

Dependencia del calcio de la respuesta contráctil de aorta de rata, conejo y cobaya y arteria uterina humana

M.J. García de Boto*, R. Molina, F. Andrés-Trelles y A. Hidalgo

Farmacología. Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
33006 Oviedo (España)

(Recibido el 16 de julio de 1990)

M.J. GARCÍA DE BOTO, R. MOLINA, F. ANDRÉS-TRELLES and A. HIDALGO. *Calcium-Dependence of the Contractile Response of Aortic Strips from Rat, Rabbit and Guinea-pig and Human Uterine Artery*. Rev. esp. Fisiol., 47 (1), 7-12, 1991.

The influence of extracellular Ca^{2+} on the contraction produced by noradrenaline (NA) (3×10^{-6} M), KCl (60 mM) and $BaCl_2$ (30 mM) on human uterine arteries (AUH) and aortic strips from rats, rabbits and guinea-pigs have been studied. The vessels were cut spirally and incubated in Krebs solution containing 2.5 mM Ca^{2+} (KN), 0 mM Ca^{2+} (K-0Ca) or 0 mM Ca^{2+} + 3 mM EDTA (K-EDTA). Both phases (fast and slow) of the response of aortic strips to NA and of the AUH to NA, KCl and $BaCl_2$ were significantly smaller in solutions without Ca^{2+} . Only in rabbit aortic strips the slow phase was significantly more reduced than the fast phase. Overall, the contractions of the rat aortic strips were most resistant to the absence of extracellular Ca^{2+} . These results confirm the variability of the responses of blood vessels from different vascular beds and species to the removal of extracellular Ca^{2+} .

Key words: Blood vessels, Aorta, Rat, Rabbit, Guinea-pig, Human Uterine Artery, Ca.

Se acepta que la contracción del músculo liso vascular se produce como consecuencia de un aumento de la concentración de calcio libre intracelular, debido a entrada de calcio extracelular y/o a movilización del calcio de los depósitos intracelulares. La importancia de uno u otro

mecanismo es variable dependiendo del tipo de contracturante: el KCl y el $BaCl_2$ producen contracción por aumentar la concentración del calcio libre intracelular a través de uno de estos mecanismos preferentemente (1, 3, 5, 14, 18), mientras que la noradrenalina (NA) y demás agonistas adrenérgicos utilizan ambos mecanismos (2, 8, 9, 13, 17, 19, 20). Se ha su-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

gerido que la liberación intracelular produce el componente fásico de la respuesta y la entrada de calcio la contracción mantenida (4, 8, 9, 13, 17, 19, 20). También es conocido que existe variabilidad en la dependencia de uno u otro *pool* de calcio en las respuestas de los vasos sanguíneos de distintos territorios y especies.

En este trabajo se estudia la influencia del calcio extracelular en la contracción de la arteria uterina humana (AUH) y de las aortas de rata, conejo y cobaya inducida por NA, KCl y BaCl₂, con el fin de dilucidar el comportamiento de los cuatro tipos de preparaciones y describir las posibles diferencias entre ellas.

Material y Métodos

Se han utilizado 24 arterias uterinas humanas y 72 aortas, 36 de rata, 18 de conejo y 18 de cobaya. Las arterias uterinas procedían de histerectomías de indicación ginecológica. Se conservaron en suero salino a 4 °C y fueron utilizadas entre 1 y 24 h de su extracción. No se utilizaron arterias de pacientes que hubieran recibido tratamiento hormonal o radiológico previo a la intervención quirúrgica. Las aortas procedían de ratas macho, Wistar, de 250 a 300 g, de conejos macho, neozelandeses, de 2.500 g y de cobayas macho de 350 a 400 g. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación; posteriormente se hacía una toracotomía media por incisión longitudinal; retirado el esófago y los pulmones, se procedía a la extracción de la aorta seccionando a nivel del cayado aórtico y del diafragma.

Los cuatro tipos de vasos sanguíneos, cortados en espiral (10) y en fragmentos de 2,5 × 0,4 cm, se montaron en baño de órganos de 20 ml y se incubaron a 37 °C, gaseados con una mezcla de O₂ (95 %) y CO₂ (5 %). Durante todo el experimento estuvieron sometidos a la tensión de 1 g. El período de estabilización fue, en todos los casos, de 2 h. Los fármacos se añadie-

ron directamente a la copa. Las contracciones se registraron en un polígrafo Omniscribe D-5000 mediante transductores isométricos F1.

