REVISTA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA DE BUENOS AIRES
19 (3): 77-84, 1971

COU 478.088.1 : 597.6 : 591.473.32

Bioensayos paralelos para determinar concentraciones de dos colinérgicos [1]

CAROLINA M. WIEDER, SELVA GARCÍA POMÉS, RAQUEL WORONA [2]

(Recibido: 30 de julio de 1971)

RESUMEN

Se determinan las actividades relativas de propionil y butirilcolina con respecto de acetilcolina en ileon ce cobayo.

Se emplean bioensayos paralelos en recto abdominal de batracio (*Leptodactylus ocellatus*) e ileon de cobayo y se estudian los requisitos que deben cumplir las curvas dosis respuesta y las condiciones bajo las cuales se pueden determinar cuantitativamente los componentes de una solución que contiene acetilcolina y uno de los otros ésteres ambos conocidos cualitativamente.

SUMMARY

Potencies of propionyl and butirylcholine relative to acetylcholine are tested by assay on the guinea pig ileum.

Parallel bioassay on the rectus abdominis of batracious (*Leptodactylus ocellatus*) and the guinea pig ileum were carried out in order to determine concentrations of a solution containing acetylcholine and any of the other mentioned esters.

The requirements of the drug response curves and experimental conditions under which this may be achieved are hereby being studied.

INTRODUCCION

Diversos autores han abordado el tema de los bioensayos paralelos para determinar concentraciones de sustancias activas del tipo acetilcolina contenidas en soluciones o en extractos de tejido.

CHANG y GADDUM (1933) indican una serie de ensayos que permiten establecer si un extracto de tejido contiene acetilcolina (Ach) o bien si la actividad se debe a la presencia de otro agonista.

Varios investigadores han tratado de aplicar el método de bioensayos paralelos a problemas similares con resultados diversos. HOSEIN (1965) encuentra que el método de bioensayos no es aplicable para la Ach y butirilcolina (Bch) porque en el ileon la Ach parece potenciar la acción de la Bch y por consiguiente el método no permite determinar la concentración de los componentes.

HEBB (1967), en cambio, usó este método para determinaciones cuantitativas de soluciones conteniendo Ach y Bch; aplicando las fórmulas de BANISTER, WHITTAKER y WIJESUNDERA (1953) obtuvo

[1] Trabajo realizado con subsidio del Consejo Nacional de Investigadiones Científicas y Técnicas.

[2] Profesora Asociada a cargo de la Orientación, Jefe de Trabajos Prácticos y Ayudante de Primera, respectivamente. Departamento de Materias Básicas, orientación Física Biológica, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Buenos Aires.

resultados que concuerdan con los valores esperados con un error menor del 20 %.

CORNFIELD (1964) se refiere al caso particular en que falta paralelismo en las curvas dosis respuesta de dos agonistas y expresa la "potencia relativa" como función del "nivel de respuesta".

En un trabajo anterior (WIEDER, 1971) se han determinado las actividades relativas de varios ésteres de la colina en músculo estriado (recto abdominal de Leptodactylus ocellatus) y se dan las expresiones matemáticas de las curvas dosis respuesta CDR respectivas.

El presente trabajo se refiere a las acciones de los mismos ésteres en músculo liso (ileon de cobayo) y al efecto de dos ésteres (mezcla) aplicados simultáneamente en músculo liso y estriado.

Se analizan las CDR, las condiciones experimentales y el procedimiento para determinar la concentración de dos colinérgicos contenidos en una solución; ambos se suponen cualitativamente conocidos y uno de ellos es Ach.

MATERIALES Y METODOS

La técnica para ensayo en músculo estriado y el equipo empleado han sido previamente descriptos (WIEDER, 1971). Para bioensayo de músculo liso se usa ileon de cobayo; el animal fue privado de alimento sólido suministrándosele agua azucarada durante las 48 horas anteriores. El trozo de ileon se condiciona en baño de 5 ml conteniendo solución Tyrode a 33°C y sometido a una tensión de 800 mg. Se proveyó oxígeno por burbujeo.

Solución Tyrode (gramos por litro de agua): 8,0 Cl Na; 0,2 Cl K; 0,2 Cl_2 Ca; 0,1 Cl_2 Mg; 0,05 PO_4 H_2 Na; 1,0 glucosa; 1,0 CO_3 H Na; Neoantergán solución 6,7 mgr %; 0,1 ml; morfina solución 16,7 mgr %: 0,1 ml.

