



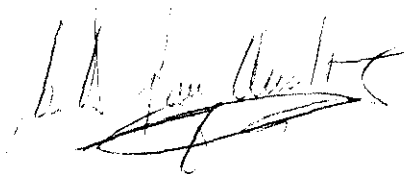
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA Y FARMACOLOGIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFLUENCIA DEL CALCIO EN LA CONTRACCION DEL MUSCULO LISO  
DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR BOVINA

M. DOLORES SAN ANDRES LARREA

INFLUENCIA DEL CALCIO EN LA CONTRACCION DEL MUSCULO LISO  
DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR BOVINA

TRABAJO QUE PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR  
EN VETERINARIA PRESENTA LA LICENCIADA Dña.  
M. DOLORES SAN ANDRES LARREA



Fdo.: M. Dolores San Andrés Larrea

MADRID, DICIEMBRE 1992

D. Manuel Ignacio San Andrés Larrea, Profesor Titular de Farmacología y Terapéutica Veterinaria y Dña. Casilda Rodríguez Fernández, Profesora Titular Interina de Escuelas Universitarias de Farmacología y Terapéutica Veterinaria, ambos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. María Dolores San Andrés Larrea con el título "Influencia del calcio en la contracción del músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina" ha sido realizada bajo nuestra dirección, en los laboratorios de la Cátedra de Farmacología.

Madrid, Diciembre de 1992

  
Fdo.: M.I. San Andrés Larrea

  
Fdo.: C. Rodríguez Fernández

A mis padres

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento y cariño, en primer lugar a mis Directores, Casilda Rodríguez y Manuel San Andrés, por su admirable trabajo de dirección. A Casilda por su tenacidad, su entrega y por todos los ratos buenos y "menos buenos" que hemos compartido durante la realización de este trabajo; a Manolo por saber separar el trabajo de la fraternidad, por su apoyo, su ayuda, y por todo aquello que hace que el trabajo sea sereno.

A D. Emilio Ballesteros por su interés y ayuda constante, además de poner a mi disposición todos los medios necesarios para la realización de este estudio y permitirme formar parte de un maravilloso grupo de trabajo.

A D. Manuel Martínez, por ser la persona que me inició con todo aquello relacionado con la investigación y gracias al cual sigo en este camino.

A todos mis amigos de la Cátedra. A Teresa por contagiarme su inagotable entusiasmo por la investigación y por su alegría. A Emma por su constante disposición de ayuda en todas las cosas "grandes y pequeñas" necesarias

para llevar a término este trabajo. A Mara por su apoyo y por ser ella misma. A Javier, Fernando, Chema, Cristina, Juan Carlos y Rafael, y a todos los demás por darme ánimo y estar dispuestos a trabajar en cualquier momento.

A Isabel, no sólo por su fabuloso trabajo mecanográfico, sino por su paciencia y voluntad de trabajo. A Juan Carlos y a todas aquellas personas de la Cátedra de Biología de las que he dispuesto en todo momento.

A Iñaki por su labor fotográfica.

A todos mis amigos de la Facultad y de la Coral Veterinaria Complutense por animarme y preocuparse por la marcha de este trabajo.

A Juanito, a Jose y a Mariano por su colaboración y apoyo constante.

A mis padres, que siempre han estado a mi lado dándome ánimos y estimulándome para continuar; sin ellos nada sería posible. A mi abuela, a Federico, Lola y Sonia por estar conmigo siempre; a mis sobrinos Federico, Jorge

y Manuel (sin cuya colaboración este trabajo hubiera visto la luz hace meses).

Al personal de la sala de mondonguería del Matadero Municipal de Madrid, por su afabilidad en el trato diario y por su trabajo bien hecho.

A todos vosotros gracias por ser mis amigos, por vuestra ayuda desinteresada y por quererme.





3.2.4.	Contracción inducida por estimulación eléctrica transmural .....	97
3.2.5.	Análisis estadístico de los resultados .....	99
4.	RESULTADOS .....	108
4.1.	RESPUESTA DE LAS PREPARACIONES DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR FRENTE AL KCl .....	109
4.1.1.	Influencia del calcio extracelular .....	110
4.1.2.	Influencia de la adición de Ca <sup>2+</sup> sobre la despolarización (K <sup>+</sup> 42,4 mM) en un medio libre de calcio .....	112
4.2.	RESPUESTA DE LAS PREPARACIONES DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR FRENTE A LA FENILEFRINA .....	129
4.2.1.	Influencia del calcio extracelular .....	129
4.3.	RESPUESTA DE LA PREPARACION DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR FRENTE A E.E.T. ....	137
4.3.1.	Parámetros óptimos de estimulación .....	137
4.3.2.	Influencia del calcio extracelular .....	140
5.	DISCUSION .....	159
5.1.	DISCUSION DEL METODO .....	160
5.2.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS .....	165
5.2.1.	Contracción inducida por KCl .....	165
5.2.2.	Contracción inducida por fenilefrina .....	180
5.2.3.	Contracción inducida por E.E.T. ....	188
6.	CONCLUSIONES .....	202
7.	RESUMEN .....	205
8.	BIBLIOGRAFIA .....	207

## 1.- JUSTIFICACION

En la línea de investigación que se desarrolla en nuestra Cátedra, se encuentra el estudio de la funcionalidad de la gotera reticular y su implicación en procesos farmacocinéticos y terapéuticos.

La gotera reticular es un segmento del canal gástrico, con capacidad para cerrarse y conducir la leche en el animal prerrumiante desde el esófago hasta el abomaso. En el animal adulto, aunque pierde funcionalidad, ésta no desaparece y puede vehicular ciertos fármacos y nutrientes directamente al abomaso.

Es una zona de transición entre músculo estriado (esófago) y músculo liso (rumen-retículo). Además presenta un componente de motilidad refleja y autónoma (células de Auerbach), que en cierto modo la asemejan a la musculatura cardíaca.

En los primeros trabajos realizados en la musculatura lisa del suelo de la gotera reticular bovina, se ha estudiado la motilidad espontánea y los receptores presentes en esta estructura. Un estudio más profundo sobre los mecanismos que regulan su funcionamiento, podría dar lugar a importantes mejoras desde el punto de vista farmacológico y terapéutico, además de servir como un nuevo modelo de experimentación.

Por todas estas razones y teniendo en cuenta la importancia de los movimientos del calcio en el proceso de contracción de la musculatura lisa y que solamente existe un trabajo sobre los mismos (LOPEZ y cols. 1992), pretendemos estudiar la influencia del calcio extracelular (canales de calcio voltaje dependientes y canales de calcio operados por receptor) y de los depósitos intracelulares del mismo en el mecanismo intrínseco de la contracción de este tipo de fibras.

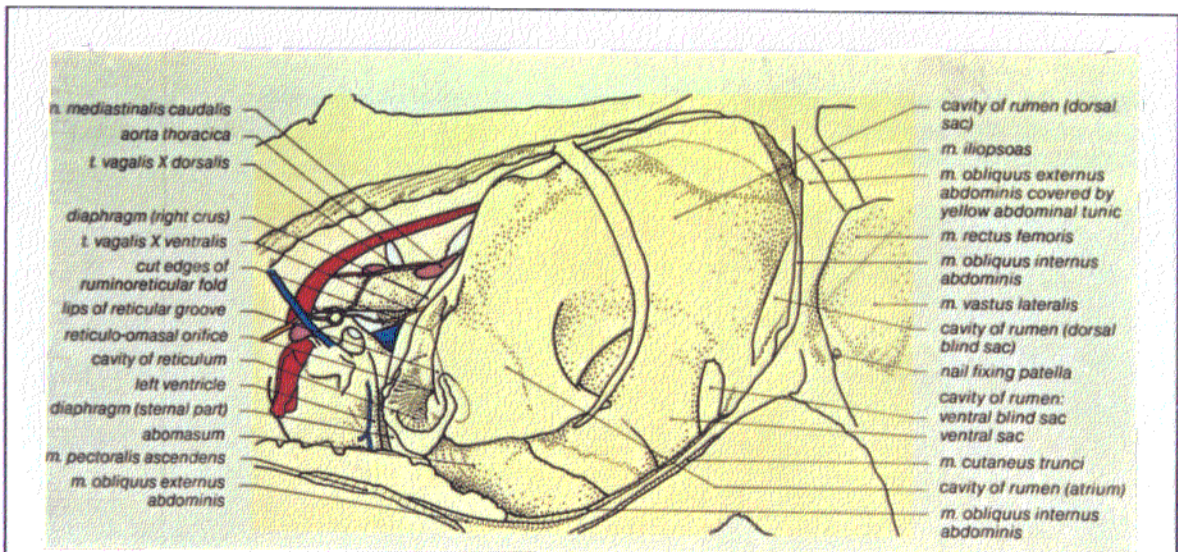
## **2.- REVISION BIBLIOGRAFICA**

## 2.1. GOTERA RETICULAR

### 2.1.1. Anatomía

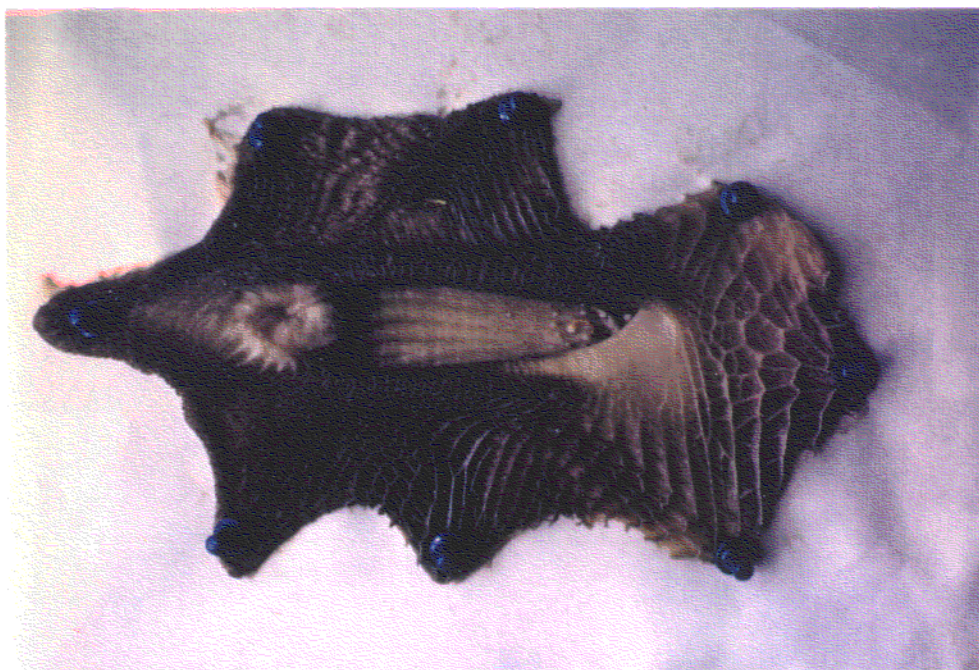
La gotera reticular, gotera esofágica, surco reticular o "sulcus reticuli" es una estructura anatómica que comienza en el cardias y termina en el orificio retículo-omasal; podríamos considerarla como una prolongación del esófago hasta el omaso (Figura 1). Desde 1983 y según la Nómina Anatómica Veterinaria, el "sulcus reticuli" se considera que constituye la primera porción de una estructura anatómica denominada "sulcus ventriculi" o canal gástrico. Es una vía directa para el paso de líquidos y sólidos desde el esófago hasta el abomaso.

El surco reticular está constituido por dos pliegues o labios, derecho e izquierdo ("labium dextrum, labium sinistrum"), en relación a su posición, tomando como punto de referencia el cardias, y entre ambos se encuentra el suelo de la gotera (Figura 2) ("fundus sulci reticuli") (HOFMANN, 1969; SISSON y GROSSMAN, 1982). Tiene una disposición espiral de unos 180<sup>0</sup>, de manera que sus pliegues o labios se proyectan primero caudalmente, luego hacia la izquierda y finalmente adquieren un sentido craneal, invirtiendo su posición relativa en el extremo ventral de forma que, el labio derecho solapa el orificio retículo-omasal, es decir,



**FIGURA 1: Disposición de la gotera reticular en la cavidad abdominal de los bóvidos (ASHDOWN y DONE, 1984).**





**FIGURA 2: Gotera reticular bovina: labios derecho e izquierdo, suelo, cardias y orificio retículo-omasal.**



en su última porción los labios se cruzan y unen formando un rodete muscular denominado esfínter retículo-omasal (HABEL, 1982; KRAHMER, 1982; SEREN, 1975).

La longitud de los labios en el ganado vacuno, según autores, es variable, aunque se mantiene siempre dentro de unos límites. Para SISSON y GROSSMAN (1982), su longitud oscila entre 18-20 cm. Según BRUNI y ZIMMERL (1947) el tamaño de los labios se sitúa entre 15-20 cm y para FLORENTIN (1952), sería de 15-18 cm de longitud por 2-3 cm de grosor (SEREN, 1975; SISSON y GROSSMAN, 1982).

El segundo segmento del canal gástrico se corresponde con el "sulcus omasi" o surco omasal, gotera omasal o canal del librillo, que se extiende desde el orificio retículo-omasal hasta el omaso-abomasal, midiendo entre 10-12 cm de longitud por 3-4 cm de grosor. Presenta una disposición inclinada caudal y ventralmente (HABEL, 1982). El último tercio de esta estructura lo forma el "sulcus abomasi", surco abomasal o canal abomasal, que según NICKEL y WILKINS (1955) es un complejo muscular oblicuo que comienza poco antes del final de la gotera omasal y discurre a lo largo de la pared lateral del abomaso (SEREN, 1975; KRAHMER, 1982; HABEL, 1982).

La inervación de la gotera reticular es llevada a cabo por dos sistemas, uno extrínseco y otro intrínseco. El sistema extrínseco de inervación corre principalmente a cargo de los troncos vagales. Del tronco vagal ventral parten varias ramas que se despliegan por todo el retículo, de forma paralela a las de la arteria reticular. Las ramas que se dirigen al labio izquierdo se originan a partir del mismo. El tronco dorsal del vago desciende unido al plexo simpático sobre la arteria ruminal izquierda, para dirigirse hacia el lado visceral del cuello del omaso, lugar del que parten unas pequeñas ramas, que inervan el labio derecho del surco reticular. Varias ramas grandes se distribuyen en la superficie visceral del retículo (SISSON y GROSSMAN, 1982).

El sistema intrínseco de inervación de la gotera corre a cargo del plexo subseroso, que a su vez posee dos componentes: el plexo mioentérico o de Auerbach y el plexo submucoso o de Meissner. El primero se localiza a nivel de la capa muscular y el segundo a nivel de la túnica submucosa (SCHENK-BABER y cols., 1985).

GIROLAMO (1952) describió que a partir del plexo mioentérico parten haces de fibras que se dirigen hacia la musculatura lisa y estriada. A nivel de la capa externa del músculo liso, adquieren una configuración de abanico, llegando algunas de ellas a la submucosa. En la musculatura

estriada de los bóvidos las placas motoras pueden aparecer expandidas o con morfología lobular (SEREN, 1975).

También procedentes del plexo de Auerbach se demostró en 1956 por FILOTTO, NEGRI y MIRAVAL, la existencia de redes neurofibrilares en las papilas y corpúsculos sensitivos de la submucosa del píloro, orificios omaso-abomasal, retículo-omasal y porción distal de la gotera reticular. Se piensa que juegan un papel muy importante en los procesos de apertura y cierre de los orificios y esfínteres (SEREN, 1975).

PELAGALLI y cols. en 1974, observaron que el componente nervioso vegetativo del plexo mioentérico, está constituido por una densa trama de fibras largas que en sus puntos de ramificación constituyen pequeños ganglios. Así mismo, también observaron pequeñas formaciones ganglionares en la parte central de la fibra muscular longitudinal de los labios de la gotera.

El plexo submucoso se forma a partir de una serie de haces de fibras que se extienden por la submucosa y la lámina propia hasta el epitelio, originando una red amielínica subpapilar y presentando en las fibras, expansiones con forma de arabescos o en corpúsculos de Ruffini simples o ultraexpansivos (PELAGALLI et col., 1974, 1975; HABEL, 1982).

La irrigación sanguínea de la gotera reticular, fue descrita por HABEL en 1970. Depende de una rama de la arteria ruminal izquierda que se denomina arteria reticular, ésta, tras bifurcarse a los 3-4 cm de su origen, se proyecta sobre la curva dorsal del rumen y desciende hacia el surco rumino-reticular para seguir ventralmente hacia el lado derecho del mismo.

La vena ruminal izquierda y la omaso abomásica, que son afluentes de la vena reticular, se encargan del retorno venoso sanguíneo procedente de esta estructura.

SCHUMMER y cols. (1981) describieron que la linfa de la gotera reticular, drena a los linfonódulos reticulares. Estos se sitúan en la superficie dorsal y posterior del retículo, en su zona de transición con el abomaso. Son pequeños nódulos de 0,5-1,5 cm de diámetro y su número oscila entre 1 y 7. Recogen la linfa del retículo y también la procedente de los linfonódulos retículo-abomasales y rumino-abomasales. Desde los linfonódulos reticulares la linfa se dirige hacia los linfonódulos esplénicos o directamente al tronco gástrico, que a su vez drena en el visceral y finalmente en la cisterna del quilo (NICKEL y cols., 1981).

### 2.1.2. Histología

La gotera reticular, desde el punto de vista histológico, presenta cuatro tunicas o capas que son comunes en todas las estructuras del aparato digestivo: mucosa, submucosa, muscular y serosa (SISSON y GROSSMAN, 1982).

La mucosa en los proventrículos de los rumiantes está formada por tres estratos: epitelio escamoso, muscular de la mucosa y la lámina propia. Su coloración es más oscura en los labios que en el suelo, presentando pliegues longitudinales en los primeros y papilas córneas en el segundo, muy próximas al orificio retículo-omasal (LEWIS, 1962).

El epitelio escamoso estratificado que recubre la totalidad del surco reticular, en el caso de los bóvidos, carece de glándulas (SISSON y GROSSMAN, 1982); no siendo así en el ganado lanar que según MUTOH y WAKURI (1988), presenta sobre todo en animales jóvenes, unas glándulas mucosas, serosas y mixtas en el labio izquierdo y alrededor del orificio retículo-omasal, habiendo un predominio de las serosas y mixtas en animales jóvenes y de mucosas en los adultos, siendo su función meramente lubricante.

La túnica muscular de la mucosa es incompleta y menos evidente en el suelo que en los labios; procede de la capa

muscular que reviste el esófago y se continua en forma de túnica completa a nivel del omaso (OSMAN y BERG, 1982). La lámina propia presenta fibras colágenas y elásticas, encontrándose unida a la submucosa de composición semejante, en cuanto al tipo de fibras.

La túnica muscular de los labios está formada por fibras musculares lisas que discurren longitudinalmente, en igual sentido que éstos. Dan lugar a la formación de dos asas, una alrededor del cardias y otra alrededor del orificio retículo-omasal. Lateralmente van a perderse en la capa interna de la túnica muscular del retículo (DELLMAN, 1971).

En el suelo se pueden distinguir una capa muscular interna y otra externa. La interna la conforman fibras musculares lisas transversales al eje mayor de la gotera. Un pequeño número revierte hacia los labios insertándose entre sus fibras longitudinales; las restantes se dirigen hacia la capa externa de la túnica muscular del retículo, para acabar fundiéndose en la misma. La muscular externa del suelo está formada por fibras lisas y estriadas, distribuidas de forma irregular por su estructura. En la zona próxima al cardias hay un predominio de las estriadas y proceden de la musculatura esofágica, apareciendo progresivamente un aumento del tejido liso (DELLMANN, 1971).

### 2.1.2.1. Estructura del músculo liso

El músculo liso presenta una estructura semejante a la del estriado. Estudios de microscopía electrónica y difracción de rayos X, han demostrado que contiene a las proteínas actina y miosina distribuidas en forma de filamentos (LOWY y cols. 1970; SOMLYO y cols. 1973; SHOENBERGZ y HASELGROVE, 1974).

Las moléculas de miosina de la musculatura lisa se presentan constituyendo los filamentos gruesos. Estructuralmente está conformada por un par de cadenas de alto peso molecular, 200.000 daltons y dos pares de cadenas ligeras que tienen un peso de 20.000 y 17.000 daltons respectivamente (HARTSHORNE, 1980). El contenido de miosina es menor que en el músculo estriado, pero a pesar de ésto, es capaz de desarrollar una tensión similar (HARTSHORNE y GORECKA, 1980).

La actina es una proteína globular de 43.000 daltons de peso molecular que se polimeriza en forma de doble filamento para constituir los llamados filamentos delgados (VIBERT y cols, 1982); estos filamentos además de actina contienen tropomiosina y carecen de la troponina presente en el músculo estriado (HARTSHORNE, 1980).

Los cambios de longitud del músculo liso, se deben a fenómenos de unión y separación de la molécula de miosina y los filamentos de actina, formando puentes cruzados que determinan un deslizamiento de los filamentos delgados y gruesos, sin que se modifique su longitud (HUXLEY, 1977).

HARTSHORNE (1980), expuso que la formación de dichos puentes para mantener la misma tensión, requiere un menor gasto de ATP para el músculo liso que para el estriado, debido a que su velocidad de formación es más lenta. SIEGMAN y cols. (1976), al igual que DILLON y cols. (1981) postularon que este menor gasto de ATP se debía a la formación de puentes cruzados fijos, no cíclicos.

En cuanto a la distribución espacial de los filamentos gruesos y delgados de la célula muscular lisa, no ha podido demostrarse la existencia de miofibrillas y sarcómeros separados por líneas Z, ya que bajo microscopía óptica no se aprecia estriación transversal y con el microscopio electrónico no se observa una repetición regular (GABELLA, 1984).

Para GABELLA (1984), los filamentos de actina y miosina durante el reposo, se disponen paralelamente entre ellos, e igualmente con respecto al eje longitudinal de la célula.



SMALL (1974), determinó que estos filamentos forman un ángulo de unos  $10^\circ$  con el eje celular.

Durante la contracción, los filamentos se deslizan permaneciendo paralelos según GABELLA (1984); mientras que SMALL (1974), FAY y cols. (1976) y FISHER y BAGBY (1977) indican que forman ángulos de  $30^\circ$ , e incluso de  $50^\circ$  con el eje celular.

COOKE (1976), sugiere que la distribución de los miofilamentos forma una estructura semejante al sarcómero, debido a la presencia de un citoesqueleto, formado por filamentos intermedios, cuerpos densos y bandas densas. Los cuerpos y bandas densas contienen  $\alpha$ -actinina, que es el principal componente de las líneas Z del músculo esquelético, suponiéndose que su función es similar (JOCKUSH e ISENBERG, 1981). Aunque la función y la distribución exacta del citoesqueleto no son totalmente conocidas, ésta proporciona el soporte necesario a los miofilamentos (GABELLA, 1984).

La relación existente entre células musculares lisas adyacentes, ha sido descrita como una hendidura de unos 100 nm aproximadamente, en la cual se distribuyen fibras de colágeno, elásticas y otros materiales extracelulares, constituyendo el estroma. Entre ambas células existen zonas de contacto que constituyen las llamadas uniones

intercelulares, que pueden ser de dos tipos: uniones de hendidura o nexus y uniones intermedias (HENDERSON, 1975).

Las uniones en hendidura han sido observadas en muchos músculos lisos; se caracterizan por una cercana aposición de las membranas, con un espacio entre ambas de 2-3 nm. Presentan unas subunidades o puentes que podrían corresponderse con los canales iónicos (GOODENOUGH y REVELT, 1970; LITWIN, 1980).

Las uniones intermedias se establecen entre dos bandas densas de células vecinas. Son uniones rígidas, pertenecientes a uniones adherentes, que se encuentran en relación con el citoesqueleto contráctil. Su función es permitir el acoplamiento mecánico entre dos células (GABELLA, 1984).

Finalmente para acabar de describir el aparato contráctil y estructural de la musculatura lisa, hay que mencionar los estudios de GABELLA (1984), que determinan las relaciones existentes entre la membrana de la célula muscular y el estroma. Estas uniones son llevadas a cabo por la lámina basal que rodea la superficie celular y las fibras de colágeno del estroma. También pueden ser realizadas mediante una glucoproteína de 220.000 daltons de peso, que es la fibronectina. La fibronectina aparece alrededor de las

células musculares lisas, vasculares y viscerales (STENMAN y VAHERI, 1978), aunque su función no ha sido totalmente determinada.

### 2.1.3. Embriología

La morfogénesis e histogénesis de la viscera gástrica de los rumiantes ha sido ampliamente estudiada, girando alrededor de aspectos tanto generales, como concretos de este desarrollo (HENRICKSON, 1970; STINSON y CALHOUN, 1976; PANCHAMUKHI y cols. 1975, 1977; PANCHAMUKHI y MUDHOLKAR, 1978; PANCHAMUKHI y SRIVASTAVA, 1982; VIVO y ROBINA, 1990, 1991).

La gotera reticular y sus labios derivan de las crestas mesodérmicas dorsal y ventral (SCHWARZE, 1984). Numerosos autores consideran que los proventrículos de los rumiantes proceden de un estómago primordial simple fusiforme y que no hay ninguna aportación esofágica en dicho desarrollo (PERNKOPF, 1931; MARTIN y SCHAUDER, 1935; HOFMAN, 1969; ELLENBERGER y BRAUM, 1974).

Frente a esta idea de no participación del esófago en la organogénesis de la viscera gástrica de los rumiantes, MUTOH y WAKURI en 1988, demostraron mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica, la similitud existente entre las glándulas presentes en la gotera reticular de la oveja, las glándulas esofágicas bovinas (WAKURI y MUTOH, 1972) y las glándulas de la base del omaso de las cabras (WAKURI, 1980). Estos autores sugieren que el área del surco

reticular que contiene estas glándulas (labio izquierdo y proximidades del orificio retículo-omasal) puede proceder del esófago en la organogénesis de los proventrículos ovinos.

Estudios embriológicos sobre el origen del estómago de los rumiantes han demostrado que las goteras reticular y abomasal se extienden a lo largo de la curvatura menor del primordio simple de los proventrículos, mientras que la omasal está situada en la curvatura mayor. MARTIN y SCHAUDER (1935) y WARNER (1958) describieron que en el primordio de la víscera gástrica de los rumiantes, la gotera primitiva flanqueada por dos crestas, estaba presente desde el cardias hasta el píloro por la curvatura menor. También apuntaban que el asentamiento inicial de las goteras reticular y abomasal coincidía con los segmentos craneal y caudal del surco primitivo y que la gotera omasal se situaba frente a la parte media. Estas observaciones dieron lugar al planteamiento de la hipótesis que apuntaba a que las láminas omasales se extienden y originan a partir del surco gástrico; fue confirmado por KANO y cols en 1988, considerando al omaso una parte aumentada del surco gástrico. Así mismo, en animales adultos, los pliegues de la gotera reticular son el resultado de la unión de los pliegues esofágicos y las láminas omasales.

La histogénesis de la gotera reticular del búfalo (*Bubalus bubalis*) fue determinada por PANCHAMUKHI y SRIVASTAVA en 1982. Sus estudios comprendían todo el desarrollo desde el estado de primodio del individuo, hasta el nacimiento del mismo. Hasta que el embrión alcanzaba un C-R (craneo-caudal o corona-rabadilla) de 2,2 cm, el epitelio del suelo y de los labios fue identificado como un epitelio embrionariamente temprano. En estadíos posteriores hasta un C-R de 3,2 cm fue considerado como un epitelio uniformemente distribuido, y a partir de este momento se apreciaba una clara diferenciación en dos estratos: basal y superficial. El estrato basal del suelo, cuando la longitud del C-R del feto era de 10,2 cm, sufría evaginaciones para dar lugar a la aparición de pliegues longitudinales. A C-R 25,5 cm, el estrato basal de los labios formaba papilas. Tanto los pliegues como las papilas estaban constituidas por la lámina propia, la muscular de la mucosa y la submucosa. Cuando el tamaño era de 50,5 cm el epitelio presentaba células escamosas estratificadas con queratinización semejante a las de los animales adultos, que después se extendían a los demás compartimentos y finalmente al esófago. Este estudio está en contra de la teoría de la saculación (SISSON y GROSSMAN, 1953) que defendía que el epitelio estratificado de los proventrículos es continuación del epitelio esofágico (LAMBERT, 1948; WARNER, 1958).

Las observaciones hechas por PANCHAMUKHI y cols. en 1975, sobre la morfogénesis del estómago del búfalo en comparación con las hechas en terneros, dieron lugar al pensamiento de que la diferenciación regional del rumen tiene lugar antes en el búfalo.

Estas aportaciones no están en concordancia absoluta con los recientes y exhaustivos estudios de VIVO y ROBINA (1990, 1991) sobre el desarrollo del estómago en el vacuno, inspirados en los realizados por DEL RIO ORTEGA en 1973 en ovinos. Se ha demostrado que el primer segmento del surco gástrico comienza a hacerse patente en fases típicamente embrionarias de 42 días y C-R de 3,3 cm, apreciándose como una comunicación entre el atrio del estómago y el omaso en crecimiento. En este mismo estadio existen indicios del surco omasal. En períodos posteriores de feto precoz con 57 días y un C-R de 6,5 cm, el surco gástrico se observa con nitidez apareciendo una gotera reticular evolucionada, portadora de dos labios, derecho e izquierdo. El labio izquierdo termina integrándose en la pared reticular y el derecho se situa adyacente a la cara visceral de la pared omasal, para posteriormente ir decreciendo y terminar circunscrito en los niveles que marca el pilar del omaso.

#### 2.1.4. Fisió-farmacología de la función motora

El funcionamiento de la gotera reticular, merece una atención especial dentro de este apartado. La gotera puede determinar el lugar del estómago en que se van a localizar los líquidos ingeridos, es decir, en el retículo-rumen o en el abomaso. Cuando los labios de la misma se cierran, se forma un tubo que conduce los líquidos deglutidos directamente hacia el sulcus omasal y finalmente al abomaso. En el animal lactante prerrumiante la leche y otros sucedáneos líquidos siguen este camino.

El cierre y control del surco reticular ha interesado a muchos autores. Los primeros datos sobre este tema, fueron aportados por JOHANN FABER, citado por PEYER, en 1685, que supuso que esta estructura anatómica servía para dirigir la leche deglutida al abomaso. Para realizar esta aseveración tuvo en cuenta las observaciones directas de la gotera, su disposición anatómica y el hecho de que en las terneras sacrificadas solo aparecía leche en el abomaso (NEWHOOK y TITCHEN, 1976).

FLUORENS en 1844 pensó que su función estaba relacionada con la formación del bolo alimenticio durante el proceso de la rumia. Esta teoría fue rebatida por COLLEN en 1871, que mediante una técnica de sutura de los labios con alambre de



cobre, observó que los animales seguían regurgitando (LEWIS, 1962).

