

## Bloqueo del potencial de acción en el electrocito de *Electrophorus electricus* por histrionicotoxina.

Eva Bartels de Bernal<sup>1</sup>, Rosalina Cadena<sup>2</sup>, y Edgar Díaz<sup>3</sup>

### EXTRACTO

Se ensayó el veneno de la rana *Dendrobates tinctorius histrionicus*, **histrionicotoxina (Htx)**, sobre la preparación del electrocito de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) usando microelectrodos para medir potenciales de reposo y de acción. Se encontró que la Htx bloquea el potencial de acción provocado por estimulación directa del electrocito. Este bloqueo depende de la actividad previa del pH y de la concentración. La Htx antagoniza los efectos de la batracotoxina (Btx) lo cual indica que actúa sobre los canales de sodio del potencial de acción. En la sinapsis la Htx es más potente a pH 7 que a pH 8.5, pero en la membrana conductiva su potencia es mayor a pH 8.5 que a pH 6.4.

El efecto de la Htx sobre los electrocitos es muy semejante al de los anestésicos locales con 3 excepciones: a) El mayor efecto a pH básico en la membrana conductiva; b) El bloqueo del potencial de acción dependiente de la actividad. c) La prolongación del potencial de acción en concentraciones bajas.

### INTRODUCCION

El órgano eléctrico o electrocito de la anguila eléctrica, *Electrophorus electricus*, es la preparación ideal para el

estudio de los canales de sodio del potencial de acción. La membrana conductiva tiene aproximadamente 10 veces más sitios de unión con tetrodotoxina (Ttx) por cm<sup>2</sup> que al axón gigante del calamar<sup>1</sup> y la magnitud de su corriente pico al interior es 1000 veces mayor<sup>2</sup>. Además es relativamente más fácil obtener y correlacionar los resultados bioquímicos, morfológicos y electrofisiológicos en las mismas preparaciones. Esta correlación es un trabajo colaborativo con el Dr. H.H. Grunhagen, del Departamento de Química Fisiológica de la Universität des Saarlandes en Alemania. Además Agnew *et al.*<sup>3</sup> adelantan investigaciones bioquímicas con membranas de la anguila eléctrica para estudiar los canales de sodio.

Las herramientas necesarias para estudiar los canales iónicos son ciertas toxinas específicas de origen animal o vegetal que activan [batracotoxina (Btx), veratridina, aconitina, grayanotoxina, tityustoxina, toxinas de la anémonas de mar] o bloquean (Ttx, saxotoxina, yohimbina) los canales de sodio. A los agentes bloqueantes mencionados se puede agregar la histrionicotoxina (Htx) que, por lo menos, en el electrocito, bloquea el potencial de acción y antagoniza la Btx.

La Htx es el veneno alcaloide segregado por el tegumento de la rana tropical *Dendrobates tinctorius histrionicus*<sup>4</sup>. Este veneno se ha estudiado en muchas preparaciones de músculos y nervios<sup>5-7</sup>. La Htx inhibe la transmisión en las sinapsis neuromusculares bloqueando los canales iónicos sinápticos pero sin afectar el receptor colinérgico. Eldefrawi *et al.*<sup>6</sup> y Sobel *et al.*<sup>8</sup> aislaron una proteína que se une con la Htx específicamente pero no con la acetilcolina. Además otros autores informaron también que la Htx bloquea los canales de potasio de la membrana conductiva sin tener efectos significativos sobre los canales de sodio<sup>5,7</sup>.

A los autores del presente trabajo les pareció poco probable que la Htx actuara como un "anestésico local típico" en la sinapsis<sup>7</sup> sin tener efectos sobre los canales de sodio en la membrana conductiva. La mayoría de los compuestos con propiedades de anestésico local si bien son más potentes en la sinapsis, también tienen efectos en la membrana conductiva<sup>9</sup>. En este estudio se han usado concentraciones de Htx 100 veces

1. Profesora Auxiliar, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

2. Profesora Asociada, Sección de Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

3. Profesor Asociado, Departamento de Física, División de Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

mayores que las que bloquean las sinapsis, y se observó un bloqueo del potencial de acción provocado por estimulación directa que depende de la concentración, del tiempo, de la actividad y del pH. Un "bloqueo dependiente de la actividad" se observa cuando el bloqueo se acelera por una despolarización prolongada o por despolarización repetitiva<sup>10</sup>.