El tiempo de acondicionamiento es variable para cada músculo. La contracción se registra durante 30 segundos, se lava por "overflow" y se espera un mínimo de dos minutos antes de aplicar la dosis siguiente. Para determinar las actividades relativas a Ach de cada agonista en ileon de cobayo se obtuvieron la CDR de Ach, la CDR de otro éster (por ej. propionilcolina) y nuevamente la de Ach para verificar la reproducibilidad de las respuestas del músculo. En caso afirmativo se prosigue con la CDR de la mezcla de ambos.

Con el objeto de determinar la concentración de Ach en una solución que la contiene junto con otro éster de la colina se obtuvo la CDR de dicha solución precedida de la CDR de Ach.

RESULTADOS

La sensibilidad del ileon de cobayo es variable para acetilcolina. Permite obtener respuestas mediante concentraciones finales en el baño, que oscilan entre 10^{-10} y 5.10^{-13} M/ml.

La actividad relativa k' de Bch, respecto de Ach, se define como la razón de la dosis de Ach y la dosis de Bch que producen igual magnitud de respuesta en el ileon. Este valor varía de un músculo liso a otro.

En la figura 1 se representan respuestas en función del logaritmo de la dosis agregada al baño. Las curvas dosis respuestas CDR obtenidas son paralelas, por consiguiente k' es único para cualquier magnitud de respuesta, siendo $k'_{Bch} = 1{,}4.10^{-2}$.

En la mayoría de las experiencias las CDR de Ach y de Bch no resultan paralelas (Fig. 2). Tomando respuestas que difieren 20 mm entre sí y calculando los k' correspondientes a las mismas se obtuvieron dos valores diferentes: $4{,}2.10^{-3}$ y $1{,}5.10^{-2}$. La variabilidad de estos valores k' es distinta en cada experiencia. En la Fig. 3 se representa la variabilidad de k' de nueve experiencias. A mayor longitud de los segmentos corresponde mayor diferencia de pendientes de las CDR que se comparan. Sólo en dos de ellas las CDR resultaron paralelas, razón por la cual, el segmento mencionado se reduce a un solo punto.

Las CDR de Ach y Pch permitieron determinar valores k'_{Pch} del mismo orden de magnitud que las anteriores.

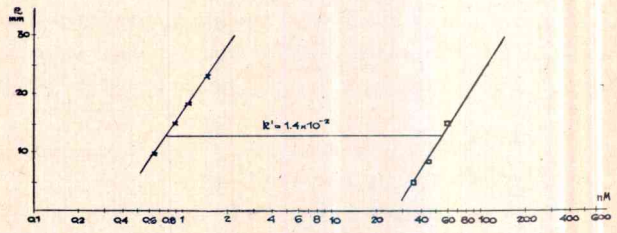

Fig. 1. —Bioensayo en ileon. CDR de × Ach y □ Bch; se indica la actividad relativa de la segunda respecto de la primera.

