac{\text{dosis de Ach sin eserina en el baño}}{\text{dosis de Ach con eserina en el baño}}$$

Como las curvas tienen igual pendiente este valor K es único, cualquiera sea la respuesta considerada.

La curva obtenida en presencia de eserina es:

$$Y_A = a \log (K h x)$$

El factor K es mayor que la unidad y varía para cada músculo. En trece experiencias se obtuvo en promedio una potenciación:

$$\bar{K} = 5,1 \pm 2,5$$

Excepcionalmente, el valor K puede ser incluso mayor que 20.

Efectos de la eserina sobre otros ésteres de la colina. Las respuestas de los otros ésteres prácticamente no son potenciadas con eserina (Fig. 2 y 3). El valor K' correspondiente, definido en forma análoga al K es menor que 2 y generalmente se mantiene próximo a la unidad para concentraciones de eserina comprendidas entre 10^{-4} y 10^{-5} .

La concentración de eserina que produce la máxima potenciación de Ach, con frecuencia, no coincide con la concentración que produce la mayor potenciación del otro éster.

En la mayoría de los ensayos realizados sin eserina, la CDR de Ach está a la derecha de la de Bch (Fig. 2), si se expresan las dosis de los agonistas en moles $\cdot 10^{-9}$. Agregando eserina al baño y volviendo a obtener ambas CDR, la Ach puede resultar aproximadamente equipotente a Bch (Fig. 2).

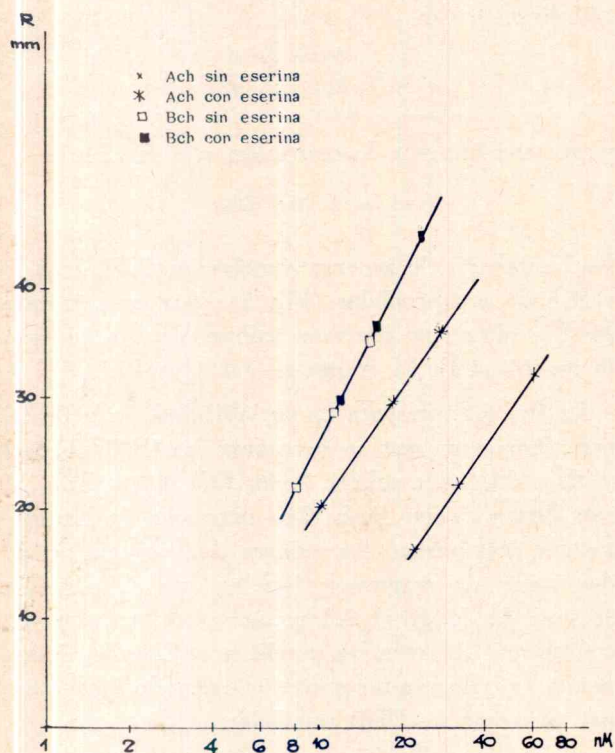


Fig. 2 — El efecto potenciador de la eserina se manifiesta claramente en el desplazamiento en la curva de Ach, no así en la de Bch.

