

EFFECTO DE PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL SOBRE PREPARACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS. PARTE II: ACCION DE LA 4,7' DIHIDROXIFLAVANONA*.

Effect of natural compounds on electrophysiological
preparations. Part II: Action of 4,7' dihydroxyflavanone.

J.M. ALARCON**; H. CARDENAS**; L. QUEVEDO** Y M. HOENEISEN**

RESUMEN

La acción biológica de un compuesto de origen natural, la 4,7' dihidroxiflavanona, se ha estudiado en preparaciones electrofisiológicas. Se ha analizado los efectos sobre Corriente de Cortocircuito (CCC), Diferencia de Potencial Transepitelial (DP) en piel de sapo, así como la amplitud, duración y cambios en el umbral en el Potencial de Acción (PA) en nervio aislado de rana. Los resultados indican que el compuesto 4,7' dihidroxiflavanona presenta una respuesta bifásica, con incremento de la CCC y DP, seguido de una inhibición de estos parámetros. Los aumentos de DP y CCC son anulados por un bloqueador b-adrenérgico.

ABSTRACT

The biological action of 4,7' dihydroxyflavanone, was studied on electrophysiological models: toad skin *Pleurodema thaul* and isolated nerve of *Caudibervera caudibervera*, in which were measured the short circuit current (CCC), potential difference (DP), the amplitude, duration and threshold of action potential (PA). The results show that the compound 4,7' dihydroxyflavanone produces a significant increase and then a decrease in DP and CCC. The increase phase was blocked by α -blockers or a Cl⁻-free medium.

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

INTRODUCCION

Se han identificado, en piel de anfibio, terminales nerviosos simpáticos que secretan noradrenalina (Kirpekar *et al.*, 1977), los cuales provocan aumen-

tos transientes de la diferencia de potencial transepitelial (DP) y de la corriente de corto circuito (CCC) participando en esta respuesta el ion Cl⁻ (González *et al.*, 1967; Lindley, 1969; Norris *et al.*, 1988). Además se ha descrito la presencia de recep-

* 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.

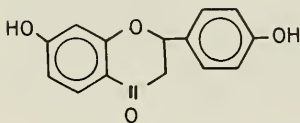
tores colinérgicos en piel de sapo, que en respuesta a acetilcolina evocan una respuesta bifásica, incrementando y luego inhibiendo la CCC y DP (Sobrevía *et al.*, 1989). En investigaciones anteriores encontramos que un compuesto de origen natural, la 4,7' dihidroxiflavanona, presenta respuestas similares a las evocadas por acetilcolina en una preparación de piel de sapo.

Se ha reconocido que la piel de batracio es una preparación electrofisiológica útil para estudiar la acción de diversos agentes químicos, tales como mediadores (Rudolph *et al.*, 1979), hormonas (Neumann *et al.*, 1985), drogas y fármacos (Quevedo *et al.*, 1984), analogándose ella a un circuito eléctrico cuyos componentes (parámetros del circuito eléctrico equivalente) equivaldrían a la diferencia de potencial transepitelial (DP), corriente de cortocircuito (CCC), potencial de la bomba de sodio (ENa) (reflejo del funcionamiento de la ATPasa Na-K), conductancia activa o de sodio (GNa) (reflejo del transporte de Na por canales iónicos y conductancia pasiva (Gsh) (producto del transporte de Na por vía paracelular), (Ussing and Zerahn, 1951; Isaacson, 1977). Asimismo el nervio ciático aislado nos permitirá diferenciar el efecto de la 4,7' dihidroxiflavanona sobre canales de Na y K voltaje dependientes y voltaje independientes.

MATERIALES Y METODOS

I. Origen de la 4,7' dihidroxiflavanona

Este compuesto fue extraído, purificado y determinada su estructura química en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad de Concepción. La 4,7 dihidroxiflavanona (4,7 DHF) (Fig. 1) fue obtenida de la planta chilena *Coreopsis suaveolens*.