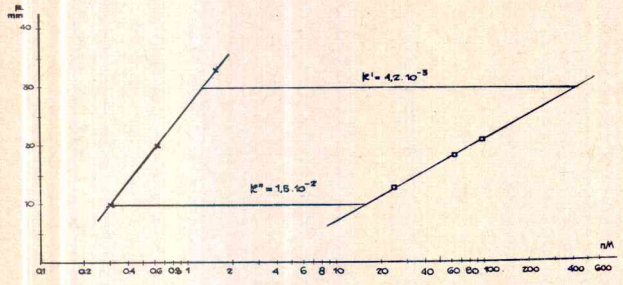

Fig. 2. — Bioensayo en ileon. Falta de paralelismo de las CDR de × Ach y □ Bch

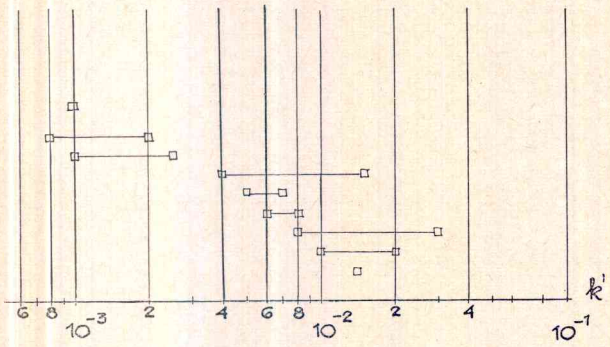

Fig. 3. — Variabilidad de k' Bch en ileon

En músculo estriado las respuestas que se obtienen con cada éster son independientes del orden en que se ensaya cada agonista (CORTINA, 1969; WIEDER et al., 1971) ; en cambio en el músculo liso no siempre ocurre así. Generalmente, si a continuación de la CDR de Ach se obtiene la CDR de Bch, el músculo liso queda sensibilizado para Ach; al reobtener esta CDR resulta potenciada, aun cuando repetidas dosis de Ach suelen llevar paulatinamente la respuesta a la curva inicial de la misma.

Ensayo de la mezcla en ileon de cobayo. Para determinar la concentración de Ach y Bch de una mezcla se obtuvieron tres CDR (Fig. 4) : la de Ach, la de una mezcla de ámbos ésteres en proporción conocida que sirve de control, y la de la mezcla incógnita. En las dos primeras se representa en abscisas el logaritmo del contenido de Ach de cada dosis en nM (Mol. 10^{-9}). Para la mezcla desconocida (Fig. 4) se usó en abscisas la escala en log. microlitros. Comparando las CDR de la mezcla desconocida con la de Ach se determina el contenido de esta sustancia en la mezcla, que resulta de 25 nM/ml en este caso.

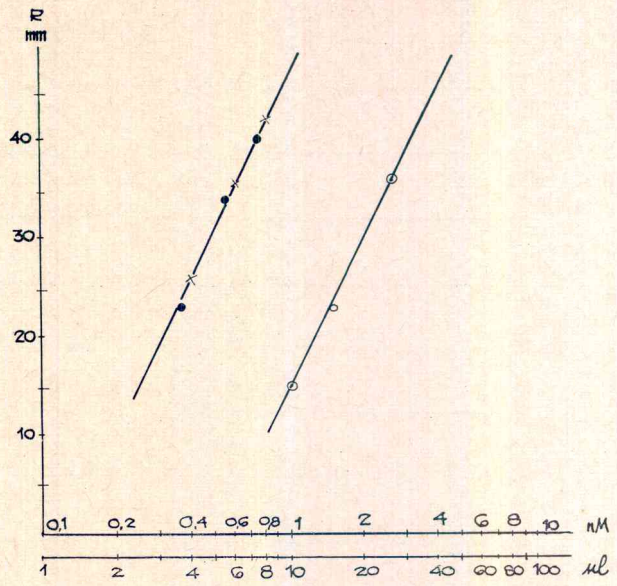

Fig. 4. — Bioensayo en ileon × CDR de Ach ; ●, mezcla conocida ; ○, mezcla incógnita

La CDR de la mezcla de concentración conocida coincide con la de Ach cuando las concentraciones de ambas sustancias son del mismo orden de magnitud. Esto último se asume también para la mezcla desconocida.

Ensayo de mezclas de Ach y Pch en músculo recto abdominal. Una vez hallada la concentración de Ach de la mezcla se determina la concentración del otro éster cualitativamente conocido. Para ello se emplea el bioensayo en recto abdominal de *Leptodactylus ocellatus.* Los ensayos en el recto abdominal fueron realizados sin eserina en el baño con el objeto de destacar la actividad de los otros ésteres respecto de Ach (WIEDER, 1971). Se obtienen primero las CDR de los componentes por separado.

Como la CDR de Ach y de Pch son generalmente paralelas (WIEDER et. al., 1971) trataremos primero este caso por ser el más sencillo, y luego el caso de CDR de Ach y Bch que generalmente no resultan paralelas.

En la experiencia de la Fig. 5 a el valor de k (definido como la razón de la dosis de Ach y la del otro agonista que producen igual respuesta en el recto), es igual a 2.

Se ensayaron mezclas que contienen ambos agonistas en distintas proporciones; así por ej. $p = 1/5$ indica que la concentración en nM de Pch es 1/5 de la de Ach.