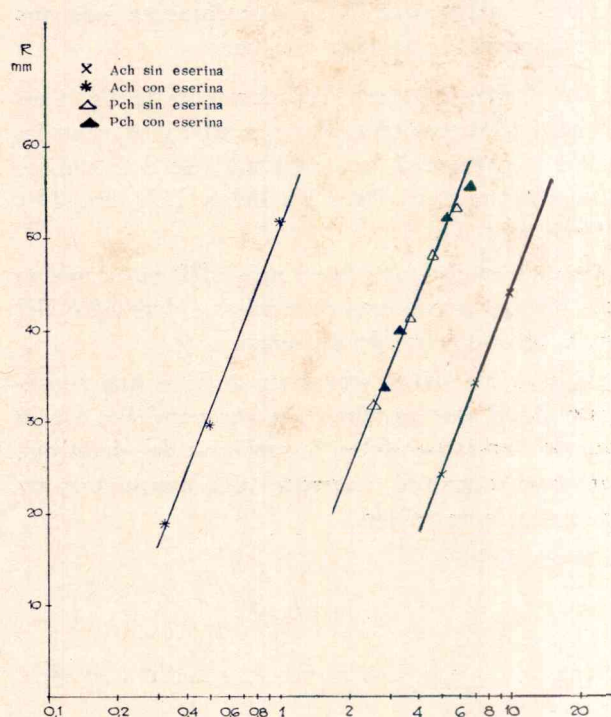


Fig. 3. — La mayoría de las CDR de Pch resultan paralelas a la de Ach. La Pch no es potenciada por efecto de la eserina

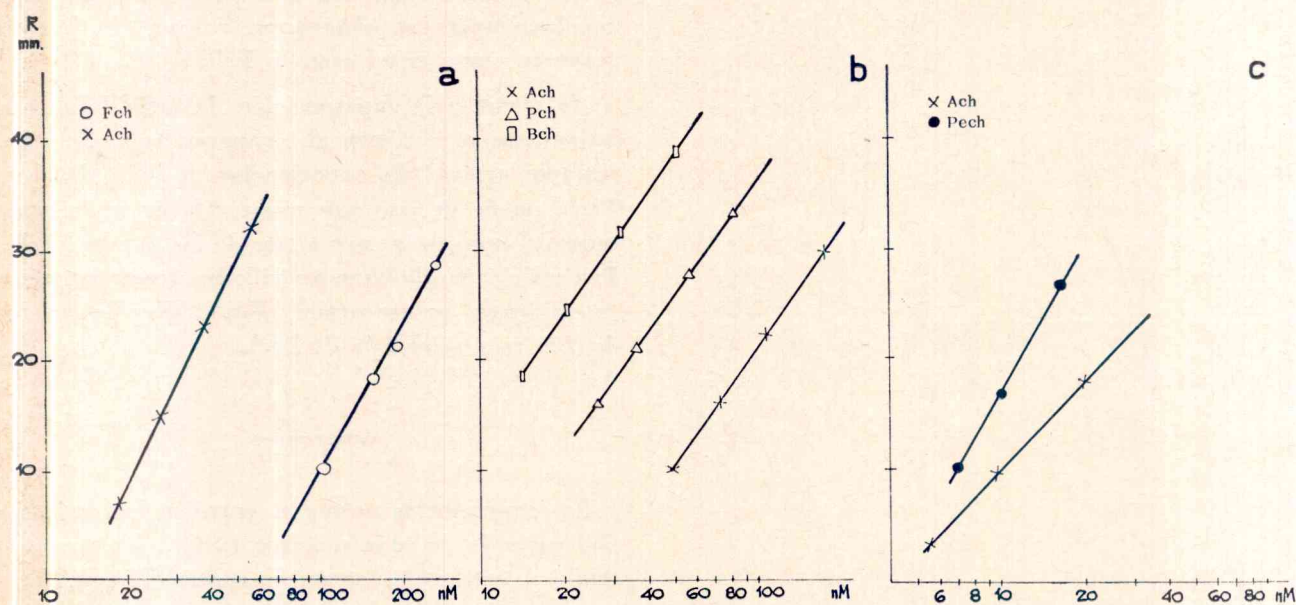


Fig. 4. — Actividades relativas de: a, Fch; b, Pch y Beh; c, Pech respecto de Ach. El orden en que se obtienen las CDR, trabajando con el mismo músculo, no afecta sus posiciones relativas

La fig. 3 muestra una experiencia con Ach y Pch en la que, después de agregar eserina, la Ach resulta más activa que Pch contrariamente a lo que ocurría antes de agregar eserina.