## METODOS

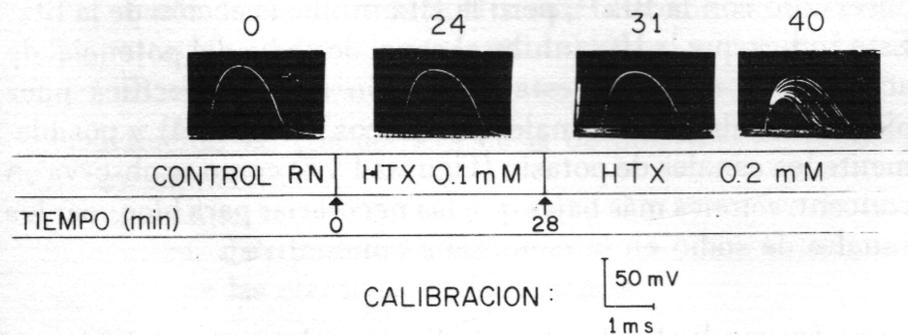
Se empleó el electrocito de la anguila eléctrica para medir los potenciales de reposo y de acción con microelectrodos intracelulares de acuerdo con las técnicas que aparecen en los artículos de Schoffeniels y Nachmansohn<sup>11</sup> y de Bartels et al.<sup>12</sup> La composición de la solución Ringer era en mM/l: NaCl, 188; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 2; amortiguador fosfatado, 1.5; glucosa, 10. La temperatura era de 24°C a 28°C y el pH 7. En los experimentos donde el pH era 8.5 el amortiguador fosfato se cambió a 2 mM TRIS. La histrionicotoxina fue un obsequio del Dr. John Daly de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos.

En el electrocito se estimula la membrana conductiva selectivamente con un estímulo catódico mientras que la sinapsis recibe estimulación anódica. Se distingue el potencial de acción provocado por estimulación directa (catódica) del provocado indirectamente (anódica), por la presencia o ausencia del potencial post-sináptico y/o el tiempo de retardo.

## RESULTADOS

### 1. Bloqueo del potencial de acción

El efecto de la Htx sobre el potencial de acción del electrocito depende de la concentración y de la actividad (Figura 1). Si se estimula una célula control 2/seg, no se observan cambios en el potencial de acción durante más de 30 minutos. Una concentración de Htx, 0.1 mM prolonga la duración del potencial ligeramente después de 30 minutos de la Htx de acuerdo con la observación de Kato y Changeaux<sup>7</sup>. La estimulación repetida no tiene efectos con esta concentración.

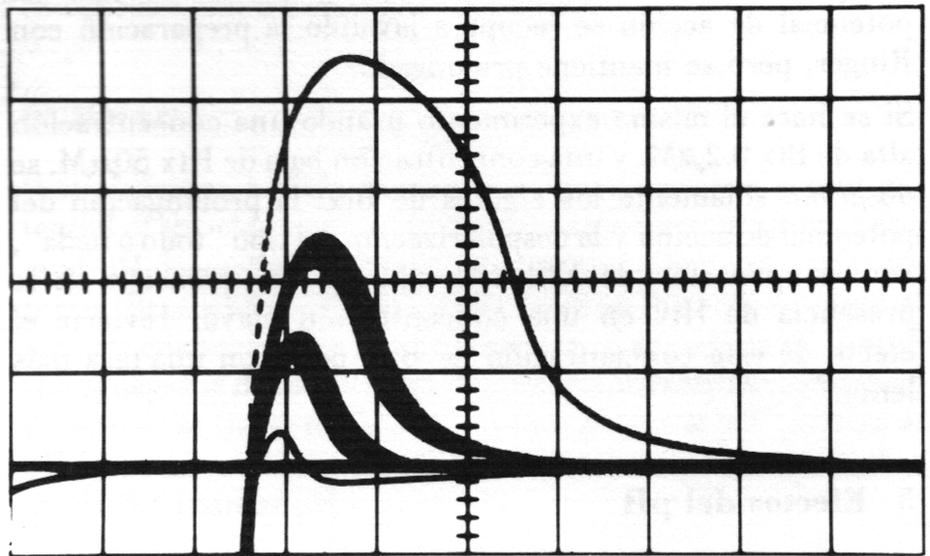


**Figura 1. Efecto de la Htx dependiente de la concentración y de la actividad sobre el potencial de acción del electrocito.**

Los números superiores se refieren al tiempo (en minutos) en que fueron tomadas las fotos. Los cambios de solución están indicados en la escala del tiempo. En la última foto la célula fue estimulada una vez por segundo; duración 0.1 ms y voltaje umbral. El primer potencial en presencia de la Htx 0.2 mM es el de mayor duración y amplitud; los siguientes disminuyen en amplitud y duración en cada estímulo.