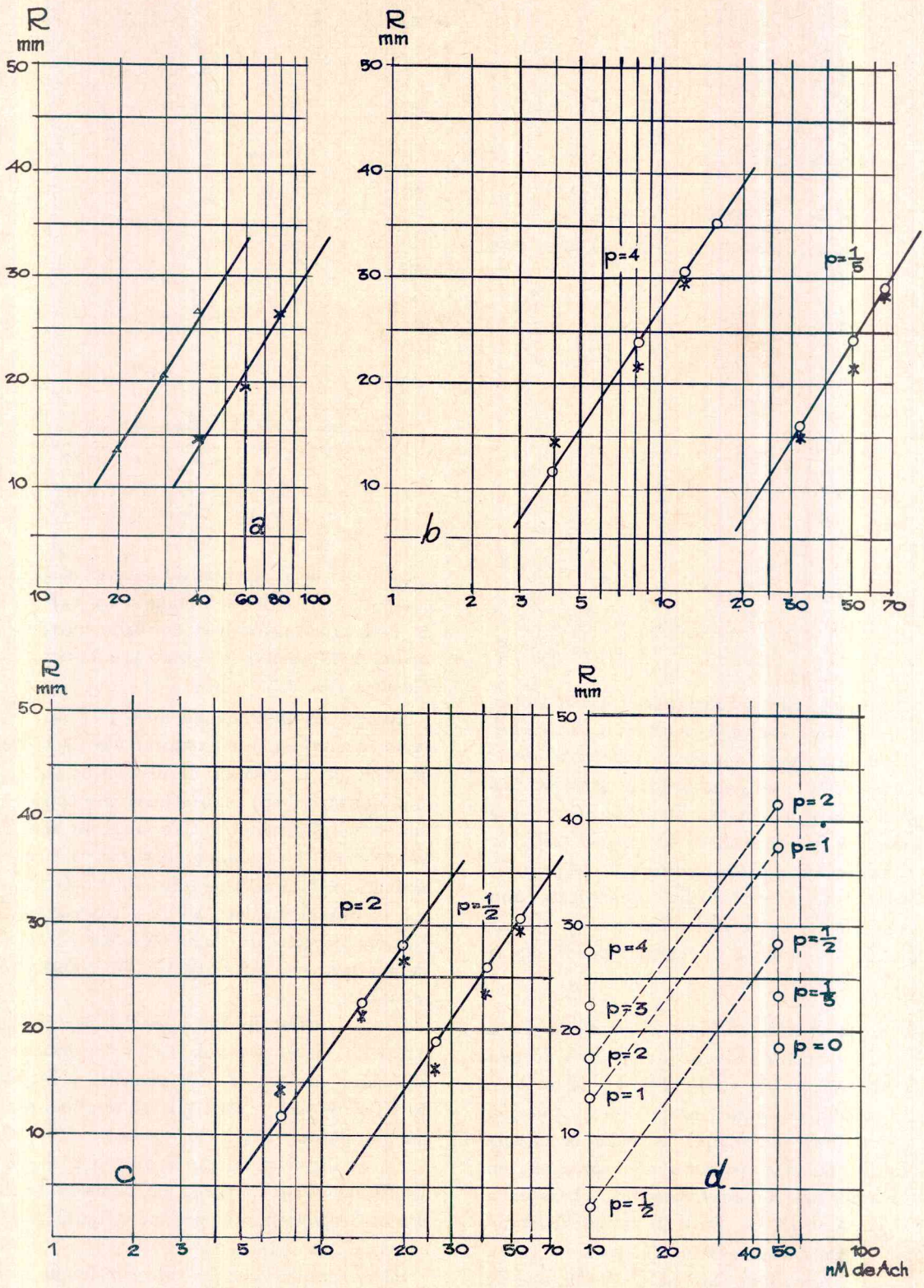

Fig. 5. — Bioensayo en músculo recto. *Curvas patrón paralelas.* × Ach ; △ Pch ; ○, respuestas y curvas calculadas de las mezclas ; ⁎ respuestas experimentales de las mezclas

CUADRO 1. — *Ensayo de una mezcla de Ach y Pch en recto abdominal con* $p = \frac{\text{contenido de Pch}}{\text{contenido de Ach}} = \frac{1}{5}$

