

## ACCION DE CLORPROMAZINA SOBRE EPITELIO DE PIEL DE SAPO\*

### Chlorpromazine action on toad skin epithelium

JERTRUDIS ALBORNOZ F., JUAN CONCHA B. Y GRACIELA CONTRERAS M.\*\*

#### ABSTRACT

Chlorpromazine (CPZ)  $10^{-5}M$  in the Ringer solution of the serosal or the mucosal sides of the isolated toad skin produced an increase of the transepithelial electric potential difference (PD) and of the short circuit current (SCC). The effect it greater when the drug is applied in the serosal side. CPZ inhibits the stimulating effect of noradrenalin ( $10^{-6}M$ ) and of angiotensin II ( $10^{-6}M$ ) on the PD and SCC. Possibly, this effect is due to inhibition of calmodulin by CPZ. The stimulating effect of CPZ on PD and SCC is not related to a possible noradrenalin releasing effect from the sympathetic nerve endings, since Propranolol ( $10^{-6}M$ ) and dibenamine ( $10^{-6}M$ ) do not inhibit the stimulating effect of CPZ. The effect of CPZ serosal is decread by  $BaCl_2$  (2 mM) serosal. Amiloride ( $10^{-6}M$ ) mucosal inhibits the action of CPZ applied in the mucosal solution. The action of CPZ in the mucosal side, possibly id due to an increase of the sodium ion permeability and the effect of CPZ in the serosal side could be due to an increase of the potassium ion permeability.

KEYWORDS: Nervous physiology. Chlorpromazine action. Epithelium.

#### RESUMEN

Clorpromazina (CPZ)  $10^{-5}M$  al ser agregada en la solución Ringer que baña la piel aislada del sapo *Pleurodema thaul* produce aumento de la diferencia de potencial eléctrico transepitelial (DP) y de la corriente de corto circuito (CCC). El efecto es mayor cuando CPZ es aplicada en la solución Ringer que baña el lado serosal de la piel. CPZ hace disminuir el efecto estimulante de noradrenalina ( $10^{-6}M$ ) y de angiotensina II ( $10^{-6}M$ ) sobre DP y CCC. Dicho efecto se debe posiblemente a inhibición de calmodulina, sustancia que participa en una etapa del mecanismo de acción de ambos compuestos. El efecto estimulante de CPZ no se debería a la acción de noradrenalina liberada de las terminaciones nerviosas simpáticas provocada por CPZ, puesto que propranolol ( $10^{-6}M$ ) y dibenammina ( $10^{-6}M$ ) en el lado serosal no inhiben el efecto de CPZ ( $10^{-5}M$ ). El efecto de CPZ serosal es disminuido cuando se aplica  $BaCl_2$  (2 mM) serosal. Amilorida ( $10^{-6}M$ ) mucosal inhibe el efecto de CPZ mucosal. CPZ actuaría aumentando la permeabilidad al ion sodio mucosal e incrementando la permeabilidad al ion potasio serosal.

#### INTRODUCCION

Las psicosis son las enfermedades más severas donde no sólo existe un marcado deterioro de la conducta, sino también una seria incapacidad para pensar en forma coherente, para apreciar la

\* Proyecto 20.33.30 de la Dirección de Investigación, U. de Concepción.

\*\* Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

realidad y para tomar conciencia de la propia anomalía. (Byck, R. 1975).

Varias estructuras químicas han sido asociadas con propiedades antipsicóticas, las que son bastante selectivas en cuanto a su capacidad de modificar los síntomas de estas enfermedades. Un grupo de estas drogas está constituido por las fenotiacinas que, con su prototipo la clorpromazina (CPZ), figuran como las más usadas en la práctica médica.

En 1953, Courvoisier y col. describieron un sinnúmero de acciones producidas por CPZ como propiedades gangliolíticas, adrenolíticas, antifibrilatorias, antiedematosas y antipiréticas. Se comprobó además que CPZ aumenta la actividad de muchas drogas analgésicas depresivas centrales.

Muchos beneficios ha traído el conocimiento adquirido hasta hoy en relación a la acción de drogas y hormonas, sustancias que se utilizan para mejorar o sustituir funciones que se encuentran ausentes o no se manifiestan con toda su eficiencia en el organismo. Dicho conocimiento se ha obtenido mediante la experimentación en estructuras vivas como los glóbulos rojos y los epitelios de piel y vejiga urinaria de sapos y ranas. Dicha experimentación ha jugado un rol fundamental en el estudio de los posibles mecanismos de acción. (González y col. 1967; Concha y col. 1970; Acevedo y col. 1981; Concha y col. 1988).

Los trabajos experimentales realizados con CPZ en estructuras biológicas como las señaladas son muy reducidos. Algunos como el realizado en 1970 por Mamelack y col. demuestran que CPZ aumenta la permeabilidad de la membrana epitelial de la piel del *Bufo marinus*. En 1977, Smith encuentra que CPZ en concentración de 50  $\mu$ M provoca un aumento de 10 mV en la diferencia de potencial eléctrico transepitelial en piel aislada de rana, efecto obtenido sólo cuando la droga se hace actuar por el lado externo de la piel.