Cuando se dobla la concentración, la amplitud del potencial de acción disminuye ligeramente dentro de 3 minutos y no se observan más cambios adicionales durante 10 minutos. Si se estimula la célula repetidamente 1/s se observa disminución

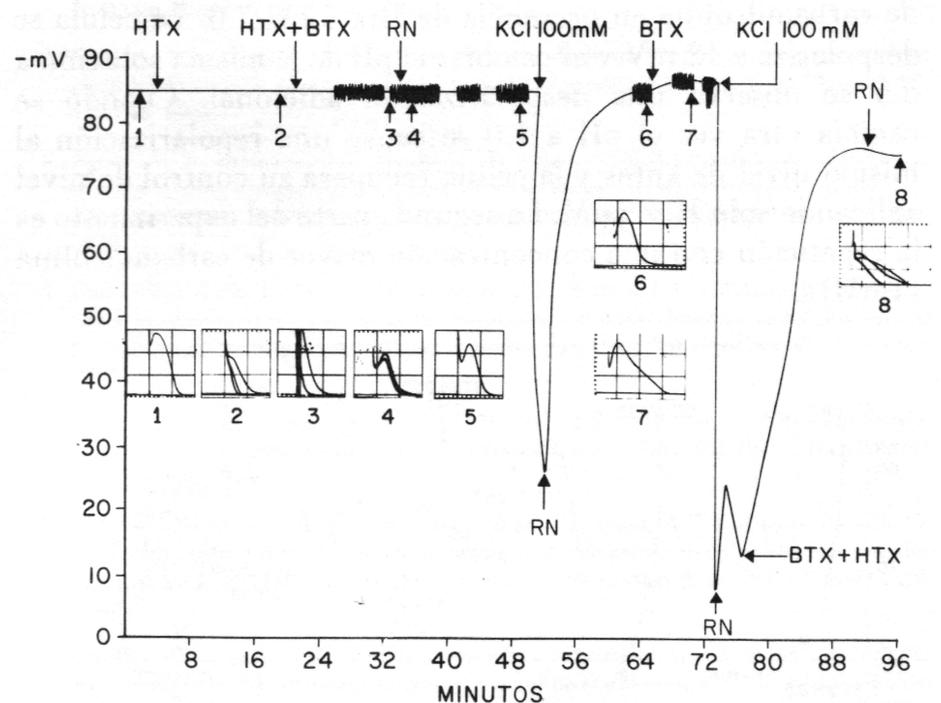
en la amplitud y duración con cada impulso. El efecto es reversible en Ringer. Con una concentración de 1 mM se observa bloqueo con dos estímulos. Un efecto similar dependiente de la actividad previa se muestra en la Figura 2, donde las células son estimuladas 1/s con 20 pulsos en presencia de una concentración de Htx más baja que la usada en la Figura 1. El potencial más grande es el primero, el más pequeño es el segundo trazo, y los potenciales de acción siguientes alternan entre los 2 tamaños intermedios. Este efecto no se observó en todas las células ensayadas.



**Figura 2. Respuesta cíclica del electrocito a la Htx.** Ver texto para explicación.

### 2. Antagonismo entre histrionicotoxina y batracotoxina

En la Figura 3 se muestra el antagonismo entre Htx y Btx. En este experimento se aplicó una concentración alta de Htx (0.5 mM) junto con una concentración baja de Btx (0.1 uM).



**Figura 3. La Htx evita y revierte los efectos de la Btx.**

Las concentraciones usadas fueron: Htx 0.5 mM, Btx 0.1 uM. Los números debajo del trazo del potencial de la membrana corresponden a los números de las fotos del potencial de acción. La estimulación es la misma que en la Figura 1. La calibración fue 2 ms y 50 mV/división.