Actividades relativas. Las curvas de la fig. 4 representan los resultados de tres experiencias en las cuales se comparan las actividades de Ach con los otros ésteres: Fch (fig. 4 a), Pch y Bch (fig. 4 b) y Pech (fig. 4 c).

Cuando se obtienen dos o más CDR en el mismo músculo las posiciones relativas no dependen del orden de obtención de las mismas.

Al ensayar Ach y otro éster de la colina se obtienen CDR que pueden o no ser paralelas. En el caso de curvas paralelas, la razón de dos dosis que dan igual magnitud de respuesta es constante y no varía con la respuesta.

En símbolos:

$$(1) \quad y_A = a \log (hx)$$

es la expresión que corresponde a la CDR de Ach.

$$(2) \quad y_P = a \log (hx')$$

es la expresión que corresponde a la CDR de Pch con $x' = \text{dosis de Pch}$; x' se obtiene por simple multiplicación de x por una constante k que es la razón de dos dosis de Pch y de Ach, expresadas

en nM (moles $\cdot 10^{-9}$), que producen igual magnitud de respuesta.

$$k = \frac{\text{dosis de Ach}}{\text{dosis de Pch}}$$

y por consiguiente la expresión (2) resulta:

$$y_P = a \log (kx)$$

En la mayoría de las experiencias las CDR de Ach y Bch no son paralelas (Fig. 5); por consiguiente pueden obtenerse diversos valores de k según sea la magnitud de la respuesta considerada.

La fig. 6 representa la variabilidad de k de 30 experiencias en que se comparan las CDR de Ach y otros ésteres, a saber: 4 con Fch, 6 con Pch, 15 con Bch y 5 con Pech. Los extremos de los segmentos representan los valores de k obtenidos de dos pares de respuestas iguales que difieren en 30 mm. La longitud del segmento es tanto mayor cuanto más difieren las pendientes. Cuando el segmento se reduce a un punto, el valor de k es único por provenir de CDR paralelas.

De la observación de los valores de k se infiere que la Fch es la menos activa pudiendo ser entre 3 y 10 veces menos activa que Ach. Los otros ésteres Pch, Bch y Pech tienen actividades relativas comprendidas entre 1 y 10, es decir, pueden llegar a ser hasta 10 veces más activas que la Ach. Excepcionalmente se obtuvieron valores de k aún mayores, como en el caso de Bch.

No obstante la superposición de actividades relativas que se obtienen al comparar los valores de los tres grupos de experiencias de Pch, Bch y Pech, puede decirse que, ensayando en un mismo músculo consecutivamente tres de los ésteres (Ach, Pch y Bch) se obtienen actividades progresivamente crecientes en ese orden (Fig. 4 b) y la acción de Pch es similar a la de Pech.

DISCUSION

Las experiencias permiten apreciar la sensibilidad variable de cada músculo para Ach como así también para otros ésteres de colina (Fig. 4). Las concentraciones finales de los agonistas en el baño sin eserina son de la misma magnitud que las empleadas en experiencias análogas con recto abdominal de *Rana pipiens* (WIEDER, trabajo inédito).

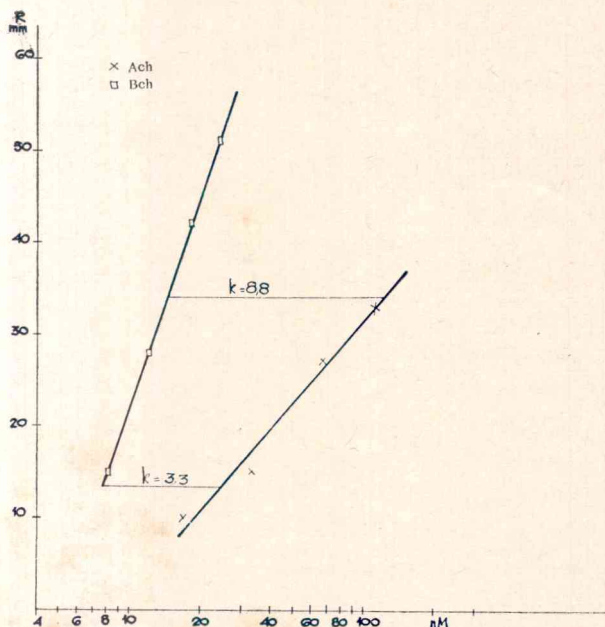


Fig. 5. — En el 80 % de los casos las CDR de Ach no resultan paralelas: k varía con el nivel de respuesta