La composición de los medios de incubación utilizados fue la siguiente (mM): Krebs control (KN); NaCl, 118; KCl, 4,75; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 1,19; NaHCO₃, 25; MgSO₄, 1,2, y glucosa, 11. Krebs sin calcio (K-0Ca), y Krebs sin calcio + de EDTA 3 mM (K-EDTA).

La pauta experimental seguida en todos los casos fue la siguiente: después de las 2 h de estabilización en KN se obtenía una contracción con NA, 3 × 10⁻⁶M, Sigma, KCl, 60 mM, o BaCl₂, 30 mM. Tras su registro se sustituía el medio de incubación por K-0Ca, en el que permanecían durante 1 h y obtenidas nuevamente las respuestas contráctiles, se volvía a sustituir el medio por K-EDTA en el que, al cabo de 1 h, se inducía una nueva contracción.

Con objeto de descartar las posibles diferencias debidas al tiempo de conservación de las arterias uterinas se estudió la posible variación de las respuestas contráctiles de la aorta de rata por el mantenimiento en suero salino durante 24 h a 4 °C, no apareciendo diferencias entre las respuestas contráctiles de las aortas recién extraídas y las conservadas en refrigeración.

En la evaluación de los resultados se consideró componente fásico de la respuesta el alcanzado a los 45 s de iniciarse la contracción y la respuesta tónica se midió a los 4 min (4), considerando esta respuesta tónica valor 100 %, control. Para comparar la diferente modificación de la respuesta fásica y tónica por la falta de calcio en el medio se obtuvo, en cada experimento, la variación proporcional de la respuesta entre los 45 s y los 4 min en mm de contracción, es decir, respuesta tónica-respuesta fásica dividido por respuesta tónica (fig. 1). Todos los datos se presentan como valores medios ± ESM. La significación estadística se calculó mediante el test de la *t* de Student para datos inde-

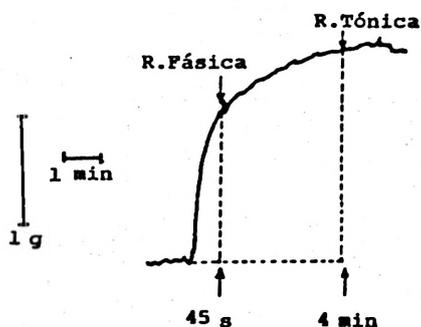


Fig. 1. Contracción inducida por noradrenalina ($3 \times 10^{-6} M$) en arteria uterina humana. Los puntos muestran cuándo se midieron ambas fases en la respuesta.

pendientes, considerando significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

La contracción fásica inducida por NA en los cuatro modelos vasculares ensaya-

dos no difiere significativamente en el porcentaje de amplitud, frente a la contracción tónica alcanzada en Krebs normal. Al incubar las preparaciones en medio sin calcio se reducen significativamente tanto la contracción fásica como la tónica en AUH y aorta de conejo, pero no en las otras dos preparaciones. Cuando la contracción se induce en un medio sin calcio y con EDTA se reducen ambas fases de la contracción en todos los modelos ensayados (fig. 2). En ningún caso se modificó significativamente la relación entre la respuesta tónica y la fásica (tabla I).

La contracción fásica de la respuesta a K^+ en KN es similar, en porcentaje de respuesta, a la producida por NA, excepto en aorta de conejo. En AUH se reducen ambos componentes al incubar en medio K-OCa y en K-EDTA. En aorta de cobaya también se modifican ambos componentes, aunque con menor intensidad. En aorta de conejo disminuye únicamente la respuesta tónica y en aorta de rata ninguno de los dos componentes se afecta al modificar la composición del medio (fig. 3). La relación entre la respuesta tónica y la

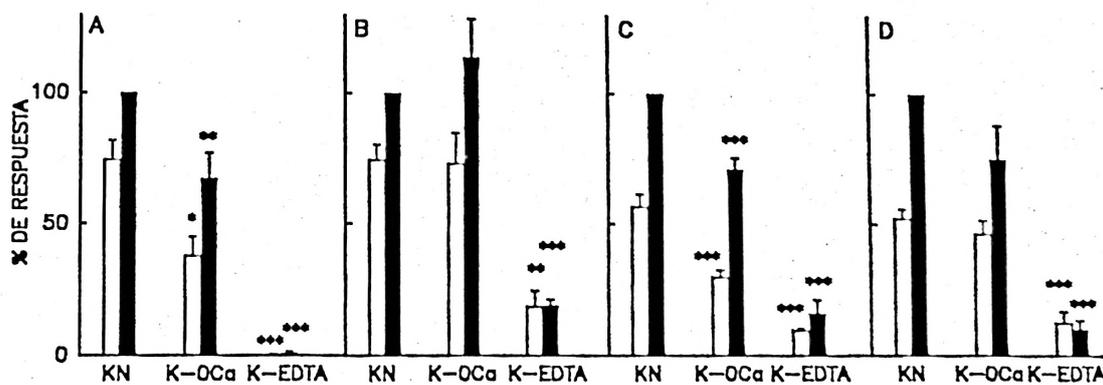


Fig. 2. Respuestas contráctiles de la arteria uterina y de las aortas a noradrenalina ($3 \times 10^{-6} M$) en los distintos medios.