Dosis	Contenido de Ach (nM)	Contenido de Pch (nM)	Contenido de Pch expresado en equivalentes de Ach	Total de equivalentes de Ach	Respuesta calculada (mm)	Respuesta experimental (mm)
Número	x	px=y	kpx	k+kpx		
1	35,0	7,0	14,0	49,0	17	15
2	51,0	10,2	20,4	71,4	24	21
3	66,0	13,2	26,4	92,4	28	28

Realizando los cálculos indicados en el cuadro 1 (columnas 3 y 4) se obtiene el total de equivalentes de Ach de cada dosis (col. 5). La CDR de Ach (Fig. 5 a) permite leer las respuestas calculadas de cada dosis (col. 6) que no difieren significativamente de las respuestas experimentales (col. 7).

De la misma manera se calcularon los valores de las mezclas con $p = 4$; 2 y $\frac{1}{2}$ (Fig. 5 b y c) que se representaron al igual que las respuestas experimentales.

Como resulta de los gráficos se pueden calcular las respuestas para 10 y 50 nM de Ach con un agregado de Pch variable entre $^1/_2$ y 4 veces la concentración de Ach.

Se calcularon gráficamente las CDR de diferentes mezclas. La fig. 5 d representa los niveles de respuesta que resultan para dosis de 10 y 50 nM de Ach aplicadas simultáneamente con diferentes dosis de Pch que se infieren de los valores p indicados. Así por ejemplo, una dosis de 10 nM de Ach aplicada simultáneamente con una de 10 nM de Pch ($p = 1$) dará previsiblemente una respuesta de 13 mm. Para un volumen cinco veces mayor de la misma solución (50 nM de Ach y 50 nM de Pch) corresponderá esperar una respuesta de 37 mm.

Por comparación de la recta experimental con las calculadas se puede inferir la concentración de Pch de una mezcla incógnita. Para una respuesta experimental cualquiera, se lee en la curva de Ach (Fig. 5 a) el número de equivalentes de Ach a que corresponde. Sabiendo que esta cifra es igual a $x + ky$, habiendo determinado la concentración x de Ach mediante el ensayo en músculo liso se puede despejar y que es el contenido de Pch de la dosis aplicada.

La Fig. 6 a representa dos curvas patrón de Ach y de Pch que resultaron aproximadamente paralelas. Con el objeto de simplificar los cálculos y de usar el mismo k para todas las respuestas se asume que la curva de Pch se comporta como la recta punteada, siendo $k = 1{,}9$.

Se ensayaron mezclas conteniendo Pch en las proporciones $p = 2$ y $p = 1/5$. Con el mismo procedimiento de cálculo del cuadro 1 se obtienen las respuestas calculadas. Las diferencias entre las respuestas calculadas y las experimentales no son estadísticamente significativas.

Ensayo de mezclas de Ach y Bch en recto abdominal. Aproximadamente en el 80 % de los casos las CDR de Ach y Bch en músculo estriado no resultan paralelas (WIEDER, 1971).

La Fig. 7 a representa uno de estos casos en que k debe ser calculado separadamente para cada respuesta. En la Fig. 7 b se representan tres CDR obtenidas en el mismo músculo con mezclas de Ach y Bch; las concentraciones relativas de ésta respecto de Ach son 0,25; 0,56 y 1,00.

Las respuestas calculadas según el procedimiento indicado se aproximan a las obtenidas experimentalmente, si bien son levemente inferiores a las mismas. El tratamiento matemático que da cuenta de esta situación es objeto de un trabajo posterior y permite acotar la respuesta de la mezcla cuando las curvas patrón se apartan del paralelismo.