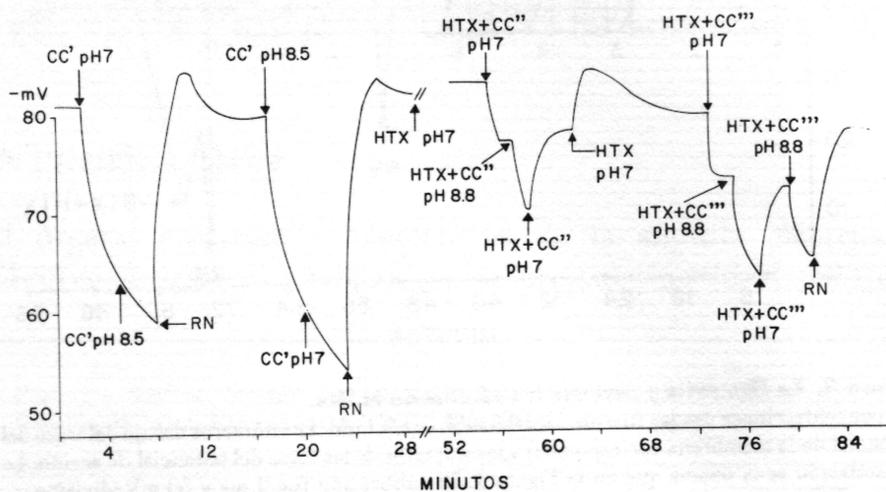
Esta combinación bloqueó el potencial de acción. Al lavar la célula con Ringer se observó la recuperación del potencial de

acción y la despolarización causada por KCl 100 mM reversionó completamente en Ringer, lo cual indica que la Htx inhibe la unión de Btx dentro de los canales de sodio en forma semejante al efecto de los anestésicos locales<sup>12</sup>. La estimulación de la célula en Btx sin Htx conduce a los efectos esperados: Prolongación del potencial de acción y la despolarización del tipo "todo o nada" después de la aplicación de KCl 100 mM. Esta despolarización no es reversible en Ringer pero la adición de Htx 0.5 mM causa la recuperación del potencial de reposo a su valor inicial dentro de 10 minutos. Es notable que la recuperación se efectúa en la presencia de Btx 0.1  $\mu$ M. El potencial de acción se recupera lavando la preparación con Ringer, pero se mantiene prolongado.

Si se hace el mismo experimento usando una concentración alta de Btx 0.2  $\mu$ M, y una concentración baja de Htx 50  $\mu$ M, se observan solamente los efectos de Btx: la prolongación del potencial de acción y la despolarización del tipo "todo o nada", con la aplicación de KCl 100 mM. La recuperación en la presencia de Htx en una concentración mayor revierte el efecto de esta concentración de Btx, pero con una tasa más lenta.