(A) AUH, (B) aortas de rata, (C) conejo y (D) cobaya. (KN) Krebs normal; (K-OCa) Krebs sin calcio; (K-EDTA) y Krebs sin calcio + 3 mM de EDTA. En cada caso se valoró 100 % la respuesta tónica en medio KN. (□) respuesta fásica; (■) respuesta tónica. Las barras verticales representan el ESM para un mínimo de 6 datos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla I. Variaciones en la respuesta a NA, KCl y BaCl₂ de la arteria uterina humana (AUH) y aortas de rata, conejo y cobaya por las modificaciones de calcio en el medio.

Relación Respuesta tónica-Respuesta fásica/Respuesta tónica, en mm de contracción (media ± ESM, n ≥ 6, * p < 0,001); KN, Krebs normal (2,5 mM de Ca²⁺); K-OCa, Krebs sin calcio; K-EDTA, Krebs sin calcio + EDTA 3 mM.

	Medio	AUH	Aorta de rata	Aorta de conejo	Aorta de cobaya
NA (3×10 ⁻⁶ M)	KN	0,263 ± 0,07	0,353 ± 0,04	0,434 ± 0,04	0,476 ± 0,03
	K-OCa	0,431 ± 0,07	0,311 ± 0,07	0,437 ± 0,02	0,339 ± 0,07
	K-EDTA	0,416 ± 0,20	-0,363 ± 0,45	0,244 ± 0,14	0,337 ± 0,54
KCl (60 mM)	KN	0,369 ± 0,04	0,300 ± 0,03	0,562 ± 0,04	0,561 ± 0,02
	K-OCa	0,691 ± 0,06*	0,220 ± 0,03	0,340 ± 0,04*	0,439 ± 0,04
	K-EDTA	0,740 ± 0,07*	0,159 ± 0,11	0,312 ± 0,04*	0,348 ± 0,05
BaCl ₂ (30 mM)	KN	0,541 ± 0,04	0,338 ± 0,08	0,732 ± 0,02	0,616 ± 0,02
	K-OCa	0,617 ± 0,06	0,372 ± 0,11	0,475 ± 0,04*	0,583 ± 0,06
	K-EDTA	0,400 ± 0,09	0,094 ± 0,25	0,458 ± 0,06*	0,589 ± 0,05

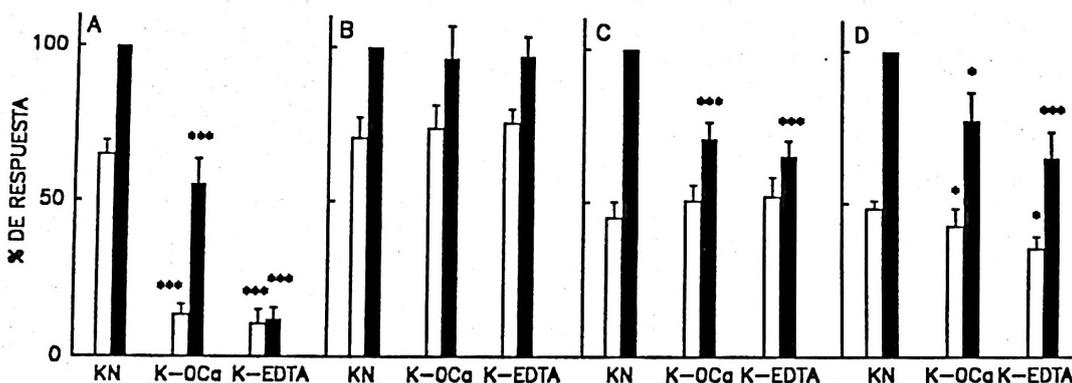


Fig. 3. Respuestas contráctiles de la arteria uterina humana (A), aortas de rata (B), conejo (C) y cobaya (D) a KCl (60 mM) en distintos medios. Abreviaturas y símbolos como en la figura 2.

respuesta fásica se modifica significativamente en aorta de conejo, siendo menor en medios sin calcio y en AUH, donde es significativamente mayor (tabla I).