4,7' dihidroxiflavanona (4,7'DHF)

PM : 251 gr/mol

Fig. 1. Representación de la estructura química de la molécula de 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; CaCl_2 2.0; NaHCO_3 2.3 y glucosa 11, pH 7.4. Además, se usó en los experimentos una solución sin cloruros (Ringer Sulfato), cuya composición es (mM): Na_2SO_4 55.98; K_2SO_4 2.396; NaHCO_3 2.452; gluconato de calcio 0.99; glucosa 5.5, pH 7.4. Se utilizó también una solución libre de calcio que contiene (mM): NaCl 114; KCl 0.528; NaHCO_3 0.415 glucosa 0.09, pH 7.4. En las soluciones Ringer Sulfato y sin calcio se ajustó la presión osmótica a 220 mOsm/l con manitol. Todas las soluciones fueron utilizadas a temperatura ambiente.

El compuesto fue disuelto en etanol (Merck) para luego sacar alícuotas y diluirlas en Ringer, con el objeto de obtener concentraciones de 50, 100, 500 y 1.000 μM . En algunos experimentos se utilizó Propanolol (1 μM) y Amilorida (1 μM); ambas drogas solubilizadas en agua destilada y alícuotas de estas soluciones fueron diluidas en Ringer-Rana.

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 (Fig. 2), la cual fue oxigenada 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. Con el objeto de medir la DP, la CCC fue llevada a cero por medio de un fijador de voltaje automático (G. Metraux Electronique). DP y CCC fueron graficados en un inscriptor (Cole-Parmer) de dos canales.

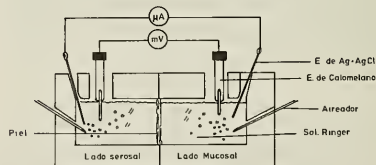


Fig. 2. Representación esquemática de la preparación piel de sapo.

III. b. Preparación nervio ciático aislado

Se disecó el nervio ciático de *Caudibervera caudibervera* y se colocó en una cámara de lucita. El nervio se estimuló con dos electrodos de Ag conectados a un estimulador (Grass S44) a través de una unidad aisladora (Grass SIU5). Las respuestas eléctricas son captadas por electrodos de Ag y amplificadas por un preamplificador (Grass P5), para ser visualizadas en un osciloscopio de rayos catódicos (Tektronix 5113). Se midió la amplitud, duración y variación del umbral de descarga del potencial de acción (PA).

III. d. Test de Isaacson

El test de amilorida de Isaacson (1977) fue utilizado para analizar el efecto del compuesto 4,7 DHF sobre los parámetros bioeléctricos CCC y DP.

Se empleó una concentración final de amilorida de $1 \mu\text{M}$ y los valores de: potencial de la bomba de sodio (Ena), conductancia activa (o de sodio) (GNa) y la conductancia pasiva (Gsh) fueron obtenidos por solución gráfica de la ecuación:

$$Gt = CCC \cdot j / \text{Ena} + \text{Gsh}$$

Se graficaron en la ordenada los valores de Gt y en la abscisa los valores de CCC. La Ena se obtuvo del inverso de la pendiente, la Gsh de la extrapolación de la recta al eje Gt. La conductancia total del sistema fue obtenida a partir de la fórmula:

$$Gt = CCC / DP$$

La GNa se obtiene a partir de la fórmula:

$$GNa = CCC / \text{Ena}$$

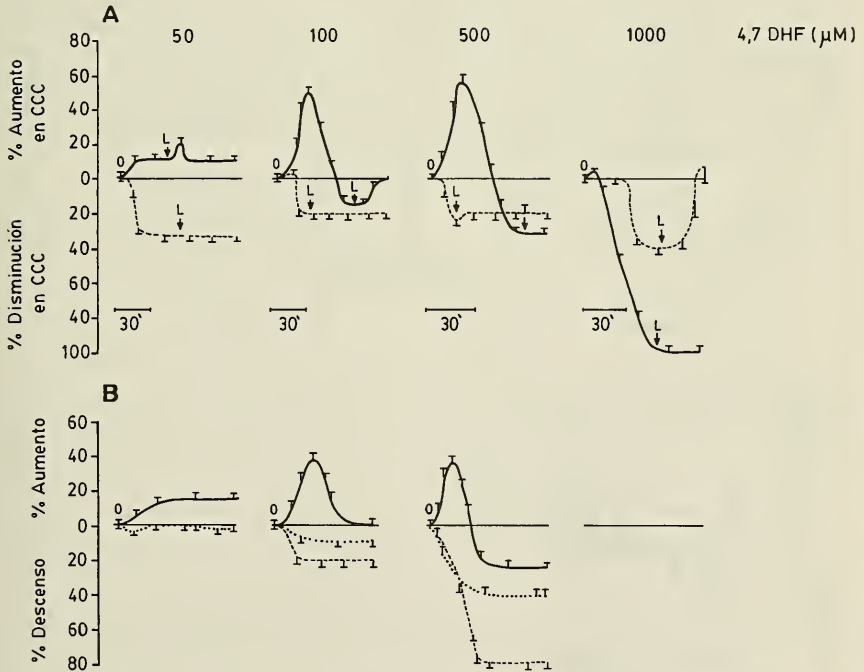


Fig. 3. A, efecto de 4,7 DHF administrado en concentraciones crecientes (en μM): 50, 500 y 1.000 al baño mucosal (línea segmentada) o serosal (línea sólida) sobre la CCC (μAcm^2). B, efecto de 4,7 DHF administrado en concentraciones crecientes (en μM): 50, 100, 500 y 1.000 sobre la CCC (μAcm^2) en presencia de Ringer sin calcio (línea sólida), de Ringer Sulfato (línea segmentada) y 1 μM propanolol serosal (línea punteada). La barra horizontal indica 30 minutos. L indica lavado. Para cada experimento $n=4$.

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

Efecto de 4,7 DHF sobre una preparación piel de sapo

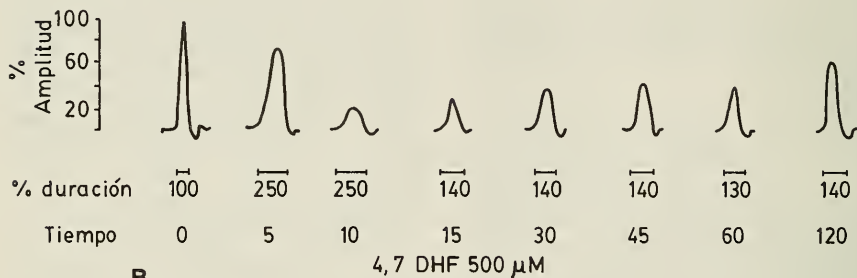
4,7 DHF administrado al baño serosal produjo un efecto bifásico en la CCC y DP, dependiente de la concentración (Fig. 3A) y parcialmente reversible. Al adicionar concentraciones crecientes de 4,7 DHF al baño mucosal sólo se observó disminución

en la CCC y DP (Fig. 3A). Para determinar un posible origen de la fase de aumento se utilizaron soluciones Ringer libres de calcio y cloruro, encontrándose que la fase de aumento desaparecía en ausencia de cloruro. Asimismo, la administración de un bloqueador b-adrenérgico, propranolol, tuvo el mismo efecto que la ausencia de cloruro en el Ringer-Rana (Fig. 3B).

Efecto de 4,7 DHF sobre una preparación de nervio ciático

La administración 500 μ M 4,7 DHF disminuye la amplitud y aumenta la duración del PA; ambos efectos fueron parcialmente reversibles en el tiempo (Fig. 4A). El umbral de descarga aumenta por un breve lapso para luego disminuir y volver a aumentar en el tiempo (FIG. 4B).