La acción o efecto de sustancias como hormonas y drogas sobre epitelios se ha estudiado en base a la variación que experimentan algunos parámetros bioeléctricos como diferencia de potencial transepitelial (DP), corriente de corto circuito (CCC), conductancia activa ( $G_A$ ), conductancia pasiva ( $G_p$ ), potencial de la bomba de  $\text{Na}^+$

$\text{K}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ ) y el flujo bidireccional de radio isótopos.

En el presente trabajo se plantea como objetivo el análisis de la acción de CPZ sobre la actividad bioeléctrica de un epitelio transportador de iones sodio y cloro como es el de la piel del sapo *Pleurodema thaul*, incluyendo el efecto que provoca dicha droga sobre la actividad de otras sustancias sobre la piel de sapo. A la luz de los resultados que se obtengan se podría adquirir un mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción de CPZ.

## MATERIAL Y METODO

El trabajo se realizó con 25 sapos de la especie *Pleurodema thaul* (sapito de cuatro ojos).

Las experiencias fueron realizadas en piel abdominal del sapo, extraída previa descerebración y demedulación del anfibio. La piel se montó en una cámara de lucita (Ussing, 1951) con 3 ml de solución Ringer en cada uno de los compartimentos que bañan el lado interno y externo de la piel. La composición del Ringer fue (mM): NaCl 112; KCl 1.9;  $\text{CaCl}_2$  2; NaHCl<sub>3</sub> 2.3 and glucose 11. La solución Ringer fue constantemente oxigenada con un aereador NS-SUN mediante cánulas comunicadas con ambos lados de la piel y su pH se ajustó a 7.5 con buffer fosfato.

La diferencia de potencial transepitelial (DP) se registró con electrodos de calomelano en contacto con ambos lados de la piel y conectados a un canal de un registrador Cole-Parmer de dos canales, a través de puentes Agar-Ringer. La corriente de corto circuito (CCC) se registró con electrodos de Ag-AgCl sumergidos en el Ringer de ambos lados de la piel y conectados, a través de un fijador de voltaje "Metraux Electronique", al segundo canal del registrador. La CCC se registró en forma continua y cada 2 minutos el fijador registró automáticamente la DP durante 4 segundos en el primer canal del registrador.

Una vez montada la piel con todos los electrodos en posición y abundante burbujeo del Ringer de ambos lados, se esperó a que se estabilizara la DP y CCC, hecho que ocurrió después de 60 minutos. Al cabo de dicho tiempo se aplicó CPZ en concentración final de  $10^{-5}$ M en el lado interno

o serosal. Después de registrar la acción de CPZ, se lavó la piel cambiando la solución Ringer de ambos lados. Enseguida se efectuó la misma operación aplicando la droga en el lado mucosal de la piel.

En otro tipo de experiencia y una vez estabilizados los valores de DP y CCC, se agregó en el lado serosal noradrenalina en concentración final de  $10^{-6}M$ . Después de registrar el efecto máximo, se lavó el compartimento serosal con solución Ringer y se esperó que se estabilizaran la DP y CCC en su nivel basal. Enseguida se aplicó CPZ en concentración final  $10^{-5}M$ , como en las experiencias anteriores. Después de esperar 20 minutos, nuevamente se hizo actuar noradrenalina  $10^{-6}M$  en el lado serosal.

El mismo procedimiento se usó aplicando angiotensina II  $10^{-6}M$  en lugar de noradrenalina.

En un tercer grupo de experiencias se estudió el efecto que tienen sustancias bloqueadoras sobre la acción de CPZ, tales como propranolol  $10^{-6}M$ , dibenamina  $10^{-6}M$ ,  $BaCl_2$  2 mM, aplicados en el lado serosal y amilorida  $10^{-4}M$  en el lado mucosal. Todas las drogas fueron de Sigma Chemical Co.

La capacidad eléctrica transepitelial antes y después de CPZ se midió utilizando un Digitor Multiméter model HC-5010C.

Los cálculos estadísticos fueron realizados mediante el "student's t test" para datos pareados (Gray, 1961).

## RESULTADOS

1. Efecto de CPZ  $10^{-5}M$  sobre DP y CCC al actuar por el lado serosal o mucosal de la piel. La DP aumenta en  $27.1 \pm 2.7\%$  cuando CPZ actúa en el lado serosal; en cambio en el lado mucosal el aumento de DP es de  $17.9 \pm 1.7\%$ . La CCC aumenta en  $10.3 \pm 1\%$  cuando CPZ se introduce en el lado serosal y solamente  $3.1 \pm 0.3\%$  cuando CPZ actúa por el lado mucosal (ver Figura 1, Figura 2 y Tabla I).

TABLA I. Acción de CPZ sobre DP y CCC en piel abdominal aislada de *Pleurodema thaul*.

	DP mV	CCC $\mu A/cm^2$	$G_r$ mS/cm <sup>2</sup>
Control	35.5 $\pm$ 4	45.4 $\pm$ 5	1.28
CPZ mucosal	37.2 $\pm$ 5	48.8 $\pm$ 3	1.31
CPZ serosal	40.6 $\pm$ 4	56.1 $\pm$ 4	1.38

2. Efectos CPZ sobre la acción de noradrenalina y angiotensina II.

a) Efecto de CPZ  $10^{-5}M$  sobre la acción de noradrenalina (N.A) en piel de *Pleurodema thaul*.

