

Papel del calcio sobre la contracción inducida por potasio y noradrenalina en rumen de oveja

M. P. Arruebo*, A. I. Alcalde y D. Murillo

Departamento de Fisiología
Facultad de Veterinaria
50013 Zaragoza (Spain)

(Recibido el 4 de noviembre de 1986)

M. P. ARRUEBO, A. I. ALCALDE and D. MURILLO. *Calcium on the Contractile Responses Induced by High K⁺ Solutions and Noradrenaline in Sheep Rumen*. Rev. esp. Fisiol., 43 (3), 365-370, 1987.

The effect of calcium on the contractile responses induced by high K⁺ solutions and noradrenaline has been investigated. Ca²⁺-free-solutions and two selective antagonists of calcium channels (verapamil and sodium nitroprusside) have been used. Both types of responses were inhibited by Ca²⁺-free-solutions. Contractions induced by high K⁺ solutions were inhibited by verapamil, but not by sodium nitroprusside. However, the responses to noradrenaline were specifically inhibited by sodium nitroprusside. These results suggest that in rumen circular smooth muscle of the sheep there are two types of calcium channels, a voltage-dependent Ca²⁺ channel and receptor-linked Ca²⁺ channel.

Key words: Rumen circular smooth muscle, Calcium channels.

La contracción en las células musculares lisas se desencadena por un incremento de la concentración de calcio en el citosol. La concentración citoplasmática de calcio aumenta porque el calcio entra del medio extracelular o porque es descargado de los reservorios intracelulares, por ello se ha sugerido la existencia de dos tipos de canales de calcio en la membrana celular: un canal voltaje-dependiente que es activado por la despolarización de la membrana, y otro canal receptor-dependiente, que se activa por la unión de agonistas a receptores específicos de la membrana (2). Los bloqueantes orgánicos

del calcio, entre los que incluye el verapamil, actúan como inhibidores selectivos de los canales voltaje-dependientes (2, 8, 11), el nitroprusiato sódico, sin embargo, actúa como inhibidor selectivo de los canales receptor-dependientes (6). Existen pocos datos acerca de la participación del calcio en los procesos de excitación-contracción en el músculo liso de los preestómagos de los rumiantes.

En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto del calcio y sus antagonistas sobre la actividad contráctil inducida por soluciones con alta concentración de K⁺ y por la noradrenalina en el músculo liso circular del rumen, en un intento de clarificar la influencia del calcio en la producción de la contracción, y qué canales están implicados.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Las muestras, procedentes del Madero Municipal, se tomaban del saco dorsal del rumen de oveja inmediatamente después del sacrificio del animal y se transportaban al laboratorio en líquido nutritivo refrigerado (Ringer Tyrode). Se eliminaba la mucosa y se cortaban preparaciones de unos 15 mm de longitud por 5 mm de anchura en dirección de las fibras musculares circulares. Las preparaciones se llevaban a un baño de órganos a 37°C y eran sometidas a una tensión en reposo de 2 g, dejándose durante 1 h para su estabilización.

En los experimentos en los que se utilizaron soluciones Ringer Tyrode sin calcio, éstas se preparaban por sustitución equimolar del CaCl_2 por NaCl . Las soluciones con alta concentración de K^+ se prepararon por sustitución de 60 mM de NaCl del Ringer Tyrode por una concentración equimolar del KCl (solución isoosmótica 62,68 mM de K^+). Las soluciones se gaseaban con una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 .

Los registros se realizaron mediante un transductor isométrico Stantham, conectado a un dinógrafo Beckman R-511.

Las sustancias inhibitoras se añadieron 20 min antes de aplicar los agonistas o en el momento en que la contracción inducida por dichos agonistas alcanzaba un tono constante.

Los fármacos utilizados eran de Sigma.

Resultados

Respuesta a las soluciones con alta concentración de K^+ . — Las respuestas contráctiles inducidas por el K^+ 62,68 mM son de tres tipos: contracción tónica, contracción fásica seguida de relajación, o aparición de contracciones fásicas de motilidad.

La permanencia de la muestra durante 20 min en el líquido nutritivo sin calcio

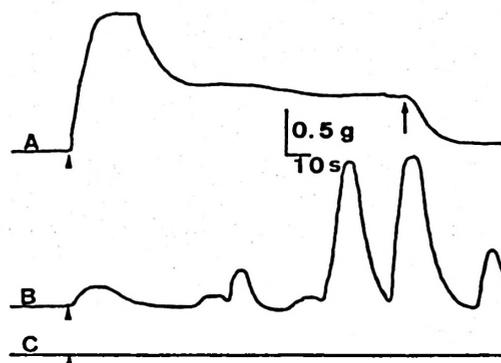


Fig. 1. Efecto del verapamilo 10^{-6} M sobre la respuesta al K^+ 62,68 mM.