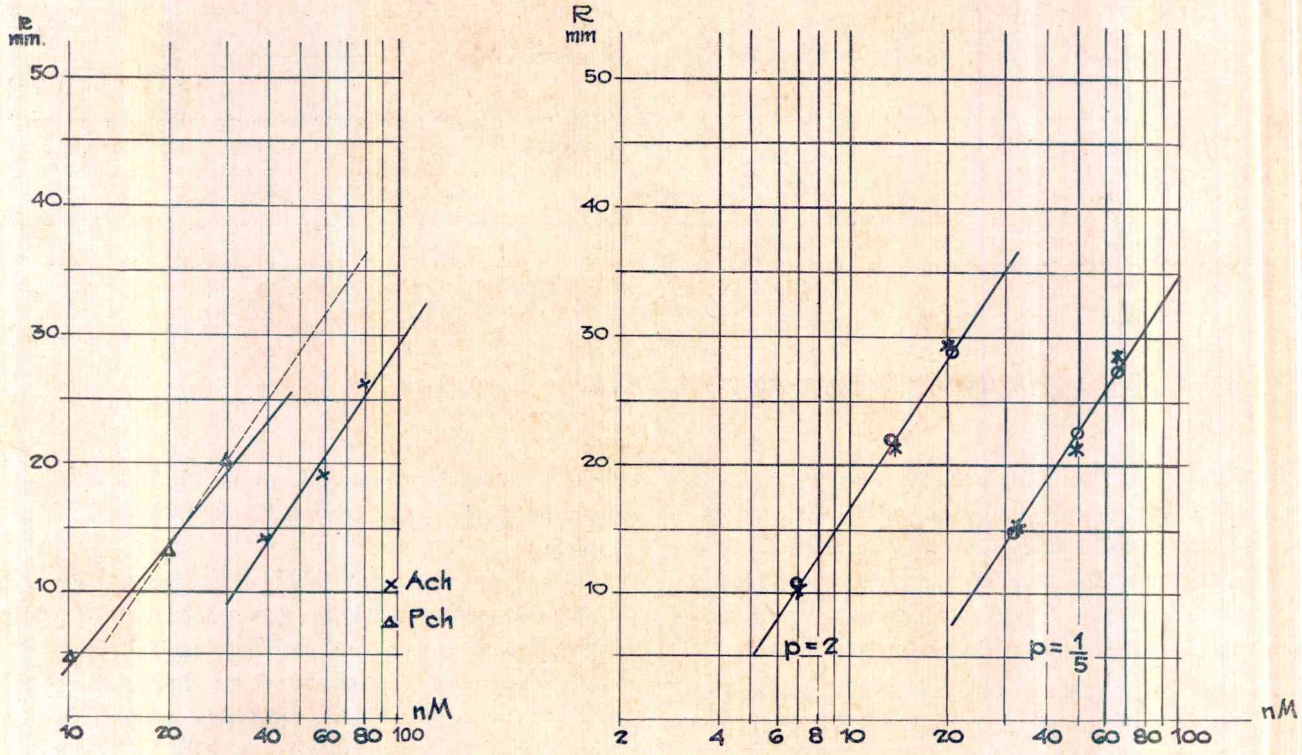

Fig. 6. — Bioensayo en músculo recto. *Curvas patrón aproximadamente paralelas.* × Ach ; △ Pch ; ✳ respuestas y curvas experimentales de las mezclas