Estudios realizados por WESTER (1930) indicaron que en los "rumiantes jóvenes" la gotera dirigía los líquidos ingeridos hacia el abomaso. También apuntó que el cierre de esta estructura se debía a un mecanismo reflejo. Al mismo tiempo, estudió el efecto de distintos compuestos químicos presentes en la leche sobre el cierre de la gotera, llegando a la conclusión que mediante la administración de sales de sodio, se estimulaba su funcionamiento hasta los 2 años. En investigaciones posteriores de WATSON y JARRET (1944) los resultados obtenidos ante las sales de sodio fueron negativos, frente a los de sales de cobre que resultaron positivos (LEWIS, 1962).

En 1948, ESCURAT estableció qué sales eran capaces de provocar el cierre y que concentraciones eran necesarias (ClNa 1%, INa 4%, SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 5%, SO<sub>4</sub>Ag 10%, CO<sub>3</sub>HNa 3%, Sacarosa 10%, NO<sub>3</sub>Na 1%, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na 2%).

Profundizando más en esta cuestión, BRUNAUD en 1952 determinó que era necesario aumentar la dosis según avanzaba la edad del animal (SEREN, 1975).

Coincidiendo con las anteriormente mencionadas aportaciones de FABER, SCHALK y AMADON en 1928 y TRAUTMAN y SCHMITT en 1933, sostuvieron el punto de vista, de que independientemente de la forma en que el líquido era consumido, éste pasaría de forma directa al abomaso, sosteniendo los primeros la teoría de que a medida que aumentaba la edad del animal, el funcionamiento de la gotera reticular tiende a cesar, atribuyendo este fenómeno, TRAUTMAN y SCHMITT, a una regresión progresiva en el desarrollo de los labios y llegando a la conclusión de que el cierre era controlado por un mecanismo reflejo activado desde boca y faringe (SEREN, 1975).

WATSON en 1944 hizo una contribución importante en esta materia, al relacionar el comportamiento del animal con el control de cierre, proponiendo que es el resultado del conjunto de actitudes que rodean el acto de mamar. Considerando que el cierre o apertura se debe a la cantidad y calidad del líquido ingerido, en los terneros que succionan se provoca el cierre, y en los adultos que beben, la gotera permanece abierta (SEREN, 1975).

Estas observaciones de WATSON fueron confirmadas por ORSKOV y BENZIE en 1969 que demostraron que únicamente cuando el animal mamaba voluntariamente y demostraba la característica "agitación juvenil", se procedía a un cierre

eficaz de la gotera. Esto sucedía de una forma independiente a la composición química del líquido consumido y de la forma de consumirlo (mamando de una tetina o bebiendo de un cubo), en cambio, si los animales eran forzados a deglutir el líquido o bebían para saciar su sed, la gotera permanecía abierta cayendo la ingesta al rumen.

Trabajos realizados por PHILLIPSON en 1946 y ORSKOV y cols. 1970 y 1988 y GUILHERMET y cols. en 1974, demuestran la importancia que tiene el reflejo condicionado (presencia de la madre o del biberón) para lograr el cierre del surco reticular. La gotera puede llegar a cerrarse en animales entrenados, mediante reflejos condicionados durante toda la vida. La administración de forma regular a cabras lactantes de líquidos mediante tetinas durante cinco lactaciones -período durante el cual la gotera mantuvo su funcionamiento- prueban estos hechos; este reflejo puede mantenerse, pero no se puede provocar en aquellos animales que no hayan sido adiestrados para mantener el comportamiento succionador durante toda su vida. Por todas estas razones, el reflejo condicionado es uno de los métodos más eficaces para provocar el cierre de labios de la gotera (ORSKOV, 1988). CHAPMAN y cols., en 1986 apreciaron que en ovejas puede mantenerse activo durante cuatro años.

COMLINE y TITCHEN (1951), pudieron estudiar en óvidos y bóvidos jóvenes descerebrados, las características físicas del mecanismo reflejo, sus vías aferentes y eferentes, así como su relación con la succión. En estos animales al administrar adrenalina por vía endovenosa se producía una respuesta refleja de la gotera. También los labios se contraían cuando se estimulaba el nervio vago en sentido eferente. Luego demostraron, que fibras parasimpáticas colinérgicas procedentes del nervio vago abdominal dorsal y de su rama ventral, aunque en menor proporción, constituían la vía eferente del reflejo (COMLINE y TITCHEN, 1962; DE VUYST, 1974).

Estos mismos autores, a partir de experimentos en los que introducían agua en la zona posterior de la cavidad bucal o estimulaban directamente esta región, provocaron los reflejos de deglución y cierre de gotera. Por esta razón definieron la vía aferente del reflejo del cierre de la gotera como los cabos centrales de los nervios laríngeos superiores.

Las propiedades de este reflejo son: sumación de estímulos subliminales, fatiga, latencia refleja, postdescarga e inhibición.

Los reflejos de deglución y cierre de la gotera comparten una zona reflexógena común, encontrándose

coordinados, aunque resultan totalmente independientes. El reflejo de cierre de gotera puede inhibirse mediante el estímulo del cabo central de la rama abomasal del nervio vago abdominal ventral, así como por la estimulación del nervio glossofaríngeo. En este último caso también sería abolido el reflejo de deglución. Otros mecanismos serían la administración endovenosa de adrenalina y noradrenalina y la estimulación de la rama periférica del nervio esplácnico. También existen diferencias, en cuanto a estímulos de carácter subliminal para la deglución, que al mismo tiempo son eficaces para el cierre del surco reticular (COMLINE y TITCHEN, 1962; HEDDE y WARD, 1973).

Todo este complejo mecanismo reflejo del cierre de la gotera va a provocar un fenómeno de contracción de la musculatura lisa y estriada presente. Según BORGATTI (1956) comienza en el esfínter omasal, para propagarse por los labios, retículo, atrio ruminal y sacos dorsal y ventral del rumen (SEREN, 1975).

Desde un punto de vista macroscópico, el cierre de la gotera consiste en un primer movimiento de acortamiento y aposición de los labios, para continuarse con un segundo movimiento que determina una inversión de los mismos, mediante un giro del labio izquierdo sobre el derecho (COMLINE y TITCHEN, 1951). Son movimientos bifásicos con una

duración entre 20-35 segundos. Para BORGATTI y MATCHER, sus registros gráficos se representan como mesetas de 3-4 contracciones, separadas por períodos de relajación de 10-60 segundos (SEREN, 1975).

Durante la aposición de los labios, un 40% del líquido ingerido pasaría directamente al abomaso y cuando el movimiento de inversión aparece, el porcentaje se eleva hasta 75-90% (RUCKEBUSH y KAY, 1971).

NEWHOOK y TITCHEN (1976) definieron cuales eran los movimientos que acompañan al cierre de la gotera y que son necesarios para que se haga efectivo el paso del líquido hacia el abomaso. Después de la ingesta líquida, se produce un acúmulo en la porción caudal del esófago, provocando una dilatación o "ampolla frénica", tras un movimiento de eversión de la mucosa y ayudada por la musculatura diafragmática, el contenido pasa de forma rápida y violenta a la gotera cerrada, para atravesar el orificio retículo-omasal y llegar finalmente al abomaso.

Al mismo tiempo que se produce este fenómeno, aparecen una serie de cambios en la motilidad de los proventrículos. Cuando la gotera se contrae, se crea una abolición de los movimientos rumino-reticulares con una duración de 3-5 minutos, para volver a reaparecer pero con menor fuerza, que

aumenta progresivamente (KAY y RUCKEBUSH, 1971); la motilidad reticular aumenta su frecuencia apreciándose descargas poco fuertes aisladas sobre una contracción parcial mantenida (KAY y cols. 1972). KAY y RUCKEBUSH (1971) atribuyen esta disminución de la motilidad rumino-reticular a un proceso precautorio para no influir en el cierre de la gotera, que es el movimiento principal y debe coincidir con la apertura del orificio retículo-omasal (SEREN, 1975).

Los estudios realizados "in vivo", sobre las modificaciones acontecidas en el cierre de la gotera de corderos y terneros, se deben a NEWHOOK y TITCHEN (1974); observaron que los agonistas muscarínicos refuerzan el cierre de la gotera durante la succión. Tanto las drogas anticolinérgicas como los estimulantes adrenérgicos reducen el cierre del surco reticular, que está controlado directamente por nervios vagales.

La dopamina (0,2 mg/Kg) también inhibe el cierre en terneros, efecto que se puede suprimir mediante la administración de sustancias antidopaminérgicas como la metoclopramida (6  $\mu$ g/Kg cada minuto) (BUENO y FIORAMONTI, 1983).

En la parte posterior del retículo, anterior del rumen y en la gotera reticular de óvidos, FALEMPIN y cols. en 1978,

describieron la presencia de mecanorreceptores vagales de adaptación lenta a estímulos de distensión y contracción. Estos pueden presentar fenómenos de actividad espontánea, coincidentes con las contracciones extrínsecas e intrínsecas de las vísceras.

De las observaciones realizadas por DE VUYST (1974) se dedujo que es posible provocar el reflejo de cierre de la gotera, mediante soluciones de sulfato sódico al 7% administradas por vía oral, siempre y cuando estas soluciones pasen a través de la faringe.

BRUGERE y cols. (1987) consiguieron el cierre de la gotera reticular en cabras mediante la administración de vasopresina (0,25 U.I./Kg), por vía endovenosa, confirmándose este hecho por MIKHAIL y cols. (1988), que aseguran que esta sustancia administrada por vía endovenosa es el procedimiento más satisfactorio para favorecer el paso de líquidos y otros compuestos a través de la gotera reticular. También indujeron la liberación de vasopresina endógena, incrementando la osmolaridad plasmática mediante la administración intracarotídea de una solución hipertónica de cloruro sódico (1,5 ml a saturación o 10,5 ml al 1,5%), aunque los resultados se consideraron menos satisfactorios. SCHOLZ Y MIKHAIL (1987), consiguieron un efecto semejante en terneros con vasopresina administrada por vía endovenosa



(0,03 U.I/Kg), manteniéndose la contracción de la gotera durante un período entre 10-15 minutos, e interrumpiéndose mediante la excitación del animal o la manipulación de su esófago. El cierre total de la gotera no se obtuvo con la administración oral de sulfato cúprico (20 ml al 10%), o la administración endovenosa de cloruro sódico (100 ml al 10%).

NICHOLSON y BELKHIRI (1991), mediante la administración intravenosa de clonidina (agonista  $\alpha_2$ ), con dosis de 2-4  $\mu\text{g/Kg}$ , inhibieron la activación del reflejo del cierre de la gotera reticular de ovejas adultas, inducido por sales de sulfato de cobre. Esta inhibición puede ser prevenida mediante la administración de idazoxan (antagonista  $\alpha_2$ ).

VAN ROGEN y OFFERMEIER (1981), consideran la importancia que deriva de la posibilidad del cierre de la gotera reticular vía receptorial excitación-inhibición (RUCKEBUSH, 1983).

También se han realizado estudios "in vitro" sobre la motilidad de las fibras musculares lisas que constituyen el suelo de la gotera (KOPER y MUCHA, 1983; ENCINAS y cols., 1989). Presentan una fuerte motilidad espontánea con características propias e identificables, como es un periodo corto de contracción seguida de un tiempo de relajación entre 2 y 4 veces mayor. Esta fuerte actividad junto con la

abundante inervación vagal, está en concordancia con los altos niveles de colinesterasa presentes en esta región y el retículo, siendo mucho mayor que para otras zonas de los proventrículos (BEGHELLI y cols., 1975). Otro enzima, la MAO (mono amino oxidasa), también presenta actividad, pero más baja que en el rumen y su distribución es más homogénea. Existen variaciones en cuanto a su frecuencia y tensión, entre las procedentes de animales jóvenes y adultos, de manera que inducen a que el tránsito sea más lento y más potente en los jóvenes.

La existencia de receptores colinérgicos y adrenérgicos en la musculatura lisa del suelo de la gotera de bóvidos adultos, fue puesta de manifiesto por ENCINAS y cols. en 1989. Estos estudios han sido confirmados, demostrándose la presencia, tanto en el suelo como en los labios, de receptores de ambos tipos.

Recientes estudios demuestran que la noradrenalina conduce a la contracción, tanto de la fibra lisa muscular de los labios como del suelo en bóvidos adultos, siendo más efectiva la respuesta de las fibras transversales del fundus. En terneros la respuesta a la adrenalina y noradrenalina sólo se obtuvo a partir de las fibras del suelo y no de los labios. Este efecto, fue antagonizado por bajas concentraciones de prazosin (antagonista  $\alpha_1$ ) y altas

concentraciones de yohimbina (antagonista  $\alpha_2$ ), así como por atropina (antagonista colinérgico). La tetrodotoxina y latrotoxina no afectan a la respuesta contráctil conducida por la noradrenalina. Todos estos resultados sugieren que la noradrenalina produce un aumento de la contracción de este tipo de fibras, a través de la estimulación de los receptores  $\alpha$ , con claro predominio de los  $\alpha_1$ . Los fenómenos de relajación están mediados por los receptores  $\beta$  (DENAC y cols. 1990, 1991).

Mediante técnicas de inmunocitoquímica, se ha descrito la distribución de nervios inmunoreactivos (IR), a las sustancia P (SP), polipéptidos vasoactivos (VIP), leucina-encefalina (L.En.K.), polipéptido gastro-liberador (GRP) y somatostatina (SOM), en el retículo-rumen y gotera reticular de terneros y vacas. Los nervios inmunoreactivos a GRP y SOM sólo fueron detectados en la gotera; los demás se distribuyen en todos los segmentos estudiados. Los más abundantes en los labios son los inmunoreactivos a SP y en orden decreciente VIP, LENK, SOM, y GRP. Todos fueron encontrados en un número mucho mayor en terneros que en vacas, existiendo una marcada diferencia, principalmente en los inmunoreactivos a SP. Otros nervios inmunoreactivos descritos en la gotera son los IR a la metionin-encefalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>). Los cuerpos celulares y las fibras de éstos, son más abundantes en los labios de los terneros lactantes que en las vacas y terneros

destetados. Los ganglios conteniendo uno o varios cuerpos celulares se localizaron en la capa de la musculatura lisa de los labios, junto con una alta densidad de haces de fibras nerviosas situadas alrededor de los haces musculares. En el suelo de la gotera, las fibras inmunoreactivas presentaban una densidad muy baja y no se detectó ningún cuerpo celular (KITAMURA y cols., 1986, 1987).

## 2.2. INFLUENCIA DEL CALCIO EN LA CONTRACCION DEL MUSCULO LISO

El calcio ionizado del citosol, juega un papel muy importante en una gran variedad de procesos celulares (contracción, secreción, etc.), transportando señales químicas y eléctricas a la maquinaria bioquímica intracelular (RUBIN, 1982).

La célula posee una serie de proteínas solubles en el citoplasma e interior de los orgánulos, con puntos de unión de alta afinidad al calcio ( $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M), capaces de formar complejos con el mismo (MEYER y cols., 1964). Estos complejos pueden actuar directamente ejerciendo su función, o bien, ser mediadores de otras enzimas. También existen otras proteínas incorporadas a la membrana de la célula que actúan de transportadores del calcio, desde la membrana al citoplasma e interior de los orgánulos intracitoplasmáticos, y así regular la concentración citosólica.

En el mecanismo de la contracción muscular, el calcio ionizado presente en el citoplasma, es el factor regulador más importante para lograr la interacción de los filamentos de actina y miosina (BOLTON, 1979; ADELSTEIN y EISENBERG, 1980).

En la musculatura lisa, este fenómeno de interacción, está determinado por la presencia de un activador dependiente del calcio. Existen dos teorías distintas sobre la naturaleza del mismo. Para EBASHI (1980), sería la leiotonina, que en presencia de calcio daría lugar a la interacción actina-miosina, sin que se produzca la fosforilización de la miosina. Frente a esta teoría se encuentra la de la fosforilización, en la que se postula que la miosina en presencia de calcio y en concentraciones similares a las necesarias para lograr la contracción del músculo liso, es fosforilada por una quinasa específica de la cadena ligera de miosina (KCLN). El paso siguiente a la fosforilización, sería la formación del complejo actomiosina, permitiéndose la hidrólisis del ATP mientras el calcio esté presente. Finalmente cuando el calcio desaparece, la quinasa se inactiva y la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (PCLM), elimina los grupos fosfato de la miosina, dando lugar a la relajación del músculo por la disgregación del complejo actomiosina (HARTSHORNE, 1980; DISALVO y cols., 1983; STEWART y cols., 1983, KAMM y STULL, 1985).

DABROWSKA y cols. en 1977 describen que la quinasa de la cadena ligera de la miosina está formada por dos subunidades: una de 105.000 daltons de peso molecular y otra pequeña de 16.680 daltons.

La calmodulina es una proteína ácida termoestable de 16,7 kD que posee 148 aminoácidos. Presenta cuatro puntos de unión con el calcio por el que tiene una especial afinidad a concentraciones  $\mu\text{M}$ . Su cinética de unión no es totalmente conocida, no sabiéndose si esta unión es independiente en cada punto, si se produce conjuntamente o si la afinidad por el calcio es la misma o diferente en los distintos lugares de unión (CROUCH y KLEE, 1980; KLEE Y VANAMAN, 1982; COX y cols., 1984).

Hay muchos procesos en los que la participación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina es esencial, como son el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de membrana y la contracción de la musculatura lisa.

Para MEANS y cols. (1991) la fijación del calcio a la calmodulina induce cambios conformacionales que le permite interactuar con una serie de proteincinasas. Unas son especializadas y dedicadas a la regulación de una sola función, como es el caso de la cinasa de la cadena ligera de miosina (que activa la fosforilasa b), la fosforilasa-cinasa y la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-proteincinasas I y III; la otra es la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-proteincinasa II o multifuncional que fosforila un gran número de sustratos proteicos.

Algunas son enzimas que intervienen en el metabolismo de principios inmediatos y en la síntesis de neurotransmisores, mientras otras son de carácter estructural, como la sinapsina I, que se encuentra asociada a las vesículas sinápticas.

Algunas de las proteínas fosforiladas por las cinasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes son idénticas a las fosforiladas por las proteincinasas A y C, pero el sitio de fosforilación es diferente (FLOREZ, 1992).

La fosfatasa de la cadena ligera de miosina, es activa en todo momento, independiente de la presencia de calcio. Su misión es conducir a la relajación del músculo liso por defosforilización de la miosina, pero solamente puede conseguirlo cuando la acción de la quinasa desaparece por eliminación del calcio (HARTSHORNE, 1980; WALSH y cols., 1982a).

La concentración citosólica de calcio ionizado para el buen funcionamiento del metabolismo del fosfato, ha de ser baja. Además este hecho permite disponer de un mensajero intracelular de bajo coste energético.

En las células musculares en reposo, la concentración de calcio en el citosol es  $10^{-7}\text{M}$ ; por el contrario, en el medio extracelular es  $10^{-3}\text{M}$ , luego el gradiente de concentración a



través de la membrana es de 5.000-10.000 veces. La célula para mantener este gradiente cuenta con la membrana plasmática que es muy impermeable al calcio y con un sistema transportador que elimina al exterior el calcio citosólico, o bien los deposita en los orgánulos intracelulares (BORLEI, 1981; RASMUSSEN, 1986).

Para que se produzca la activación de la fibra muscular lisa, es necesario que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ascienda a  $10^{-6}$ - $10^{-5}\text{M}$  (FILO y cols., 1965). Este calcio puede proceder del medio extracelular entrando en la célula a través de los canales de calcio o por medio del intercambiador  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (BOLTON, 1979); o del medio intracelular, liberándose del retículo sarcoplásmico principalmente, las mitocondrias y membrana plasmática. (BOLTON, 1986) (Figura 3).

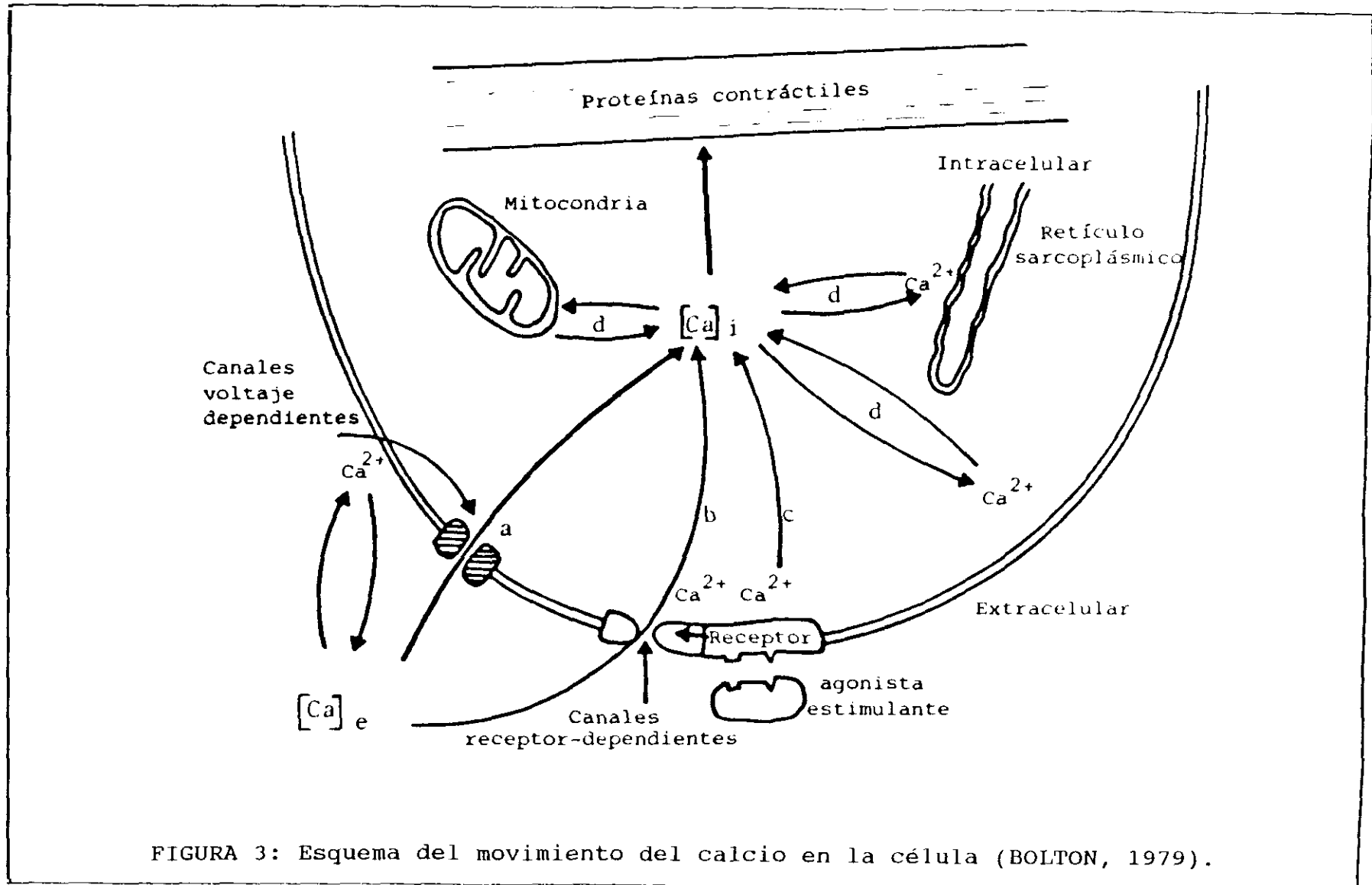


FIGURA 3: Esquema del movimiento del calcio en la célula (BOLTON, 1979).

### 2.2.1. Canales de calcio

La entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, se realiza entre otros mecanismos, gracias a la apertura de unos canales específicos para este ión presentes en la membrana celular.

Los canales de calcio pueden definirse, al igual que otros canales iónicos, como grandes moléculas glicoproteicas que se distribuyen en la superficie de la membrana celular, permitiendo de una forma controlada la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular al interior de la célula (HILLE, 1984; TOWART y SCHRAMM, 1984).

Recientemente se han descrito varios tipos de canales de calcio dependiendo de sus propiedades funcionales (conductancia, voltaje o potencial-dependencia), farmacología y distribución celular. En las células musculares lisas se han definido dos grandes grupos de canales de calcio: canales de goteo (calcium leak) y canales excitables.

Los "leak channels", "calcium leak" o canales de goteo, están implicados en la difusión del calcio a través de la membrana. Se desconoce el mecanismo por el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  atraviesa la membrana celular, penetrando en la célula en condiciones de reposo. Este goteo de calcio fue definido por VAN BREEMEN y cols. (1986a) como el influjo del calcio en

condiciones basales y ausencia de estimulación no siendo impedido por los antagonistas orgánicos del calcio.

Dentro del grupo de canales de calcio excitables podemos hacer una nueva división en: canales de calcio voltaje-dependiente (VOC), canales de calcio operados por receptor (ROC) y canales activados por distensión mecánica (stretch-activated channels o stretch channels). Esta clasificación se ha realizado teniendo en cuenta que los canales de calcio excitables permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol, siempre que se produzca un estímulo de tipo eléctrico (despolarización de la membrana), químico, (acción de neurotransmisores, autacoides, etc.), o mecánico (distensión de la pared muscular) respectivamente (BOLTON, 1979).

Los primeros canales excitables de calcio encontrados en la musculatura lisa fueron los VOC y los ROC (VAN BREEMEN y cols., 1979).

Los canales de calcio voltaje-dependientes o canales de calcio dependientes de potencial están presentes en todas las células excitables eléctricamente (HAGIWARA, 1983). Se caracterizan según HAGIWARA y BYERLY (1981) por:

- Las señales producidas en la membrana celular (intensidad de la corriente, amplitud del

potencial de acción o la despolarización) son dependientes de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio extracelular.

- Son insensibles a la acción de la tetrodotoxina (TTX).
- Son insensibles a la concentración extracelular de sodio.
- Los  $\text{Ca}^{2+}$  pueden ser sustituidos por  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ .
- Son inhibidos por concentraciones micromolares de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ .
- Son inhibidos por los antagonistas orgánicos del calcio.

En condiciones fisiológicas la penetración de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a través de estos canales de calcio no se produce. Resultan ser menos selectivos que los canales de sodio y potasio, puesto que permiten el paso de iones  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ , siendo más permeables para éstos que para  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, este hecho solo se aprecia en ausencia de calcio, pues la afinidad del calcio por los puntos de unión del canal es mucho mayor. Otro grupo de cationes compuesto

fundamentalmente por  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{La}^{3+}$ , inhiben el paso del calcio por el canal porque su permeabilidad es menor pero su afinidad por los puntos de unión es mucho mayor, derivándose de esta unión un bloqueo (HESS y TSIEN, 1984; HAGIWARA, 1983).

La apertura de los VOC, se realiza cuando el potencial a través de la membrana se reduce. Existen diferentes mecanismos que van a influir en este proceso como es el que los canales de sodio, responsables del impulso nervioso, estimulen la apertura de los canales de calcio por la despolarización producida. Esta despolarización se ve favorecida por la entrada de nuevos iones calcio, que permiten y favorecen que se abran más canales, por el contrario, la despolarización puede ser interrumpida por la apertura de los canales de potasio (HAGIWARA, 1983).

El proceso de activación de los canales depende del grado de despolarización y aumenta de forma progresiva hasta un punto máximo, a partir del cual, se produce una inactivación dependiente del potencial de membrana y la acumulación del calcio en el interior celular. La apertura de los canales empieza a ser más probable cuando el potencial se sitúa entre -50 y -20 mV, alcanzando la máxima probabilidad de apertura entre 0 y -30 mV (HAGIWARA, 1983; HILLE, 1984; ECKERD y CHAD, 1984; HESS y cols., 1984). Los canales de

calcio no permanecen abiertos durante todo el período de despolarización sino que se encuentran en constante transición entre varios estadios, dependiendo del potencial de membrana (CHIN, 1986):

- Reposo (R). La conductancia del canal es mínima porque la compuerta de activación está cerrada.

- Activado (A). La activación se produce por el potencial de acción y provoca un breve aumento de la permeabilidad del canal, por cierre rápido de las compuertas.

- Inactivado (I). Este estado aparece después del estado de activado y se produce por el cierre de las compuertas de activación. El canal una vez inactivado debe pasar al estado de reposo antes de volver a ser activado. Este fenómeno se denomina reactivación del canal (Figura 4) (TAMARGO y VALENZUELA, 1987; TAMARGO y DELFON, 1992).

El fenómeno de cierre de los canales de calcio dependiente del calcio, para OHYO y cols. (1988) se debe a una unión entre el propio calcio que entra en la célula y el canal glicoproteico. ECKERT y CHAD (1984) han postulado que la inactivación inducida por el calcio, se produce, mediante una desfosforilización del canal, debida a una fosfatasa dependiente de la calmodulina. Este dato está en concordancia

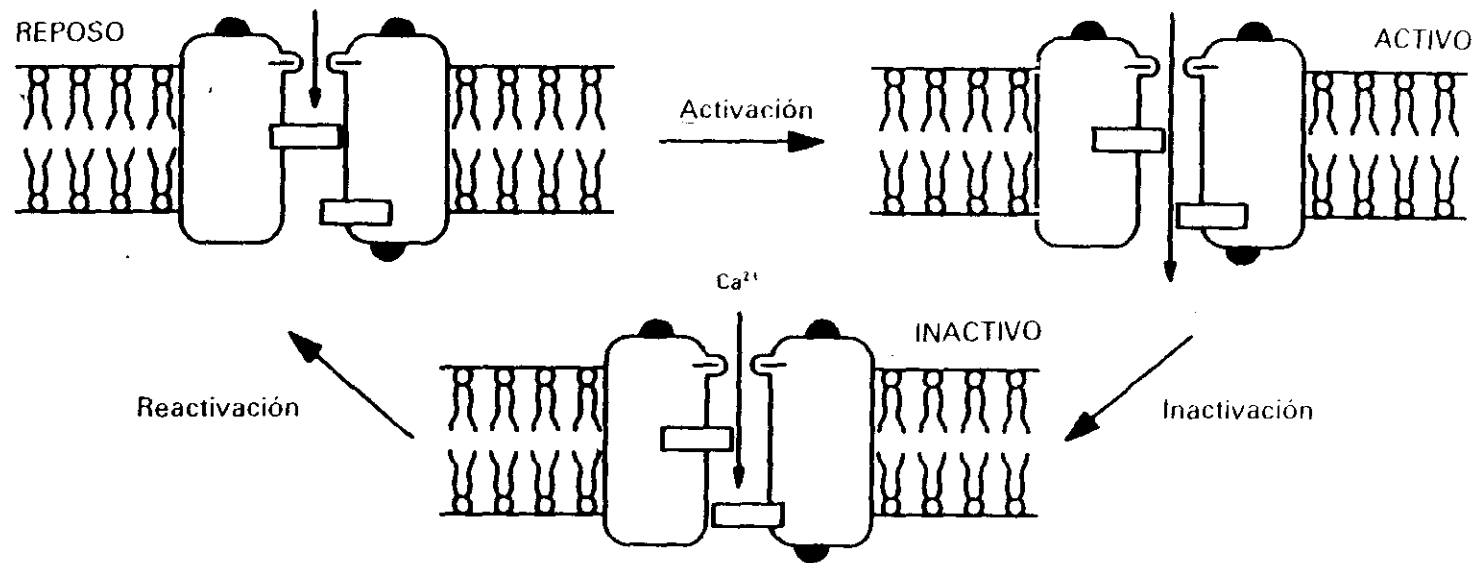


FIGURA 4: Teoría sobre el mecanismo de apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (TAMARGO y DELPON, 1992).



con los estudios realizados en musculatura esquelética por CURTIS y CATTERALL (1985) que observaron que para que un canal fuese activo tenía que sufrir una fosforilización previa.