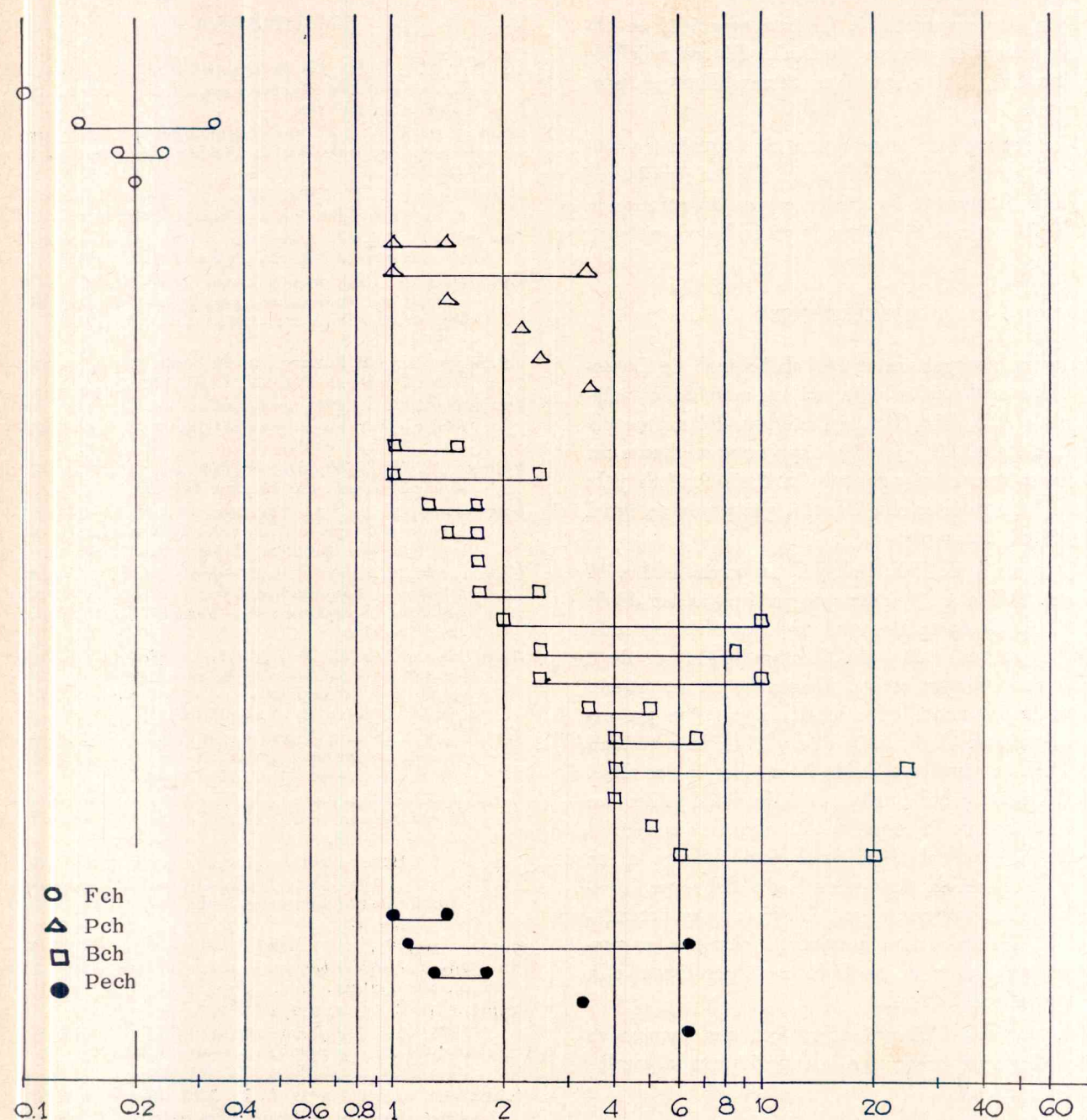


Fig. 6. — Variabilidad de k , actividad relativa de Ach respecto de otros ésteres. Los extremos de los segmentos representan los valores de k de dos pares de respuestas iguales que difieren en 30 mm

to) con el que se detectan en el baño aprox. 0,1 nM/ml con eserina y 0,5 nM/ml sin eserina.

Los segmentos de las Fig. 6 permiten apreciar las variaciones de la sensibilidad relativa y su variabilidad en cada experiencia. Fueron representados en escala logarítmica con vista a su comparación con valores obtenidos de experiencias realizadas en ileon de cobayo (trabajo en preparación).

Cuando se realizan bioensayos en músculo estriado con el propósito de expresar en "equivalentes de Ach" la actividad de un extracto de tejido se suele comparar una respuesta originada por un volumen fijo del extracto con una o dos respuestas aproximadamente iguales de Ach.

El inconveniente de este método reside en el hecho de que si se repite la determinación refirién-

dola a una respuesta de distinta magnitud se obtiene generalmente un resultado diferente debido a que las CDR respectivas tienen distintas pendientes.

Las expresiones matemáticas presentadas permiten un estudio cuantitativo del efecto simultáneo de dos ésteres de la colina cuyo sinergismo en músculo estriado es objeto de un trabajo posterior.

CONCLUSIONES