La Tabla II, Figura 3 y Figura 4 muestran la acción inhibitoria de CPZ sobre la acción de N.A.  $10^{-6}M$ .

TABLA II. Efecto de CPZ sobre la acción de noradrenalina en piel abdominal de *Pleurodema thaul*.

	DP mV	CCC $\mu A/cm^2$	$G_r$ mS/cm <sup>2</sup>
Control	36.5 $\pm$ 6	45.4 $\pm$ 5	1.24
N.A.	44.8 $\pm$ 6	58.7 $\pm$ 4	1.31
N.A. después de CPZ	36.3 $\pm$ 8	44.8 $\pm$ 5	1.23

b) Efecto de CPZ  $10^{-5}M$  sobre la acción de angiotensina II  $10^{-6}M$  en piel de sapo.

La Figura 5 muestra claramente el efecto inhibitorio que CPZ tiene sobre la acción de angiotensina II ( $A_{II}$ ).

3. Acción de algunos inhibidores específicos sobre el efecto de CPZ en piel de sapo.

a) Acción de propranolol  $10^{-6}M$  sobre el efecto de CPZ en el lado serosal de la piel. La Figura 6 demuestra que propranolol no modifica la respuesta a CPZ.

b) Acción de dibenamina  $10^{-6}M$ . En la Figura 7 también indica que dibenamina no modifica la respuesta a CPZ.

c) Acción de  $BaCl_2$  2 mM sobre respuesta de CPZ en piel.

Las Figuras 8 y 9 demuestran la acción inhibidora de  $\text{BaCl}_2$  2mM sobre el efecto producido por CPZ  $10^{-5}\text{M}$ .

- d) Acción de amilorida  $10^{-4}\text{M}$  mucosal sobre el efecto de CPZ  $10^{-5}\text{M}$  mucosal.

La Figura 10 muestra el efecto inhibitorio de amilorida mucosal sobre el efecto mucosal de CPZ.

4. Efecto de CPZ sobre la capacidad eléctrica transepitelial.

Antes de CPZ la capacidad fue de  $0.045 \pm 0.009 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  y después de CPZ fue de  $0.050 \pm 0.008 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , variación que no fue significativa.

## DISCUSION

La piel aislada de anfibios ha sido ampliamente utilizada en la investigación biológica, ya que constituye un buen modelo que permite estudiar los mecanismos de acción y efectos de estímulos químicos, neurotransmisores, drogas y hormonas; efectos que se traducen en cambios de la actividad bioeléctrica, representada por los parámetros del circuito eléctrico equivalente como la diferencia de potencial transepitelial (DP), la corriente de corto circuito (CCC), la conductancia eléctrica transepitelial ( $G_T$ ) y la capacidad eléctrica transepitelial ( $C_T$ ).

Mucho se conoce acerca del funcionamiento de la piel de sapo y rana en cuanto se refiere al transporte pasivo y activo de iones. Sus características la enmarcan como un epitelio de alta resistencia, semejante al epitelio de los túbulos renales, distales y colectores, en los cuales los mecanismos de transporte son muy similares a los de la piel. El epitelio de la piel de *Pleurodema thaul* tiene además semejanzas con el epitelio de la rama gruesa ascendente del asa de Henle ya que, además del transporte de sodio, existe un transporte de cloruro desde el lado serosal hacia el mucosal.

Como se mostró en resultados, CPZ produce aumento de DP, CCC y  $G_T$ , efecto que es mayor cuando se aplica en el lado serosal. Mamelack en 1973 y Smith en 1977 observaron una acción

semejante solamente cuando la droga se aplicaba en el lado mucosal de la piel. La explicación de las diferencias puede deberse a la especie diferente de anfibio utilizada.

Fuera de las citas anteriores, no hay otras que presenten estudios sobre la influencia de CPZ sobre parámetros bioeléctricos.

En forma general el incremento de DP, CCC y  $G_T$  generado por un agente estimulante, como es el caso de CPZ, involucra un aumento del transporte de iones positivos desde el lado mucosal hacia el serosal o un aumento de iones negativos desde el lado serosal hacia el mucosal. En el caso de la piel de *Pleurodema* se trataría de un aumento del transporte activo de sodio desde el lado mucosal hacia el serosal, un aumento del flujo de potasio desde la célula transportadora hacia el lado serosal y un posible aumento del transporte de cloruro desde el lado serosal hacia el mucosal. Estos aumentos de los movimientos iónicos podrían ser explicados por aumento de la permeabilidad de las membranas apical y basolateral de las células transportadoras.

El aumento de permeabilidad sería el resultado de la acción directa de CPZ sobre las membranas. Como no hubo una variación significativa de la capacidad eléctrica transepitelial se piensa que la acción de CPZ, de ser efectiva, no fue tan violenta como para alterar gravemente las membranas y producir gran incremento de la permeabilidad.

Otra posibilidad que podría explicar la acción de CPZ sería ser la liberación de noradrenalina desde las terminaciones simpáticas adrenérgicas de la piel.