Se han descrito distintos tipos de canales de calcio voltaje-dependientes. Para HESS y cols. (1984) existen tres tipos diferentes:

- Tipo 0. No presentan aperturas permaneciendo cerrados.
- Tipo 1. Presentan aperturas de breve duración, permaneciendo cerrados la mayor parte del tiempo.
- Tipo 2. Presentan cierres de corta duración, permaneciendo abiertos.

Otra subdivisión de los VOC es la que contempla la existencia de los tipos L, T, N y P.

Los canales tipo L o lentos, constituyen el subtipo más conocido en la actualidad. Son definidos como canales activados por voltajes altos (HVA). Están presentes tanto en células de tejidos no excitables como excitables, siendo la principal vía de entrada voltaje-dependiente del calcio, en corazón y fibra muscular lisa. Pueden ser bloqueados por

antagonistas del calcio como el verapamil, diltiazem y dihidropiridinas como la nifedipina, pero son insensibles a la acción de toxinas peptídicas como la  $\omega$ -conotoxina. Su comportamiento es modal y cumplen todo lo anteriormente expuesto. Gracias a los avances de la biología molecular se ha descrito que los canales L del músculo esquelético son heterooligómeros y están compuestos por 5 subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  (Figura 5). Las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  presentan un elevado peso molecular (145-175 kD y 135-150 kD, respectivamente), siendo la  $\alpha_1$  el punto de unión para los antagonistas del calcio (dihidropiridinas, fenilalkilaminas y benzotiazepinas), así como posiblemente la estructura que forma el poro del ión. La proteína  $\alpha_1$  es semejante a la  $\alpha$  del canal de sodio, presenta cuatro dominios (I-IV) y cada segmento posee seis segmentos transmembrana ( $S_1$ - $S_6$ ). El cuarto segmento de cada dominio ( $S_4$ ) contiene residuos cargados positivamente que pueden formar parte de la estructura sensible a los cambios de voltaje (Figura 6). Las subunidades  $\beta$  y  $\delta$  y  $\gamma$  tienen un peso molecular tres veces por debajo que las anteriores (55 kD, 24-29 kD y 33 kD respectivamente) (TSIEN y cols., 1991; ZERNING, 1991; WATSON y ABBOTT, 1992; FLOREZ, 1992).

Los canales tipo T o rápidos son activados por voltajes bajos (LVA); necesitan potenciales de membrana mucho más negativos, abriéndose mediante pequeñas despolarizaciones. Su

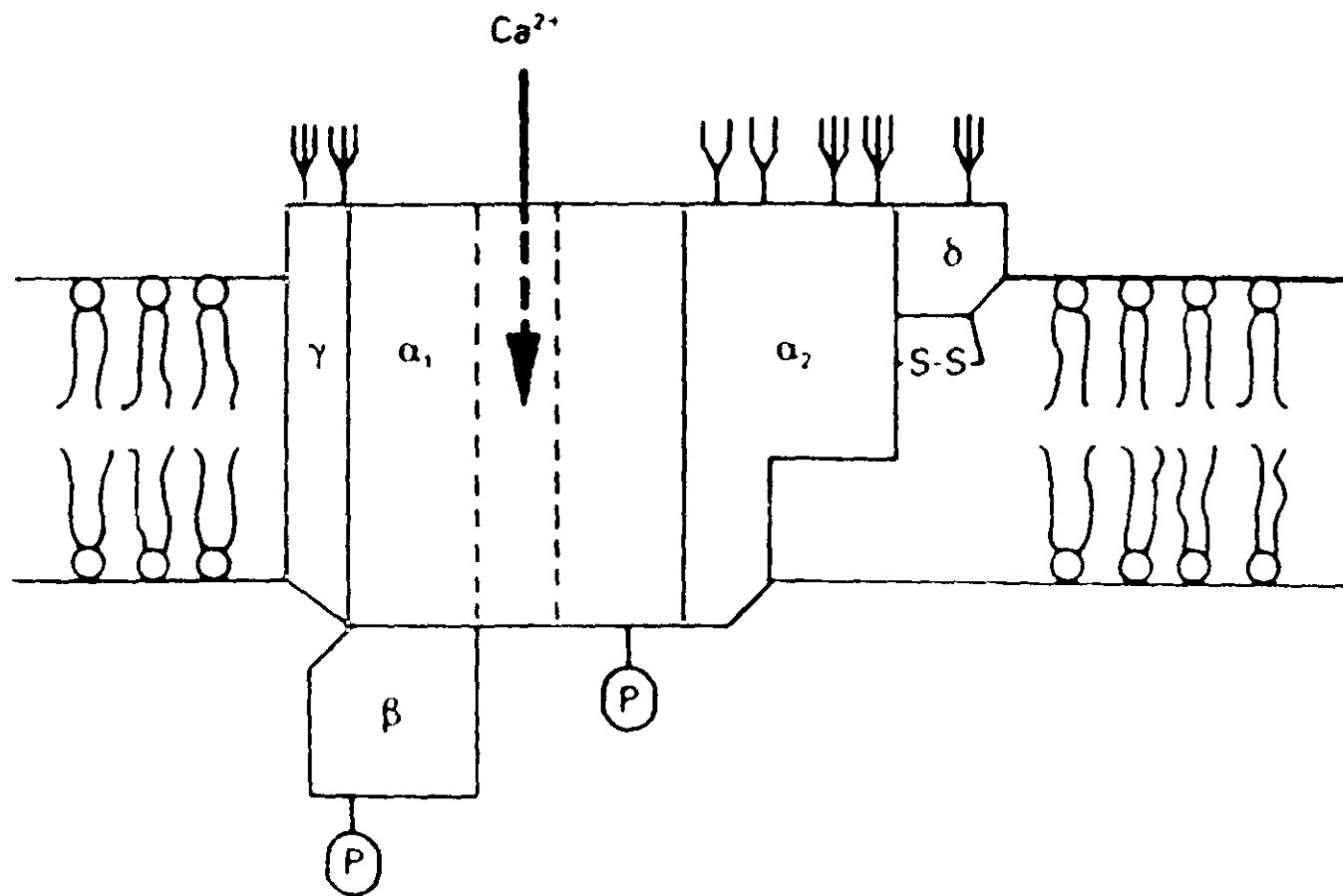


FIGURA 5: Estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje (FLOREZ, 1992).

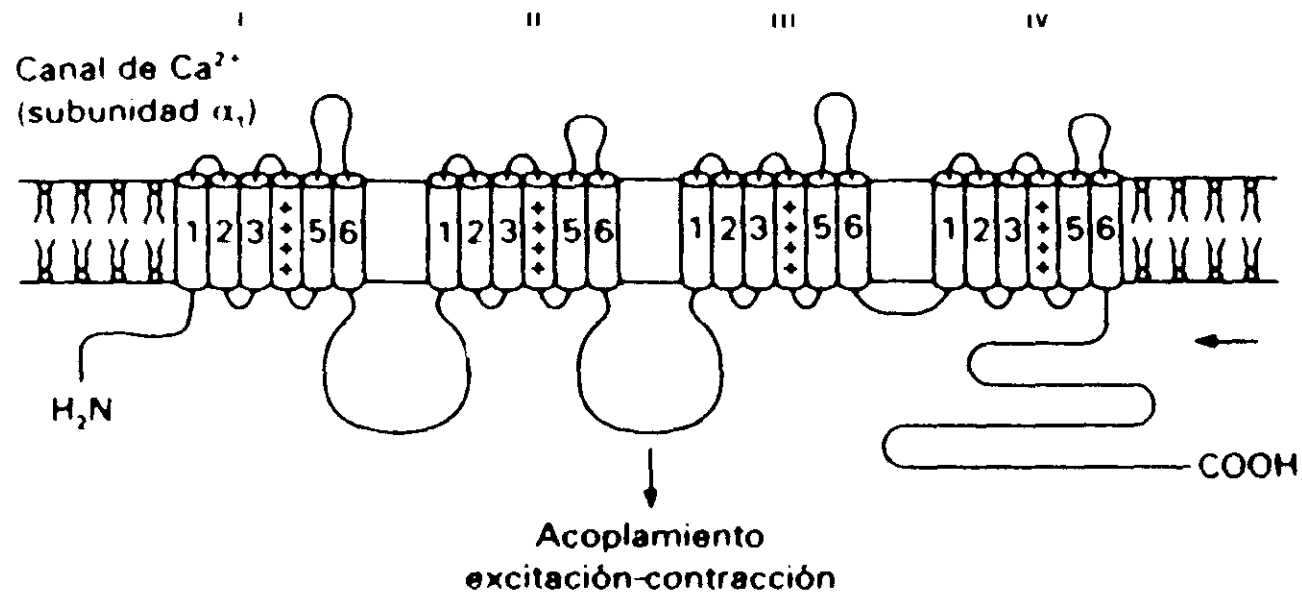


FIGURA 6: Esquema que representa la disposición transmembrana de los cuatro dominios en las subunidades principales de un canal de calcio voltaje dependiente ( $\alpha_1$ ). Cada dominio contiene 6 regiones transmembrana, siendo la cuarta la que se comporta como "sensor" de voltaje. El segmento entre los dominios II y III aloja el elemento de acoplamiento entre excitación-contracción (FLOREZ, 1992).

inactivación depende únicamente del voltaje. Son menos sensibles al ión  $\text{Cd}^{2+}$  que los tipo L y más sensibles al  $\text{Ni}^{2+}$ , amiloride y octanolol; en general son resistentes a la acción de las dihidropiridinas. Han sido descritos en un amplio grupo de células de tejidos excitables, pero no se han apreciado en células cromafines ni en neuronas simpáticas. La función más importante de los canales tipo T es favorecer la entrada de calcio a través de membrana con potenciales negativos, creando la actividad en espiga de neuronas y células endocrinas.

Los canales tipo N son activados al igual que los L por voltajes altos, pero farmacológicamente son resistentes a la acción de las dihidropiridinas y son bloqueados por la  $\omega$ -conotoxina. Su conductancia es menor que la de los L. Son los responsables principales de la entrada de calcio en neuronas sensoriales, simpáticas y del plexo mioentérico.

Los canales tipo P son los que se han identificado en último término. Se activan con voltajes altos y aparecen en gran abundancia en las células de Purkinje. Son insensibles a la acción de dihidropiridinas y  $\omega$ -conotoxina, pero pueden ser bloqueados por FTX (Funnelweb Spider Toxin).

Los canales de calcio operados por receptor ROC han sido ampliamente descritos por BOLTON (1979); en ellos la

permeabilidad de la membrana al calcio externo es regulada y activada por la acción de diferentes agonistas sobre el receptor.

Se ha comprobado que la estimulación de ROCs puede inducir a despolarización de la membrana, hiperpolarización o no producir cambios en el potencial de membrana (CASTEELS y cols., 1977; SUZUKI, 1981).

Han sido descritos como canales catiónicos no selectivos, o menos selectivos que los canales voltaje-dependiente, porque la corriente cálcica que pasa a su través va acompañada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (FINKEL y cols., 1984).

El mecanismo de interacción agonista-receptor que activa la apertura de los canales y la entrada del calcio no se ha podido establecer concretamente. Podría deberse a cambios en la estructura del receptor o a la participación de segundos mensajeros como el  $\text{IP}_3$  e  $\text{IP}_4$ ; pero aún se necesitan un mayor número de experiencias para poder dilucidar este problema (BENHAM y TSIEN, 1987; BERRIDGE e IRVINE, 1984).

En cuanto a la inactivación farmacológica de los canales operados por receptor, presenta controversia. Para KARAKI y WEISS (1984), el nitroprusiato sódico es el inhibidor selectivo de estos canales, pero este hecho se cumple

solamente en la fibra lisa de aorta de conejo. El nitroprusiato sódico hiperpolariza la membrana, aumenta los niveles de calcio de los depósitos intracelulares y también los de GMPc celular (KARAKI y cols., 1984a,b; ITOH y cols., 1983a; KUKOVETZ y cols., 1981).

KARAKI y WEISS (1984) han clasificado los músculos lisos con arreglo a los distintos canales de  $Ca^{2+}$  en:

- Músculos lisos tipo 1. En este grupo puede tomarse como modelo el músculo liso vascular de aorta de conejo. En dicho músculo existen dos tipos de canales, uno de ellos se regula por el potencial de membrana y se inhibe por los antagonistas orgánicos del calcio; el otro canal está regulado a través de los receptores de membrana y es inhibido específicamente por el nitroprusiato sódico.
  
- Músculos lisos de tipo 2. Se incluyen en este grupo gran parte de los músculos lisos vasculares y también el músculo liso gástrico. Los dos canales de  $Ca^{2+}$  son al menos parcialmente sensibles a antagonistas orgánicos y al nitroprusiato sódico.

- Músculos lisos de tipo 3. Se incluyen en este apartado los músculos lisos del intestino, aparato genital y tráquea. En este caso ambos canales sólo son sensibles a los antagonistas orgánicos y no lo son al nitroprusiato sódico.

El último tipo de canales de calcio excitables son los canales activados por distensión mecánica "stretch cannels". Su existencia fue señalada por BEVAN y cols. en 1982. Se ponen de manifiesto al observar que la contracción inducida por estímulos mecánicos es dependiente del calcio extracelular y no de naturaleza neurógena. Es además insensible al bloqueo de los alfa-receptores y distinta de la despolarización inducida por  $K^+$ .



### 2.2.2. Depósitos intracelulares de calcio

En el músculo liso, el calcio del medio extracelular es la fuente principal para conseguir la contracción, y la membrana plasmática, la encargada del control de los niveles de calcio citoplasmático. En la última década se ha puesto en evidencia que no solamente esta membrana celular es la responsable, sino que gran cantidad de organelas intracelulares presentan calcio, aunque de las que depende la movilización intracelular del calcio, son el retículo sarcoplásmico principalmente, las mitocondrias y la capa interna glicoproteica de la membrana (IRVINE, 1986).

Esta idea surgió de las experiencias realizadas por HUDGINS y WEISS (1968), en las que la noradrenalina y la histamina inducían a la contracción de la fibra muscular lisa en soluciones libres de calcio o cuya entrada había sido bloqueada mediante la adición de lantano al medio.

El calcio contenido en estas estructuras (retículo sarcoplásmico, mitocondrias y superficie interna de la membrana), puede disociarse rápidamente, por encontrarse ionizado o débilmente unido a compuestos "buffer" (BOLTON, 1986).

El retículo sarcoplásmico, está presente en la musculatura lisa y es capaz de almacenar calcio, procedente de soluciones que lo contengan a nivel micromolar (SOMLYO y cols., 1971, 1973).

Se ha demostrado que la cafeína, que libera calcio del retículo sarcoplásmico del músculo esquelético y cardíaco, también lo hace en la musculatura lisa, conduciendo a una contracción de la misma (ENDO, 1977; KARAKI y cols., 1987).

La liberación de calcio del retículo sarcoplásmico puede ser llevada a cabo de tres formas distintas y que están en relación con la cantidad de calcio presente en el fluido extracelular.

El calcio puede liberarse por depolarización del retículo sarcoplásmico, por inducción mediada por calcio o inducción por inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ).

SAIDA (1981) e ITOH y cols. (1982) demostraron que la depolarización de la membrana del retículo sarcoplásmico puede realizarse, mediante la sustitución de aniones propionato (poco permeables) por aniones cloro (más permeables). Esta sustitución provocaba la liberación de calcio y la cantidad liberada dependía de la concentración del ión  $Cl^-$ , que es el responsable de la despolarización de

la membrana. Frente a esta teoría KOBAYASHI y cols. (1985), postulan que la depolarización del retículo sarcoplásmico es consecuencia de la depolarización de la membrana plasmática.

La liberación de calcio inducida por calcio fue estudiada por SAIDA (1981, 1982) y SAIDA y VAN BREEMEN (1984). Estos autores proponen que la concentración de calcio en el retículo sarcoplásmico aumenta progresivamente y acorde con un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio, pero que cuando este último excede de  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  se produce una liberación del calcio almacenado.

Las experiencias realizadas por ITOH y cols. (1983b) demuestran que la cafeína es un activador del proceso de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  al aumentar los niveles celulares de AMPc, por inhibición de la fosfodiesterasa del AMPc. El AMPc disminuye el umbral de la concentración del calcio necesario para estimular la liberación de calcio. El efecto liberador de calcio de la cafeína es inhibido por la procaina (SAIDA y VAN BREEMEN, 1984).

El  $\text{Mg}^{2+}$  es inhibidor del proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$ , pues aumenta el umbral de calcio necesario para su liberación (SAIDA, 1982).

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico, debida a la influencia de los niveles de calcio en el medio próximo al retículo sarcoplásmico, según KARAKI y WEISS (1988), se debe a una entrada de calcio a través de los canales voltaje-dependientes de inactivación rápida, es decir, depende del calcio extracelular. Este tipo de apertura de canales se produce por la acción de soluciones con altas concentraciones de  $\text{K}^+$  y también se puede provocar por la acción de agonistas sobre los canales operados por receptor, ya que permiten el paso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que despolarizan la membrana, y esta despolarización induce a la apertura de los canales potencial-dependientes de inactivación rápida (ITOH y cols., 1983b).

La liberación de calcio del retículo sarcoplásmico de la célula muscular lisa inducida por el inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), ha sido demostrada por YAMAMOTO y VAN BREEMEN en 1985. Esta liberación es capaz de producir contracción en tejidos en los que el retículo sarcoplásmico esté cargado de calcio e intacto (JOHNS y cols., 1987).

El mecanismo de acción del  $\text{IP}_3$ , en cuanto a la liberación del calcio intracelular, no es totalmente conocido. Autores como IRVINE (1986) y KHALIL y cols. (1987) postulan que se debe a la acción del  $\text{IP}_3$  sobre receptores específicos presentes en la membrana del retículo

endoplásmico. Estos receptores han sido purificados y caracterizados en el músculo liso por CHADWICK y cols. (1990).

La acción del  $IP_3$  no es inactivada por la acción de la procaína, ni del  $Mg^{2+}$ , lo que induce a pensar que en el retículo sarcoplásmico existen dos tipos de canales de calcio: canales por "goteo" y canales operados por receptor, puesto que los otros dos mecanismos de liberación del calcio del retículo sarcoplásmico si son inhibidos por la procaína y el  $Mg^{2+}$  (VAN BREEMEN y cols. 1987).

IINO (1990) en relación con este fenómeno de liberación del calcio intracelular, propone la existencia de dos compartimentos de almacenamiento del calcio:  $S_\alpha$  y  $S_\beta$ . En el compartimento  $S_\alpha$  el calcio puede liberarse tanto por inducción mediada por calcio como por inducción por  $IP_3$ ; mientras que en el  $S_\beta$  solamente puede liberarse por inducción dependiente del  $IP_3$ . Las propiedades de la liberación de calcio inducido por calcio, son semejantes a las de la musculatura estriada, siendo modificadas por la ryanodina, de manera que el compartimento  $S_\alpha$  pierde su capacidad de almacenar calcio, mientras que el  $S_\beta$  queda intacto. La liberación inducida por  $IP_3$ , es también dependiente de la concentración del ión  $Ca^{2+}$ ; concentraciones inferiores a

300 nM favorecen este mecanismo, mientras que si son superiores lo inhiben.

El fenómeno de recaptación del calcio por el retículo sarcoplásmico en el músculo liso, según WIBO y cols. (1981), se realiza, entre otros mecanismos, gracias a una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa semejante a la del músculo cardiaco y esquelético. Los estudios realizados en la última década por KARAKI y WEISS (1988), VAN BREEMEN y cols. (1986 a,b); VERBIST y cols. (1986); DEVINE y cols. (1971), JOHNS y cols. (1987) y KHALIL y cols. (1987), han demostrado que el retículo sarcoplásmico capta el calcio del medio extracelular, para almacenarlo. Este fenómeno en condiciones de reposo, se realiza a través de los canales de goteo y los canales voltaje-dependientes de activación lenta. Cuando los canales activados son los potencial-dependientes de activación rápida, se produce una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico, mientras que cuando el calcio penetra a través de los canales operados por receptor, se bloquea la captación por el retículo sarcoplásmico en la contracción del músculo liso.

El papel de las mitocondrias como activadores del calcio citosólico, ocupa un segundo puesto frente al retículo sarcoplásmico, aunque las mitocondrias tienen una gran capacidad para captar el calcio y almacenarlo (SOMLYO, 1985).

El paso del  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la matriz mitocondrial es llevado a cabo por un transportador monoiónico, localizado en la membrana interna de las mitocondrias, con gran capacidad de transporte. El calcio se va a encontrar en el interior de la matriz mitocondrial combinado con iones fosfato, de manera que solamente un 1% del calcio se encuentra en estado libre. La velocidad de entrada del calcio al interior de las mitocondrias está determinada por la concentración de calcio en el citosol, de manera que cuando la concentración citosólica se sitúa entre 0,1-0,5  $\mu\text{M}$ , la captación del calcio aumenta ligeramente, pero cuando es superior a 0,6  $\mu\text{M}$ , hay una captación masiva, de manera que se va a producir almacenamiento del mismo, puesto que las vías de salida formadas por dos tipos de intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}:2 \text{H}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}:2 \text{Na}^+$  se saturan. Luego cuando se produce una invasión masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, las mitocondrias actúan como protectores celulares, captando el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberándolo después lentamente, sin alterar el metabolismo celular. En condiciones fisiológicas el calcio mitocondrial, es necesario para el funcionamiento de varias enzimas que intervienen en la cadena respiratoria para aumentar los niveles de ATP (CROMPTON y cols., 1978; CARAFOLI y LENINGER, 1971; NICHOLLS, 1986).

Las investigaciones realizadas por BURGUESS y cols. en 1983, demuestran que, excepto en las células en las que las

concentraciones de calcio intracelular alcanzan niveles micromolares, la afinidad de las mitocondrias por el calcio es muy pequeña, de manera que no pueden ser la principal fuente de calcio activador, aunque participen en el proceso.

La movilización de calcio intracelular por la intervención de la capa interna glicoproteica de la membrana plasmática, presenta condiciones muy inferiores a las del retículo sarcoplásmico y las mitocondrias. DANIEL (1985), considera que se produce liberación de calcio durante la activación del músculo liso, a partir de la capa interna de la membrana plasmática.



### 2.2.3. Sistemas de eliminación del calcio citosólico

La concentración citosólica de calcio ionizado para el buen funcionamiento de las células musculares lisas, ha de ser baja y el acúmulo del mismo en las organelas intracitoplasmáticas debe evitarse. Si no existiese un sistema de eliminación, el calcio tendería a acumularse en el citoplasma por el goteo pasivo a través de los canales de goteo (en condiciones de reposo) y por su entrada masiva a través de los canales excitables (en condiciones de estimulación).

Los sistemas de eliminación con los que cuentan las células excitables son dos: la bomba de calcio dependiente de ATP y el sistema de intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ .

En la última década, el sistema de eliminación del calcio dependiente de ATP ha sido el objeto de estudio de muchos investigadores. La existencia de la bomba de calcio dependiente de ATP fue demostrada por SCHATZMANN (1982) en eritrocitos. EGGERMONT y cols. (1988), entre otros, han puesto en evidencia la existencia de dos ATPasas transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso. La primera ATPasa se une a la calmodulina y se localiza en la membrana plasmática; la segunda ATPasa no se une a la calmodulina y está localizada en fracciones del retículo sarcoplásmico.

La molécula que conforma la bomba de calcio, tiene dos funciones: hidrolizar el ATP y eliminar el  $\text{Ca}^{2+}$  del interior de la célula. Cuando se produce la hidrólisis del ATP este enzima se fosforiliza de forma pasajera produciéndose la traslocación del  $\text{Ca}^{2+}$ . La energía necesaria para el transporte de calcio es generada por ella misma. Es electrogénicamente neutra de forma que intercambia un  $\text{Ca}^{2+}$  por dos  $\text{H}^+$  (WUYTACK y cols., 1982).

La bomba de calcio ha sido elegida como el sistema principal para mantener la concentración del calcio citosólico en condiciones de reposo. DIPOLO y BEAUGE (1987) determinaron que la capacidad de transporte de la ATPasa cálcica es baja pero su afinidad por el ión calcio es muy fuerte.

La velocidad de eliminación por este sistema aumenta al incrementarse la concentración intracitoplasmática de calcio (RASMUSSEN, 1986).

El sistema de intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  se caracteriza porque necesita ingresar tres  $\text{Na}^+$ , cada vez que elimina un  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de  $\text{Na}^+$  está regida por la bomba de sodio, que por cada tres iones sodio movilizados requiere una molécula de ATP. Luego para la eliminación de un  $\text{Ca}^{2+}$  la energía necesitada depende de la bomba de sodio, pudiéndose eliminar

un ión calcio por cada ATP hidrolizado (BLAUSTEIN, 1984). Este intercambio iónico determina un desequilibrio con incremento de carga positiva a través de la membrana; esta diferencia de carga se traduce en un incremento de energía que es utilizado por el sistema de intercambio  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  (KITAMURA y cols., 1986; CAPUTO y cols., 1986).

El sistema de intercambio puede funcionar en sentido inverso, favoreciendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma, cuando hay una reducción del gradiente de sodio (SHEU y BLAUSTEIN, 1986).

Los fenómenos de despolarización de la membrana también producen un incremento de la entrada de calcio por una vía distinta a los canales. Por el contrario, los fenómenos de hiperpolarización incrementan la eliminación del calcio (BAKER y McNAUGHTON, 1976). DIPOLO y BEAUGE (1986), demostraron que el intercambio en sentido inverso (influjo de calcio), depende de la concentración de calcio intracelular. El sistema de intercambio  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  está regido por el potencial de membrana, el gradiente de sodio y la concentración intracelular de calcio.

Su función principal es eliminar la gran cantidad de iones presentes en las células tras su estimulación. Esta función deriva de su gran capacidad de transporte y su baja

afinidad por el calcio, actuando solo en concentraciones de calcio citosólico de  $10^{-6}M$ .

La existencia del sistema de intercambio de  $Na^{+}-Ca^{2+}$  en el músculo liso ha sido ampliamente discutida. Las experiencias de BOVA y cols. (1986, 1988) y ASHIDA y BLAUSTEIN (1987), sugieren que al disminuir el gradiente de sodio se produce una contracción tónica de la musculatura lisa, debida a la entrada de calcio en este sistema, de manera que la actuación del sistema  $Na^{+}-Ca^{2+}$  aparece en células estimuladas, favoreciendo la entrada de calcio cuando ya se ha producido un aumento de la concentración citosólica del mismo a partir de su influjo a través de los canales y de la liberación del retículo sarcoplásmico. La despolarización de la membrana determina la inversión de la actuación del sistema, aunque algunos músculos lisos permanecen relajados en estas condiciones (ITOH y cols., 1982). También ha sido puesto de manifiesto mediante la realización de medidas directas de la actividad del sodio intracelular (AICKIN, 1987).

Otros autores consideran que el sistema de intercambio  $Na^{+}-Ca^{2+}$  carece de un papel importante en la fisiología de la regulación del calcio intracelular del músculo liso. Esta aseveración deriva de estudios que determinan que: este sistema está menos desarrollado en el músculo liso que en la

musculatura esquelética, que la actividad de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPasa}$  es más baja que la de  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{ATPasa}$  y que además la bomba de calcio dependiente de ATP está muy desarrollada en la musculatura lisa (SOMLYO y cols., 1986; MOREL y GODFRAIND, 1984; VERBIST y cols., 1986; WUYTACK, 1982).

### 2.3. SUSTANCIAS QUE INFLUYEN EN LOS MOVIMIENTOS DEL CALCIO

Dentro del grupo de sustancias que influyen en los movimientos del calcio encontramos, entre otras, los llamados antagonistas del calcio. Este término lo introdujeron y defendieron FLECKENSTEIN y cols. (1969). Para estos autores este grupo engloba a todas aquellas sustancias que bloquean la corriente lenta de calcio, de una manera dosis-dependiente y cuyo efecto debe ser revertido por iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

Actualmente incluye a los compuestos que afectan a la función celular del calcio, bien disminuyendo la concentración de calcio citosólico por bloqueo del influjo a través de membrana, favoreciendo el eflujo, inhibiendo la liberación de calcio intracelular o incrementando el secuestro o almacenamiento en las organelas intracitoplasmáticas, o bien interfiriendo la relación y acción del calcio con las proteínas contráctiles (NAYLER, 1980).

La terminología empleada para la definición de estos compuestos, a lo largo de la década de los ochenta, ha sufrido una variación importante, que ha evolucionado de manera acorde con los nuevos conocimientos. Para VANHOUTTE y BOHR (1981), el término empleado para designar estas sustancias ha de ser "bloqueantes o bloqueadores de la

entrada de calcio" y para NAYLER y POOLE-WILSON (1981) ha de ser "bloqueantes de los canales de calcio. CAUVIN y cols. (1983) puntualizaron aún más, recomendando la utilización de los términos "bloqueantes orgánicos de la entrada de calcio" o "antagonistas orgánicos del calcio" para referirse a aquellos compuestos cuyo mecanismo de acción principal es inhibir el influjo de calcio, a través de los canales específicos de la membrana celular, en presencia de estimulación, estableciendo de esta manera, una neta separación con un grupo formado por cationes polivalentes, que también impiden la entrada del calcio al interior celular pero por mecanismos totalmente distintos: los antagonistas inorgánicos del calcio.

VAN ZWIETEN (1985) propuso la siguiente definición: Los bloqueantes o bloqueadores de la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  son compuestos cuyo mayor efecto es la inhibición selectiva del flujo lento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que atraviesa la membrana celular por un canal apropiado, en condiciones fisiológicas. El efecto debe ser reversible por iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

GODFRAIND y cols. (1986) aunan los grupos anteriormente mencionados, en el término moduladores de calcio, junto con otros grupos que también afectan a los movimientos del calcio. Dentro de los moduladores del calcio encontramos, entre otros: los antagonistas orgánicos del calcio, los

antagonistas inorgánicos del calcio, los antagonistas de la calmodulina y los facilitadores del calcio.