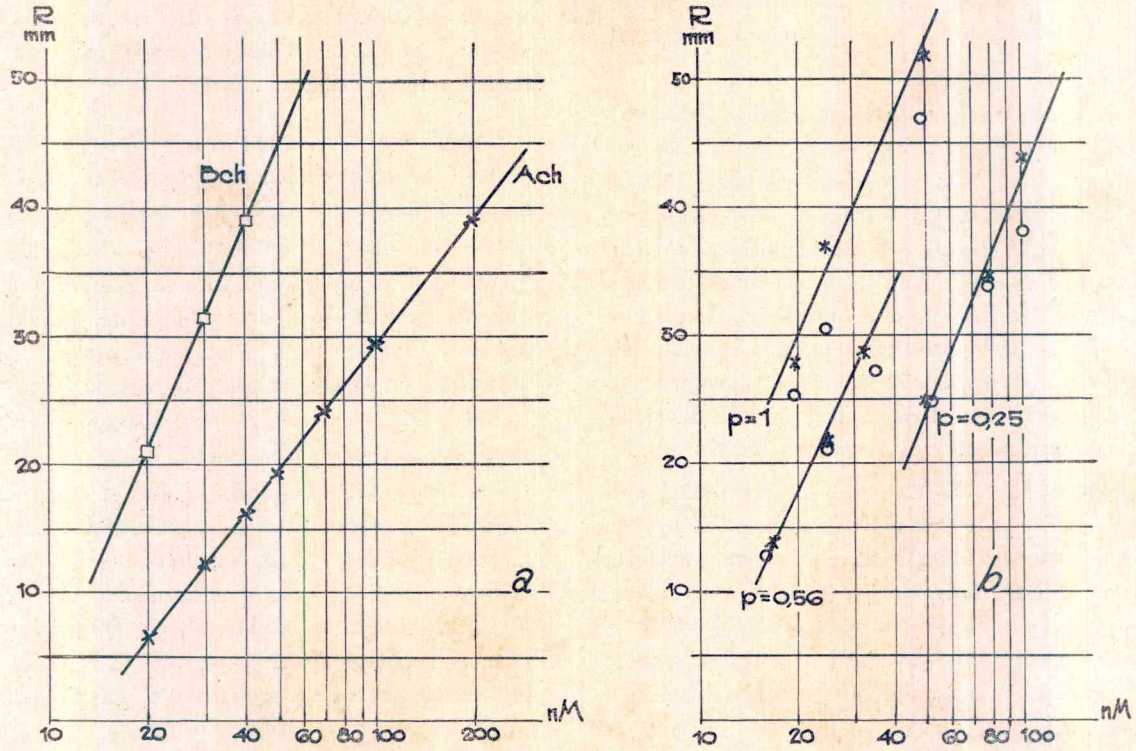

Fig. 7. — Bioensayo en músculo recto. *Curvas patrón no paralelas* × Ach ; □ Bch ; ✳ respuestas y curvas experimentales de las mezclas

DISCUSION

El bioensayo en ileon de cobayo se emplea para determinar la concentración de Ach en una mezcla que la contiene junto con otro éster de la colina. Esto es posible cuando la proporción en que se encuentran ambos agonistas se mantiene dentro de determinados valores límites.

Si de las CDR obtenidas en recto e ileon resulta que éste es 100 veces más sensible para Ach que para Bch y que la "mezcla" a ensayar tiene $p = 0$ o muy próximo a 0, es decir, que prácticamente contiene sólo Ach, entonces será posible obtener la CDR en ileon y recto a condición de usar dos diluciones cuyas concentraciones difieran en 10^2 debido a la diferencia de sensibilidad de ambos bioensayos. Por comparación con las curvas patrón de Ach y Bch obtenidas en recto se inferirá que prácticamente no contiene Bch.

Si en cambio p es mayor que 0 y menor que 10, el ileon permite dosar Ach por cuanto su sensibilidad para ésta Ach es, generalmente; más de 100 veces mayor que para Bch; el ensayo en el recto permitirá establecer la concentración de Bch.

Para valores de p mayores que 10 habrá que tener en cuenta el k' del músculo liso para decidir si la respuesta se debe exclusivamente al contenido de Ach o si se debe al efecto simultáneo de ambos componentes de la mezcla, en cuyo caso el bioensayo en ileon puede no ser apto para dosar Ach. Es el caso de las soluciones que contienen 100 veces más Bch ($p = 100$), que Ach, ésta no podrá ser determinada con un ileon cuyo k' es igual o mayor que 10^{-2} en cambio podrá obtenerse en ileon con $k' < 10^{-3}$.

BANISTER et al. (1953) obtuvieron una fórmula para calcular la concentración de Ach y de Pch en una solución que las contiene; ésta se ensaya en recto abdominal de rana cuya respuesta comparada con respuestas de Ach permite determinar la concentración r de la solución en equivalentes de Ach. Iguala esta concentración r con el binomio que resulta de sumar la concentración X de Ach, a la concentración Y de Pch dividida por P_r, donde P_r es μg de Pch equivalentes a 1 μg de Ach en el recto

$$r = X + Y/P_r$$

De la misma manera se considera el valor de la concentración i que resulta del ensayo en ileon

$$i = X + P_i$$

donde $P_i = \mu g$ de Pch equivalentes a 1 μg de Ach en el ileon.

Las fórmulas son aplicables sólo cuando las CDR de Ach, de Bch y de la mezcla son paralelas y esto constituye una restricción de sus posibilidades de aplicación.

El ensayo de una mezcla de Ach y Bch (HOSEIN, 1965) consistió en mezclar un ml de cada una de manera que contengan igual actividad (equivalente a 1 mg de Ach) según resulta del ensayo en el recto.