▲: CLK. A: ↑: Adición de verapamilo. B: Respuesta control al K^+ . C: Respuesta tras la incubación con verapamilo.

impide la producción de las respuestas inducidas por el K^+ . La inhibición es del 100% en todos los casos, por lo que no es necesario añadir ningún agente quelante del calcio, y es reversible dado que se recupera tras el lavado y posterior incubación con líquido nutritivo con Ca^{2+} 1,8 mM, durante 20 min.

En las preparaciones que responden al K^+ con una contracción tónica, al añadir

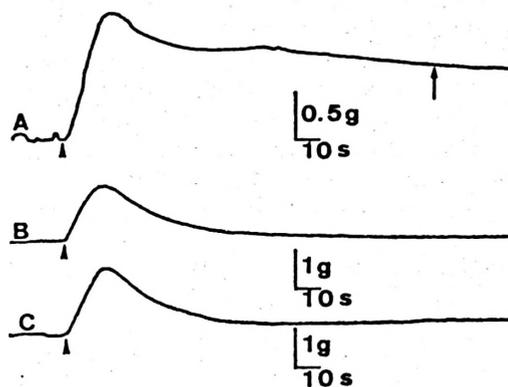


Fig. 2. Efecto del nitroprusiato sódico 10^{-6} M sobre la respuesta al K^+ 62,68 mM.

▲: CLK. A: ↑: Adición de nitroprusiato sódico. B: Respuesta control al K^+ . C: Respuesta tras incubación con nitroprusiato sódico.

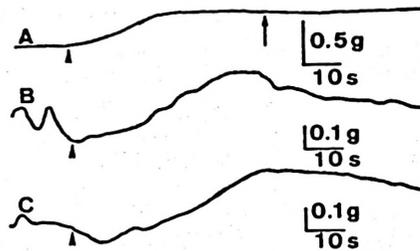


Fig. 3. Efecto del verapamilo 10^{-6} M sobre las respuestas a la noradrenalina.

▲: Noradrenalina 10^{-4} M. A: ↑: Adición de verapamilo. B: Respuesta control a la noradrenalina. C: Respuesta tras la incubación con verapamilo.

el verapamilo 10^{-6} M se produce una inmediata relajación ($n = 15$) (fig. 1, A); el nitroprusiato sódico no modifica el tono ($n = 9$) (fig. 2, A).

En presencia de verapamilo mantenido en incubación durante 20 min, la respuesta al K^+ se anula totalmente ($n = 11$) (fig. 1, B y C); en las mismas condiciones el nitroprusiato sódico 10^{-6} M no produce inhibición ($n = 8$) (fig. 2, B y C).

Respuestas a la noradrenalina. — El efecto de la noradrenalina 10^{-4} M sobre las preparaciones es de tipo excitatorio, registrándose tres tipos distintos de contracciones: una sostenida de tipo tónico, una fásica seguida de relajación, o un incremento de tono acompañado de aparición de contracciones fásicas de motilidad.

Estas respuestas se anulan, incubando las preparaciones durante 20 min en medios sin calcio. La inhibición es en todos los casos del 100% ($n = 10$), por lo que tampoco es necesario añadir agentes quelantes del calcio.

En las preparaciones que responden con una contracción tónica, al añadir verapamilo (10^{-6} M) no se produce ninguna modificación (fig. 3, A), mientras que el nitroprusiato sódico (10^{-6} M) produce una inmediata relajación con pérdida del

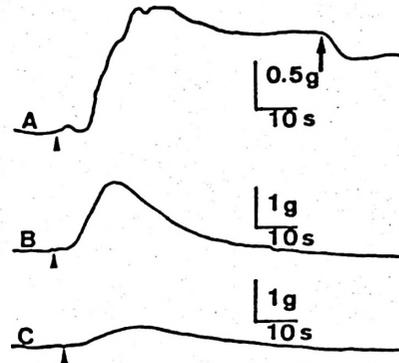


Fig. 4. Efecto del nitroprusiato sódico 10^{-6} M sobre las respuestas a la noradrenalina.

▲: Noradrenalina 10^{-4} M. A: ↑: Adición de nitroprusiato sódico. B: Respuesta control a la noradrenalina. C: Respuesta tras la incubación con nitroprusiato sódico.

tono ($n = 15$) (fig. 4, A). Con incubaciones de 20 min en estos dos antagonistas, el verapamilo no afecta la producción de la respuesta (fig. 3, B y C), mientras que el nitroprusiato sódico la disminuye claramente (fig. 4, B y C).

Por último se estudia el efecto de la tetrodotoxina (TTX) para determinar si la respuesta a la noradrenalina está mediada por el sodio ($n = 10$). En ningún caso resulta afectada dicha respuesta, tras la incubación con TTX durante 15 min.