Los antagonistas de la calmodulina incluyen aquellas sustancias que interfieren la relación del calcio y esta proteína (GODFRAIND y cols., 1986).

El término facilitadores del calcio empleado por GODFRAIND y cols. (1986), agrupa a una serie de compuestos cuya acción final es aumentar la concentración de calcio citoplasmático. Los agonistas del calcio, definidos por SCHRAMM y cols. (1983 a y b) como sustancias favorecedoras de la entrada de calcio a través de los canales específicos de la membrana, se encuentran incluidos en este grupo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), sugirió al comité de expertos, discutir la definición y clasificación de los fármacos utilizados para interferir el manejo del ión  $Ca^{2+}$  por los distintos tejidos. Dicho comité llegó a la conclusión, que el término "antagonistas del calcio" aunque no es totalmente correcto, por razones históricas, y sobre todo, con el fin de simplificar el tema, debía utilizarse preferentemente a la denominación de bloqueantes a la entrada de calcio o bloqueantes de los canales de calcio u otros similares (VAN HOUTTE, 1987).



El grupo farmacológico de los antagonistas del calcio, ha sido clasificado de distintas maneras según autores. FLECKENSTEIN (1981) los divide en dos grupos, de acuerdo con la especificidad para inhibir la corriente lenta de  $Ca^{2+}$  que poseen estos fármacos:

Grupo A: - Se incluyen fármacos específicos y de potente acción que inhiben el complejo excitación/contracción dependiente del  $Ca^{2+}$  hasta un 90% antes de afectar a la corriente rápida de  $Na^+$ .

- Se subdividen en tres grupos:

I.- Fármacos "Verapamilo-like": Verapamilo y Gallopamil.

II.- Fármacos "Nifedipino-like": Nifedipino, Nitrendipino, Nisoldipino, Nimodipino, Nicardipino, etc...

III.- Fármacos "Diltiazem-like": Diltiazem.

Grupo B: - Son fármacos menos potentes y específicos que los del grupo A. Inhiben el complejo excitación/contracción dependiente de  $Ca^{2+}$  en un 50-60% antes de afectar a la corriente rápida de  $Na^+$ .

- Se incluyen: Prenilamina, Perhexelina, Bepridil, Cinarizina, Flunarizina.

Otra clasificación es la propuesta por KAUFFMANN y cols. (1982). Se basa en los efectos de los antagonistas del calcio sobre el denominado fenómeno Bowditch en preparaciones de músculo papilar aislado de gato. El aumento de la amplitud de la contracción provocada al aumentar la frecuencia se puede modificar de tres maneras por los antagonistas del calcio:

- Grupo I.- Disminuyen o revierten la relación amplitud-frecuencia.
  - Se incluyen: Verapamil, Diltiazem y Fenililina.
  
- Grupo II.- Tienen poco efecto sobre la relación amplitud-frecuencia.
  - Se incluyen: Nifedipino y Prenialmina.
  
- Grupo III.- Provocan un incremento en la respuesta contráctil. Su efecto inotrope (-) desaparece a altas frecuencias.
  - Se incluyen: Perhexelina y Benciclán.

La característica de tiempo-dependencia y la reversibilidad de los efectos inhibitorios de los fármacos antagonistas del  $Ca^{2+}$  en preparaciones de ciego de cobayo, fueron los fundamentos para la clasificación que propuso SPEDDING en 1982:

1.- Dihidropiridinas (DHP):

- Se unen a algún punto específico del canal.
- Se incluyen: Nifedipino, Nimodipino, Nisoldipino, Nitrendipino, etc...

2.- Verapamil y Diltiazem:

- Son fármacos que pueden regular positiva o negativamente la unión de las dihidropiridinas en su lugar específico por un mecanismo alostérico.

3.- Difenilpiperacinas:

- Son fármacos con una marcada  $Ca^{2+}$ /dependencia. Se incluyen Flunarizina y Cinarizina

GODFRAND y cols. (1986) propusieron la siguiente clasificación:

Grupo I. - Bloqueantes de la entrada de  $Ca^{2+}$ :

- Subgrupo I-A:

Sustancias selectivas para los canales lentos del  $Ca^{2+}$  en el miocardio (bloqueadores de los canales lentos:

- Fenilalquilaminas: Verapamil y Gallopamil.
- Dihidropiridinas: Nifedipino, Nitrendipino, Nisoldipino, Nimodipino, Nicardipino, etc.

- Benzotiazepinas: Diltiazem.

- Subgrupo I-B:

Sustancias con acción no percibida sobre la corriente lenta de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el miocardio.

- Difenilpiperacinas: Cinarizina y Flunarizina.

Grupo II.- Bloqueantes no selectivos de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ :

- Subgrupo II-A:

- Sustancias que actúan en los canales del  $\text{Ca}^{2+}$  y en los canales rápidos de  $\text{Na}^+$ .

- Bepridil.

- Subgrupo II-B:

- Sustancias que actúan sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  teniendo otro lugar primario de acción.

### 2.3.1. Antagonistas orgánicos del calcio

Es un grupo formado por diversas sustancias de estructura química muy diferente, pero cuyo principal mecanismo de acción consiste en inhibir el influjo de calcio, durante los procesos de activación de la célula.

De acuerdo con su naturaleza química existen cuatro subgrupos:

- Fenilalquilaminas, cuyos representantes principales son el Verapamil y D600.
- Dihidropiridinas, como la Nifedipina.
- Benzotiazepinas, como el Diltiazem.
- Difenilpiperacinas, como la Funaricina, Cinaricina y Lidoflacina.

BRAUNWALD (1982) sugiere que, teniendo en cuenta la diversidad de estructura química y que los mecanismos de acción para inhibir la corriente cálcica no son totalmente coincidentes, los lugares de unión de estos compuestos a los canales de la membrana, deben ser diferentes. En el mismo año, GLOSSMAN y cols., apuntaron que las dihidropiridinas

tienen su lugar de unión en la parte externa del canal, el Verapamil en la interna y el diltiazem en ninguna de estas zonas.

Para realizar el estudio de los lugares específicos de unión de estos compuestos, se han utilizados técnicas de unión con radioligandos (binding) [(<sup>3</sup>H)-dihidropiridinas, (<sup>3</sup>H)-verapamil y (<sup>3</sup>H)-diltiazem], demostrándose que las hipótesis anteriores eran correctas (JANIS y TRIGGLE, 1984; BALWIERZAK y SCHWARTZ, 1985).

Una vez determinados los puntos de interacción entre el antagonista orgánico y el canal, las experiencias han sido dirigidas hacia la determinación de cual es el mecanismo íntimo de la interacción. SANGUINETTI y KASS (1984a) postularon que la interacción entre un antagonista de calcio y su lugar de unión en el canal, depende de los cambios del potencial de membrana. Estas variaciones, en los canales dependientes de potencial, van a determinar si el estado en que se encuentra dicho canal es de reposo, abierto o inactivado. Los canales en estado de reposo se encuentran cerrados; la apertura se produce cuando la membrana se despolariza. Si la despolarización permanece se inactivan y solamente podrán abrirse o activarse, siempre y cuando mediante una repolarización previa, adquieran previamente el estado de reposo.

Las sustancias que a pH fisiológico se encuentran ionizadas (verapamil) solo pueden acceder a su punto de unión con el canal, cuando éste se encuentra abierto (ruta hidrofílica). Los compuestos neutros (dihidropiridinas) pueden acceder por esta misma vía o a través de la membrana lipídica que rodea el canal inactivado (ruta hidrofóbica) (McDONALD y cols., 1984). En el caso del verapamil la probabilidad de que los canales esten abiertos aumentará de acuerdo con un incremento en la frecuencia de estimulación; no siendo así para las dihidropiridinas.

En contraposición a esta teoría, KANAYA y cols. (1983) exponen que el verapamil y el diltiazem siempre se unen a los canales cuando se presentan en estados de inactivación.

Aún no estando totalmente establecido cual de estos postulados es el correcto, la acción de los bloqueantes de la entrada de calcio es dependiente del potencial de membrana y su efectividad sobre los canales independientes de potencial es grande, aboliendo las contracciones de la fibra lisa producidas por altas concentraciones de potasio.

En el caso de los canales operados por receptor, también presentes en la membrana plasmática, el grado de eficacia de estas sustancias es generalmente mucho menor, aunque existe

una gran variabilidad en cuanto al bloqueo de las respuestas inducidas por agonistas en la fibra lisa muscular.

Los canales operados por receptor presentan dos estadios de activación frente a los bloqueantes de la entrada de calcio: sensibilidad e insensibilidad. La inducción a cualquiera de estos dos estadios, está determinada por la liberación de calcio producida por el agonista a partir del retículo sarcoplásmico y por la concentración de dicho agonista. El estado de activación sensible, aparece a bajas concentraciones del agonista, en los músculos lisos capaces de liberar calcio intracelular y a cualquier concentración cuando no hay liberación de calcio almacenado. El estadio de insensibilidad aparecería cuando las concentraciones son altas en los músculos que liberan calcio desde el retículo sarcoplásmico (CAUVIN y cols., 1983).

CAVERO y cols. (1983) sugieren que el grado de sensibilidad de los canales operados por receptor, al bloqueo con antagonistas del calcio, se debe a la activación particular de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos o  $\alpha_2$  adrenérgicos. Son más sensibles a los antagonistas las respuestas inducidas por la estimulación de los  $\alpha_2$ , mientras que la activación de los  $\alpha_1$  es más resistente. Este autor sugiere que la activación de los receptores  $\alpha_2$  provoca la entrada de calcio extracelular y la de los  $\alpha_1$  la de calcio



intracelular. Pero también SKARBY y cols. (1984) han observado que las respuestas inducidas por estimulación de receptores  $\alpha_1$  son dependientes del calcio extracelular y se pueden bloquear por antagonistas del calcio.

Ya hemos mencionado que la acción principal de los bloqueantes de la entrada de calcio, es impedir la entrada del mismo a través de los canales específicos de la membrana celular y fundamentalmente de los voltaje dependientes de potencial; pero existen una serie de acciones secundarias, con respecto del calcio como son: interacciones con la calmodulina, estimulación de la bomba de sodio, aumento de la salida de calcio e interacción con las proteínas contráctiles, que van a participar de manera secundaria en su acción farmacológica general (GODFRAND y cols., 1986).

Estos autores opinan que la efectividad de los antagonistas del calcio esta en relación con su tropismo por el tejido, la selectividad de acción sobre los canales, la dependencia del potencial de membrana, la dependencia de la frecuencia de estimulación y las acciones secundarias frente al calcio.

### 2.3.2. Antagonistas inorgánicos del calcio

En este grupo pueden incluirse el  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . Estos cationes polivalentes son antagonistas del calcio no selectivos y presentan una mayor afinidad que el calcio por sus puntos de unión, desplazándolo o bloqueando su transporte.

El antagonista inorgánico más utilizado ha sido el  $\text{La}^{3+}$ . Este catión se une fuertemente a los lugares de la membrana que participan en el transporte del calcio, desplazándolo de los lugares de la superficie a los que se ha unido (HAGIWARA, 1983). Bloquea la entrada de calcio a través de los canales de goteo, los operados por receptor y los dependientes de potencial (RAEBURN, 1987). Inhibe totalmente la respuesta inducida por altas concentraciones de potasio y disminuye las que son producidas por la movilización de los depósitos intracitoplasmáticos. Así como el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, se encuentra muy comprometido por la acción del  $\text{La}^{3+}$ , la salida del calcio persiste puesto que el mecanismo de transporte del calcio dependiente de ATP no sufre ninguna modificación (DROOGMANS y cols., 1977; CAUVIN y cols., 1983).

El  $\text{Mn}^{2+}$  también modifica la respuesta inducida por el potasio, y por la noradrenalina en el músculo liso. Al igual

que el lantano es considerado como un inhibidor no selectivo que impide la aparición del potencial de acción en la musculatura lisa (SULLIVAN y cols., 1968; KEENE y cols., 1972).

### 2.3.3. Nitrocompuestos

El grupo de los nitrocompuestos está formado por el nitroprusiato sódico, la nitroglicerina y el nitrito de isoamilo. Desde el punto de vista de su estructura química tienen en común la presencia de oxido de nitrógeno en su molécula. Producen relajación de la fibra lisa muscular, pero sus efectos pueden ser variables. En aorta de conejo inhiben las contracciones inducidas por noradrenalina, histamina y angiotensina II, pero no ejercen bloqueo alguno sobre las respuestas producidas por concentraciones elevadas de potasio (OHASHI y cols., 1983; WATKINS y DAVIDSON, 1980; KARAKI y cols., 1984a).

El nitroprusiato sódico es el nitroferricianuro sódico, cuya acción vasodilatadora es consecuencia de la presencia del ión nítrico. Su mecanismo de acción no se conoce completamente. KARAKI y WEISS (1984) consideran que el nitroprusiato sódico es un inhibidor selectivo de la entrada de calcio al citosol a través de los canales operados por receptor. En contraposición con esta idea, experiencias realizadas en tejido liso no vascular demuestran que el nitroprusiato sódico no produce ninguna inhibición de las respuestas provocadas por agonistas; por esta razón su mecanismo de acción no puede centrarse únicamente en el

bloqueo propuesto por KARAKI y WEISS (1984). (KREYE, 1980; ROSENGERG y cols., 1979; BRADING y SNEDDON, 1980).

ITOH y cols. (1983a) proponen que además de interferir el influjo de calcio a través de canales operados por receptor, impiden la liberación del calcio intracelular.

En la última década, ha sido demostrado, que los nitrocompuestos son sustancias relajantes de la musculatura lisa porque provocan una elevación de los niveles de GMPC, por activación directa de la guanilato ciclasa. La activación de esta enzima está mediada por el oxido nítrico que los nitrocompuestos generan en las células (GRUETER y cols., 1980, 1981).

El mecanismo por el cual el GMPC disminuye fuertemente los niveles de calcio citosólico, relajando la musculatura lisa, no ha sido determinado. Son varias las sugerencias sobre el desarrollo del mismo, pero no están confirmadas. Para SARMIENTO y cols. (1981), se trata de fenómenos de captación del calcio por los microsomas. El secuestro del calcio está mediado por una proteínquinasa dependiente del GMPC. ITOH y cols. (1985) sugieren que el GMPC activa la eliminación del calcio de la célula. En esta línea la proteínquinasa dependiente del GMPC catalizaría la fosforilización de varias proteínas que podrían participar en

un aumento del eflujo de calcio o una disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$  (MORGAN y MORGAN, 1984).

SYBERTZ y cols. (1986) proponen que el GMPC, y por tanto los nitrocompuestos, no modifican la movilización del calcio, sino que alteran la señal del calcio necesaria para que aparezca la contracción.

En general podemos decir que los nitrocompuestos son relajantes de la musculatura lisa que elevan los niveles de GMPC y disminuyen la concentración de calcio citosólico.

### **3.- MATERIAL Y METODO**

### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. Material biológico

Goteras reticulares de bóvidos adultos de distintas razas, principalmente cruces industriales (Matadero Municipal de Madrid).

#### 3.1.2. Material diverso

- Material quirúrgico.
- Recipientes isotermos.
- Copa de baño de órganos (25 ml).

#### 3.1.3. Aparataje

- Polígrafo (Grass 79 D).
- Preamplificadores (Grass 7P.1).
- Amplificadores (Grass 7.D.A.).
- Transductores isométricos (Grass FTO 3).
- Estimulador (Grass S.D.9).
- Temporizador (Cibertec).
- Termostato (Tectrom S. 473.100).
- Electrodo de plata en forma de anillo.
- Balanza analítica electrónica (Mettler A.E. 160).
- Ordenador (Netset 386SX/600).



- Programas (W.P. 5.1.; Harvard Graphics; Sigma; Lotus Freelance plus).
- Micropipetas de 20, 100, 200 y 1.000  $\mu\text{l}$  (Pipetman Gilson).

#### 3.1.4. Soluciones

- Ringer Tyrode sin glucosa (RT).
- Ringer Tyrode sin glucosa rico en  $\text{K}^+$  ( $\text{RTK}^+$ ).
- Ringer Tyrode sin glucosa libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{RTOCa}^{2+}$ ).
- Ringer Tyrode sin glucosa libre de  $\text{Ca}^{2+}$  rico en  $\text{K}^+$  ( $\text{RTK}^+\text{OCa}^{2+}$ ).
- Ringer Tyrode sin glucosa libre de  $\text{Ca}^{2+}$  con EGTA ( $\text{RTOCa}^{2+}_{\text{EGTA}}$ ).
- Ringer Tyrode sin glucosa libre de  $\text{Ca}^{2+}$  con EGTA rico en  $\text{K}^+$  ( $\text{RTK}^+\text{OCa}^{2+}_{\text{EGTA}}$ ).
- Ringer Tyrode sin glucosa hipertónico rico en  $\text{K}^+$ : se preparó adicionando  $\text{KCl}$  (42,4 mM) al RT sin reducir la cantidad de  $\text{NaCl}$ .

	RT	RTK <sup>+</sup>	RTOCa <sup>2+</sup>	RTOKCa <sup>2+</sup>	RTOCa <sup>2+</sup> EGTA	RTKOCa <sup>2+</sup> EGTA
mM						
CaCl <sub>2</sub>	3.5	3.5	--	--	--	--
NaCl	136.7	--	136.7	--	136.7	--
KCl	2.6	139.3	2.6	139.3	2.6	139.3
MgSO <sub>4</sub>	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
NaHCO <sub>3</sub>	11.9	11.9	11.9	11.9	11.9	11.9
Glucosa	--	--	--	--	--	--
EGTA	--	--	--	--	0.1	0.1

### 3.1.5. Sustancias y reactivos

- CaCl<sub>2</sub> (Panreac).
- NaCl (Panreac).
- KCl (Panreac).
- Mg SO<sub>4</sub> (Panreac).
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac).
- NaHCO<sub>3</sub> (Panreac).
- Acido etilen glicol-bis ( $\beta$ -amino-etil eter)  
N,N,N',N'-tetra acético) (EGTA) (Sigma).
- Verapamil (Sigma).
- Nitroprusiato sódico (Sigma).
- Tetrodotoxina (TTX) (Sigma).
- Cafeína (Sigma).
- Carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>).
- Fenilefrina (F.E.) (Sigma).

### 3.1.6. Dilución de reactivos y sustancias

Todas las soluciones fueron realizadas y almacenadas de acuerdo con la normativa recomendada por MARTINDALE (1989).

## 3.2. METODO

### 3.2.1. Aislamiento y montaje de la preparación

La recogida del material biológico se realizaba en el Matadero Municipal de Madrid a diario. Durante la evisceración de los animales, recién sacrificados, se extraía la gotera reticular de forma que no se lesionara la misma. El traslado al laboratorio se realizaba en termos estancos que contenían Ringer Tyrode ( $4^{\circ}\text{C}$ ;  $38^{\circ}\text{C}$ ).

Para aislar los haces de fibras lisas del suelo de la gotera reticular, se procedía a la exéresis de todos los tejidos circundantes. Los labios de la gotera una vez separados, se fijaban a una tabla de disección, evidenciándose claramente la mucosa del suelo. Mediante una cuidadosa disección con tijera, evitando lesionar las fibras lisas, se retiraba dicha mucosa. Del tercio anterior de cada gotera extraíamos dos haces musculares de 15 a 20 mm de longitud por 2 a 5 mm de diámetro, que se colocaban en una placa de Petri con RT a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Figura 7) (adaptación del método de ENCINAS y col. 1989).

Estas preparaciones se unían por un extremo mediante una ligadura inextensible, a un soporte, para ser posteriormente introducidas en una copa de baño de órganos conteniendo 20 ml

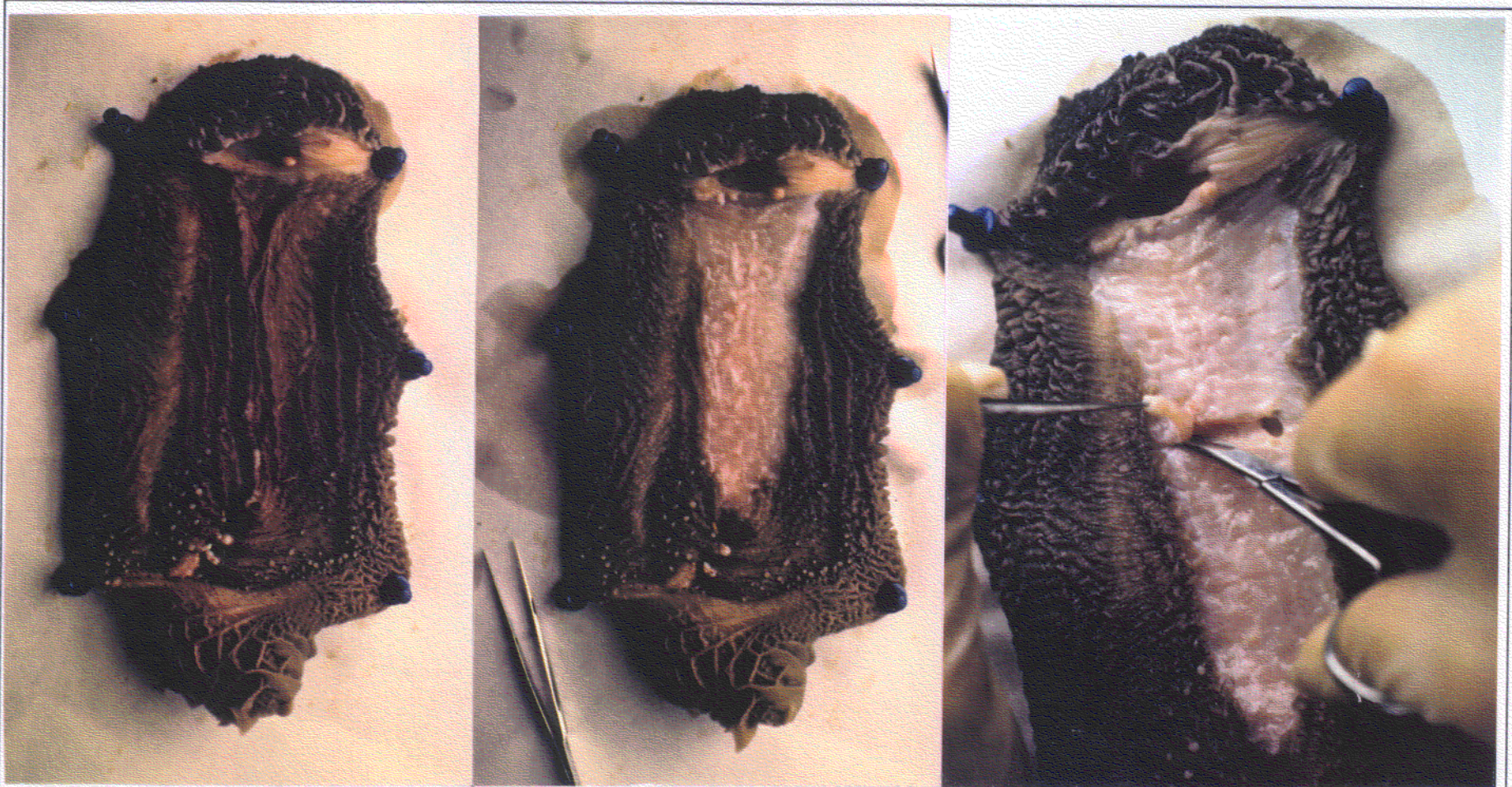


FIGURA 7: Disección y obtención de las fibras musculares lisas transversales del suelo de la gotera reticular bovina, según ENCINAS y cols. (1989).

de RT ( $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y oxigenadas con un burbujeo micronizado de carbógeno. El otro extremo del haz de fibras se fijaba a un transductor isométrico, con un hilo inextensible. Las piezas eran sometidas a una tensión inicial de 0,02 Nw y la sensibilidad se fijaba a 5 mV/cm, estableciéndose un período de adaptación a estas condiciones de 60 minutos.

En todas las experiencias se constataba el buen funcionamiento de las fibras utilizando, solamente aquellas cuya respuesta era estable y duradera.

El volumen adicionado a la copa de sustancias y reactivos no superó nunca los 500  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.2. Contracción inducida por KCl

La respuesta contráctil inducida por KCl se llevaba a cabo mediante la sustitución del RT por RTK<sup>+</sup> (42,4 mM). A continuación se lavaban las preparaciones tres veces con RT (3 Lv).

#### \* Naturaleza de la respuesta:

- Evolución en el tiempo (esquema 1A).
- Reproducibilidad.
  - Doble despolarización (esquema 1A).
  - Concentraciones crecientes de KCl (esquema 2A).
- Soluciones hipertónicas de KCl (esquema 1B).

#### \* Supresión del Ca<sup>2+</sup> en el medio (esquema 2B y 2B').

#### \* Adición de verapamil y nitroprusiato sobre la contracción inducida por KCl (esquema 3A y 3B).

#### \* Incubación con nitroprusiato sódico previa a la depolarización por KCl (esquema 2A').



- \* Incubación con verapamil y nitroprusiato sódico previa a la depolarización por KCl en ausencia de calcio (esquema 2C y 2D).
  
- \* Influencia del calcio sobre la depolarización inducida por KCl (esquema 4).
  - Reproducibilidad (esquema 5A).
  - Incubación con verapamil y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}M$ ) (esquema 5B y 5C).



### 3.2.3. Contracción inducida por fenilefrina (F.E.)

Las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina se llevaban a cabo mediante la adición en la copa del baño de órganos de fenilefrina (F.E) ( $10^{-6}\text{M}$ ). A continuación se realizaba el lavado de las preparaciones de la misma forma que en el caso anterior (3 Lv).

**\* Naturaleza de la respuesta:**

- Evolución en el tiempo (esquema 6A).
- Reproducibilidad (esquema 6A).

**\* Supresión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (esquema 6D).**

**\* Incubación con verapamil y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}\text{M}$ ) (esquema 6B y 6C).**

### 3.2.4. Contracción inducida por estimulación eléctrica transmural (EET)

Las condiciones generales de trabajo fueron comunes a las del apartado 2.1., excepto que la sensibilidad elegida era de 10 mV/cm.

Para la estimulación eléctrica se utilizaron electrodos de plata en forma de anillo. Los haces de fibras se fijaban a un soporte por uno de sus extremos, introduciéndose posteriormente a través de los anillos inferior y superior.

Las señales eléctricas emitidas por los electrodos se producían en un estimulador Grass S.D. 9, que libera pulsos de ondas cuadradas, de las que podíamos modificar: la diferencia de potencial, la frecuencia, y la duración de los impulsos según los requerimientos de las distintas experiencias.

#### \* Determinación de las condiciones de estimulación

Para establecer las condiciones idóneas de trabajo realizamos una serie de pruebas preliminares con distintos valores de todos aquellos parámetros que influyen en la EET, de manera que aplicamos diferencias de potencial entre 50 V y 100 V; frecuencias entre 0,8 Hz y 50 Hz; pulsos entre 0,4

y 8 ms; duración del estímulo entre 1 y 5 s, e intervalos entre 1 y 4 min.

- \* Supresión del  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (esquema 8).
  
- \* Incubación con verapamil y nitroprusiato cálcico ( $10^{-6}\text{M}$ ) (esquema 7B y 7C).
  
- \* Incubación con cafeína en un medio con y sin  $\text{Ca}^{2+}$  (esquema 8C y 8D).
  
- \* Adición de tetrodotoxina (TTX).

Se realizó una EET continuada con las siguientes condiciones: voltaje supramaximal, frecuencia 30 Hz, pulso de 2 ms con una duración de 5 s e intervalos de 4 min. Después de 30 min en estas condiciones se procedía a la adición de TTX ( $10^{-6}\text{M}$ ), dejándola actuar durante 120 min sin dejar de estimular eléctricamente la fibra.

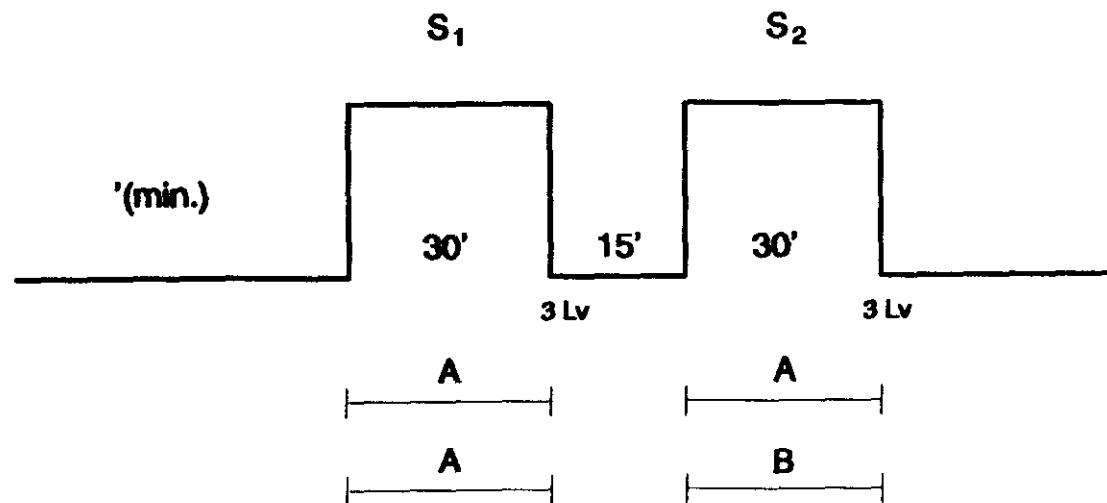
### 3.2.5. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados fueron sometidos a un estudio estadístico, mediante el programa SIGMA. Los resultados mostrados en todo nuestro trabajo se expresan como Media±Error standard medio (E.S.M.) de un número mínimo de 5 pruebas.

Para el cálculo de la Dosis Efectiva 50 ( $DE_{50}$ ), Dosis Inhibitoria 50 ( $DI_{50}$ ) y Frecuencia de Estimulación Eléctrica 50 ( $FEE_{50}$ ) se utilizó la ecuación de la recta obtenida mediante regresión lineal para todos los experimentos.

La significación estadística de los resultados se calculó mediante la comparación de medias independientes (Test de la "t" de Student).