Noradrenalina produce notable aumento de DP, CCC y  $G_T$ . En este caso se descarta esta acción ya que el efecto de CPZ se produjo igual antes y después de bloqueadores de efectos adrenérgicos como propranolol y dibenamina. Como se demostró en resultados la CPZ misma es un inhibidor de la acción de noradrenalina y sustancias como la angiotensina II que actúan por vía de AMP cíclico con participación de calmodulina, sustancia que sería inhibida por CPZ. (Berman, D. 1985; Berman, D. y col. 1986).

Descartada la posible participación de noradrenalina en el aumento de permeabilidad de las membranas, principalmente de la apical, solo

quedaría considerar la acción directa de CPZ sobre las membranas apical y basolateral. El hecho que un bloqueador de la permeabilidad de la membrana basolateral al ion potasio, como es el  $BaCl_2$ , inhibe el efecto de CPZ y que la acción bloqueadora de la permeabilidad de la membrana apical al ion sodio producida por amilorida también inhibe la respuesta a la CPZ, estaría indicando que la última hipótesis sobre la acción de CPZ  $10^{-5}M$ , en piel del sapo *Pleurodema thaul*, podría ser lo más ajustado a la realidad.

Los resultados obtenidos son importantes en el sentido que ayudan a interpretar la acción de CPZ sobre otras células transportadoras como las de los túbulos renales, las células secretoras y células nerviosas. En la acción sobre estas últimas se basan los efectos antipsicóticos producidos por CPZ y otras drogas de la familia de las fenotiazinas.

En resumen, el aumento de la permeabilidad de las membranas y el efecto anticalmodulina demostrados en este trabajo puede ayudar bastante en el estudio del mecanismo de acción de CPZ sobre células animales en general.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Srta. Nardita Albornoz por el esmerado apoyo en el tipeo del trabajo y al señor Roberto Sepúlveda por la confección de gráficos y esquemas.

## BIBLIOGRAFIA

Acevedo, C.G.; Contreras, G.; González, C. and Concha, J. 1981. Colchicine action on bioelectric parameters of toad skin. *Cellular and Molecular Biology*. 27:413-

- 417.
- Bick, B. 1975. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In the *Pharmacological Basis of Therapeutics* by Goodman L.S. and Gilman A. Editors. Fifth Edition 1975. Macmillan Publishing Co. Inc. New York, pp 152-171.
- Berman, D. 1985. Inhibition of stimulated osmotic water flow by fluphenazine, a calmodulin inhibitor in the isolated toad skin. *Comp. Biochem. Physiol.* 18: 203-208.
- Berman, D.; Soria, M.; Coviello, A. 1986. Phenothiazines increase active sodium transport across the isolated toad skin. *Pflügers Arch.* 407:327-332.
- Concha, J.; Norris, B.; Sánchez, J.; González, C. 1970. Electrical Resistance and capacitance in toad skin during changes in potential difference induced by the administration of noradrenalin. *Bol. Soc. Biol. Concepción.* 42:345-348.
- Concha, J.; Norris, B.; González, C.; Contreras, G. 1988. Possible mechanisms of action of angiotensin II on high resistance epithelia. *Bol. Soc. Biol. Concepción.* 59:23-36.
- Courvoisier, S.; Fournel, J.; Ducrot, R.; Kolsky, M. and Koetschet, 1953. Propriétés pharmacodynamiques du chlorhydrate de chloro-3 (dimethylamino-3'propyl)-10 phenothiazine (4560RP). *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* 92:305-361.
- Gray D.E. 1961. In statistics for medical students pp. 22-23. Hong Kong University Press.
- González, C.; Sánchez, J.; Concha, J. 1967. Further evidence for the release of noradrenaline under nerve stimulation and its effects on the potential difference in a toad nerve-skin preparation. *Biochim. Biophys. Acta* 135:167-170.
- Mamelack, M.; Weissbluth, M.; Maffly, R. 1970. Effect of chlorpromazine on permeability of the toad bladder. *Biochemical Pharmacology.* 19:2303-2315.
- Smith, P. 1977. The effect of chlorpromazine on cell membrane resistance and capacitance. *European J. Pharmacol.* 45:251-256.
- Ussing, H.H. and Zerahn, K. 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short circuited, isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23:110-127.

Acción de clorpromazina mucosal (\*) y serosal (o)