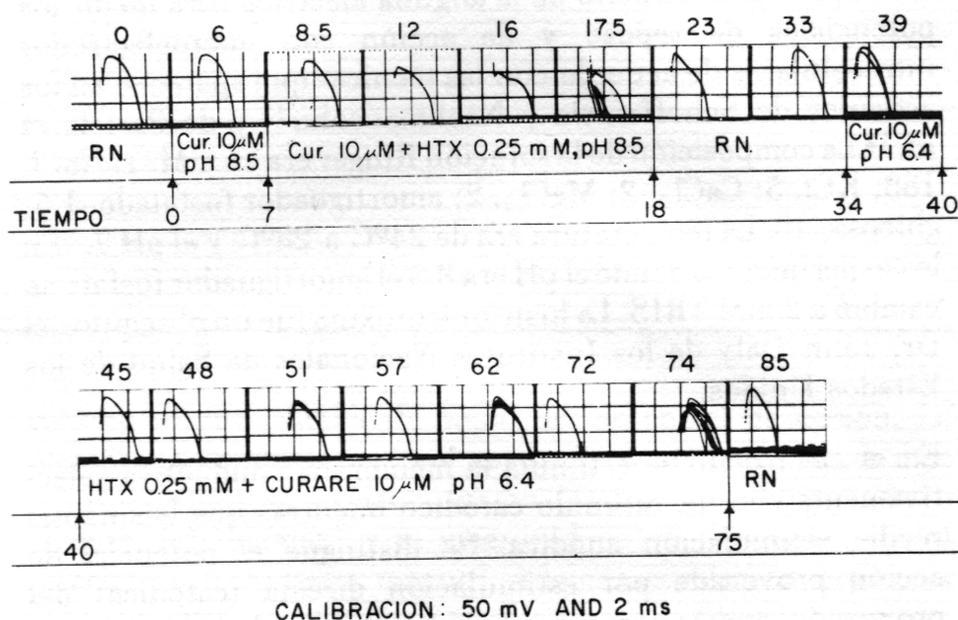
### 3. Efectos del pH

La acción de Htx depende del pH en todos sus efectos tanto en la sinapsis como en la membrana conductiva, pero las potencias de su forma cargada y no cargada son diferentes en los distintos sitios. En la sinapsis la Htx es más potente en pH 7 que en pH 8 (Figura 4). El solo cambio de pH en este rango no modifica la despolarización causada por carbamilcolina. La despolarización más larga observada con la segunda aplicación de carbamilcolina en pH 8.5 ocurre también en pH constante. La tasa de la despolarización es la misma luego del cambio del pH. Después de una recuperación en Ringer se incubó la célula en Htx 5  $\mu$ M durante 30 minutos<sup>7</sup> y sigue una aplicación de 40  $\mu$ M de carbamilcolina en presencia de Htx a pH 7.0. La célula se despolariza a 12 mV y al cambiar el pH de la misma solución a 8.5 se observa una despolarización adicional. Cuando se cambia otra vez el pH a 7.0 se causa una repolarización al mismo nivel de antes y la célula recupera su control de nivel aplicando solo Htx 5  $\mu$ M. La segunda parte del experimento es la repetición con una concentración mayor de carbamilcolina (1mM).



**Figura 4. Acción de la Htx dependiente del pH en la sinapsis.** Las concentraciones usadas fueron: Htx 5  $\mu$ M, cc' 20  $\mu$ M, cc'' 100  $\mu$ M. cc = carbamilcolina. La forma cargada de Htx es más potente.

El efecto de la Htx sobre el potencial de acción provocado por estimulación directa también parece ser una función del pH. Como se puede observar en la Figura 5, se aplicó Htx 0.25 mM en presencia de curare 10  $\mu$ M. El curare estaba presente para bloquear la actividad sináptica. En pH 8.5 el potencial de acción se bloqueó después de 10 minutos con la aplicación de impulsos eléctricos repetidos, mientras que en pH 6.4 no se observó bloqueo en los 30 minutos siguientes, aun con estimulación repetida prolongada.



**Figura 5. Acción de la Htx dependiente del pH sobre el potencial de acción.** Los números superiores corresponden al momento cuando se tomaron las fotos y a su vez a la escala de tiempo. Se había aplicado curare para bloquear la actividad sináptica. Después de 17.5, 39, 51, 62 y 74 minutos se estimuló la célula con 10 impulsos a 1/s. En pH básico el potencial de acción se bloqueó después de 10 minutos mientras que en pH ácido se observó solamente una disminución pequeña en amplitud y duración después de 30 minutos. Se nota una prolongación del potencial de acción después de 16 minutos en pH básico.

### DISCUSION

Al contrario de lo que ocurre en otras preparaciones la Htx bloquea el potencial de acción reversiblemente en el electrocito, siendo la concentración mínima efectiva 0.2 mM 100 veces mayor que la necesaria para bloquear la sinapsis<sup>7</sup>. El bloqueo del potencial de acción depende de la concentración, del tiempo, de la actividad repetida y del pH, y es semejante al observado con la Btx<sup>13</sup>, pero la Htx inhibe la acción de la Btx. Esto indica que la Htx inhibe el canal de sodio del potencial de acción. Sin embargo, esta inhibición no es específica pues bloquea también los canales sinápticos<sup>7</sup> (Figura 4) y posiblemente los canales de potasio (Figuras 1 y 5) como se observa en concentraciones más bajas que las necesarias para bloquear los canales de sodio en la membrana conductiva<sup>7</sup>.

Como los resultados de este estudio son solamente cualitativos, no se puede saber con certeza si el antagonismo entre la Htx y la Btx es de tipo competitivo o no. Sin embargo, hay una diferencia con el antagonista no-competitivo la tetrodotoxina (Ttx). La Htx impide que la Btx se una con su receptor (Figura 3), mientras que la Ttx no lo hace<sup>13</sup>. Otra diferencia entre la Ttx y la Htx consiste en que la recuperación de la despolarización del tipo "todo o nada" que causa la Btx en presencia de la Ttx depende sólo del estado metabólico de la célula, mientras que la recuperación en presencia de la Htx depende, además, de su concentración.