En los ensayos con recto abdominal de *Leptodactylus ocellatus* sin eserina las actividades relativas de Ach, Pch, Bch y Pech son del mismo orden de magnitud y pueden expresarse mediante un factor k que es la razón de la dosis de Ach y la dosis del otro éster considerado, que producen igual magnitud de respuesta.

El valor k de Pch, Bch y Pech varía de 1 a 10 lo que indica actividades que pueden variar desde igual a Ach hasta 10 veces mayores. Fch, en cambio, es menos activa que Ach pudiendo ser de 3 a 10 veces menos activa. Ensayadas en un mismo músculo las actividades relativas guardan un orden creciente: Fch, Ach, Pch y Bch; la actividad de Pech es similar a la de Pch. Cuando las CDR tienen igual pendiente, k es único cualquiera sea la magnitud de la respuesta. En caso de pendientes distintas la variabilidad de k puede llegar a ser muy considerable dependiendo de dichas pendientes y de las respuestas que se elijan para determinarlas. Generalmente, aunque no siempre, es mayor la pendiente de la CDR correspondiente a la sustancia más activa.

La potenciación que sufre Ach con eserina es marcadamente superior a la experimentada por los otros ésteres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. JOSEPH V. AUDITORE (EE. UU.) y al Dr. DONALD J. JENDEN (EE. UU.) nuestro agradecimiento por facilitar los fármacos empleados.

A la Inga. Agra. NORMA M. CANTATORE del Departamento de Materias Básicas, orientación Estadística, por su asesoramiento y colaboración en el tratamiento estadístico de los datos.

A la Lic. MARÍA JOSEFINA ERRAMUSPE por su colaboración en las expresiones matemáticas.

