

EFFECTO DE PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL SOBRE PREPARACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS. PARTE I

Effect of natural compounds on electrophysiological preparations. Part. I

J.M. ALARCON, H. CARDENAS, P. AQUEVEQUE,* , L. QUEVEDO,** Y M. HOENEISEN, ***

RESUMEN

Hemos estudiado los efectos de productos naturales puros químicamente identificados aislados de plantas sobre dos preparaciones electrofisiológicas (piel del sapo *Pleurodema thaul* y piel inervada de la rana *Caudibervera caudibervera*) determinándose los parámetros bioeléctricos corriente de cortocircuito (CCC), diferencia de potencial (DP) y la respuesta secretoria (RS) evocada por la estimulación del nervio. Los resultados indican que algunas de estas sustancias producen una variación significativa en la DP, CCC y RS. El objetivo de este estudio es mostrar los efectos de estos compuestos en nuestros modelos biológicos, transporte iónico y transmisión sináptica.

INTRODUCCION

Durante los últimos años se ha desarrollado un creciente interés en la obtención de productos de origen natural, con el fin de identificarlos químicamente y determinar su actividad biológica, para

ABSTRACT

We have studied the effects of pure, chemically identified natural compounds isolated from plants, on two electrophysiological models (toad skin of *Pleurodema thaul* and innervated frog skin of *Caudibervera caudibervera*) in which the variations in short circuit current (CCC), potential difference (DP) and the secretory response (RS) evoked by nerve stimulation were determined. The results indicate that some of the compounds under study produce significant variations in the DP, CCC and RS.

KEYWORDS: Ion Transporting Epithelium. Natural Compounds. Toad Skin. Sodium Transport.

luego ser utilizados como herramientas en el arsenal farmacéutico.

La piel de sapo representa, en la investigación biológica, un modelo que ha servido para estudiar la acción de una multiplicidad de agentes químicos, tales como mediadores (Rudolph *et al.*, 1979), hor-

* Financiado por proyecto D.I. 923365-1. Universidad de Concepción.

** Laboratorio de Electrofisiología. Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

* Laboratorio de Fitoquímica. Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción.

monas (Neumann *et al.*, 1985), drogas y fármacos (Quevedo *et al.*, 1984; Sobrevía *et al.*, 1989; Alarcón *et al.*, 1991). El transporte a través de epitelio de sapo se basa en un transporte activo de sodio y potasio de las células epiteliales, manteniéndose el medio intracelular pobre en sodio y con alta concentración de potasio, a pesar de la entrada de sodio por el lado mucosal. Esto permite un óptimo desarrollo de la actividad celular, además de la mantención de gradientes iónicas que son aprovechadas para el cotransporte de otros iones y sustancias no iónicas. El resultado de estas gradientes es una diferencia de potencial (DP) a través del epitelio, evidenciándose un transporte de sodio desde el lado mucosal hacia el serosal, de la piel. La corriente de cortocircuito (CCC) se determina mediante la aplicación de una corriente en sentido opuesto a la corriente generada por el flujo de ión sodio (Ussing and Zerha, 1951).

Por otra parte, se han identificado, en piel de rana, terminales nerviosos simpáticos que secretan noradrenalina (González *et al.*, 1967; Kirpekar *et al.*, 1977), neurotransmisor que es responsable de los aumentos transientes de la corriente de corto circuito (CCC). A este cambio transiente le acompa-

ña una respuesta secretora (RS). Esta respuesta se evoca experimentalmente por la estimulación eléctrica del nervio tibial que inerva la región cutánea de las extremidades inferiores (González *et al.*, 1967; Lindley, 1969; Norris *et al.*, 1988), y representa la actividad glandular secretora de cloruro.

En base a estas características, tanto la piel de sapo como la de rana son modelos para estudiar los efectos de productos naturales, sobre el transporte de iones y sobre la regulación de éste por sistema nervioso, respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

I. Compuestos Derivados de Plantas Utilizados en el estudio

De los compuestos extraídos, de plantas chilenas, en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad de Concepción, algunos han sido estudiados en nuestro laboratorio; éstos se presentan en la siguiente Tabla I.