El porcentaje de respuesta fásica en las contracciones inducidas por BaCl₂ en KN es inferior al 50 % de la respuesta total, excepto en aortas de rata. La supresión de calcio del medio y el tratamiento con

EDTA reduce ambos componentes en la respuesta de la AUH y el componente tónico en aorta de conejo. No se modifican las contracciones de aorta de rata y de cobaya (fig. 4). La relación entre respuesta tónica y respuesta fásica sólo se modifica significativamente en aortas de conejo incubadas en ambos medios sin calcio (tabla I).

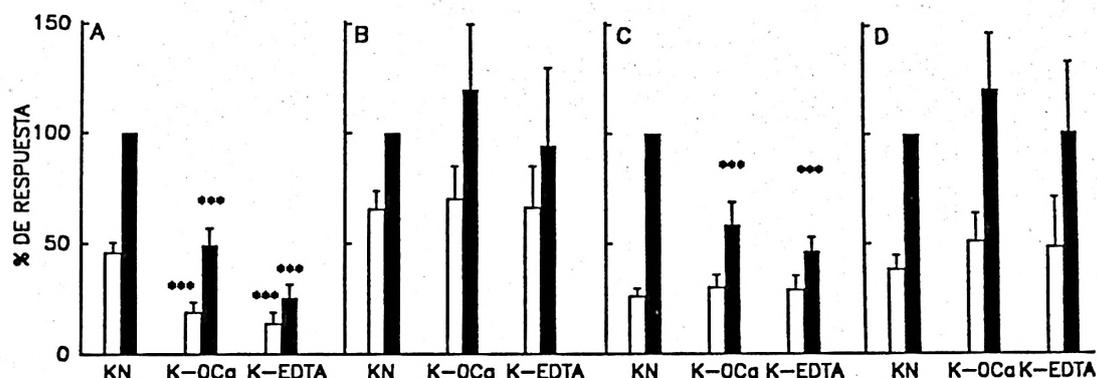


Fig. 4. Respuestas contráctiles de la arteria uterina humana (A), aortas de rata (B), conejo (C) y cobaya (D) a $BaCl_2$ (30 mM) en distintos medios. Abreviaturas y símbolos como en la figura 2.

Discusión

La contracción inducida por los agonistas ensayados es similar en las cuatro especies. En cada caso es posible diferenciar una fase de ascenso rápido (respuesta fáscica) seguida de una contracción mantenida (respuesta tónica) aun cuando, a diferencia de lo descrito por algunos autores (13), no se manifiesta inflexión en el registro entre una y otra fase. Todas las respuestas se mantienen en administraciones repetidas sin taquifilaxia o agotamiento del órgano.

El hecho de que sólo en algunas de las respuestas se modifique la relación de la variación proporcional entre la respuesta tónica y la fáscica sugiere que ambas fases de la respuesta se producen por utilización de calcio de la misma fuente. Únicamente las respuestas tónicas de las aortas de conejo a potasio y bario y las fáscicas a potasio de la AUH sugieren una mayor dependencia de calcio extracelular.

La supresión del calcio extracelular produce modificaciones diferentes en los territorios vasculares ensayados y en las contracciones inducidas por NA, KCl y $BaCl_2$. La contracción inducida por NA parece claramente dependiente de calcio

extracelular, sobre todo en AUH y aorta de conejo, si bien el calcio intracelular tiene una participación en la contracción ya que se mantiene una contracción residual a NA en medios sin calcio y con EDTA. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores (6, 7, 13) y corroboran datos previos en AUH (11).

La contracción por KCl, en AUH, depende casi exclusivamente del calcio extracelular, y confirma la inhibición por bloqueantes de los canales de calcio (11). El calcio extracelular también participa en las respuestas de aorta de cobaya y en la fase tónica de la de conejo. Sorprendentemente, la contracción por KCl en aorta de conejo y cobaya es aproximadamente el 70 % en preparaciones tratadas con EDTA, lo que sugiere una importante contribución del calcio intracelular, el cual podría tener un papel relevante en la contracción por KCl en aorta de rata. Aun cuando la contracción por KCl en muchos territorios depende de la entrada de calcio extracelular y se reduce por bloqueantes de la entrada de calcio (15), nuestros resultados sugieren que el calcio intracelular también podría contribuir en la contracción por KCl. En concordancia con nuestros resultados se han descrito contraccio-

nes por KCl independientes del calcio extracelular, en vena metatarsial de perro y en aorta de rata (12, 16).