Albuquerque *et al.*<sup>14</sup> demostraron que aunque la Htx puede unirse con el canal iónico de la sinapsis en su conformación activa y en reposo, tiene afinidad mayor para el estado activo. La Figura 2 muestra el efecto de una concentración baja donde probablemente no todos los receptores para Htx están ocupados. Se puede comparar el efecto al descrito por Albuquerque *et al.*<sup>14</sup> para la sinapsis. La Figura 6 muestra los primeros 6 potenciales provocados del experimento que aparece en la Figura 2. Se debe asumir que la amplitud del potencial de acción corresponde a un número dado de receptores ocupados por la Htx, y que siempre hay receptores libres, porque el potencial de acción no se bloquea como en el caso del experimento de la Figura 1, donde la concentración de la Htx es mayor. Es posible suponer que el efecto de la Htx depende de la actividad y del voltaje. Si esto es así, el primer potencial sería idéntico al control, pero el segundo sería mucho más pequeño. Si el potencial es pequeño, el equilibrio entre los receptores de Htx ocupados y libres se desplaza a favor de los receptores libres y el siguiente potencial de acción es mayor. El ciclo se repite mientras que los receptores libres y ocupados estén en equilibrio.

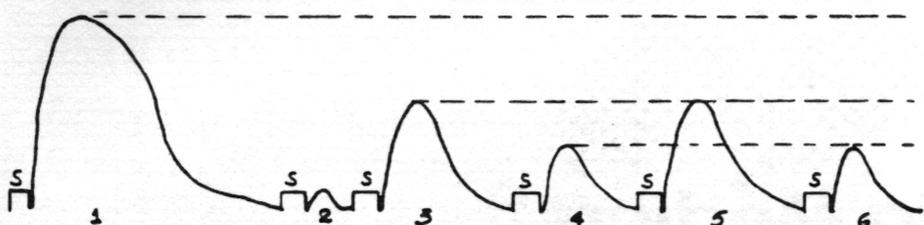


Figura 6. Presentación esquemática de los primeros potenciales de acción de la Figura 2.

En la sinapsis la Htx es más potente a pH 7 que a pH 8.8, mientras que en la membrana conductiva la Htx es más potente en pH alcalino. Esto la hace distinta de los anestésicos locales que son más potentes en pH ácido en la sinapsis y en la membrana conductiva del electrocito<sup>15</sup>. El pH de la Htx es 9. Podría ser que el canal de sodio reaccionara preferiblemente con la forma no ionizada de la Htx; o que la Htx pueda penetrar solamente por la vía de la fase lípida a su sitio de unión dentro del canal de sodio.

Al comparar los efectos de la Htx con la acción del anestésico local tetracaína sobre los parámetros eléctricos del electrocito se notan similitudes y diferencias. Las primeras son:

1. Inhibición no competitiva de la despolarización inducida por carbamilcolina<sup>7</sup>.
2. Bloqueo del potencial de acción en concentraciones mayores que las efectivas en las sinapsis.
3. Inhibición del efecto de la batracotoxina distinta de la tetrodotoxina<sup>12</sup>.
4. Potencia mayor en pH ácido que en pH básico de su efecto sináptico.

Las diferencias son:

1. Efecto mayor de la Htx en pH básico en la membrana conductiva.

2. Bloqueo del potencial de acción dependiente del uso.
3. Aumento en la duración del potencial de acción en concentraciones bajas.

La estructura química de la Htx es más compleja y su liposolubilidad es mayor que la de la tetracaína<sup>4</sup>. Por tanto la Htx podría tener acceso a su sitio de unión dentro del canal de sodio solamente por la vía de los lípidos de la membrana y durante la activación cuando los canales de sodio están abiertos. Esto explicaría el efecto que depende de la actividad y la diferente dependencia del pH sobre el potencial de acción comparado con los anestésicos locales.

## SUMMARY

Histrionicotoxin (Htx) blocks the directly evoked action potential of the electroplax. This blockade is concentration, use-, and pH-dependent. Htx antagonizes the effects of batrachotoxin (Btx) which indicates that it acts on the action potential sodium channels. The pH-dependency of the effect of Htx on the synapse is different from that on the directly evoked action potential; at the synapse Htx is more potent at pH 7.0 than at pH 8.8 while at the conducting membrane its potency is higher at pH 8.5 than at pH 6.4.