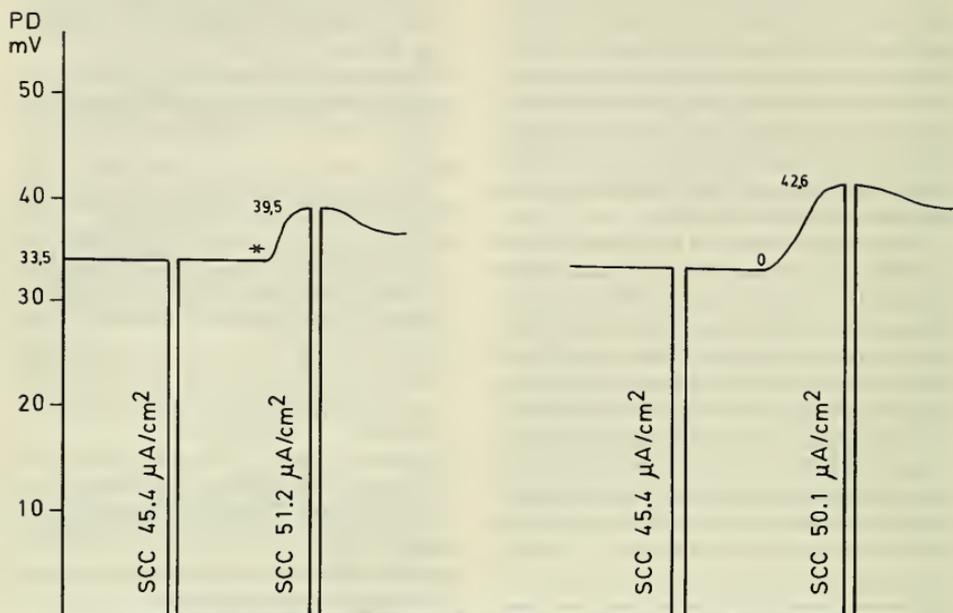


FIGURA 1. Acción de Clorpromazina (CPZ)  $10^{-5}M$  al actuar por el lado mucosal y serosal de la piel del sapo *Pleurodema thaul*.

EFEECTO DE CLORPROMAZINA (C.P.) SEROSAL

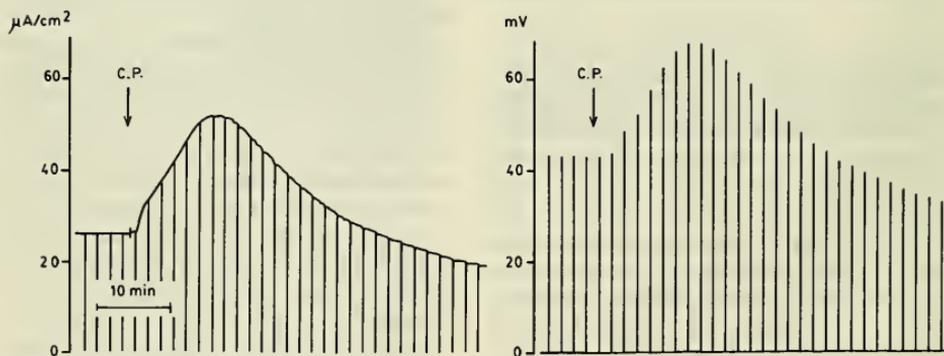


FIGURA 2. Acción de Clorpromazina (CPZ)  $10^{-5}M$  en el lado serosal de la piel del sapo *Pleurodema thaul*. Marcado efecto sobre la CCC y la DP.