TABLA I. Plantas de origen y compuestos usados:

ESPECIE	ABREVIACION	COMPUESTO EXTRAIDO
<i>Pleocarphus revolutus</i>	7 MTF	7 metoxi-4-, 5,6 trihidroxiflavanona
<i>Gutierrezia resinosa</i>	5,4, 5 TT	5,4:5 trihidroxi-3,6,7,8 tetrametoxiflavanona
<i>Amni visnaga</i>	5,7 DMF	5,7 dihidroxi-4 metoxiflavanona
<i>Senna candolleana</i>	Trimermy	Trimermy emodin
<i>Robinsonia thurifera</i>	Kauren	Acido Kauren -16-19 oico Kauren -16-19 oic acid
<i>Haplopappus taeda</i>	Terpen	anillos terpénicos fusionados aún no identificados
<i>Coreopsis suaveolens</i>	4,7 DHF	4,7 dihidroxiflavanona

II. Soluciones

La piel y el nervio aislado de batracio se mantuvieron bañados en una solución Ringer-Rana de la siguiente composición (mM): NaCl 113.0; KCl 1.9; CaCl₂ 2.0; NaHCO₃ 2.3 y glucosa 11 (pH 7.4).

Los compuestos extraídos de plantas fueron disueltos en etanol absoluto (Merck) para luego sacar alícuotas y diluirlas en Ringer, con el objeto de obtener concentraciones entre 1 µM y 100 µM. Durante todos los experimentos las soluciones usadas estaban a temperatura ambiente.

III. Estudios Electrofisiológicos

III. a Preparación piel de sapo

Se disecó la piel de la región abdominal del anfibio *Pleurodema thaul* y se colocó entre dos hemicámaras de lucita tipo Ussing (Ussing and Zerahn, 1951), exponiendo las superficies serosal y mucosal a una solución Ringer, oxigenándolas por abundante burbujeo de aire atmosférico. La DP fue captada por un par de electrodos de calomelano con puentes de Agar-Ringer y la CCC fue registrada por dos electrodos de Ag-AgCl. La CCC fue llevada a cero por medio de un fijador de voltaje automático (G. Metraux Electronique) con el objeto de medir la DP; ambos parámetros fueron graficados en un inscriptor (Cole-Parmer) de dos canales.

III. b Preparación Neuropiel

Se disecó un trozo de piel de una de las extremidades posteriores de *Caudibervera caudibervera* innervada por la rana cutánea del nervio tibial, colocándola en una cámara de lucita tipo Ussing. Las superficies serosal y mucosal de la piel y el nervio tibial se bañan permanentemente en solución Ringer-Rana, pH 7.4. Los perfiles de DP y CCC en el tiempo fueron graficados en un inscriptor (Cole-Parmer) de dos canales registrándose, junto con la CCC y DP, la RS evocada por estimulación del nervio tibial. Las características del estímulo usado sobre el nervio fueron las siguientes: 1 msec de duración, frecuencia 4 p.p.s., intensidad 4 volts, durante 30 segundos, entregado por un estimulador Grass S44 a través de una unidad aisladora SIU5.

IV. Análisis Estadístico

Los cálculos estadísticos fueron realizados en base a muestras pareadas para el cálculo de "t" según D.E. Gray (1961). Los resultados fueron expresados como variaciones normalizadas, en porcentaje, con respecto al control.

RESULTADOS

Los resultados presentados en este trabajo muestran sólo el efecto más importante de cada compuesto, sobre CCC, DP o RS.

Dos de estos compuestos, el 5, 4, 5 TT y el 5, 7 DMF no tuvieron un efecto significativo sobre los

parámetros CCC y DP. Sin embargo, los 5 restantes compuestos presentaron efectos significativos sobre estos parámetros.

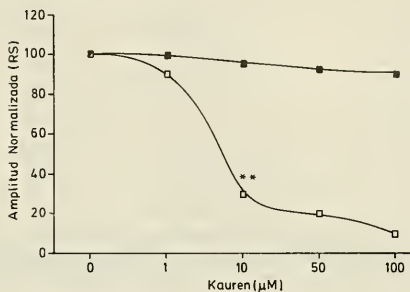


Fig. 1. Efecto de concentraciones crecientes (en µM): 1, 10, 50 y 100 de la solución del compuesto Kauren sobre la RS (μAcm^{-2}), administrado al lado serosal (cuadro abierto) o mucosal (cuadro lleno). Los asteriscos (**) indican un $p < 0.01$. $n=6$. Para ésta y las siguientes figuras los resultados se expresaron como variaciones porcentuales con respecto al valor control.