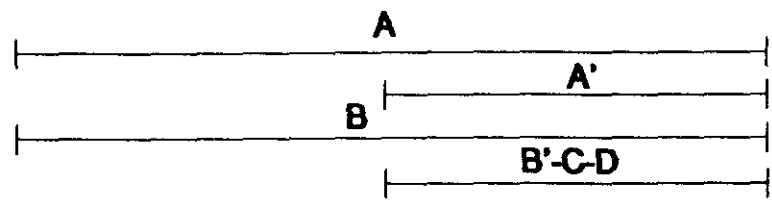
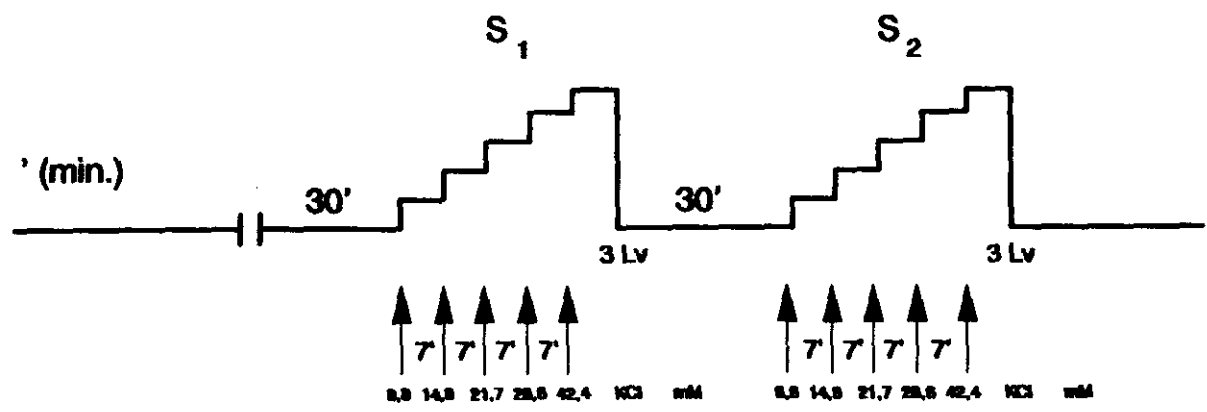
**ESQUEMA 1**



A) RTK<sup>+</sup> ISOTONICO (42,4 mM)

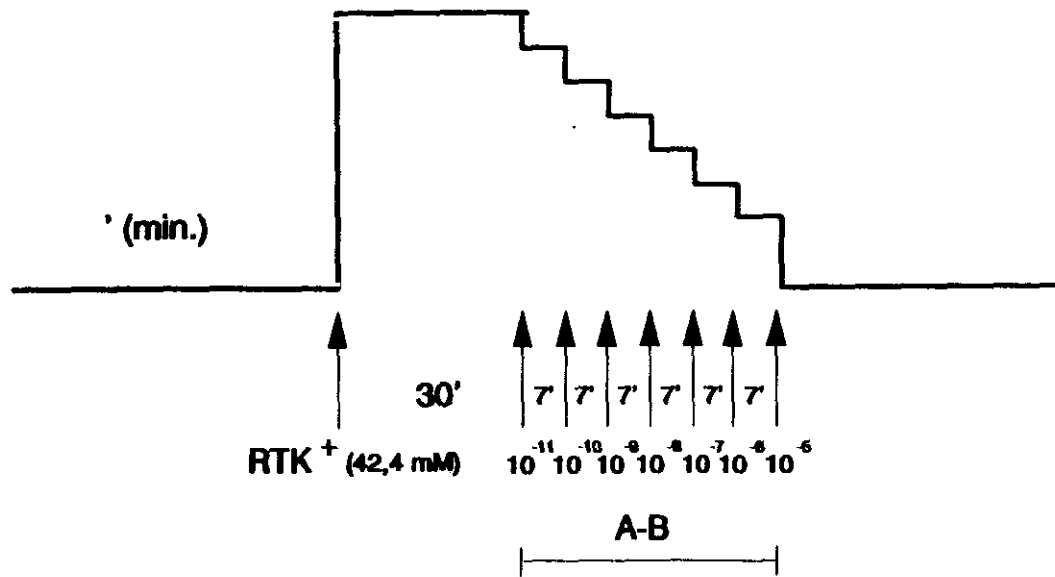
B) RTK<sup>+</sup> HIPERTONICO (42,4 mM)

ESQUEMA 2



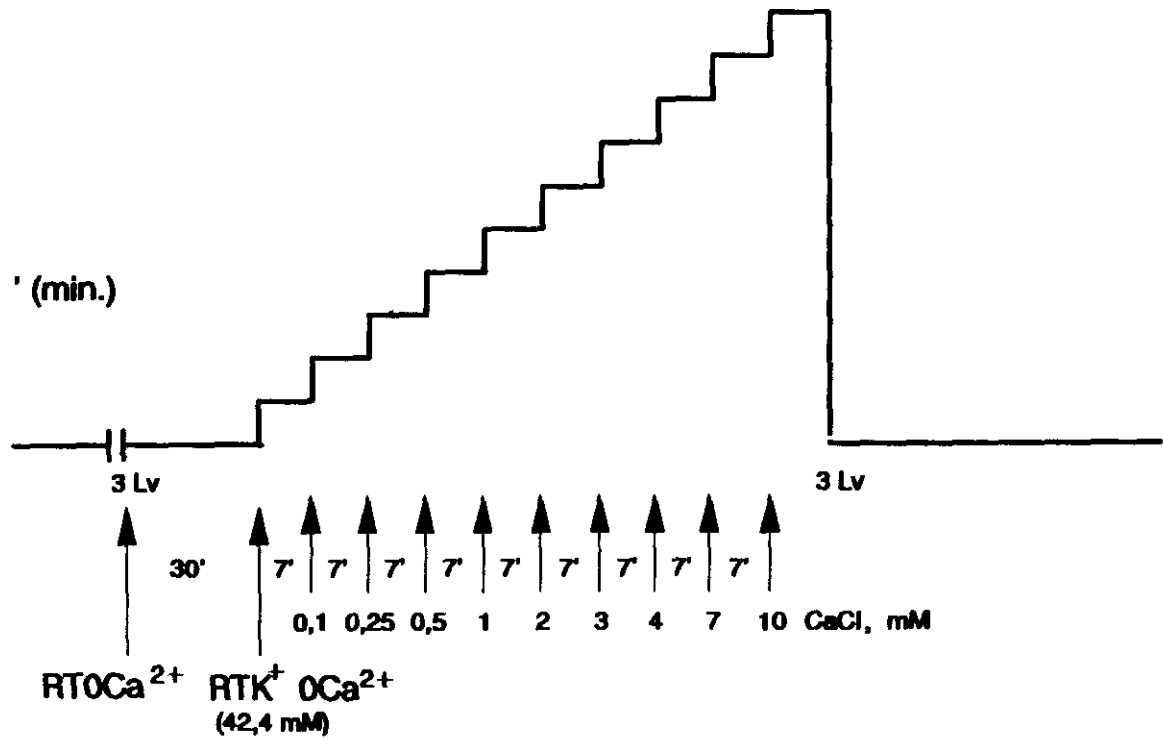
- A) RT                      A') RT + Nitroprusiato ( $10^{-6}$  M)
- B) RT0Ca<sup>2+</sup>              B') RT0Ca<sup>2+</sup><sub>EGTA</sub>
- C) RT0Ca<sup>2+</sup><sub>EGTA</sub> + Verapamil ( $10^{-6}$  M)
- D) RT0Ca<sup>2+</sup><sub>EGTA</sub> + Nitroprusiato ( $10^{-6}$  M)

**ESQUEMA 3**



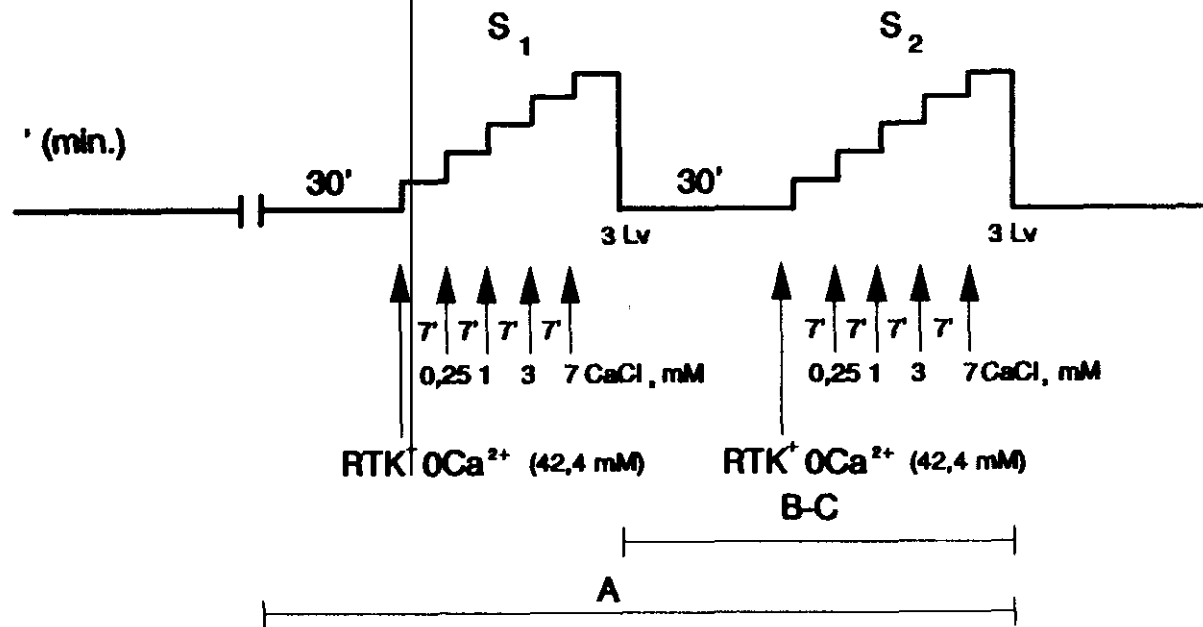
- A) VERAPAMIL
- B) NITROPRUSIATO SODICO

ESQUEMA 4



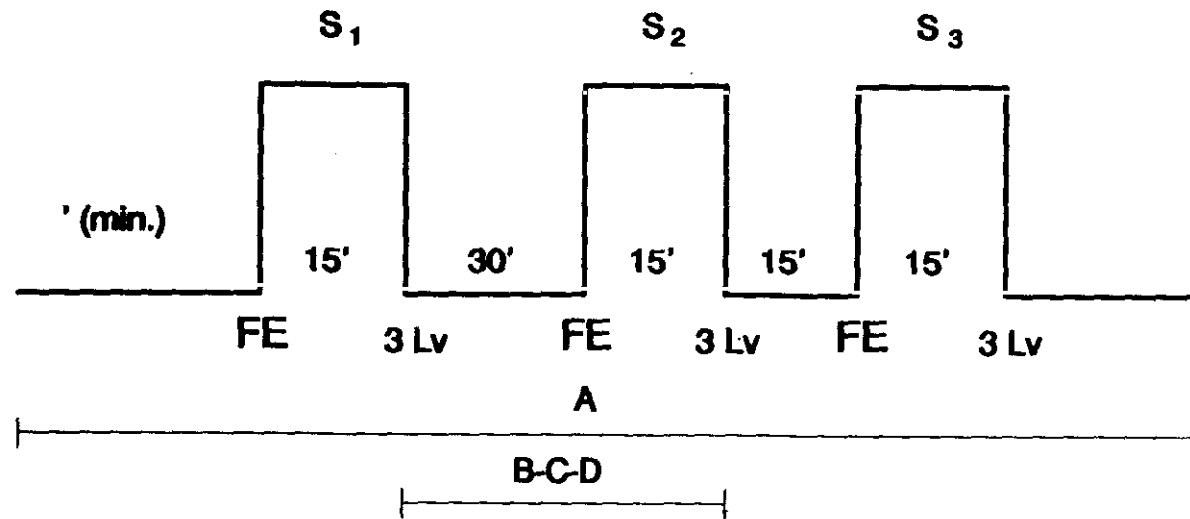


ESQUEMA 5



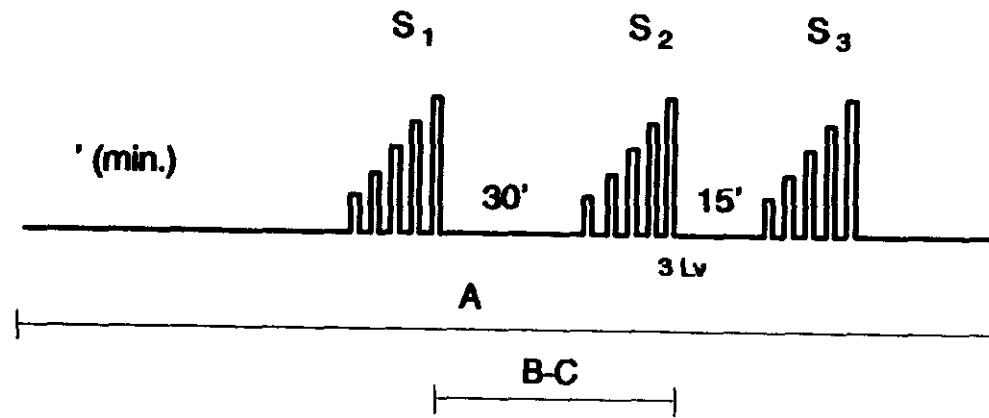
- A) RT0Ca<sup>2+</sup>
- B) RT0Ca<sup>2+</sup>+ Verapamil (10<sup>-6</sup> M)
- C) RT0Ca<sup>2+</sup>+ Nitroprusiato (10<sup>-6</sup> M)

ESQUEMA 6



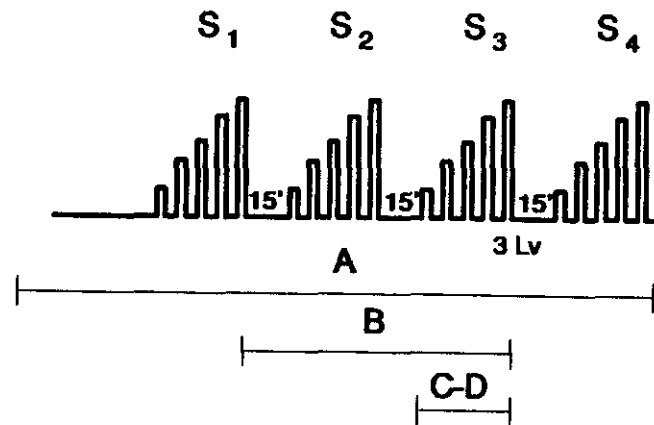
- A) RT
- B) VERAPAMIL ( $10^{-6}$  M)
- C) NITROPRUSIATO SODICO ( $10^{-6}$  M)
- D) RT0Ca<sup>2+</sup><sub>EGTA</sub>

**ESQUEMA 7**



- A) RT
- B) VERAPAMIL ( $10^{-6}$ M)
- C) NITROPRUSIATO SODICO ( $10^{-6}$ M)

ESQUEMA 8



A) RT

B) RT0Ca<sup>2+</sup><sub>EGTA</sub>

C) RT + Cafeina (30x10<sup>-3</sup> M)

D) RT0Ca<sup>2+</sup><sub>EGTA</sub> + Cafeina (30x10<sup>-3</sup> M)

## **4.- RESULTADOS**

#### 4.1. RESPUESTA DE LAS PREPARACIONES DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR FRENTE AL KCl

El KCl (42,4 mM), provoca la aparición de una respuesta contráctil excitatoria de la fibra lisa del suelo de la gotera reticular, que se caracteriza por ser una contracción de tipo fásico seguida de una pequeña relajación y un mantenimiento de tipo tónico (Gráfica 1, Registro 1).

La evolución de la respuesta al KCl en el tiempo es reproducible, ya que si se repite la administración de KCl (42,4 mM) pasados treinta minutos de incubación en RT, induce una nueva contracción, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre  $S_1$  y  $S_2$ .

Se realizaron curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de KCl entre 8,8 y 42,4 mM, no existiendo tampoco diferencias estadísticamente significativas entre las curvas  $S_1$  y  $S_2$ . La  $CE_{50}$  calculada para la curva  $S_1$  es igual a 23,39 mM  $K^+$ , y para la  $S_2$  es igual a 26,90 mM  $K^+$  (Gráfica 2A, Tabla 1A).

La respuesta contráctil inducida por soluciones isotónicas de KCl es semejante a la producida por

soluciones hipertónicas de KCl, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos tipos de respuesta.

#### 4.1.1 Influencia del calcio extracelular

La supresión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (incubación 30 minutos en un medio  $\text{RTOCa}^{2+}$ ), determina una fuerte inhibición de la respuesta contráctil, produciendo un desplazamiento de la curva a la derecha y una clara disminución del efecto máximo, frente a concentraciones crecientes de KCl (8,8; 14,8; 21,7; 28,6 y 42,4 mM) (Gráfica 2B). La adición de EGTA al medio sin calcio no modifica la respuesta, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas curvas (Gráfica 2B, Registro 4A, Registro 4C). Este hecho se verificó mediante la adición de EGTA sobre la contracción inducida por 42,4 mM en un medio libre de calcio.

El efecto del verapamil y el nitroprusiato sódico sobre la contracción inducida por KCl (42,4 mM) nos indica que el verapamil tiene un mayor efecto relajante que el nitroprusiato, ya que al realizar las experiencias con concentraciones crecientes de estos compuestos (desde  $10^{-11}$  hasta  $10^{-5}$  M), se obtuvo una  $\text{DI}_{50}$  para el verapamil de

$3,89 \times 10^{-6}$  M y una  $DI_{50}$  para el nitroprusiato sódico de  $1,41 \times 10^{-4}$  M (Gráfica 3, Registro 2).

La incubación durante 30 minutos de las preparaciones en un medio que contenga nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) no influye en la respuesta contráctil inducida por concentraciones crecientes de KCl (desde 8,8 hasta 42,4 mM); no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las curvas  $S_1$  y  $S_2$  (Gráfica 4A, Registro 3, Tabla 1A).

La supresión de  $Ca^{2+}$  del medio no afecta a la respuesta del verapamil ni del nitroprusiato, ya que, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas realizadas en un medio libre de calcio y en un medio libre de calcio más nitroprusiato sódico ( $p < 0,05$ ). El verapamil bloquea completamente la pequeña respuesta observada en el control ( $0,05 \geq p \geq 0,01$ ) (Gráfica 4B, Registro 4B).

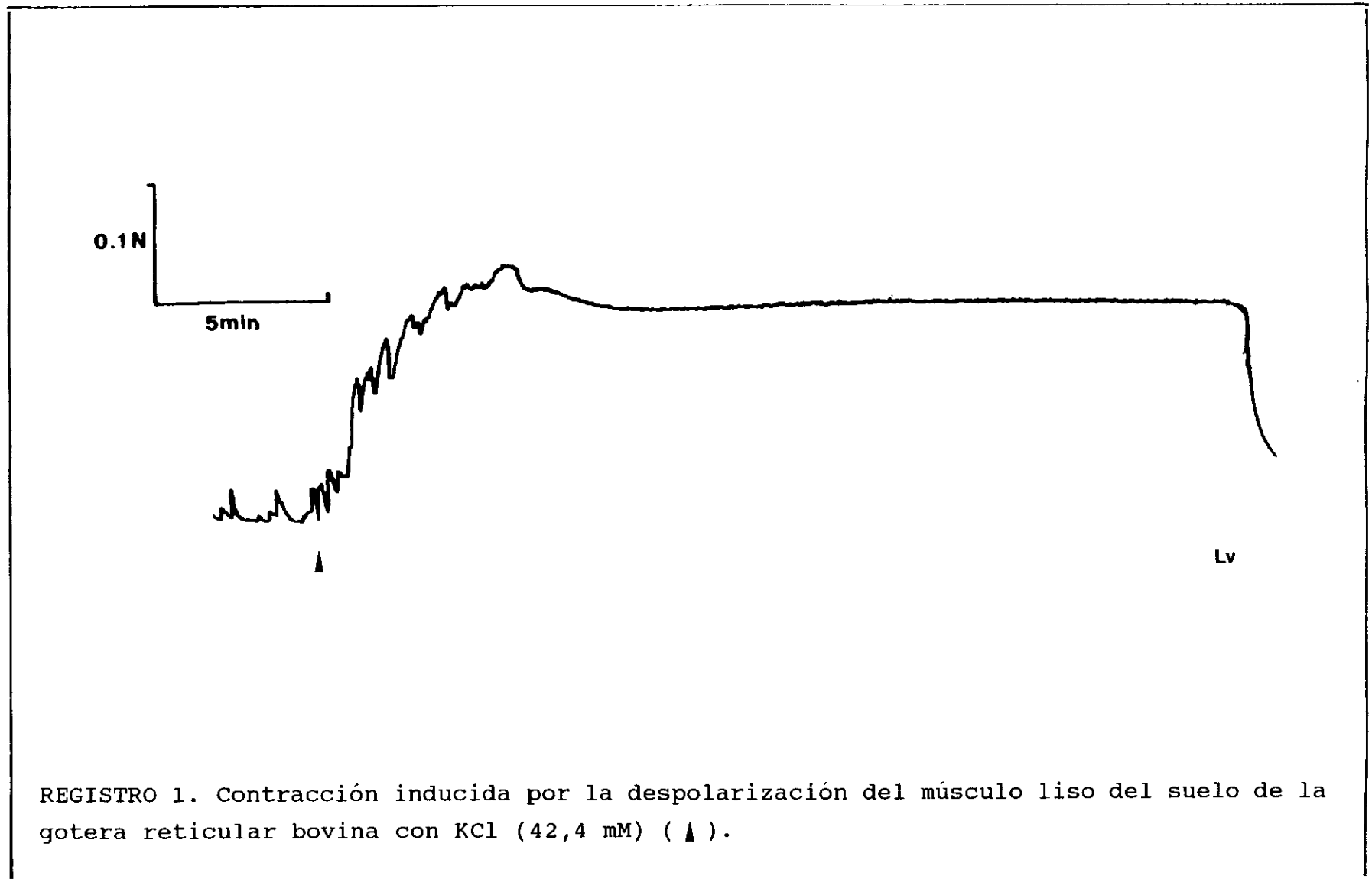


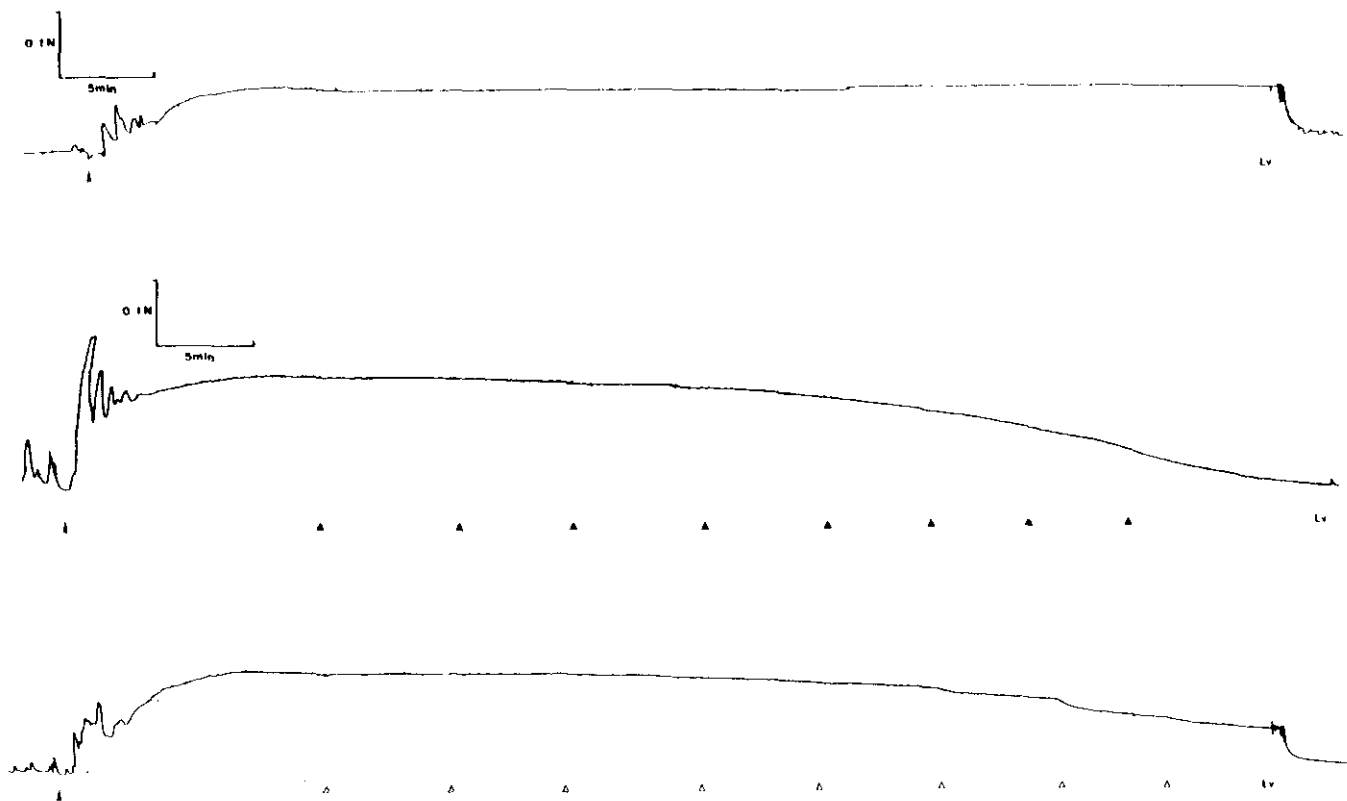
#### 4.1.2. Influencia de la adición de $Ca^{2+}$ sobre la despolarización ( $K^+$ 42,4 mM) en un medio libre de calcio

El efecto de la adición de concentraciones crecientes de  $CaCl_2$  (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 7; 10 mM) sobre la despolarización inducida por KCl (42,4 mM) en un medio carente de calcio, produce un aumento de la respuesta contráctil, existiendo una clara relación dosis-respuesta (Gráfica 5). La  $DE_{máx}$  es 7 mM  $CaCl_2$ , la  $DE_{mín}$  es 0,25 mM  $CaCl_2$ . El uso de nueve concentraciones crecientes de  $CaCl_2$  determina un fenómeno de agotamiento de la fibra, alcanzándose un efecto máximo del 67%. Las concentraciones crecientes de  $CaCl_2$  idóneas para conseguir la respuesta óptima fueron 0,25; 1; 3 y 7 mM. Estas curvas dosis-respuesta al calcio, se reproducen cada 30 minutos sin que existan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellas (Gráfica 6, Tabla 1B), alcanzando el 100% de respuesta con estas cuatro adiciones.

La incubación durante 30 minutos de las preparaciones con verapamil ( $10^{-6}$  M), en las condiciones anteriormente mencionadas, determinan una inhibición de la respuesta contráctil de un 80% aproximadamente para todas las dosis estudiadas. Si la incubación se realiza con nitroprusiato

sódico ( $10^{-6}$  M) el efecto inhibitorio es aproximadamente un 30%. (Gráfica 7, Tabla 1B, Registro 5).