### EFFECTO DE NORADRENALINA (N.A.) ANTES Y DESPUES DE CLORPROMAZINA (C.P.)

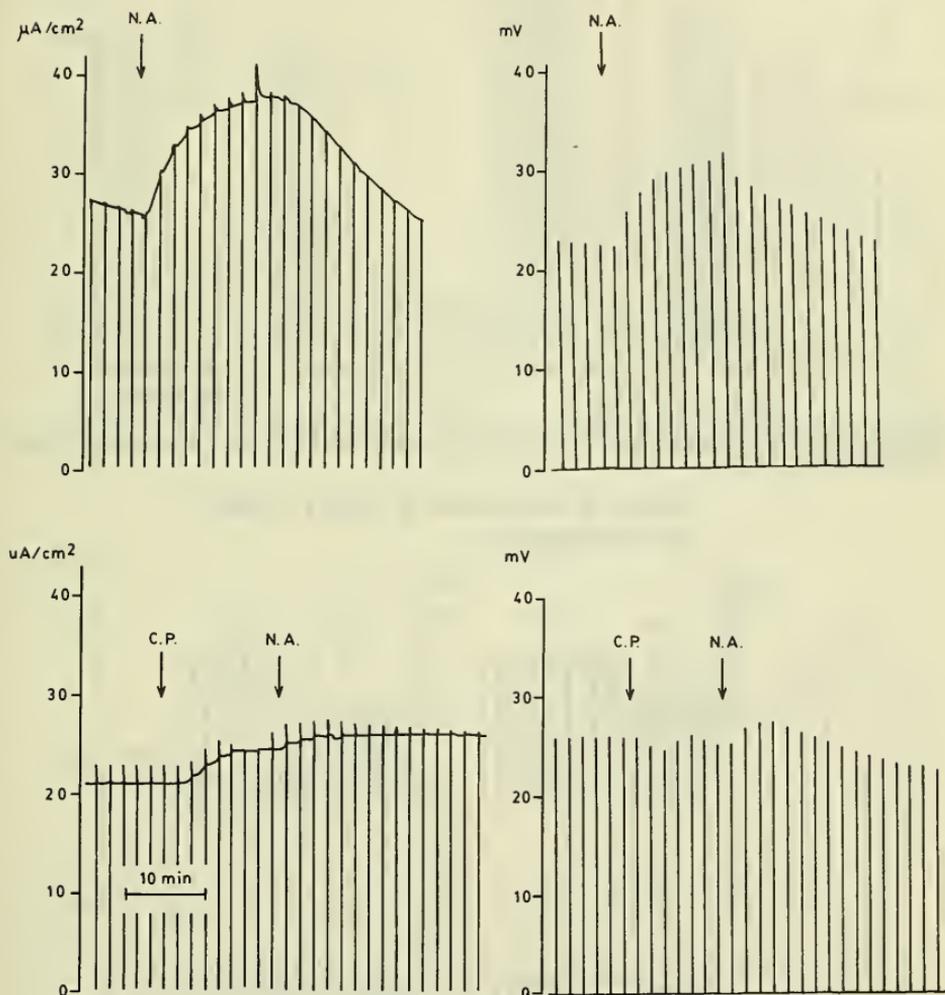


FIGURA 3. Acción de noradrenalina (N.A.)  $10^{-6}\text{M}$  antes y después de Clorpromazina (CPZ)  $10^{-5}\text{M}$ . Se aprecia el notable efecto inhibitorio de CPZ sobre la acción de N.A.

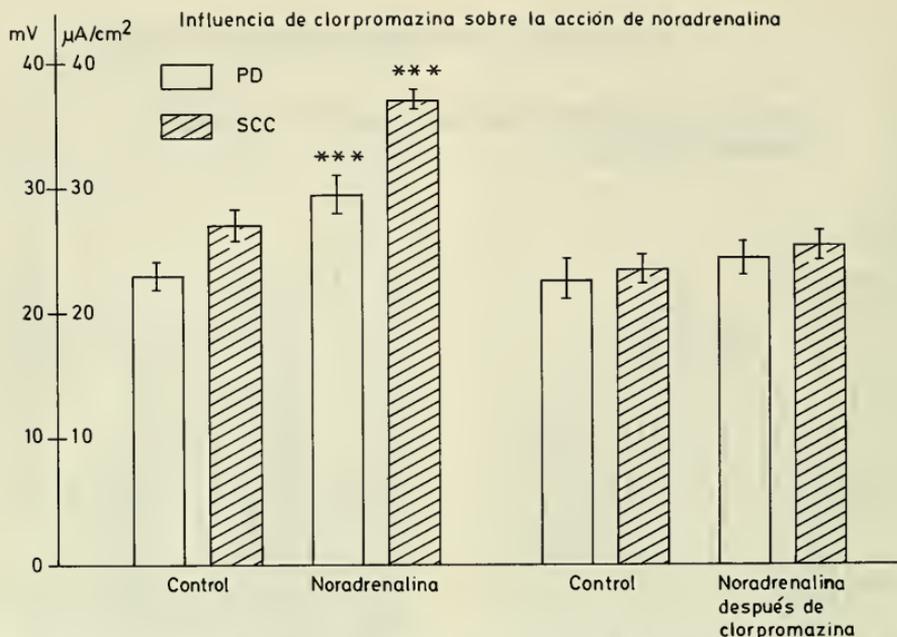


FIGURA 4. Efecto inhibitorio que ejerce CPZ  $10^{-5}M$  sobre la acción de N.A.  $10^{-6}M$  serosal en piel aislada del sapo *Pleurodema thaul* \*\*\*  $P < 0.01$ .

**EFFECTO DE ANGIOTENSINA II ANTES Y DESPUES DE CLORPROMAZINA**

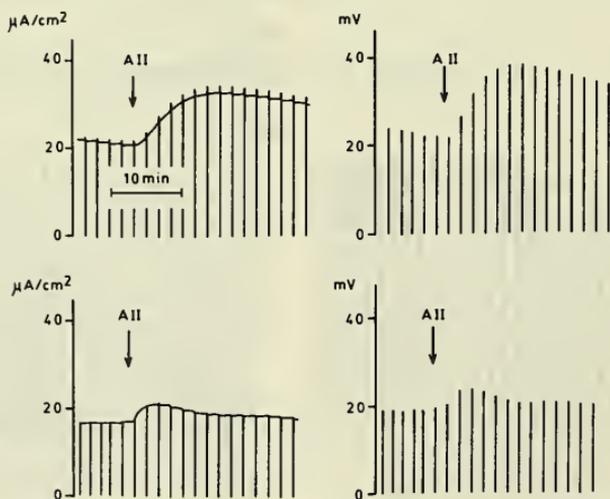


FIGURA 5. Efecto inhibitorio que ejerce CPZ  $10^{-5}M$  serosal sobre la acción de Angiotensina II ( $A_{II}$ ) serosal en piel aislada del sapo *Pleurodema thaul*.