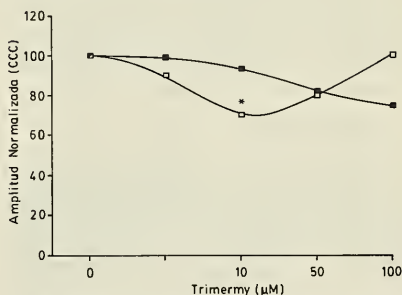


Fig. 2. Efecto de concentraciones crecientes (en µM): 1, 10, 50 y 100 de la solución del compuesto Trimermy sobre la CCC (μAcm^{-2}), administrado al lado serosal (cuadro abierto) o mucosal (cuadro lleno). El asterisco (*) indica un $p < 0.05$. $n=4$.

Efecto de Kauren

En una preparación neuropiel, Kauren bloquea la respuesta secretorfa a una concentración de 10 µM (Fig. 1), en tanto que CCC y DP no varían en forma significativa.

En piel de sapo la CCC como la DP fueron inhibidas por este compuesto al ser adicionado al lado serosal, expresándose la máxima inhibición entre los 50-60 minutos después de adicionar el compuesto (datos no mostrados).

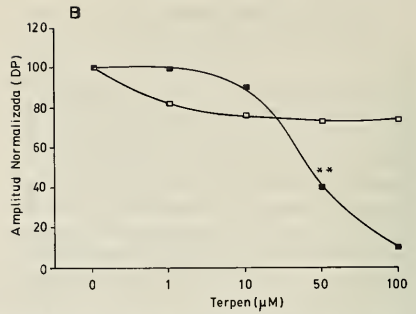
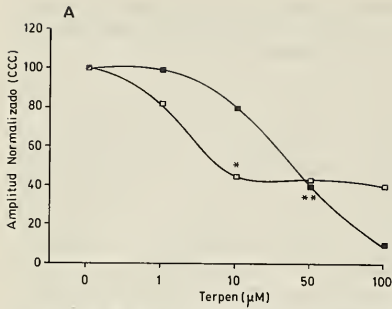


Fig. 3. A, efecto de concentraciones crecientes (en μM): 1, 10, 50 y 100 de la solución del compuesto Terpen sobre la CCC (μAcm^{-2}) y B sobre la DP (mV). El compuesto fue administrado al lado serosal (cuadro abierto) o mucosal (cuadro lleno). Los asteriscos (*), (**) indican un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. $n=6$.

Efecto de Trimermy

En una preparación piel de sapo, Trimermy administrado en concentraciones crecientes (10-100 μM) al baño serosal, inhibe a la CCC en forma significativa, pero no a la DP, observándose el peak de máxima inhibición a una concentración de 10 μM Trimermy; mientras que por el lado mucosal la inhibición fue significativa sólo a 100 μM (Fig. 2).

Efecto de Terpen

El efecto inhibitorio de Terpen sobre la CCC por el compuesto Terpen fue similar al set administrado en ambos lados de la piel de sapo (Fig. 3A). La DP presentó una inhibición significativa sólo con la adición del compuesto por el lado mucosal de la

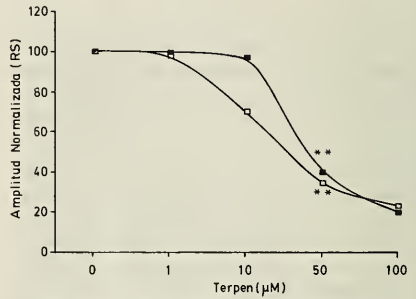


Fig. 4. Efecto de concentraciones crecientes (en μM): 1, 10, 50 y 100 de la solución del compuesto Terpen sobre la RS (μAcm^{-2}), administrado al lado serosal (cuadro abierto) o mucosal (cuadro lleno). Los asteriscos (**) indican un $p < 0.01$. $n=6$.

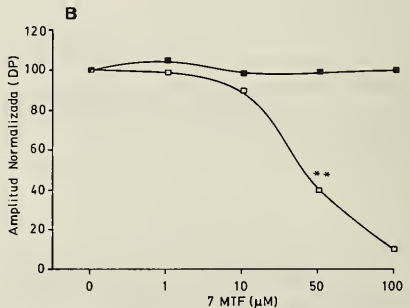
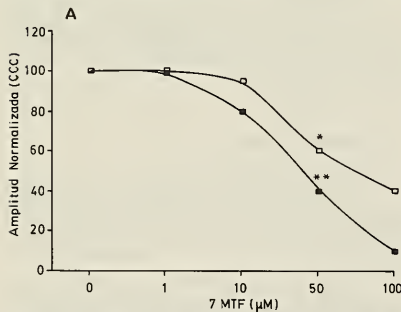


Fig. 5. A, efecto de concentraciones crecientes (en μM): 1, 10, 50 y 100 de la solución del compuesto 7 MTF sobre la CCC (μAcm^{-2}) y B sobre la DP (mV). El compuesto fue administrado al lado serosal (cuadro abierto) o mucosal (cuadro lleno). Los asteriscos (*), (**) indican un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. $n=6$.