Teóricamente se obtiene para la mezcla una actividad total 2 en el recto y 1 en el ileon, dado que el efecto de la Bch en esta proporción es despreciable; no obstante, se obtuvo experimentalmente el valor 1.7 en el ileon, infiriéndose de aquí un efecto potenciador de la Ach sobre la Bch.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, cabe afirmar que la evaluación de la equiactividad de ambas sustancias en el recto requiere ser determinada sobre la base de las CDR de las dos sustancias; si se basa sólo en la comparación de las dosis de un par de respuestas iguales, es posible obtener discrepancias considerables dado que cabe la posibilidad de que se hubiesen considerado dos respuestas de igual magnitud que pertenezcan a CDR de distintas pendientes, cuyo k puede diferir en un factor 2 o aún mayor para los diversos niveles de respuesta.

CONCLUSIONES

La sensibilidad del ileon en las condiciones descriptas puede dar respuestas con dosis del orden de 10^{-12} mol/ml.

Las actividades relativas de los ésteres Pch y Bch respecto de Ach son muy similares entre sí, en el ileon, resultando generalmente de 100 a 1.000 veces menos activos que Ach. Varían para cada músculo (fig. 3) y generalmente no son expresables con un solo valor debido a la considerable diferencia de pendientes de la CDR.

El bioensayo en ileon de cobayo permite dosar Ach en una solución que la contiene junto con otro éster de la colina con tal de que la concentración de éste sea tal que no interfiera con la acción de la Ach. Si su concentración es superior a 50 veces la de Ach y k' del orden de 10^{-2}, este bioensayo puede no ser apto para determinar Ach.

Cuando ambos agonistas se encuentran en cantidades comparables el ensayo en recto permitirá dosar Bch de la mezcla si previamente se ha determinado en ileon la concentración de Ach.

Si la CDR de Ach y la otra sustancia no resultan paralelas carece de sentido la determinación de los equivalentes de Ach ("acetilcholine like activity") de dicha sustancia como así también la de la mezcla de ambas, por cuanto el número de equivalentes varía con el nivel de respuesta. En cambio tiene sentido experimental hablar de los equivalentes de Ach de una dosis de la otra sustancia o de la mezcla.

Para el caso de CDR de los componentes que en el recto se apartan considerablemente del paralelismo, es necesario expresar dichas CDR mediante fórmulas matemáticas. De éstas se pueden deducir dos funciones que permiten acotar la CDR de la mezcla para proporciones fijas de los componentes. Además se podrá estudiar el efecto sinérgico de ambos agonistas que actúan sobre receptores colinérgicos. Esto será objeto de un trabajo posterior.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Juan Izquierdo, Cátedra de Farmacología Experimental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, el haber facilitado la técnica para bioensayo en músculo liso.

BIBLIOGRAFIA

BANISTER, J., WHITTAKER, V. P. and WIJESUNDERA, S. 1953. *The occurrence of homologues of acetylcholine in of spleen.* J. Physiol. 121 : 55 71.

CORNFIELD, J. 1964. *Comparative bioassays and the role of parallelism.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 144 : 143-149.

CORTINA, E. 1969. *Trabajo de Seminario presentado en el Departamento de Fisica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.* Biblioteca de la Fac. de Ciencias Exactas y Naturales. Univ. B. Aires.

CHANG, C. H., and GADDUM, J. H. 1933. *Choline esters in tissue extracts.* J. Physiol. Lond. 79 : 255-285.

HEBB, C. and MORRIS, D. 1967. *Parallel bioassay as a method of identifying acetylcholine.* Nature 214 : 284-285.

HOSEIN, E. A. and TEOW YAN KOH. 1965. *Failure of the method of parallel bioassay to identify acetylcholine in mixtures of substances with acetylcholine-like activity.* Can. J. Physiol. Pharmac. 43 : 657-662.

— 1965. *Inability of Parallel Bioassay to recognize Acetylcholine in Mixtures of Substances with Acetylcholine-like activity.* Nature 205 : 1119-20.

WIEDER, C. M., GARCÍA POMÉS, S. y WORONA, R. 1971. *Actividades relativas de varios ésteres de la colina ensayados en músculo estriado* Revta. Fac. Agron. y Vet. Univ. B. Aires 19 (1-2) : 33-40.