## EFFECTO DE CLORPROMAZINA (C.P.) ANTES Y DESPUES DE PROPRANOLOL

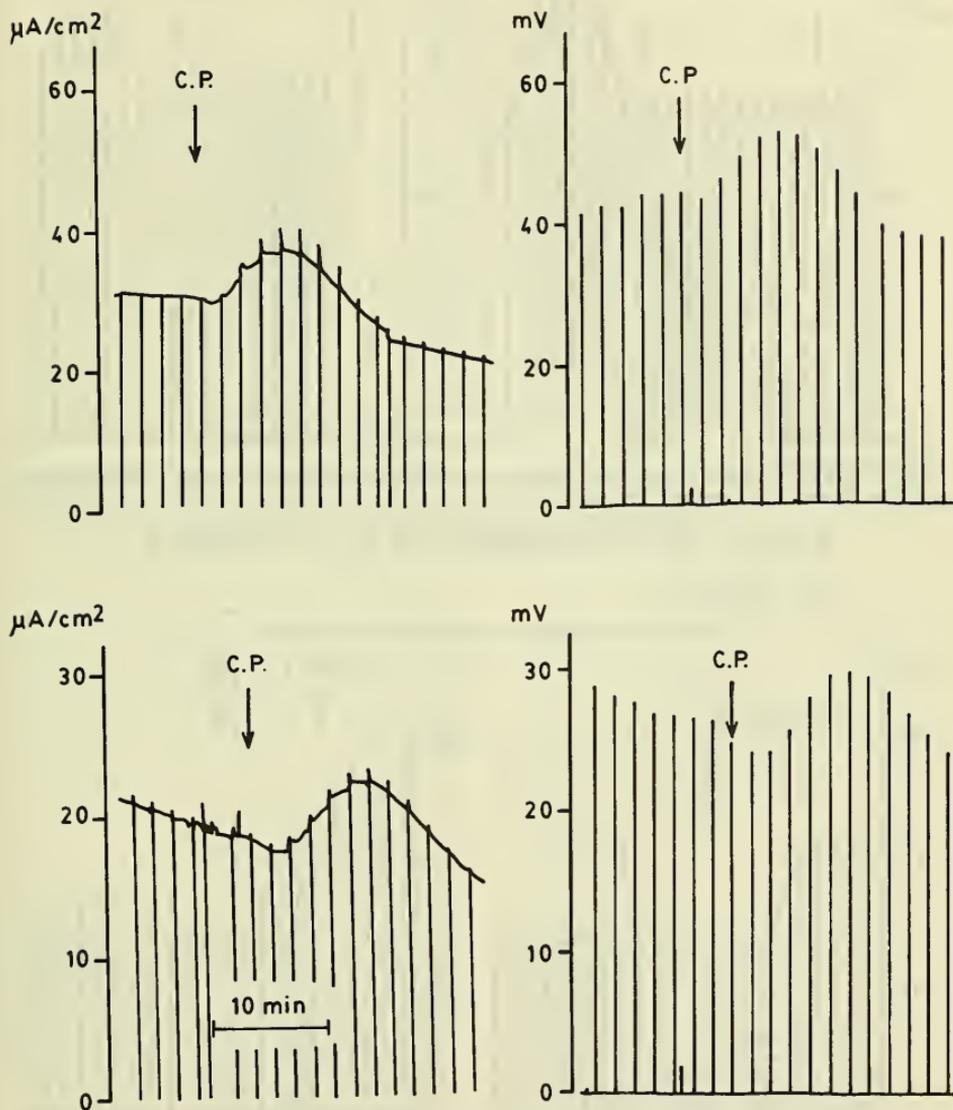


FIGURA 6. Acción de Clorpromazina (CPZ)  $10^{-5}\text{M}$  serosal y después de agregar propranolol  $10^{-6}\text{M}$  en el lado serosal en piel aislada de *Pleurodema thaul*.

### EFFECTO DE CLORPROMAZINA (C.P.) DESPUES DE DIBENAMINA (D)

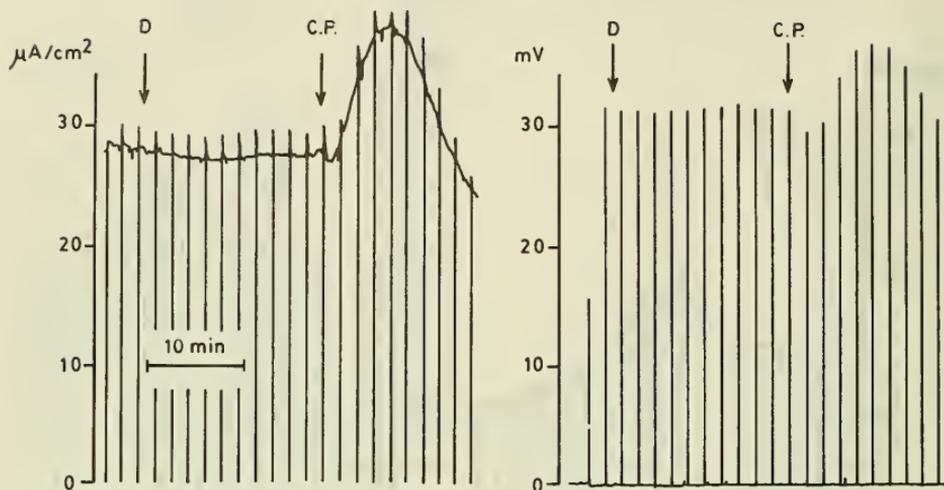


FIGURA 7. Acción de Clorpromazina (CPZ)  $10^{-5}\text{M}$  serosal antes y después de agregar dibenamina  $10^{-6}\text{M}$  serosal en piel aislada del sapo *Pleurodema thaul*.