A



B

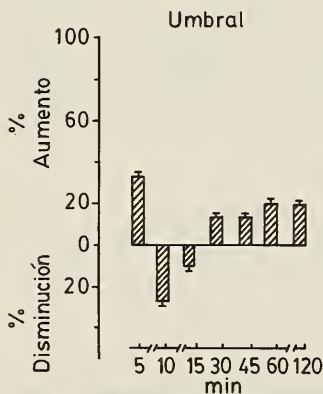


Fig. 4. A, efecto de 4,7 DHF 500 μ M sobre la amplitud y duración del potencial de acción compuesto de nervio a través del tiempo. La dosis fue agregada a la solución Ringer que baña al nervio ciático. B, variación porcentual del umbral del potencial de acción a través del tiempo por efecto de la adición de 4,7 DHF 500 μ M a la solución Ringer que baña al nervio ciático. n=4.

Efecto de la 4,7 DHF sobre los parámetros del circuito eléctrico equivalente.

La determinación de los valores del circuito eléctrico equivalente para la fase de decaimiento de la respuesta bifásica se obtuvo mediante el test de Isaacson (Fig. 5A). Los resultados muestran un significativo incremento de las conductancias del sistema, acompañadas de una inhibición del potencial transepitelial (Fig. 5B).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se ha descrito que etanol a concentraciones de 0,1 M produce variaciones tanto en la DP como en la CCC (Concha *et al.*, 1987). La concentración de etanol en las soluciones de 4,7 DHF es menor de 100 μM lo que nos asegura que los efectos observados no se deben al etanol.

La respuesta bifásica producida por 100 y 500 μM 4,7 DHF en el baño serosal se compone de una primera fase con aumento de DP y CCC y una segunda fase de descenso de éstos. La primera fase no se altera cuando la solución Ringer está libre de Ca, sin embargo, en ausencia de Cl desaparece,

indicando que ella depende de este ion. Se ha descrito que en piel de batracio noradrenalina incrementa la DP y CCC, por estimulación de receptores adrenérgicos; además, se ha encontrado que este aumento es dependiente de Cl (Kirpekar *et al.*, 1977; Norris *et al.*, 1988). Asimismo, nuestros experimentos muestran que se inhibe totalmente la primera fase al preincubar con 4,7 DHF la preparación piel de sapo. En base a estos resultados podemos suponer que la primera fase se debería a una acción simpatomimética de 4,7 DHF sobre el receptor adrenérgico. Es menos probable que 4,7 DHF actúe sobre terminales noradrenérgicos, puesto que es necesario Ca extracelular para la liberación del neurotransmisor, y en una preparación con 4,7 DHF y Ringer sin calcio se conservó la primera fase.

Por otra parte, la segunda fase no es inhibida en una preparación pretratada con propanolol, demostrando su independencia de procesos activados por receptores b-adrenérgicos. Sin embargo, esta última fase es incrementada en una solución Ringer sin Cl. Suponemos que ambas fases podrían desarrollarse simultáneamente, y la respuesta final observada representaría la resultante entre ambas; esto es, a tiempo cero ambas respuestas se desarrollan, pero como la de aumento sería mayor se expresaría primero hasta que es reemplazada por la fase de inhibi-