Discusión

En el músculo liso de aorta de conejo las soluciones con alta concentración de K^+ actúan despolarizando la membrana e induciendo respuestas contráctiles (7); en el músculo liso vascular esta contracción es anulada en medios sin calcio (1, 4). En preparaciones ruminales de oveja el K^+ en altas concentraciones provoca respuestas contráctiles que son bloqueadas en medios sin calcio. Estos resultados sugieren que el calcio extracelular es necesario para inducir la respuesta, mientras que el

calcio almacenado intracelularmente no participa en la misma.

El verapamilo produce un efecto inhibitorio sobre las respuestas inducidas por altas concentraciones de K^+ y el nitroprusiato sódico no altera la respuesta, sugiriendo que el calcio entra en la célula a través de los canales voltaje-dependientes y no por los canales receptor-dependientes.

La noradrenalina, en el músculo liso de aorta de conejo provoca contracciones sin producir cambios sensibles en el potencial de membrana; sin embargo, en otros músculos lisos vasculares, las contracciones inducidas por noradrenalina no se anulan en soluciones sin calcio, sino que es necesario la adición de agentes quelantes del calcio, EGTA (ácido etilenglicol-tetraacético) o EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) los cuales eliminan la fracción de calcio extracelular ligado a la membrana (4, 5, 10). En el presente trabajo, la noradrenalina produce respuestas contráctiles que son anuladas en soluciones sin calcio, sin adición de un quelante y además la TTX no inhibe la respuesta. Por ello, se podría concluir que el calcio extracelular participa en la respuesta. Estos resultados se contradicen con los obtenidos en aorta de rata que sugieren que las respuestas contráctiles a la noradrenalina son debidas a la liberación del calcio intracelular.

La contracción inducida por la noradrenalina es resistente al verapamilo e inhibida por el nitroprusiato sódico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por MILANOV *et al.* (8), realizados en rumen de oveja y utilizando como agonista la acetilcolina. Para estos autores la contracción inducida por la acetilcolina se anulaba en medios sin calcio y era inhibida por el nitroprusiato sódico y resistente al verapamilo y al D-600 (metoxiverapamilo). Así, se podría concluir que ambos agonistas, noradrenalina y acetilcolina, actúan activando los canales receptor-dependientes, permitiendo la en-

trada de calcio a la célula para producir la contracción.

En conclusión, el músculo liso circular del rumen de oveja posee dos tipos de canales de calcio: un canal voltaje-dependiente, activado por soluciones con alta concentración de K^+ y antagonizado por el verapamilo, y otro canal receptor-dependiente, activado por la noradrenalina e inhibido por el nitroprusiato sódico. Incluyéndose el músculo circular ruminal en el grupo de músculos lisos tipo I propuestos por KARAKI y WEISS (6), según el tipo de canales de calcio.

Resumen

Se estudia en preparaciones musculares circulares de saco dorsal de rumen de oveja el efecto del calcio sobre las respuestas contráctiles isométricas inducidas por soluciones con altas concentraciones de K^+ y por noradrenalina. Se utilizan soluciones sin calcio y como antagonistas del calcio verapamilo y nitroprusiato sódico. En ausencia de calcio se inhiben ambas respuestas. El verapamilo actúa únicamente antagonizando las contracciones inducidas por el K^+ y el nitroprusiato sódico las inducidas por la noradrenalina. Los resultados sugieren que en el músculo liso del rumen de oveja existen dos tipos de canales de calcio: uno voltaje-dependiente, activado por soluciones con altas concentraciones de K^+ , y otro receptor-dependiente activado por la noradrenalina.

Palabras clave: Músculo liso circular del rumen, Canales de calcio.

Bibliografía

1. Bohr, D. F.: *Science*, 139, 597-599, 1963.
2. Bolton, T. B.: *Physiol. Rev.*, 59, 606-718, 1979.
3. Godfraind, T. y Kaba, A.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Thér.*, 196 (suppl.), 35-49, 1972.
4. Hudgins, P. M. y Weiss, G. B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 159, 91-97, 1968.
5. Karaki, H., Kubota, H. y Urakawa, N.: *Eur. J. Pharmacol.*, 56, 237-245, 1979.
6. Karaki, H. y Weiss, G. B.: *Gastroenterology*, 87, 960-970, 1984.
7. Mekata, F.: *J. Physiol. (London)*, 258, 269-278, 1976.

8. Milanov, M. P., Stoyanov, I. N. y Boev, K. K.: *Gen. Pharmac.*, 15, 99-105, 1984.
9. Triggle, D. J.: En «New perspectives on calcium antagonists» (Weiss, G. B. ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, 1981, pp. 1-18.
10. Turlapaty, P. D. M. V., Hester, R. K. y Carrier, O.: *Blood Vessels*, 13, 193-209, 1976.
11. Weiss, G. B.: En «New perspectives on calcium antagonists». Williams & Wilkins, Baltimore, 1981, pp. 83-94.