### EFFECTO DE CLORPROMAZINA (C.P.) DESPUES DE $\text{BaCl}_2$

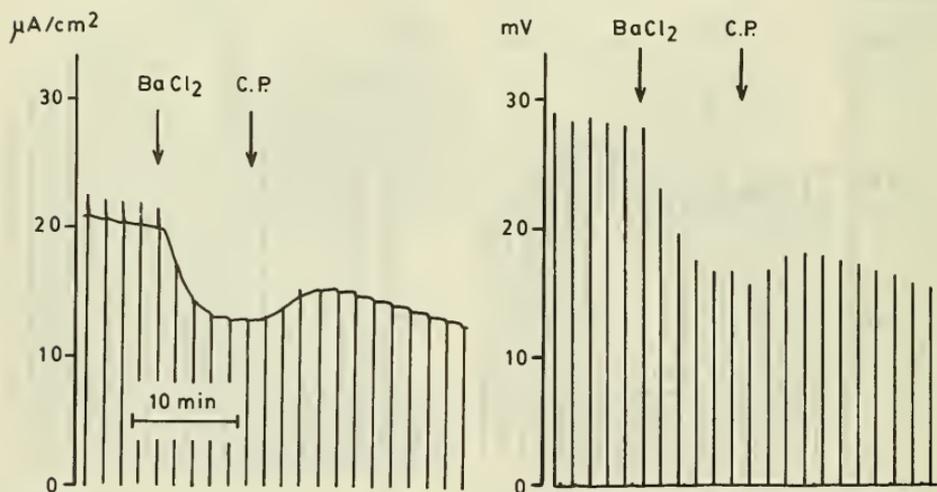


FIGURA 8. Acción de Clorpromazina (C.P.)  $10^{-5}\text{M}$  serosal después de agregar  $\text{BaCl}_2$  2 mM en el lado serosal en piel aislada del sapo *Pleurodema thaul*.

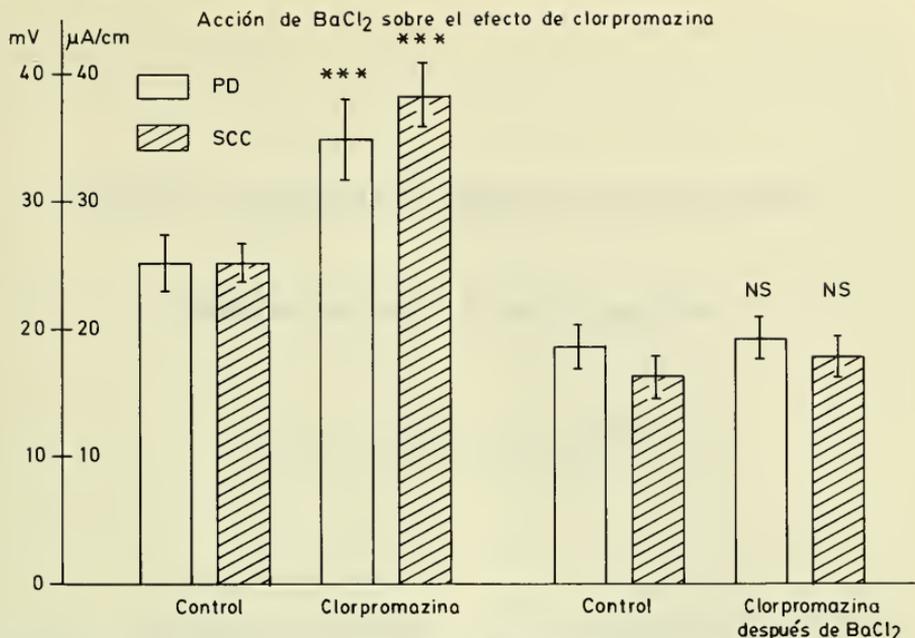


FIGURA 9. Acción del BaCl<sub>2</sub> 2 mM serosal sobre el efecto de Clorpromazina 10<sup>-5</sup>M serosal en piel aislada del sapo *Pleurodema thaul*. Se observa la notable inhibición de la SCC y de la PD. \*\*\* P<0.01.

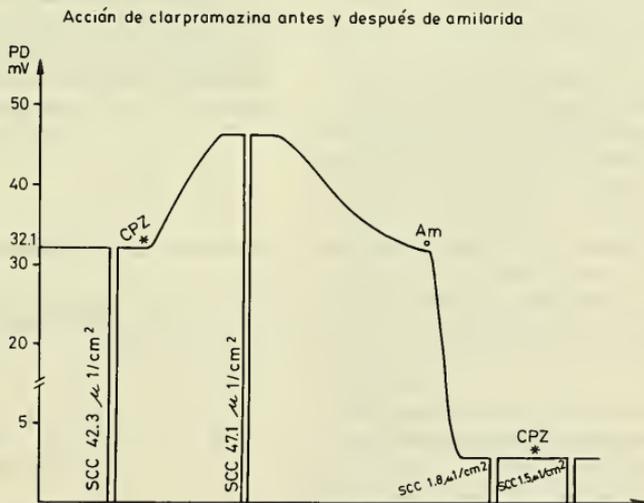


FIGURA 10. Acción de amilorida 10<sup>-4</sup>M mucosal sobre el efecto de Clorpromazina 10<sup>-5</sup>M mucosal en piel aislada del sapo *Pleurodema thaul*. Se observa que amilorida elimina totalmente el efecto de CPZ.