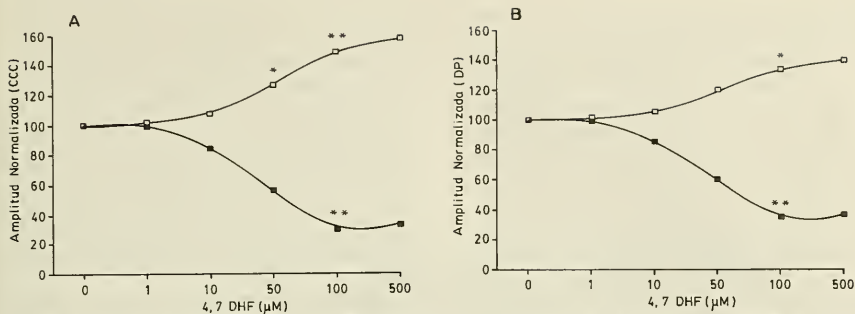


Fig. 6. A, efecto de concentraciones crecientes (en µM): 1, 10, 50, 100 y 500 de la solución del compuesto 4,7 DHF sobre la CCC (µAcm²) y B sobre la DP (mV). El compuesto fue administrado al lado serosal (cuadro abierto) o mucosal (cuadro lleno). Los asteriscos (*), (**) indican p<0.05 y p<0.01, respectivamente. n=5.

preparación (Fig. 3B). Terpen tuvo, además, un efecto inhibitorio significativo sobre la RS de una preparación neuropiel (Fig. 4).

Efecto de 7 MTF

El compuesto 7 MTF, en un rango de 1-100 µM produjo inhibición en la CCC, al adicionarse a ambos lados de la piel, y en la DP, sólo al adicionarse por el lado mucosal; ambos efectos fueron irreversibles (Fig. 5A y Fig. 5B).

Efecto de 4,7 DHF

4,7 DHF (100 y 500 µM) administrado al baño serosal produjo un efecto bifásico y parcialmente reversible en la CCC y DP, con un aumento de los parámetros bioeléctricos seguido de una disminución de éstos (Fig. 6). Al ser adicionado el compuesto al baño mucosal se observa una disminución dosis-dependiente poco reversible de la CCC y DP (Fig. 6).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue el de detectar y comprobar la actividad biológica de diversos compuestos aislados de plantas, sobre modelos biológicos: piel y piel inervada de batracio.

La inhibición de la respuesta secretoria de Cl⁻ por adición de Kauren en el lado seroso de la piel inervada podría deberse a un posible efecto sobre la

respuesta noradrenérgica de la piel, ya que por el lado mucosal no presenta efecto. El hecho de que Kauren no afectara en forma importante a la CCC y DP aportaría hacia su posible efecto sobre la innervación o la sinapsis noradrenérgica.

La inhibición concentración-independiente de la CCC y la poco significativa inhibición de la DP, podrían indicar un complejo efecto de Trimerny sobre el lado seroso de la piel. Asimismo, la inhibición de la CCC y mantención de la DP casi invariable reflejan una consecuente inhibición en la conducta total del sistema. Si consideramos que la conductancia total del sistema depende mayoritariamente del transporte de Na⁺ vía canales iónicos y minoritariamente del transporte de Na⁺ vía paracelular (Isaacson, 1977), podemos considerar que una disminución en la CCC podría deberse a la inhibición del transporte de Na⁺ vía canales iónicos, pudiendo ser efecto concomitante el aumento del transporte de este ion por medio de las vías paracelulares, manteniéndose con esto la DP casi constante.

El compuesto Terpen fue muy estudiado en preparaciones neuropiel, debido a la fuerte inhibición, dosis dependiente, que produce sobre la respuesta secretoria; sin embargo, esta inhibición se presenta al adicionarse Terpen, tanto al lado mucosal como serosal de la piel de rana, no esperándose así un efecto particular sobre el terminal o receptor adrenérgico. Igualmente la inhibición de los parámetros bioeléctricos CCC y DP fue dosis dependiente. Sin embargo, al ser adicionado por el lado serosal, Terpen no varía significativamente a la DP, pero sí la CCC. Si consideramos que la mantención de la DP transepitelial es dependiente de la ATPasa

Na-K, es posible que ésta no se altere al adicionarse Terpen al lado serosal de la piel.