La respuesta inducida por bario, atribuida clásicamente a liberación de calcio intracelular (3), parece más bien producirse por activación de canales dependientes del voltaje, con la consiguiente entrada de calcio (14). En su ausencia, el bario podría penetrar en la célula, a través de estos canales e inducir contracción (14). Este mecanismo puede estar involucrado en las respuestas de la aorta de rata y de cobaya puesto que no se modifican por falta de calcio y la presencia de EDTA. En cambio, en AUH y aorta de conejo, aun cuando puede haber contribución de calcio intracelular, el mayor componente de la respuesta depende de la entrada de calcio extracelular.

Agradecimientos

Agradecemos al Servicio de Ginecología y Obstetricia de la Residencia Sanitaria Covadonga de Oviedo, su colaboración en la obtención de las arterias uterinas humanas.

Resumen

Se estudia la influencia del calcio extracelular en las contracciones inducidas por noradrenalina (NA) (3×10^{-6} M), KCl (60 mM) y BaCl₂ (30 mM) en arteria uterina humana (AUH) y aortas de rata, conejo y cobaya. Todos los vasos sanguíneos se cortan en espiral y se incuban en baño de órganos en solución de Krebs normal (KN, 2,5 mM de Ca²⁺), Krebs sin calcio (K-0Ca) y Krebs sin calcio + EDTA 3 mM (K-EDTA). Las respuestas fásica y tónica de las aortas a la NA y de las AUH a la NA, KCl y BaCl₂, son significativamente menores en medios sin calcio que en medios KN. En general, las respuestas contráctiles de la aorta de rata resultan más resistentes a la ausencia de calcio en el medio. Sólo en aorta de conejo las respuestas tónicas resultan significativamente menores que las fásicas en los medios sin calcio. Estos resultados confirman la gran variabilidad de las

respuestas de los vasos sanguíneos de distinto territorio y especie a la falta de calcio en el medio.

Palabras clave: Músculo liso vascular, Aorta, Rata, Conejo, Cobaya, Arteria uterina humana, Ca.

Bibliografía

1. Bando, T., Aizu, M., Sakato, U. y Yanagisawa, M.: *Folia Pharmac. Jpn.*, 66, 89, 1970.
2. Bohr, D. F.: *Science*, 139, 597-604, 1963.
3. Bohr, D. F.: *Pharmacol. Rev.*, 16, 85-111, 1964.
4. Bohr, D. F.: En «Uterine and placental blood flow» (Moawad, A. H. y Lindheimer, M. D., eds.). Masson Publ. USA Inc. Nueva York. 1984. pp. 73-82.
5. Bohr, D. F. y Uchida, E.: *Can. Med. Assoc. J.*, 90, 174-179, 1964.
6. Caastels, R., Raeymaekers, L. y Suzuki, H.: *J. Physiol.*, 331, 33-34, 1981.
7. Cauvin, C., Saida, K. y van Breemen, C.: *Blood vessels*, 21, 23-31, 1984.
8. Deht, R. y van Breemen, C.: *Pflügers Arch.*, 348, 13-22, 1974.
9. Deht, R. y van Breemen, C.: *J. Membr. Biol.*, 30, 363-368, 1977.
10. Furchgott, R. F. y Bhadrakom, S.: *J. Pharmac. exp. Ther.*, 108, 129-143, 1953.
11. García de Boto, M. J., Hidalgo, A. y Andrés-Trelles, F.: *Res. Commun. Chem. Patol. Pharmacol.*, 50, 361-364, 1988.
12. Greenberg, S., Long, J. P. y Diecke, F. P. J.: *J. Pharmac. exp. Ther.*, 185, 493-504, 1973.
13. Heaslip, R. J. y Rahwan, R. G.: *J. Pharmac. exp. Ther.*, 221, 7-13, 1982.
14. Karaki, H., Satake, N. y Shibata, S.: *Br. J. Pharmac.*, 88, 821-826, 1986.
15. Karaki, H. y Weiss, G. B.: *Life Sci.*, 42, 111-122, 1988.
16. Krishnamurthy, V. S. K. y Grollman, A.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 220, 180-188, 1976.
17. Sitrin, M. D. y Bohr, D. F.: *Am. J. Physiol.*, 220, 1124-1128, 1971.
18. Somlyo, A. P. y Somlyo, A. V.: *Pharmacol. Rev.*, 20, 197-272, 1968.
19. Steinsland, O. S., Furchgott, R. F. y Kirpekar, S. M.: *Circ. Res.*, 32, 49-58, 1973.
20. Van Breemen, C. B., Farinas, B. R., Gerba, P. y Mc-Naughton, E. D.: *Circ. Res.*, 30, 44-53, 1972.