The effect of Htx on the electroplax is very similar to that of local anesthetics with three exceptions: a) The stronger effect at basic pH at the conducting membrane. b) The use-dependency of the blockade of the action potential. The prolongation of the action potential at low concentrations.

## REFERENCIAS

1. Grunhagen, H.H., Dahl, G. y Reiter, P.: Tetrodotoxin receptors in membrane fragments. Purification from *Electrophorus electricus* electroplax and binding properties. *Biochim Biophys Acta* 612: 267-285, 1981.
2. Marlock, N.L., Benamy, D.A. y Grundfest, H.: Analysis of spike electrogenesis of eel electroplaques with phase plane and impedance measurements. *J. Gen Physiol* 52: 122-144, 1968.
3. Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S. y Raftery, M.A.: Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proc Natl Acad Sci* 75: 2606-2610, 1978.
4. Daly, J.W., Karle, I., Myers, Ch., Tokuyama, T., Waters, J.A. y Witkop, B.: Histrionicotoxins: Roentgen-ray analysis of the novel allenic and acetylenic spiroalkaloids isolated from a Colombian frog, *Dendrobates histrionicus*. *Proc Natl Acad Sci* 68: 1870-1975, 1971.
5. Lapa, A.J., Albuquerque, E.X., Sarvey, J.M., Daly, J.W. y Witkop, B.: Effects of histrionicotoxin on the chemosensitive and electrical properties of skeletal muscle. *Exp Neurol* 47: 558-580, 1975.
6. Eldefrawi, M.E., Aronstam, R.S., Bakry, N.M., Eldefrawi, A.T. y Albuquerque, E.X.: Activation, inactivation and desensitization of acetylcholine receptor channel complex detected by binding of perhydrohistrionicotoxin. *Proc Natl Acad Sci* 77: 2309-2313, 1980.
7. Kato, G. y Changeux, J.P.: Studies on the effect of histrionicotoxin on the monocellular electroplax from *Electrophorus electricus* and on the binding of <sup>3</sup>H-acetylcholine to membrane fragments from *Torpedo marmorata*. *Mol Pharmacol* 12: 92-100, 1976.
8. Sobel, A., Heidmann, T., Hofler, J. y Changeux, J.P.: Distinct protein components from *Torpedo marmorata* membranes carry the acetylcholine receptor site and the binding site for local anesthetics and histrionicotoxin. *Proc Natl Acad Sci* 75: 510-514, 1978.
9. Bartels, E.: Relationship between acetylcholine and local anesthetics. *Biochim Biophys Acta* 109: 194-203, 1965.

10. Schwarz, W., Palade, P.T. y Hille, B.: Local anesthetics effects of pH on use-dependent block of sodium channels in frog muscle. **Biophys J** 20: 343-368, 1977.
11. Schoffeniels, E. y Nachmansohn, D.: An isolated single electroplax preparation. I. New data on the effect of acetylcholine and related compounds. **Biochim Biophys Acta** 26: 11-15, 1957.
12. Bartels, E., Rosenberry, T. y Daly, J.W.: Effect of batrachotoxin on the electroplax of electric eel: Evidence for voltage-dependent interaction with sodium channels. **Proc Natl Acad Sci** 74: 951-955, 1977.
13. Bartels, E., Llano, M.I. y Díaz, E.: Algunos efectos de la batracotoxina sobre las electroplacas de la anguila eléctrica y su antagonismo con anestésicos locales. **Acta Med Valle** 6: 74-80, 1975.
14. Albuquerque, E.X., Adler, C., Spivak, E. y Aguayo, L.: Mechanism of nicotinic channel activation and blockade. **Ann NY Acad Sci** 358: 204-238, 1980.
15. Rosenberg, P., Higman, H.B. y Bartels, E.: The active structure of local anesthetics. Effect on electrical and cholinesterase activity. **Biochim Biohys Acta** 66: 406-414, 1963.



La Corporación Editora Médica del Valle es una corporación sin ánimo de lucro cuyos fines son la publicación y difusión de material tendiente a mejorar el nivel académico de las profesiones afines a la salud en el Valle del Cauca y en el país.

Colombia Médica Editada  
por Carvajal S.A. Publicaciones  
Suscripciones Calle 37 No. 13-08 A.A. 53550  
Bogotá, Colombia