El compuesto 7 MTF presentó una significativa y dosis dependiente inhibición de la CCC, siendo mayor cuando el compuesto fue administrado al baño mucosal. Sin embargo, ambos efectos fueron de lento desarrollo, por ejemplo, la disminución de un 60% en la CCC (Fig. 5A) se alcanza después de 60 minutos de administrado 7 MTF mucosal o serosal. Este efecto mediato podría deberse a una acción transmembranal del compuesto que afectara posiblemente a la síntesis proteica, y ésta a la CCC y DP, sin embargo, no se ha establecido el rol de inhibidores de la síntesis proteica en piel de anfibio. Por otra parte, el efecto del 7 MTF puede deberse lisa y llanamente a su lenta difusión a través de la piel hasta llegar a las células basales.

En una preparación piel de sapo, la respuesta bifásica producida por la adición de 100 y 500 μM 4,7 DHF al baño serosal se descompone en una

primera fase de aumento de los parámetros bioeléctricos y una segunda fase de descenso de éstos. Estos resultados pueden hacernos sospechar sobre un posible rol noradrenérgico o colinérgico de esta sustancia, ya que se ha descrito que neurotransmisores como noradrenalina o acetilcolina producen un crecimiento transiente de la CCC y DP en una preparación piel de sapo (Norris *et al.*, 1988; Sobrevía *et al.*, 1989). Por otra parte, la segunda fase, inhibición de la CCC y DP, puede deberse a un efecto secundario de la 4,7 DHF sobre el transporte iónico.

Podemos concluir que los compuestos Kauren, Trimermy, Terpen, 7 MTF y 4,7 DHF presentan actividad biológica en nuestras preparaciones. Sin lugar a duda, estos resultados establecen que los estudios abocados a la búsqueda de productos de origen natural y el análisis de su o sus efectos biológicos en sustratos animales son un importante campo de desarrollo en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la excelente asis-

tencia técnica de don Julio Vargas Amaza. (Proy. DI 92-3365-1)

BIBLIOGRAFIA

- Alarcón, J.M., Quevedo, L. y Reyes, P. 1991. Efectos de antioxidantes sobre la acción del peróxido de hidrógeno en piel de sapo. Bol. Soc. Biol. Concepción, 62: 21-26
- González, C., Sánchez J. and Concha, J. 1967. Further evidence of the release of noradrenaline under nerve stimulation and its effect on the potential difference in a toad nerve skin preparation. Biochem. Biophys. Acta. 135: 167-170.
- Gray, D.E., 1961. Statistics for Medical Students. Hong Kong University Press.
- Isaacson, I. 1977. Resolution of parameters in the equivalent electrical circuit of the sodium transport mechanism across toad skin. J. Membrane Biol. 30: 301-317.
- Kirpekar, M., Kirpekar, S. and Prat, J., 1977. Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation. J. Physiol. (London). 272: 517-528.
- Lindley, B., 1969. Nerve stimulation and electrical properties of frog skin. J. Gen. Physiol. 53: 427-449.
- Neuman, V., Quevedo, L. and Concha, J. 1985. Effects of progesterone on the sympathetic response of a frog nerve-skin preparation. Cell. Mol. Biol. 31(5): 373-377.
- Norris, B., González, C., Concha, J. and Contreras, M. 1988. Effect of 4-aminopyridine on the bioelectric parameters of the toad skin. Med. Sci. Res. 16: 887-889.
- Quevedo, L., Melo R., Sáez, J.C. and Cifuentes, F., 1984. Blockade of electrophysiological properties of muscle fibres by lycorine. Neuropharm. 23(3). 391-394.
- Rudolph, I., Norris, B., Concha, J. and González, C. 1979. Studies on the electrical responses of a toad nerve-skin preparation. Cell. Mol. Biol. 24: 17-27.
- Sobrevía, L., Quevedo, L., Alarcón, J. y Concha, J. Presencia de receptores colinérgicos en piel de *Pleurodema thaul*. Rol del Calcio. 1989. Bol. Soc. Biol. Concepción, 60: 231-238.
- Ussing, H. and Zerahn, K., 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the shortcircuited isolated frog skin. Acta Physiol. Scand. 23: 110-127.