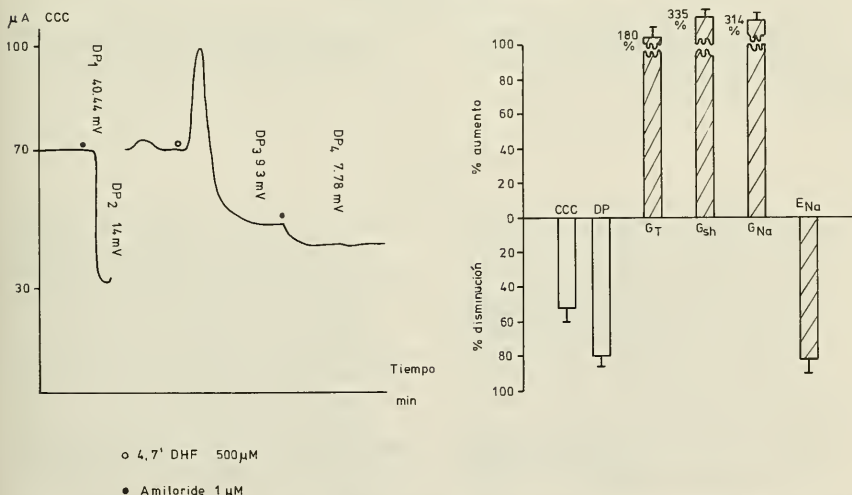


Fig. 5. A, representación esquemática del desarrollo del test de Isaacson sobre una gráfica de CCC versus tiempo, para analizar la fase de decaimiento del efecto de 4,7 DHF. En la gráfica se indican la adición de amilorida (círculo negro), de 4,7 DHF (círculo abierto) y de los valores de DP. B, variación porcentual de los parámetros del circuito eléctrico equivalente Gsh, GNa, ENa, CCC, DP y Gt. Note el gran incremento de las conductancias y la disminución de la ENa. n=4.

ción. Los resultados indican que la segunda fase es inhibida en una preparación libre de calcio, indicando cierto rol de este ion en el efecto inhibitorio.

Para poder dilucidar la naturaleza de la fase de decaimiento en la CCC y DP producto de la adición de 4,7 DHF al baño serosal (segunda fase) se efectuó el test de Isaacson, cuyos resultados muestran un gran incremento de las conductancias activas y pasivas del sistema, representantes del transporte de Na^+ vía canales iónicos ubicados hacia el lado mucoso de la piel y del flujo de Na^+ por la vías paracelulares, respectivamente (Isaacson, 1977) y una inhibición de la actividad de la ATPasa Na-K.

En una preparación de nervio aislado, la disminución de la amplitud del PA, asociada a la disminución del umbral de descarga, podrían hacernos pensar que una inhibición del transporte de K^+ , estaría participando en estos eventos, ya que un bloqueo parcial de los canales de K^+ determinaría una disminución del potencial de membrana, con la consiguiente disminución del umbral de descarga y del PA, con un aumento de su duración. Sin embargo, el aumento anterior y posterior a la disminución del

umbral de descarga siguen todavía sin explicación.

Si aplicamos la información obtenida en nuestros experimentos a un modelo celular de la piel de sapo, podremos explicar, que una inhibición del eflujo de K^+ desde la célula basal, podría afectar la bomba Na-K con la consiguiente disminución de la DP. La ATPasa Na-K al disminuir el transporte de Na^+ hacia el lado seroso causaría la disminución de la CCC, independientemente del transporte por los canales de Na^+ .

Por otra parte, la inhibición de los parámetros bioeléctricos al adicionar 4,7 DHF por el lado mucosal puede ser del mismo origen que la fase de decaimiento observada al ser adicionado el compuesto por el lado serosal, sin embargo, no ha sido aún estudiada en detalle.

Podemos concluir que la 4,7 DHF, provoca una respuesta bifásica en los parámetros bioeléctricos CCC y DP, cuya primera fase puede ser consecuencia de un efecto noradrenérgico de la 4,7 DHF y cuya segunda fase puede ser un efecto secundario inespecífico probablemente por las altas dosis de 4,7 DHF las que afectarían la permeabilidad al K^+ .

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la excelente y valiosa asistencia técnica brindada a nosotros por don Julio Vargas Amaza.

Trabajo financiado por Proyecto DI 92-3365-1 de la Universidad de Concepción.

BIBLIOGRAFIA

- Concha, J., Quevedo, L. y Contreras, G. 1987. Acción de etanol sobre la actividad bioeléctrica del epitelio de piel de sapo. Bol. Soc. Biol. Chile. 58: 31-38.
- 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.
- Neumann, 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., González, C. 1979. Studies on the electrical responses of a toad nerve-skin preparation. Cell. Mol. Biol. 24: 17-27.

Sobrevia, 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.