BIBLIOGRAFIA

- AKUBUE, P. I., 1966. *The site of action of drugs in the isolated taenia caeci from the guinea pig*. Br. J. Pharmac. Chemother. 27: 347-365.
- BENNET, A., 1966. *A pharmacological investigation of human isolated stomach*. Br. J. Pharmac. Chemother. 27: 286-298.
- BIRMINGHAM, A. T., 1961. *Absence of spasm in a sensitive assay for acetylcholine*. J. Pharm. Pharmac. 13: 510.
- BLABER, L. C., 1961. *A sensitive method for the assay of Acetylcholine*. J. Pharm. Pharmac. 13: 445-446.
- BROWNLEE, G., 1963. *Some pharmacological properties of the circular and longitudinal muscle strips from the guinea pig, isolated ileum*. Br. J. Pharmac. Chemother. 21: 544-554.
- CHANG, C. H., and GADDUM, J. H. 1933. *Choline esters in tissue extracts*. J. Physiol., Lond. 79: 255-285.
- DESPHANDE, V. R., 1965. *Drug actions on the isolated oesophagus of the guinea pigs*. Archs. int. Pharmacodyn. Théor. 157: 125-131.
- FLOREY, E., 1967. *The clam-heart bioassay for acetylcholine*. Comp. Biochem. Physiol. 20: 365-377.
- GREEMBERG, M. J., 1963. *The action of 5-H. T. and acetylcholine on the rectus of the venus-clam Mercenaria mercenaria*. Comp. Biochem. Physiol. 9: 275-290.
- HAMMAR, C. G., HANIN, I. and HOLMSTEDT, B., 1968. *Identification of Acetylcholine in fresh rat brain by combined gas chromatography-mass spectrometry*. Nature (Lond.) 220: 915-917.
- HANIN, I. and JENDEN, D. I., 1966. *The effect of perchlorate ion and some pharmacological agents on the sensitivity of the frog (Rana pipiens) rectus abdominis to acetylcholine*. Experientia, 22: 537-543.
- JENDEN, D. J., HANIN, I. and LAMB, S. J., 1968. *Microscintillation gaschromatography of acetylcholine and relative compounds*. Analyt. Chem. 40: 125-128.
- LADD, R. J. and THORBURN, G. D., 1955. *New test animal for acetylcholine assay*. Aust. J., exp. Biol. med. Sci. 33 (2): 207-213.
- LANARI, A., 1934. *Los transmisores químicos. Contribución al estudio fisiológico y farmacológico de la acetilcolina*. Tesis de doctorado, Buenos Aires, Facultad de Ciencias Médicas, 173.
- MOUSSATCHE, H., 1945. *Sensibilidad de músculo reto abdominal de alguns batráquios aos ésteres de colina. Acao da temperatura*. Revta. bras. Biol. 5 (4): 445-452.
- SCHMIDT, D. E., SZILAGYI, P. I. and ALKON, D. L. et al, 1970. *A method for measuring nanogram quantities of acetylcholine by pyrolysis-gas chromatography, etc.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 174: 337-45.
- SCHNEIDER, R. and TIMMS, A. R., 1957. *Some aspects of the pharmacology of an homologous series of choline esters of fatty acids*. Br. J. Pharmac. Chemother 12: 30-38.
- VALLE, J. R., 1941. *Sensibilidade a acetilcolina da sanguessuga « Diplobdella Brasiliensis » (Pinto 1920)*. Mems. Inst. Butantan, 15: 17-25.
- XAVIER, A. A., 1940. *Diplobdella Brasiliensis especie de sanguessuga comun dos arredores do Rio de Janeiro, como objeto de prova em farmacologia quantitativa*. Bras. med. 54: 760-765.
- XAVIER, A. A., FREIRE, P. M. and VALLE, J. R., 1964. *Sensitiveness of toad rectus abdominis muscle to acetylcholine and influence of eserine and neostigmine*. Archs. int. Pharmacodyn. Théor. 147: 388-399.
- ZAPATA, P. and EYZAGUIRRE, C., 1967. *Bioassay of acetylcholine on the sinus venosus of the frog*. Can. J. Physiol. Pharmac. 45: 1021-1032.