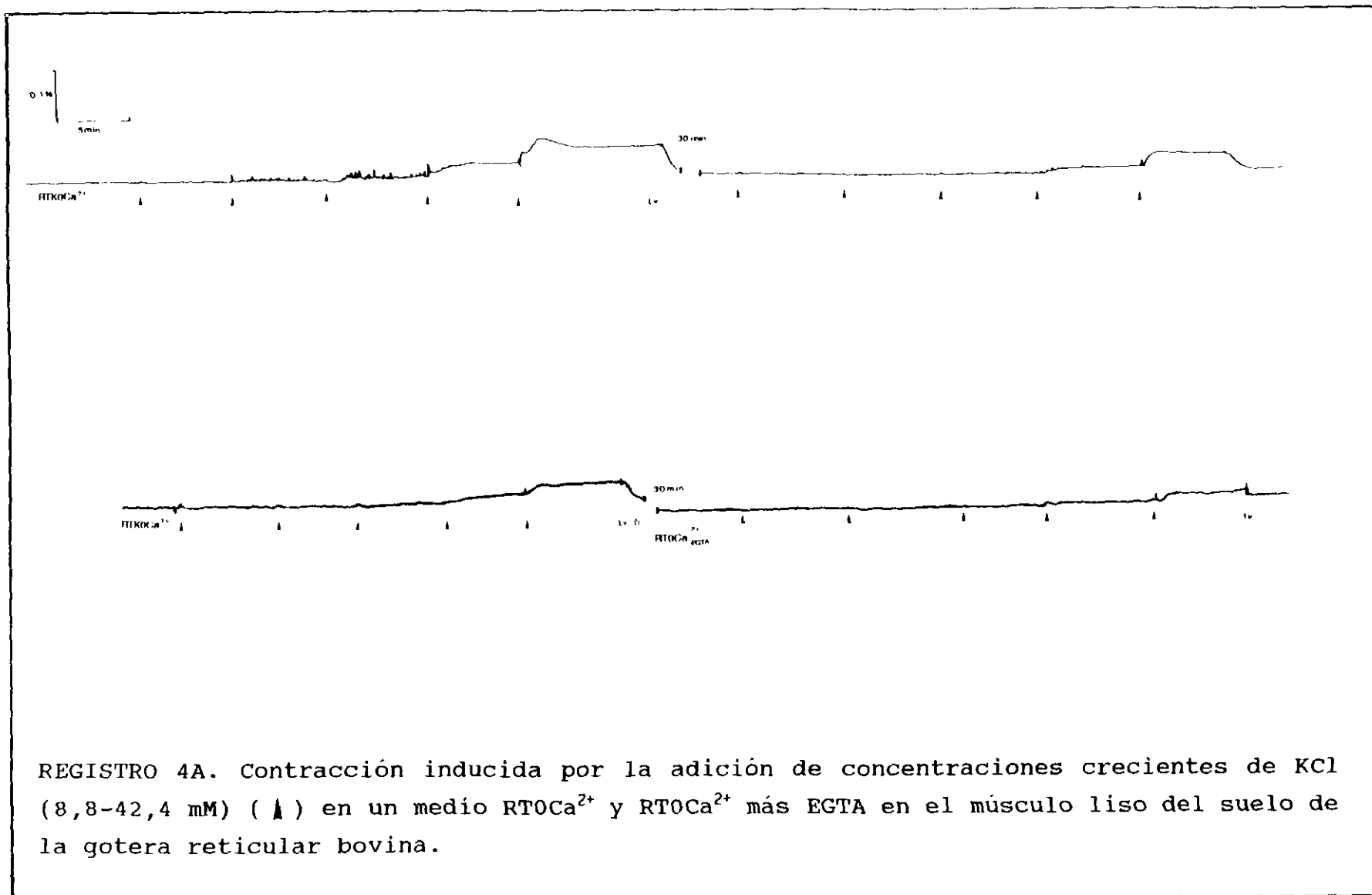




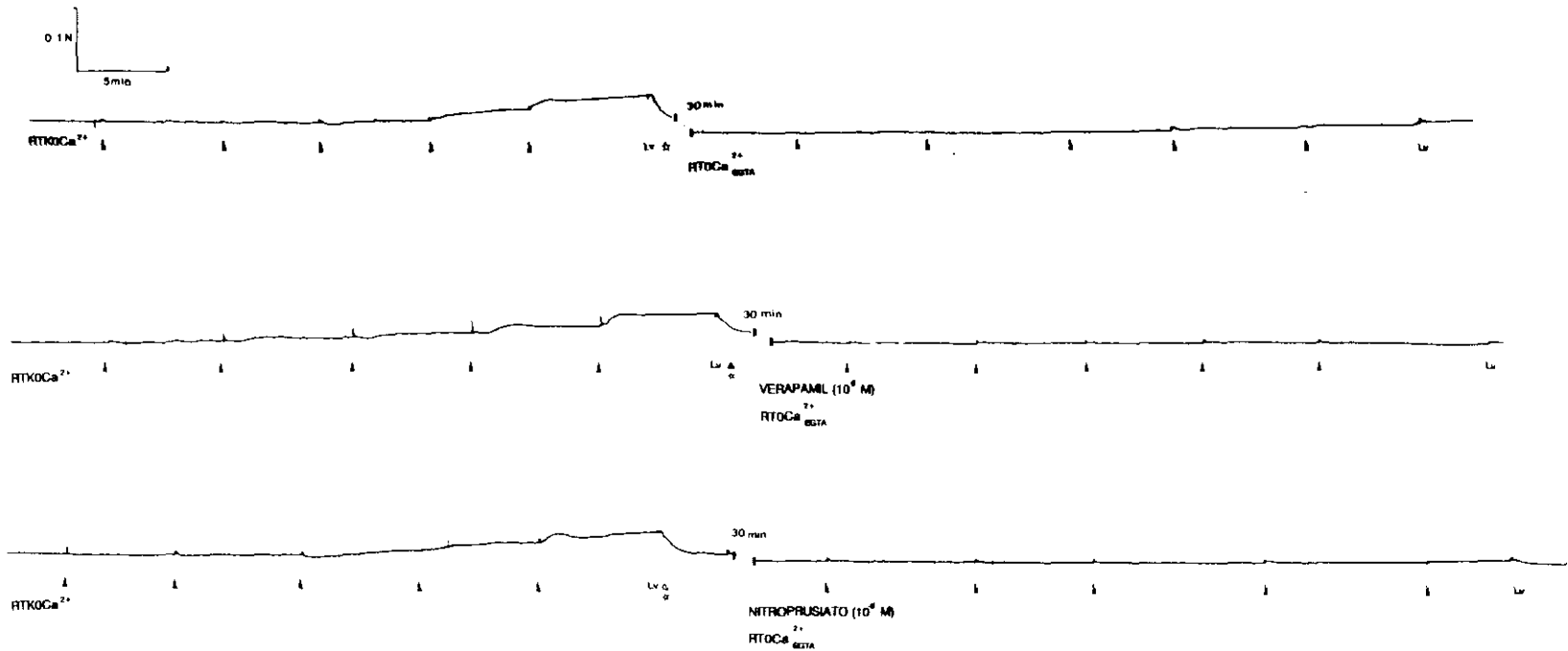
REGISTRO 2. Efecto de la adición de concentraciones acumulativas ( $10^{-11}$ - $10^{-4}$  M) de verapamil (▲) y nitroprusiato sódico (Δ) sobre la contracción inducida por KCl (42,4 mM) (▲) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



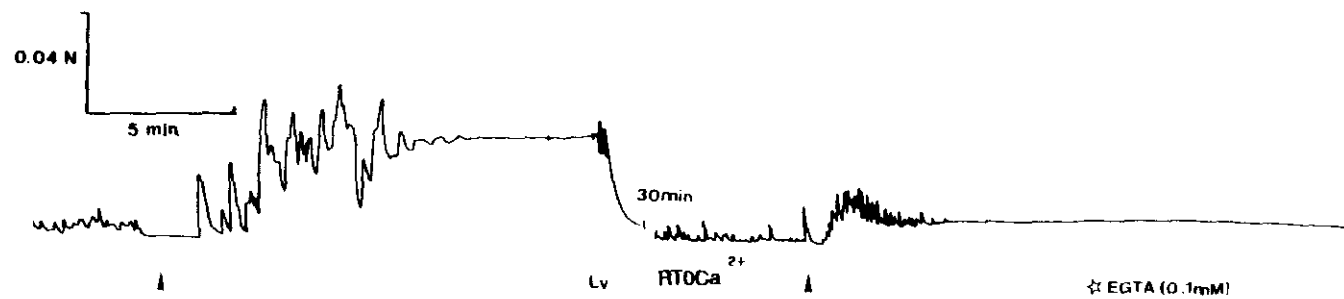
REGISTRO 3. Efecto de la incubación con nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) ( $\Delta$ ) sobre la respuesta inducida por concentraciones crecientes de KCl (8,8-42,4 mM) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



REGISTRO 4A. Contracción inducida por la adición de concentraciones crecientes de KCl (8,8-42,4 mM) (▲) en un medio RT0Ca<sup>2+</sup> y RT0Ca<sup>2+</sup> más EGTA en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.

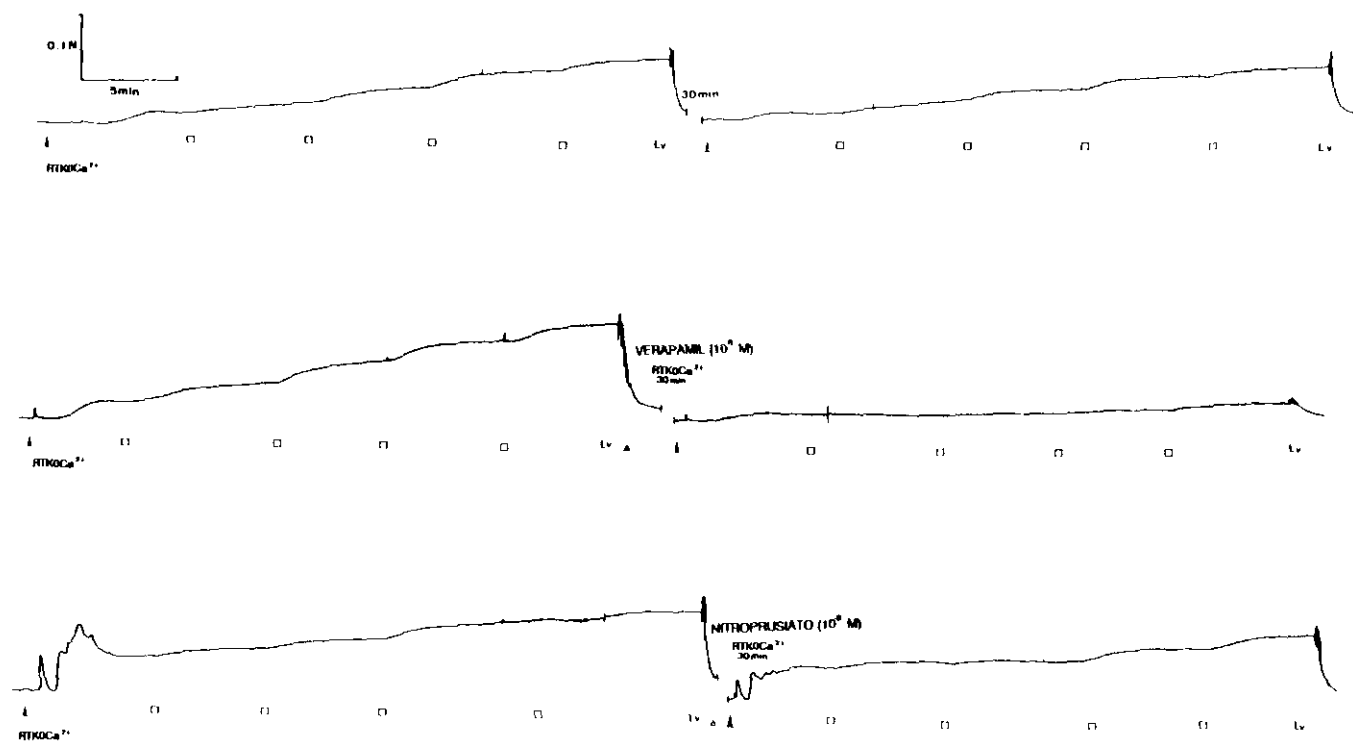


REGISTRO 4B. Efecto de la incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M) ( $\blacktriangle$ ) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) ( $\triangle$ ) sobre la contracción inducida por concentraciones crecientes de KCl (8,8-42,4 mM) en un medio RT0Ca<sup>2+</sup> más EGTA en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.

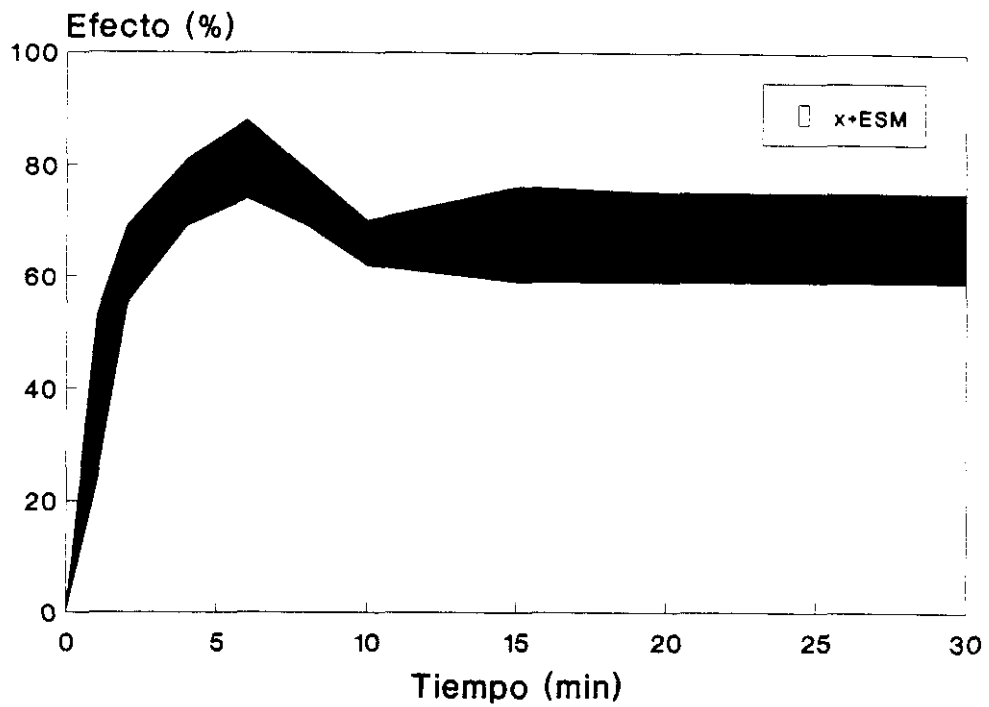


REGISTRO 4C. Efecto de la adición de EGTA (0,1 mM) (☆) sobre la contracción inducida por KCl (42,4 mM) (▲) en un medio RTOCa<sup>2+</sup> en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.

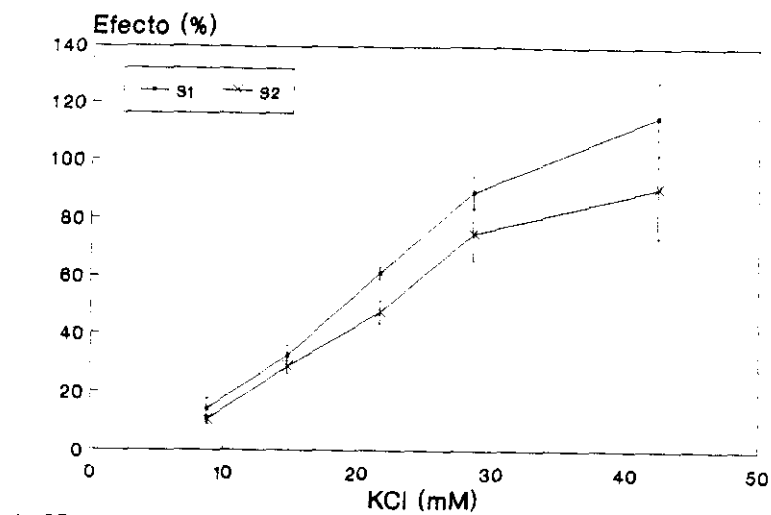




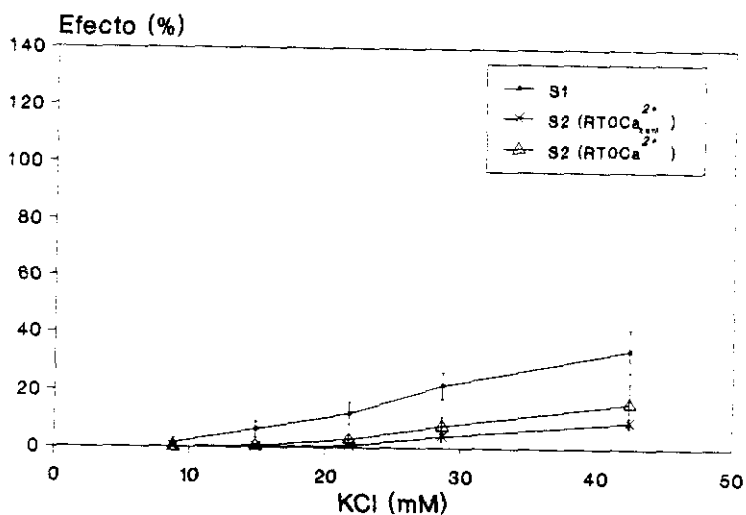
REGISTRO 5. Efecto de la incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M) ( $\blacktriangle$ ) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) ( $\blacktriangle$ ) sobre la contracción inducida por la adición de  $CaCl_2$  (0,25-7 mM) en un medio  $RTKOCa^{2+}$  (42,4 mM) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



GRAFICA 1. Evolución en el tiempo de la respuesta contráctil inducida por KCl (42,4 mM) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina (n=5).

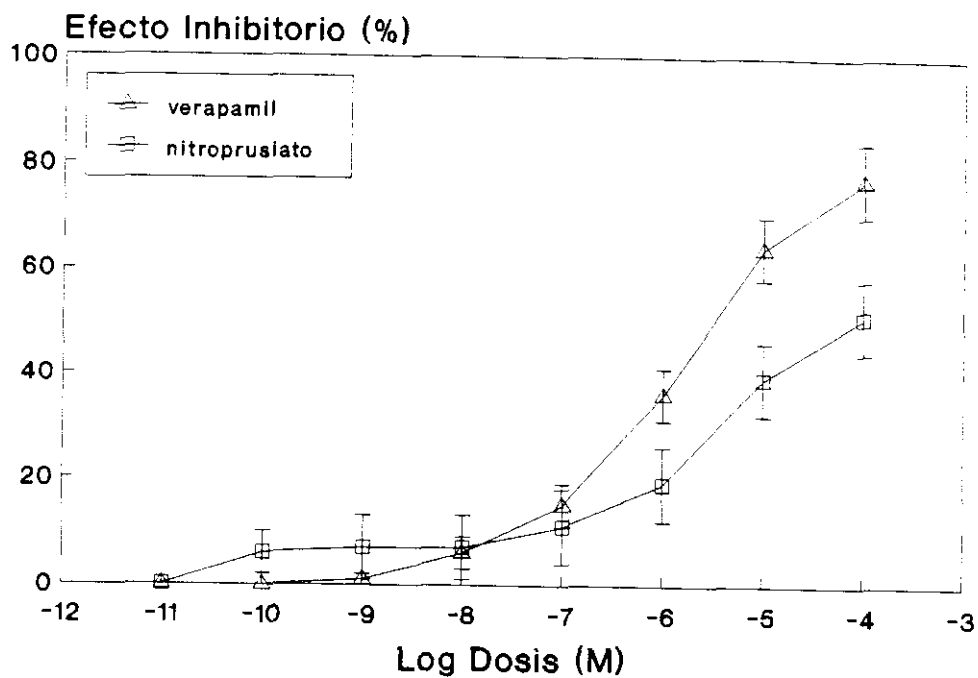


A.- RT

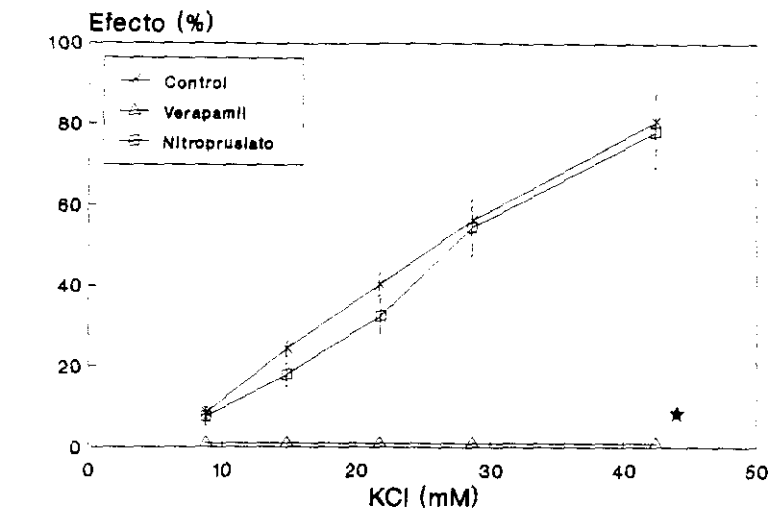


B.- RTOCa

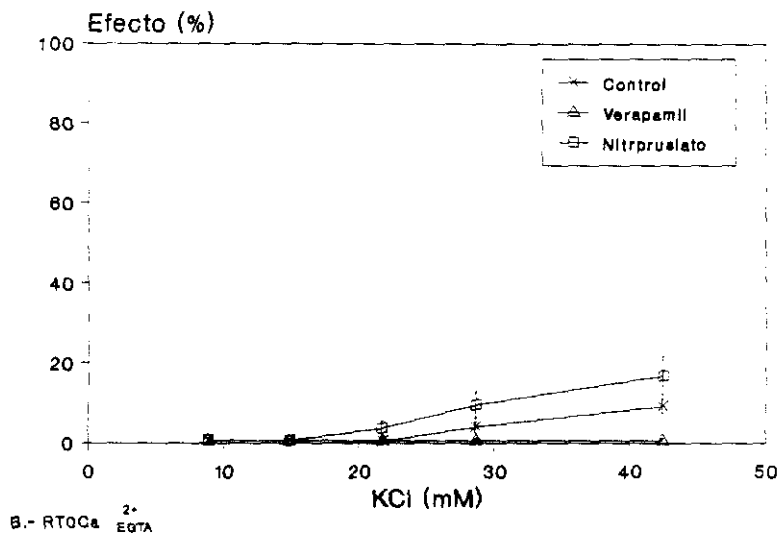
GRAFICA 2. Efecto contráctil inducido en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina por concentraciones acumulativas de KCl (8,8-42,4 mM) (curva S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) en presencia de calcio (A) y ausencia de calcio con y sin EGTA (B). Los resultados se expresan como media±E.S.M. (n=6-7).



GRAFICA 3. Efecto de concentraciones acumulativas de verapamil ( $10^{-11}$ - $10^{-4}$  M) y nitroprusiato sódico ( $10^{-11}$ ) sobre la contracción inducida por KCl (42,4 mM) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media±E.S.M. (n=5-6).



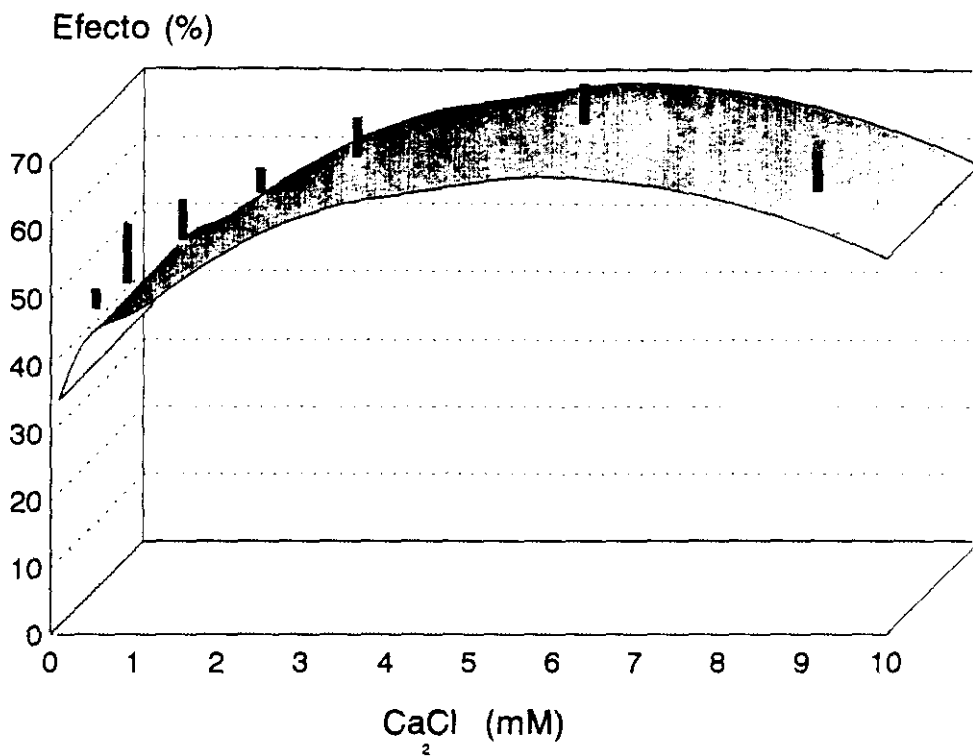
A.- RT



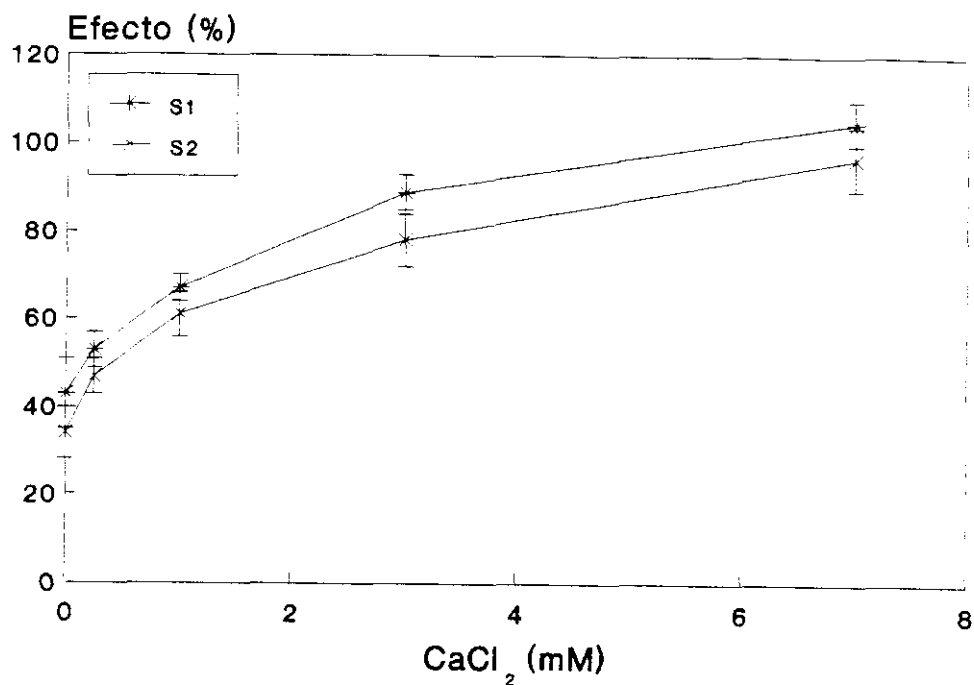
B.- RT0Ca<sup>2+</sup> + EGTA

GRAFICA 4. Efecto de la incubación (30 min) con verapamil\* ( $10^{-6}$  M) y con nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) sobre la contracción inducida por KCl (8,8-42,4 mM), en RT (A) y en medio RT0Ca<sup>2+</sup> más EGTA (B) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media±E.S.M. (n=6).

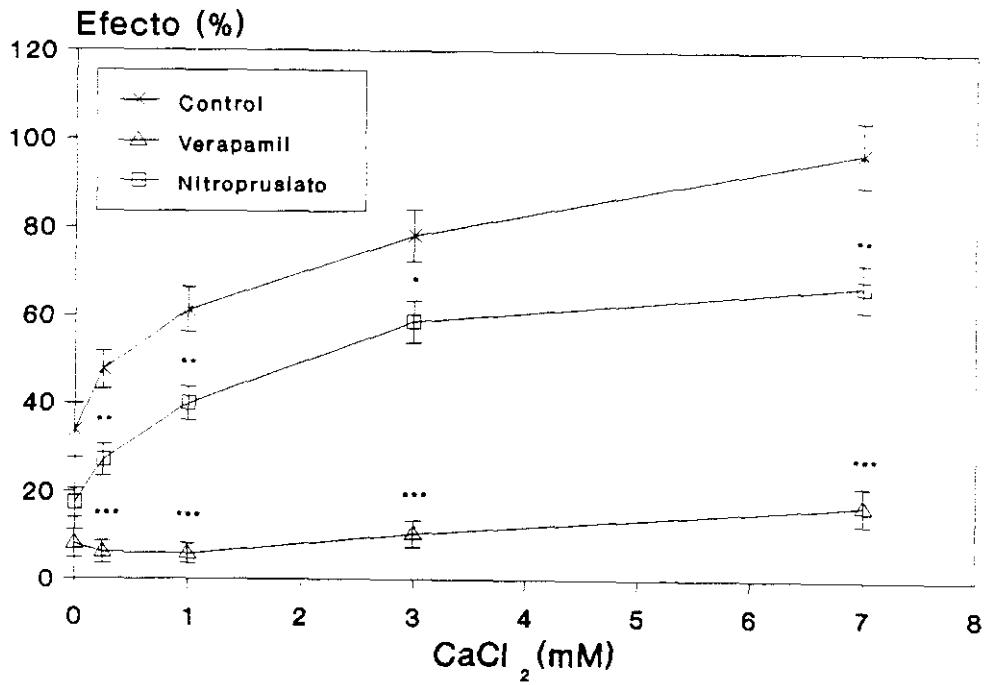
\* LOPEZ y cols. 1992



GRAFICA 5. Efecto de concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  (0,1-10 mM) sobre la contracción inducida por  $\text{KCl}$  (42,4 mM) en  $\text{RTOCa}^{2+}$  en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como la media+E.S.M. (barras) (n=5).



GRAFICA 6. Efecto contráctil inducido por concentraciones acumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (0,25-7 mM) sobre la despolarización producida por  $\text{KCl}$  (42,4 mM) (curva  $S_1$  y  $S_2$ ) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como  $\text{media} \pm \text{E.S.M.}$  ( $n=7$ ).



GRAFICA 7. Efecto del verapamil ( $10^{-6}$  M) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) sobre la contracción inducida por  $\text{CaCl}_2$  (0,25-7 mM) en un medio  $\text{RTK}^+$  (42,4 mM) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  E.S.M. (n=6).

\*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .



	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
CONTROL	23,39	26,90
NITROPRUSIATO	24,03	28,70

	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
CONTROL	0,16	0,26
VERAPAMIL	0,19	----
NITROPRUSIATO	0,34	3,17

TABLAS 1A Y 1B. Concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) obtenidas a partir de la adición de concentraciones crecientes de KCl (8,8-42,4 mM) (1A) o por la adición de concentraciones crecientes de CaCl<sub>2</sub> (0,25-7 mM) (1B) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular de bóvidos (curvas S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>).

#### 4.2. RESPUESTA DE LAS PREPARACIONES DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR FRENTE A LA FENILEFRINA

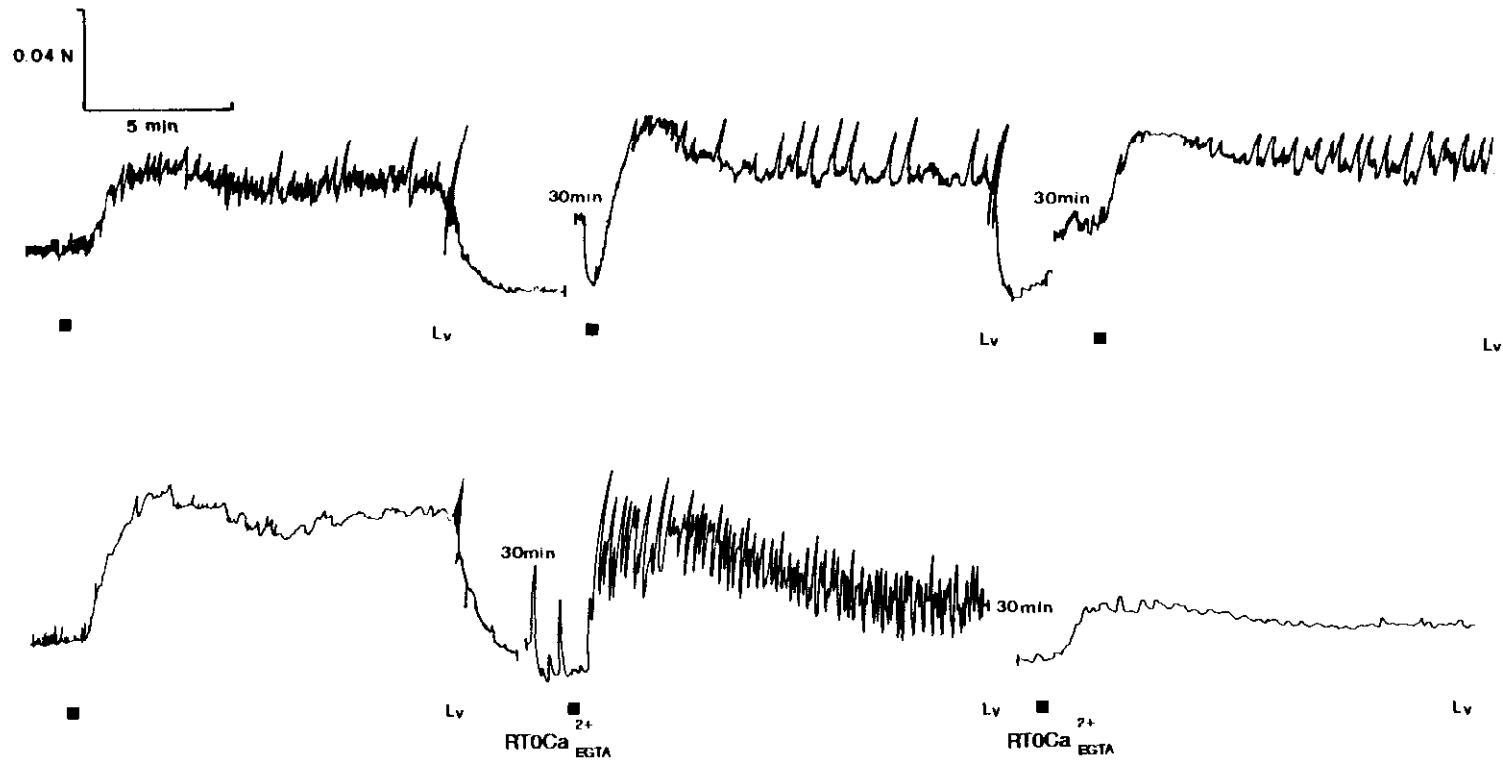
El efecto que produce la adición de fenilefrina ( $10^{-6}$  M) sobre la actividad mecánica de las preparaciones, es de tipo excitatorio, induciendo una contracción fásica, seguida de una leve relajación y posteriormente un mantenimiento tónico creciente. Esta respuesta es reproducible en el tiempo no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las curvas  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  (Gráficas 8 y 9).

##### 4.2.1. Influencia del calcio extracelular

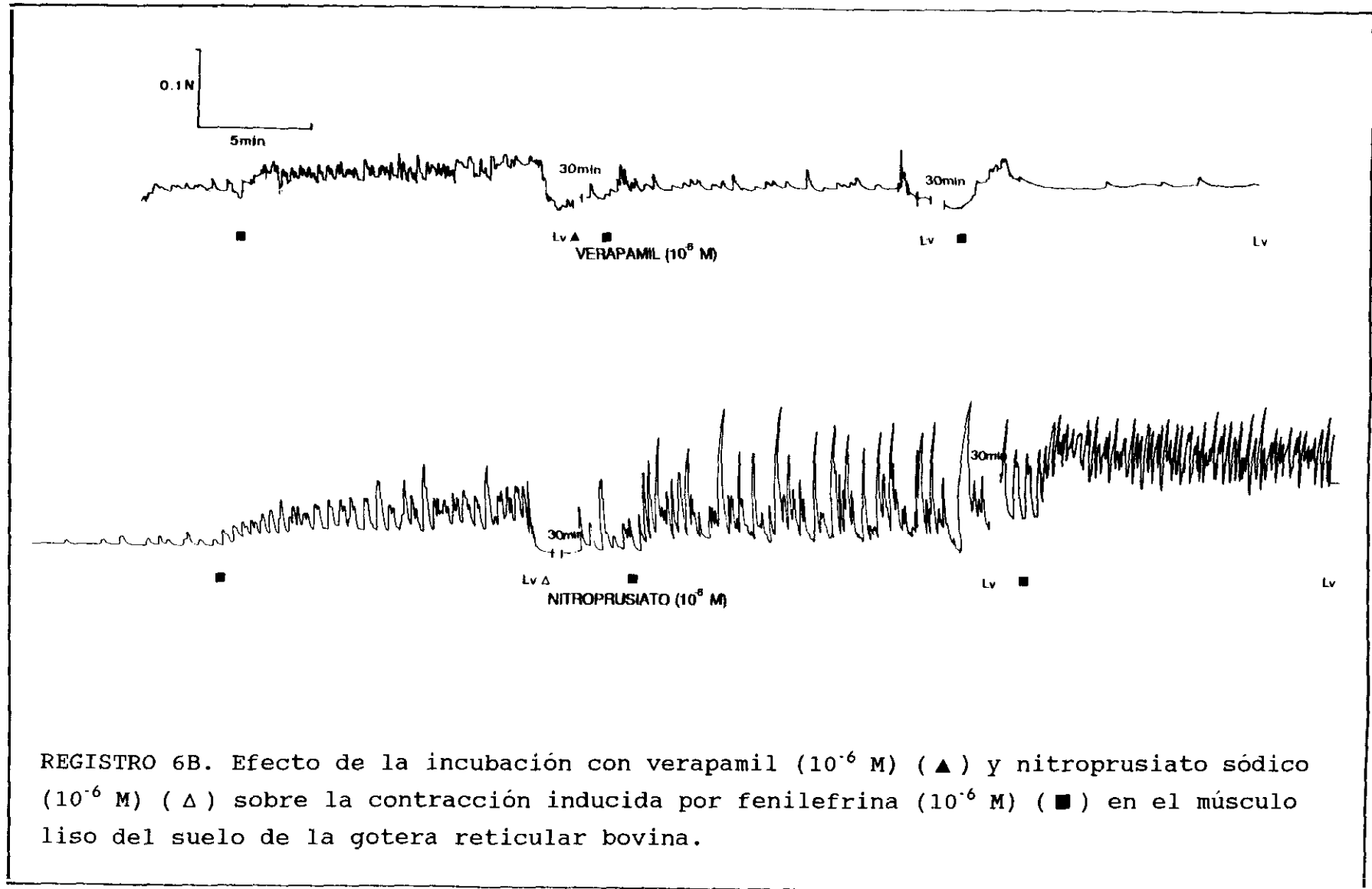
Para valorar la influencia del  $Ca^{2+}$  extracelular sobre la aparición de la respuesta contráctil tras la adición de fenilefrina, se valora la respuesta inducida por fenilefrina tras la incubación de las preparaciones durante 30 minutos en ausencia de calcio y más EGTA, observándose que existen diferencias estadísticamente significativas a partir de los 8 minutos después de la adición de la fenilefrina (Gráfica 10, Registro 6A).

El efecto de la incubación de las preparaciones con verapamil  $10^{-6}$  M y nitroprusiato sódico  $10^{-6}$  M durante

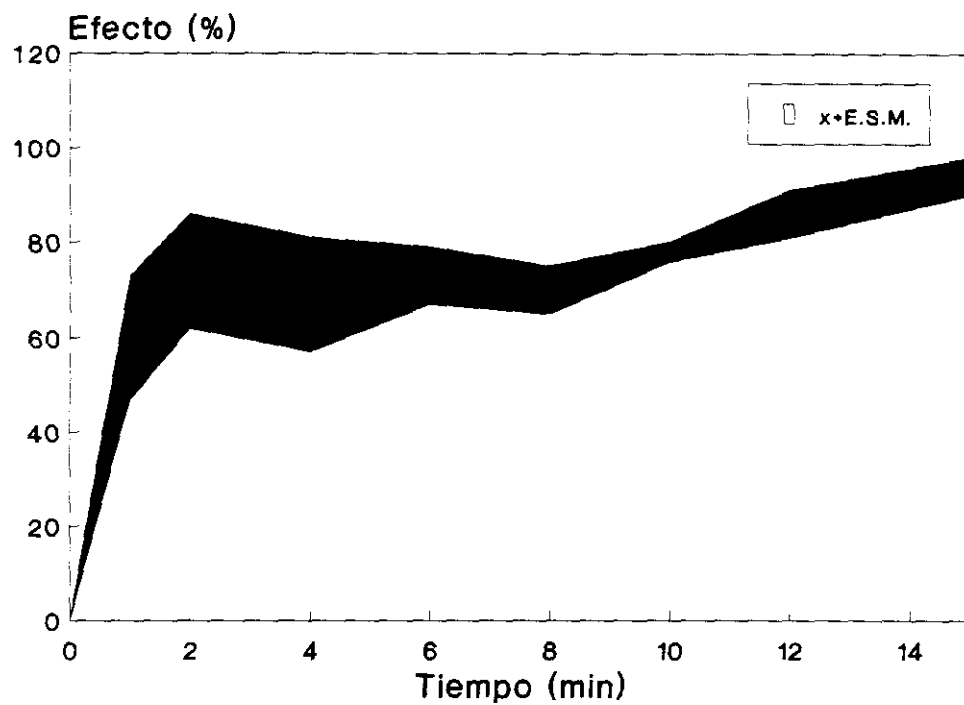
30 min, dio lugar a un fenómeno de inhibición de respuesta que oscila entre el 29% y 47% para el verapamil, existiendo diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos y una inhibición entre el 15% y 46% para el nitroprusiato, existiendo diferencias estadísticamente significativas sólo durante los 6 primeros minutos de la respuesta ( $p < 0,05$ ). (Gráfica 10, Registro 6B). El estudio realizado sobre la máxima respuesta obtenida indica que la presencia de verapamil ( $10^{-6}$ ) y la ausencia de calcio reducen significativamente la respuesta, siendo reversible este efecto (Gráfica 11, Registro 6).



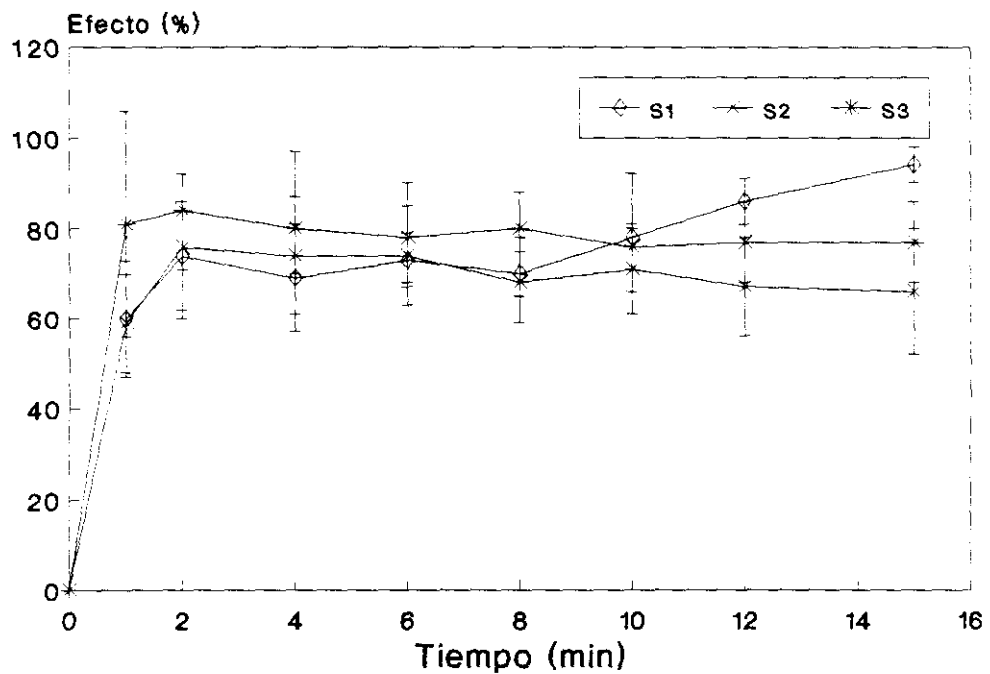
REGISTRO 6A. Contracción inducida por fenilefrina ( $10^{-6}$  M) (■) en un medio  $RT0Ca^{2+}$  más EGTA en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



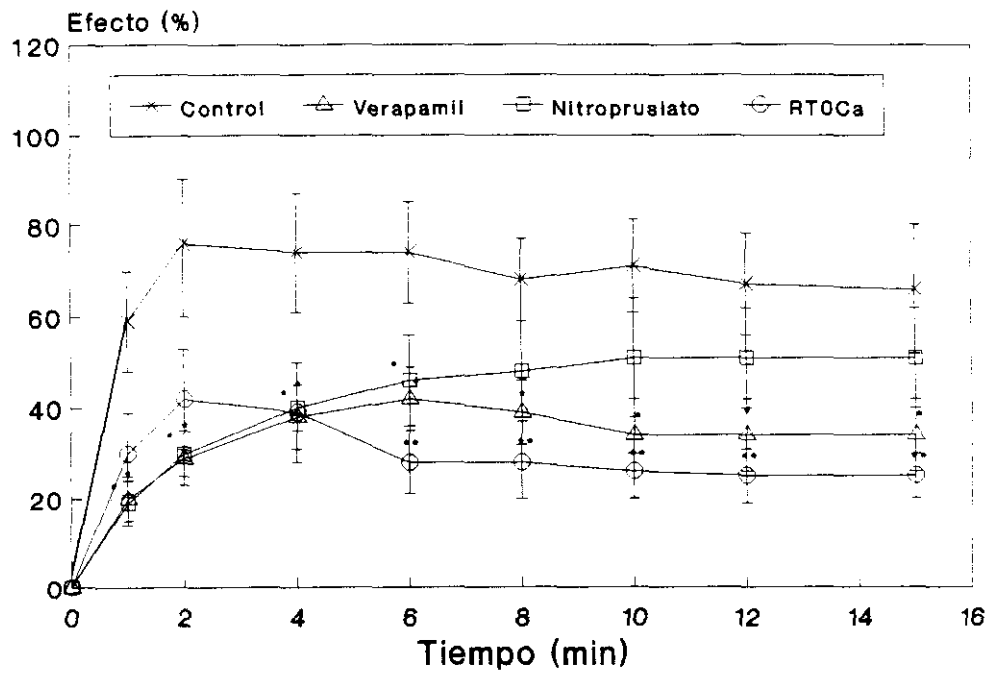
REGISTRO 6B. Efecto de la incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M) ( $\blacktriangle$ ) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) ( $\triangle$ ) sobre la contracción inducida por fenilefrina ( $10^{-6}$  M) ( $\blacksquare$ ) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



GRAFICA 8. Evolución en el tiempo de la respuesta contráctil a la fenilefrina ( $10^{-6}$  M) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina (n=6).



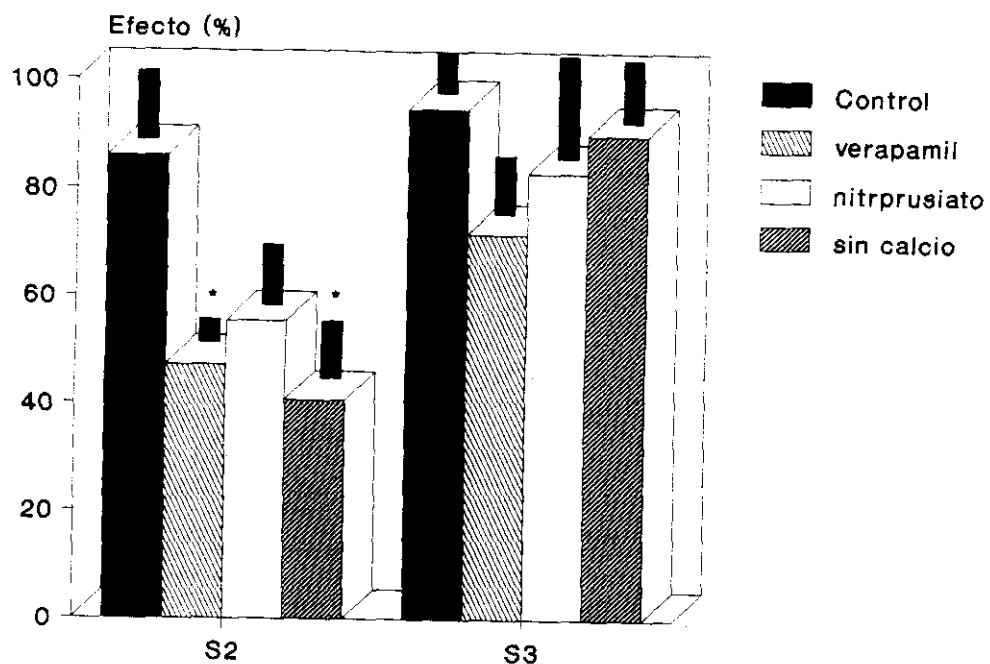
GRAFICA 9. Efecto contráctil inducido por la fenilefrina ( $10^{-6}$  M) (curva S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub>, con intervalos de 30 min) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina (n=6).



GRAFICA 10. Efecto del verapamil ( $10^{-6}$  M), del nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) y de la ausencia de calcio en un medio  $RT0Ca^{2+}$  más EGTA sobre la contracción inducida por fenilefrina ( $10^{-6}$  M) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media  $\pm$  E.S.M. (n=5-6).

\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.





GRAFICA 11. Efecto del verapamil ( $10^{-6}$  M), del nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) y de la ausencia de calcio en un medio  $RTOCa^{2+}$  más EGTA sobre la contracción máxima inducida por fenilefrina ( $10^{-6}$  M) (curva  $S_1$  y  $S_3$ ) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina (n=5-6).

### 4.3. RESPUESTA DE LAS PREPARACIONES DEL SUELO DE LA GOTERA RETICULAR FRENTE A LA ESTIMULACION ELECTRICA TRANSMURAL (EET)

#### 4.3.1. Parámetros óptimos de estimulación

Los resultados obtenidos de la determinación de los parámetros óptimos para la EET fueron los siguientes:

- Diferencia de potencial supramaximal: 70-100 V.
- Intervalo entre estímulos para estimulación continuada: 4 min.
- Intervalo entre estímulos para realización de trenes de 5 impulsos con descanso de 15 minutos entre ellos: 3 min. (Gráfica 12).
- Duración de los pulsos aplicados: 4 ms. (Gráfica 13, Registro 8).
- Duración del estímulo: 5 s.
- Frecuencia para estimulación continuada: 30 Hz.
- Frecuencias para trenes de 5 impulsos con descansos de 15 minutos: 2 Hz; 6 Hz; 20 Hz y 30 Hz.

En la determinación de estos parámetros se observó que los intervalos entre estímulos de un minuto, producían

fenómenos de tetanización (Registro 7) y los estímulos aplicados cada dos minutos originaban fenómenos de taquifilaxia de la fibra (Gráfica 12).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la curva de la duración de los pulsos, se deduce que la duración mínima es 1 ms, la duración del pulso submaximal es 4 ms y la duración de pulso media es 1,92 ms.

La mayoría de las preparaciones estimuladas eléctricamente dieron lugar a una respuesta contráctil en primer lugar de tipo fásico y sincrónica con el estímulo, y una vez que cesa éste, aparece una relajación rápida hasta alcanzar el tono inicial, e incluso a veces, este tono desciende por debajo del mismo para recuperarse posteriormente (Registro 9).

En algunos casos se produce una contracción fásica, rápida y sincrónica con el estímulo y finalizado éste, aparece una relajación, que se continúa con una nueva contracción que puede superar o no la primera. Esta respuesta termina con una relajación que puede alcanzar el tono inicial o descender por debajo del mismo y recuperarse posteriormente (Registro 9).

Teniendo en cuenta que las preparaciones de fibra lisa del suelo de la gotera reticular pueden presentar motilidad espontánea, no se observa en ningún caso que ésta sea abolida por la EET a los valores utilizados. La respuesta contráctil frente al estímulo eléctrico es mayor cuando coincide con una contracción espontánea de la fibra.

El efecto de la aplicación de frecuencias crecientes (0,8; 2; 4; 6; 8; 10; 15; 20; 30; 40; 50 Hz) produce un incremento en la respuesta contráctil, siendo la  $FE_{\min}$  2Hz, la  $FE_{\max}$  40Hz y la  $FE_{50}$  12,7Hz (Gráfica 14). Las frecuencias idóneas para conseguir una respuesta óptima fueron 2, 4, 10, 20 y 30 Hz. Cuando se aplican estímulos con este rango de frecuencias, con 5 s de duración, intervalos de 3 min, diferencia de potencial submaximal y pulsos de 4 ms, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la curva  $S_1$  y  $S_2$  ( $p < 0,05$ ) (Gráfica 15).

#### 4.3.2. Influencia del calcio extracelular

Cuando suprimimos el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio en que se encuentra inmersa la preparación se aprecian diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos al comparar las curvas  $S_1$  y  $S_2$  ( $0,05 \geq p \geq 0,001$ ) (Gráfica 16, Registro 9). Este fenómeno es reversible, recuperándose totalmente la respuesta con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio y 15 minutos de incubación en el mismo (Registro 10). Al realizar una estimulación eléctrica con 30 Hz cada cuatro minutos durante tres horas, se observó que la fibra sigue respondiendo aún después de mantenerla durante dos horas y media en un medio libre de calcio, pero se aprecia una disminución de la misma, siendo este efecto reversible (Registro 10B).

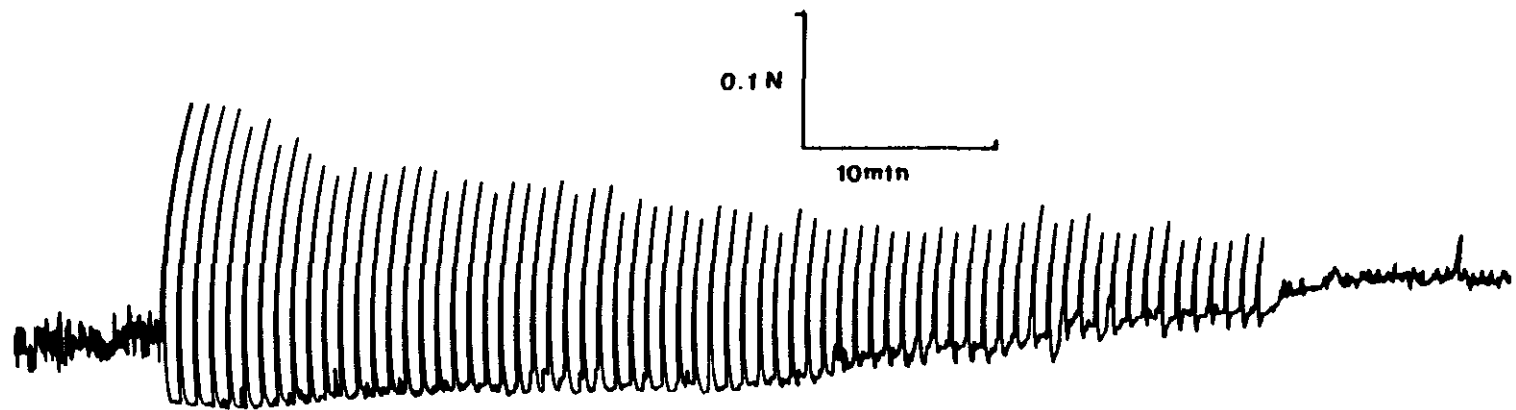
La adición al medio tanto de verapamil ( $10^{-6}$  M) como de nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M), no produce inhibición de la respuesta de la fibra frente a la estimulación eléctrica, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre la  $S_1$  y  $S_2$  en ambos casos ( $p \leq 0,05$ ) (Gráfica 17, Registro 11, Tabla 2).

La adición al baño, de cafeína (30 mM), para ver la influencia de esta sustancia en la contracción inducida por

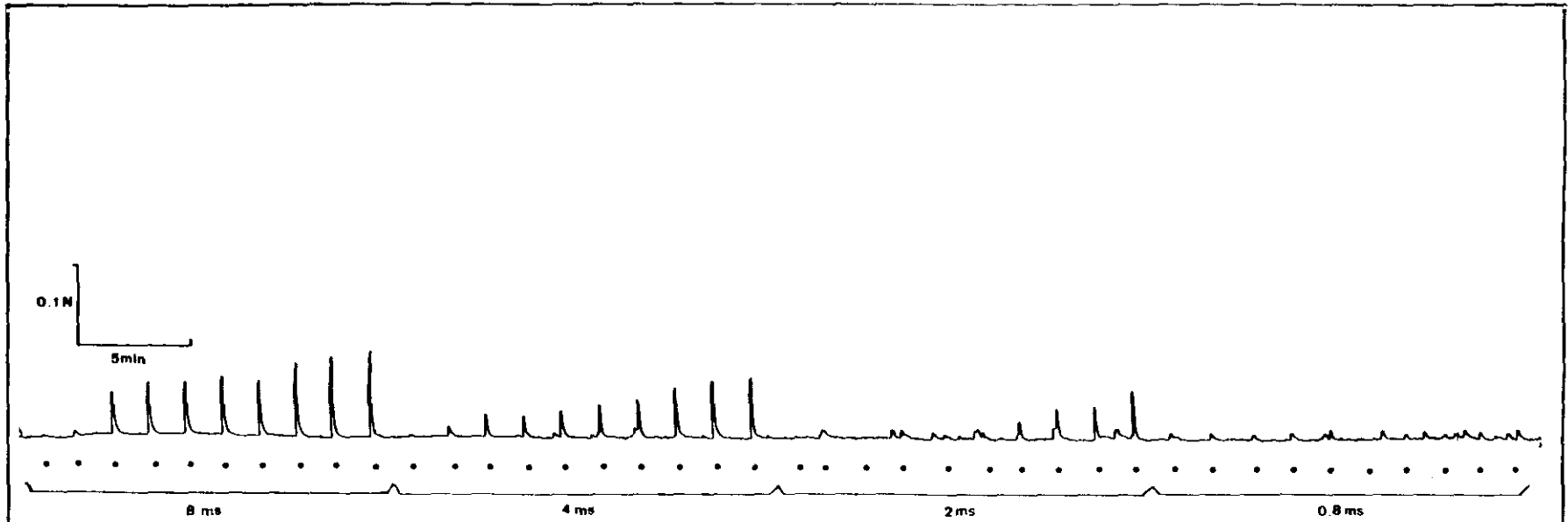
estimulación eléctrica en ausencia de calcio, produjo un claro desplazamiento a la derecha de la curva de frecuencias, con una fuerte disminución del efecto máximo, existiendo diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos ( $0,05 \geq p \geq 0,001$ ). Es importante mencionar que la fibra lisa del suelo de la gotera reticular de bóvidos, cuando se añade cafeína al medio, no sufre ningún tipo de contracción. El efecto producido por la cafeína es reversible, después de quitarla del medio, de manera que después de 15 minutos de incubación al repetir la estimulación eléctrica, existen diferencias estadísticamente significativas en los tres primeros puntos ( $0,05 \geq p \geq 0,001$ ) que desaparecen a medida que avanza la prueba. (Gráfica 18, Registro 12, Tabla 3).

Al estudiar el efecto de la cafeína en presencia y ausencia de calcio, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas, pero el efecto es reversible al repetir la curva de las frecuencias después de haber incubado 15 min con RT (Gráfica 18, Registro 12 y Tabla 3). Si se realiza una quinta curva en RT, el tejido recupera totalmente su capacidad de respuesta a la EET.

La tetrodotoxina ( $10^{-6}$  M) no inhibe la respuesta a la estimulación eléctrica transmural (Registro 14).

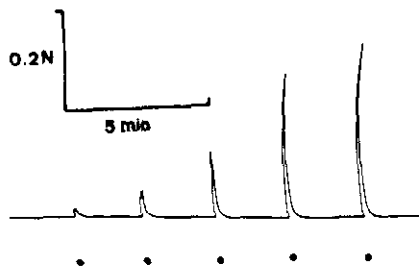


REGISTRO 7. Contracción inducida por EET con un intervalo entre estímulos de 1 min (voltaje supramáx., 30 Hz, 4 ms, 5s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.

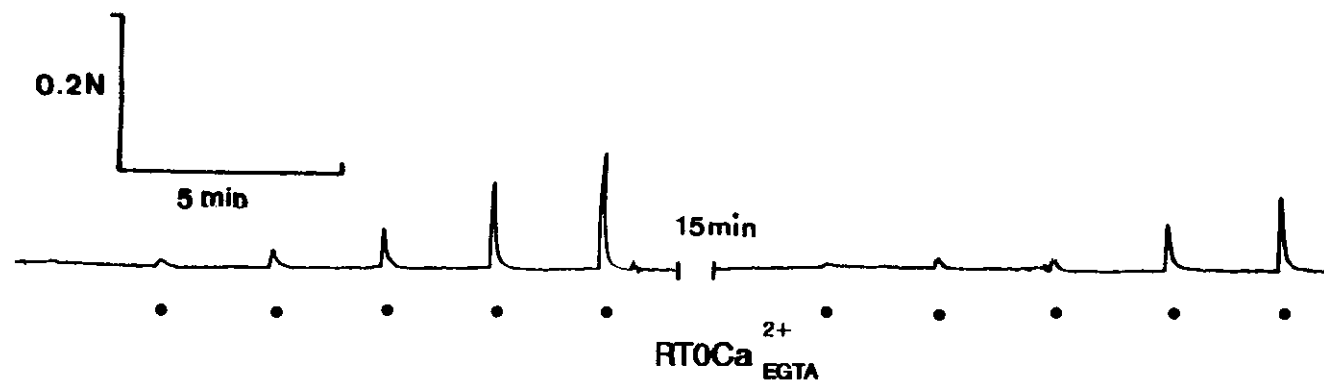


REGISTRO 8. Contracción inducida por EET con pulsos de 8, 4, 2 y 0,8 ms (voltaje supramax., 0,8-50 Hz, 3 min, 5 s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina





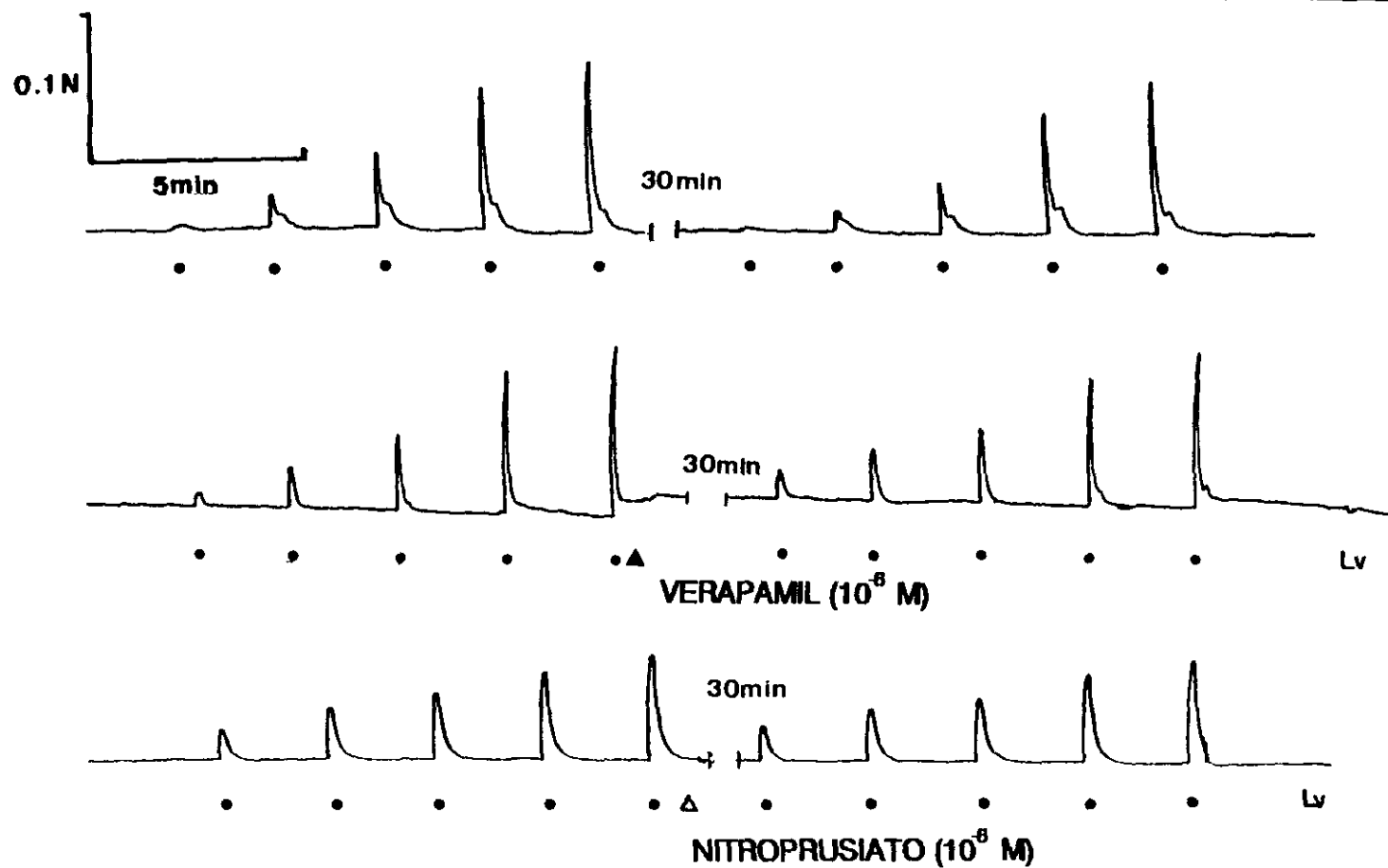
REGISTRO 9. Distintos tipos de respuesta inducida por EET (voltaje supramax., 2-30 Hz, 3 min, 4 ms, 5 s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



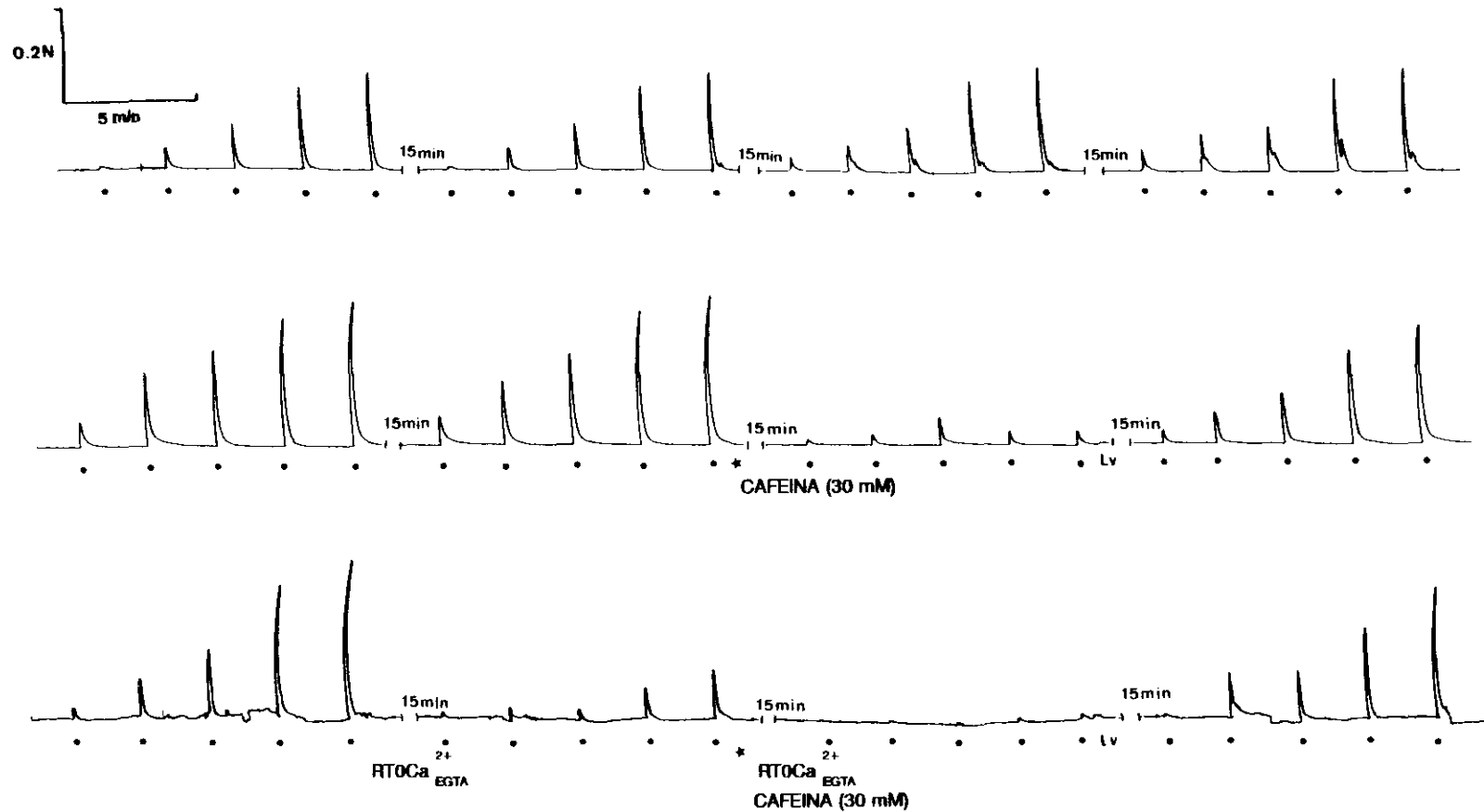
REGISTRO 10A. Efecto de la supresión de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{RT0Ca}^{2+}$  más EGTA) en la respuesta frente a la EET (voltaje supramax., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



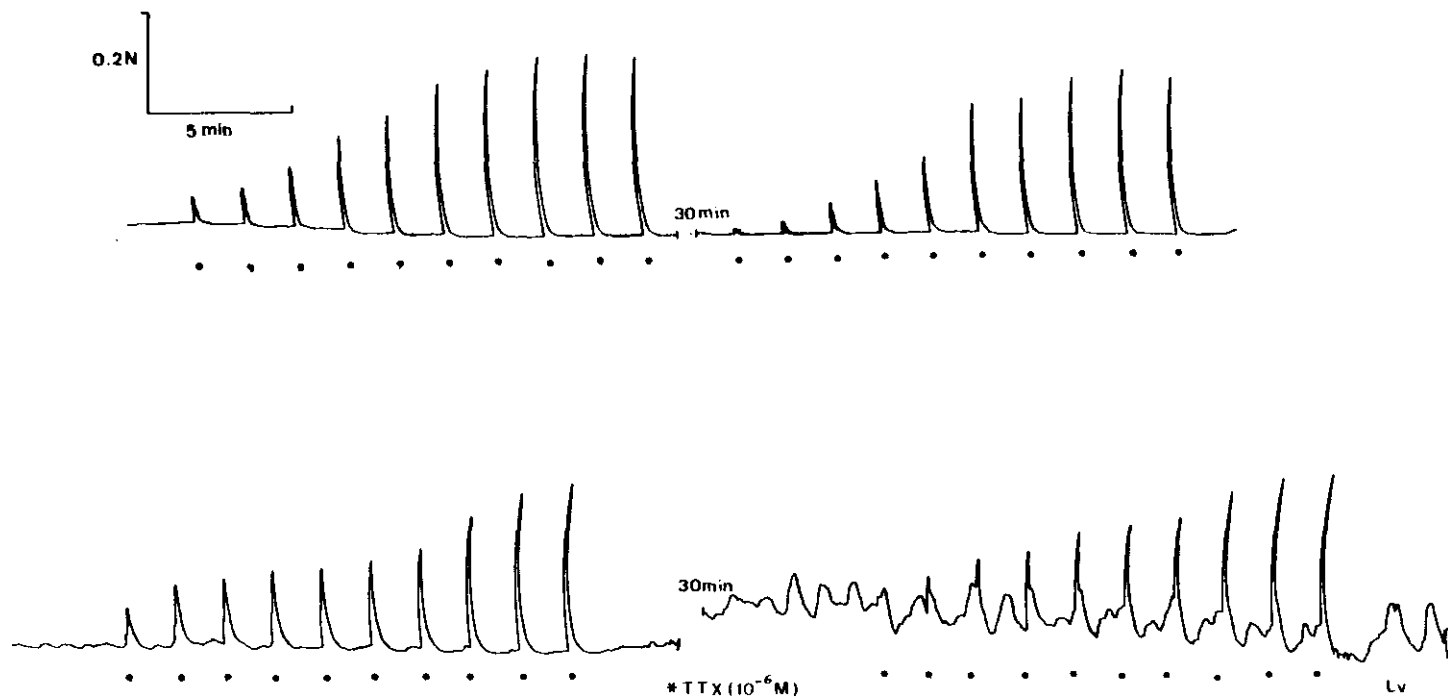
REGISTRO 10B. Efecto de la supresión del  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{RT0Ca}^{2+}$  más EGTA) en la respuesta frente a la EET (voltaje supramax., 30 Hz, 4 ms, 4 min, 5 s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



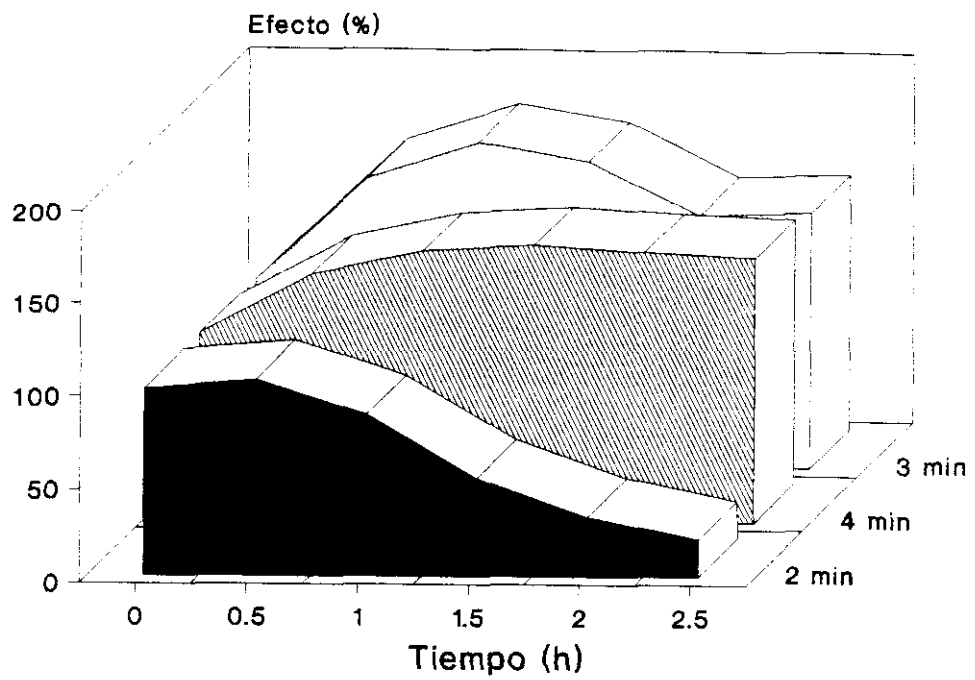
REGISTRO 11. Efecto de la incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M) ( $\blacktriangle$ ) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) ( $\triangle$ ) sobre la respuesta inducida por EET (voltaje supramax., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5 s) ( $\bullet$ ) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



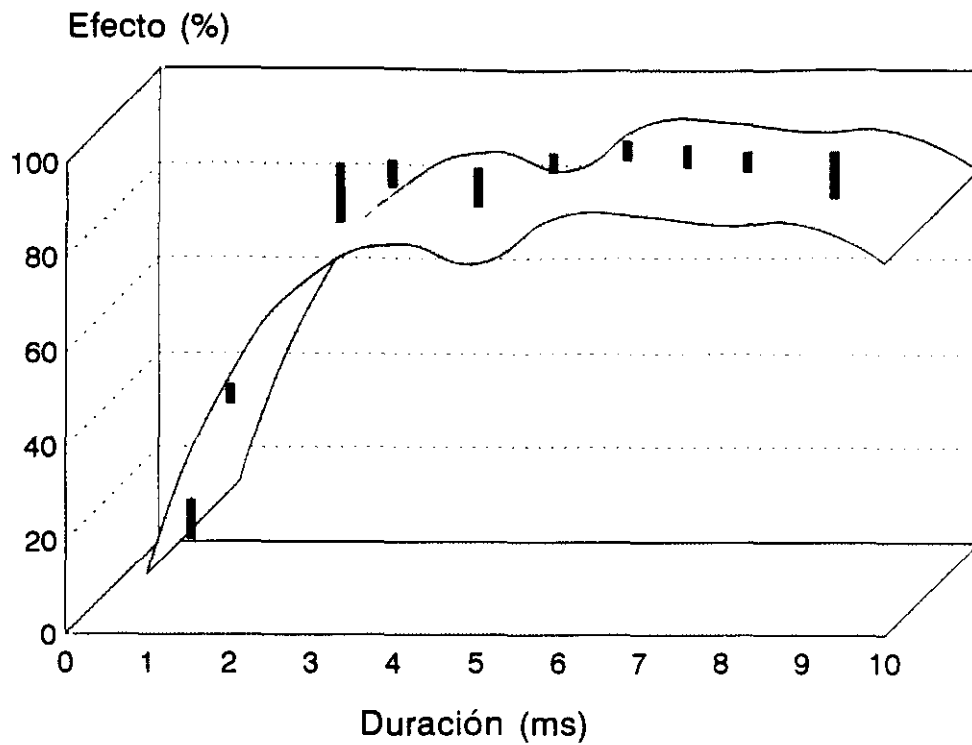
REGISTRO 12. Efecto de la incubación con cafeína (30 mM) (★) en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$  sobre la respuesta inducida por EET (voltaje supramax., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5 s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.



REGISTRO 13. Efecto de la incubación con TTX ( $10^{-6}$  M) (\*) sobre la respuesta inducida por EET (voltaje supramax., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5s) (•) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina.

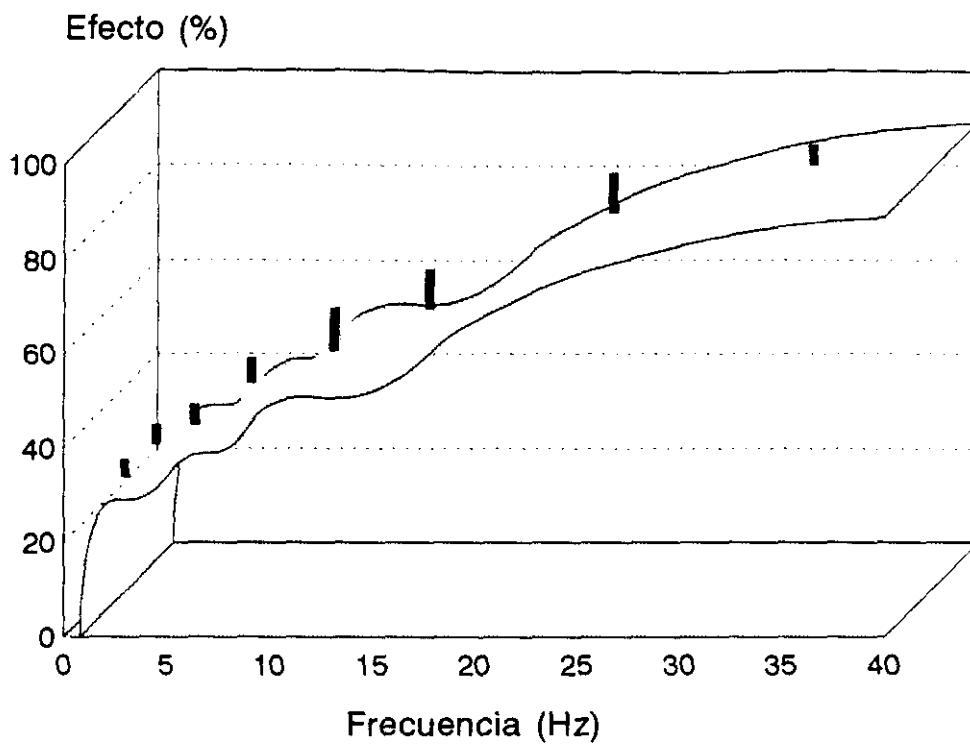


GRAFICA 12. Influencia del intervalo de estímulo en la respuesta contráctil a la EET (voltaje supramax., 30 Hz, 4 ms, 5 s) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina (n=5-6).

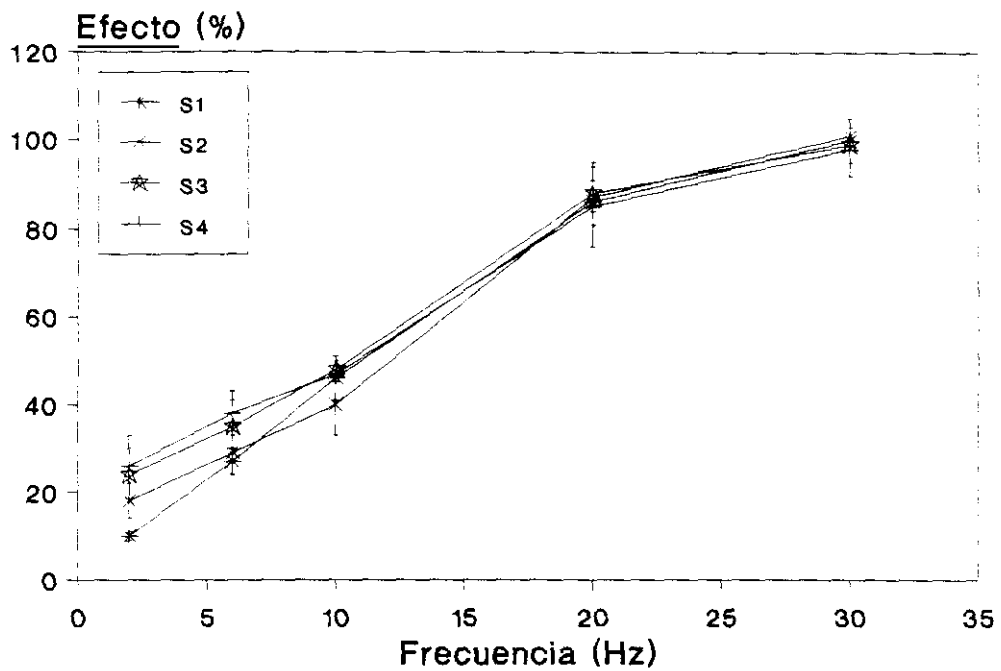


GRAFICA 13. Influencia de la duración del pulso (0,8-10 ms) sobre la contracción inducida por EET (voltaje supramax., 0,8-50 Hz, 3 min, 5s) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media+/-E.S.M. (barras) (n=6).

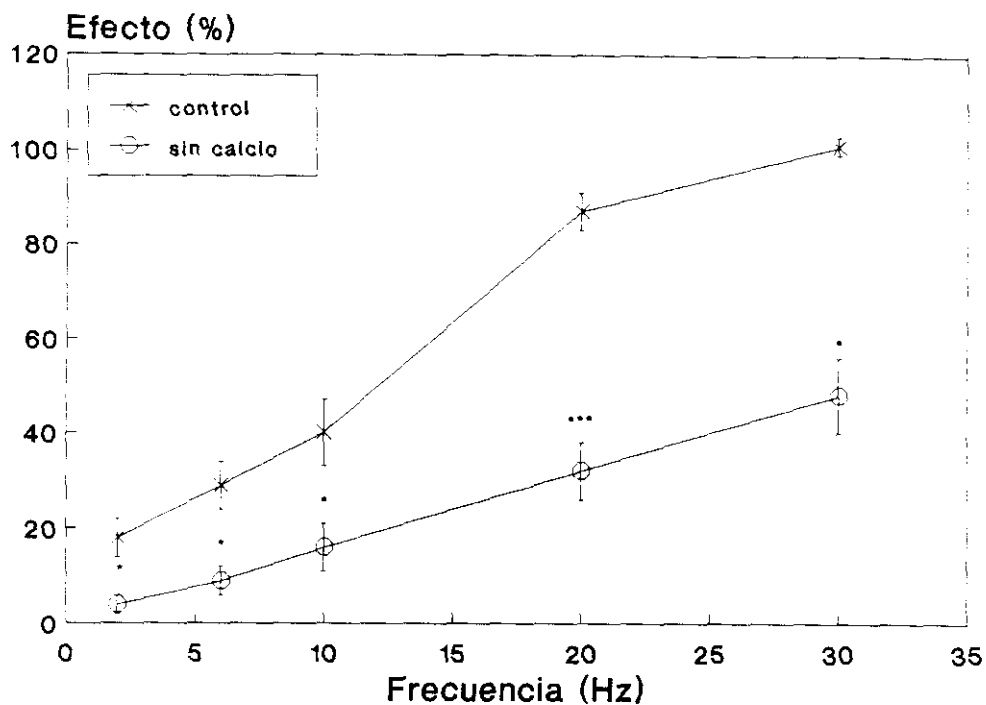




GRAFICA 14. Influencia de la frecuencia de estímulo (0,8-50 Hz) en la contracción inducida por EET (voltaje supramax., 4 ms, 3 min, 5s) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media+E.S.M. (n=5).

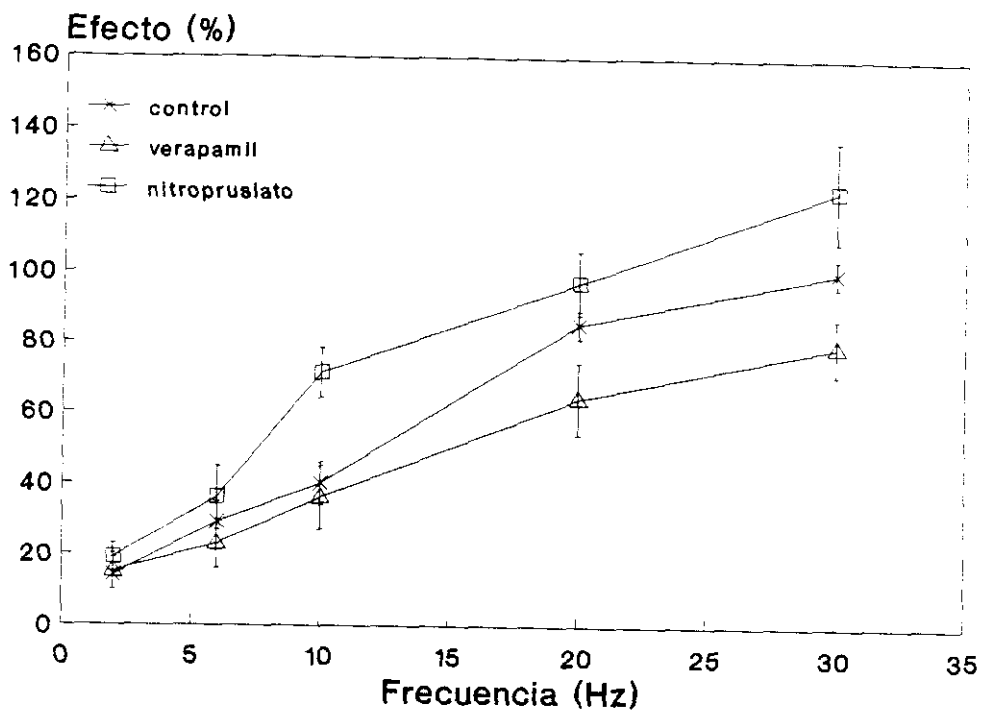


GRAFICA 15. Efecto contráctil inducido por EET (voltaje supramáx., 4 ms, 3 min, 5 s) con frecuencias crecientes de estímulo (2-30 Hz) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina (curvas S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub>). Los resultados se expresan como media ± E.S.M. (n=6).

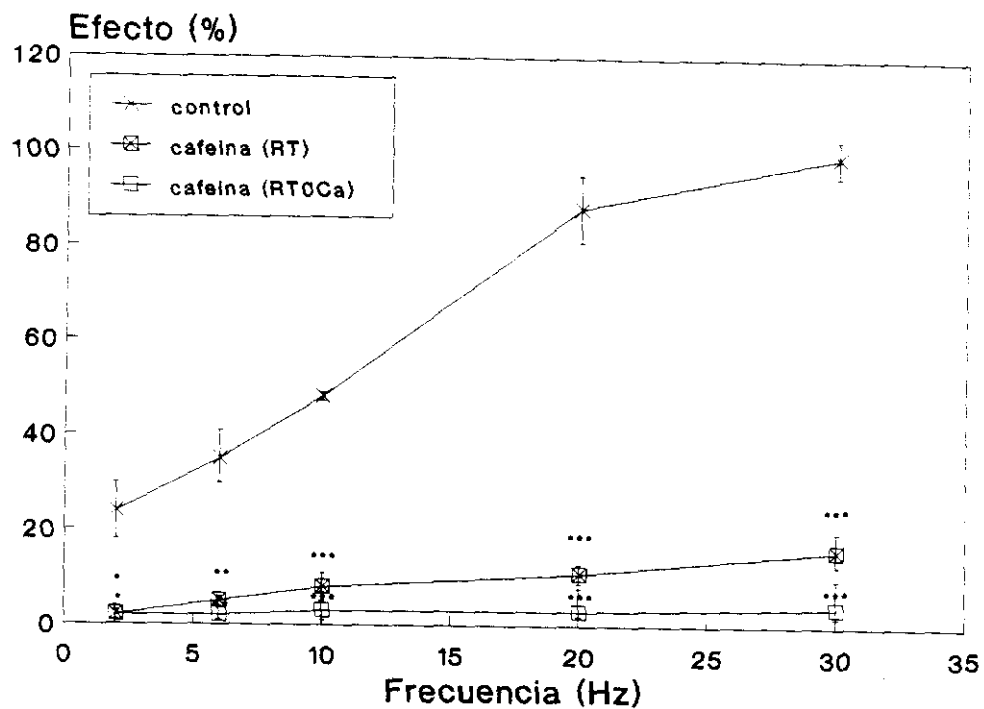


GRAFICA 16. Efecto de la privación de calcio en el medio (RTOCa<sup>2+</sup> más EGTA) en la contracción inducida por EET (voltaje supramáx., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5 s) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Los resultados se expresan como media±E.S.M. (n=6).

\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.



GRAFICA 17. Efecto del verapamil ( $10^{-6}$  M) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) sobre la contracción inducida en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina por EET (voltaje supramáx., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5s). Los resultados se expresan como media  $\pm$  E.S.M. (n=5-6).



GRAFICA 18. Efecto de la cafeína (30 mM) sobre la contracción inducida por EET (voltaje supramáx., 2-30 Hz, 4ms, 3 min, 5 s) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina, en presencia y ausencia de calcio en el medio. Los resultados se expresan como media±E.S.M. (n=4-6).

\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
CONTROL	11,76	12,51
VERAPAMIL	11,21	16,44
NITROPRUSIATO	9,71	8,36

TABLA 2. Frecuencia efectiva 50 (FE<sub>50</sub>) obtenida a partir de EET (voltaje supramáx., 2-30 Hz, 4 ms, 3 min, 5 s) antes y después de la incubación (30 min) con verapamil (10<sup>-6</sup> M) y nitroprusiato sódico (10<sup>-6</sup> M) (curvas S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) en el músculo liso del suelo de la gotera reticular de bóvidos.

	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
CONTROL	14,43	11,98	10,53	10,30
CAFEINA	12,99	10,58	-----	16,89
CAF. RT0Ca <sup>2+</sup>	14,91	-----	-----	-----

TABLA 3. Frecuencia efectiva 50 (FE<sub>50</sub>) obtenida a partir de EET antes y después de la incubación con cafeína (30 mM) en medio RT y RT0Ca<sup>2+</sup> en el músculo liso del suelo de la gotera reticular de bóvidos.

## **5.- DISCUSSION**



## 5.1. DISCUSION DEL METODO

El cierre reflejo de la gotera reticular, ha sido objeto de numerosos estudios, y según autores puede provocarse por varios mecanismos. Para ORSKOV (1988) se puede estimular mediante reflejos condicionados; RUCKEBUSCH (1983), logra el cierre mediante la estimulación del reflejo oro-faríngeo; también, con la administración de acetil colina y otros fármacos (vasopresina, extractos posthipofisarios...) se ha llegado a conseguir este cierre (BEGHELLI y cols., 1975; SCHOLZ y MIKHAIL, 1987; BRUGUERE y cols., 1987). Luego, en el cierre de la gotera reticular, se aprecia la influencia de factores psicógenos y de estímulos químicos. ¿Cuál de estos mecanismos es el determinante?. Actualmente no se ha dilucidado, ya que no se ha realizado un estudio de "mapeo" receptorial profundo.

A esta controversia inicial hay que sumarle que debido a su localización anatómica, podría ser considerada una prolongación del esófago hasta el omaso, lo que hace que sea una zona de transición entre musculatura estriada (esófago) y musculatura lisa (retículo-rumen). Histológicamente, el suelo de la gotera reticular presenta en su tercio anterior fibras musculares lisas, con incursiones de fibras musculares estriadas. Esta musculatura estriada no se aprecia en el tercio medio ni en el posterior. Las fibras que hemos

utilizado, como hemos descrito en el apartado de material y métodos, corresponden al tercio anterior pero proceden de las capas más superficiales, donde histológicamente no quedan restos de músculo estriado.

De acuerdo con los resultados que hemos obtenido, nuestras preparaciones conservan ciertas características que se corresponden con las del músculo estriado. Entre estas, se encuentra su gran capacidad de almacenamiento intracelular de calcio. Para GODFRAIND (1986), es uno de los factores que ayudan a distinguir los diferentes tipos de musculatura lisa.

Para la elección del líquido nutricio, nos basamos en los trabajos de ENCINAS y cols. (1989), en los que emplean Ringer Tyrode sin glucosa, manteniendo sus preparaciones una buena motilidad espontánea y unas respuestas semejantes a las obtenidas por otros autores frente a la adición de distintos compuestos. En este sentido, Dugherty en 1942, Duncan en 1953 (ARRUEBO 1986), VAN MIERT y HUISMAN (1968) y ARRUEBO (1986), en preparaciones procedentes de proventrículos emplean Ringer Tyrode sin glucosa. BURGÍN (1979), TANEIKE y OGHA (1975) y MURILLO (1971) trabajan en musculatura lisa de rumen con Ringer Tyrode con glucosa; MURILLO (1981) observa que después de la utilización de Ringer Tyrode sin glucosa no existe diferencia de respuesta utilizando tanto uno como otro.

Para las preparaciones de labios y suelo de gotera, DENAC (1991) emplea glucosa en el líquido nutritivo. Los resultados de este autor, en cuanto a la respuesta de este tejido frente a distintos fármacos, son semejantes a los observados por ENCINAS y cols. (1989) y LUCAS y cols. (1992a y 1992b). Dado que la presencia o ausencia de glucosa en el medio no influye de manera decisiva en las respuestas de las preparaciones, hemos elegido para nuestro estudio el RT sin glucosa.

El hecho de que la glucosa no influya en estos estudios, podría explicarse por el especial metabolismo de los rumiantes. Las necesidades metabólicas de glucosa de estos animales son muy bajas, puesto que los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico), son la fuente energética principal y pueden tener una acción ahorradora de glucosa, aunque no parecen producir una síntesis neta de la misma (CHURCH, 1974).

La tensión (0,02 N) que aplicamos a las preparaciones coinciden con la utilizada por DENAC y cols. (1991), en el mismo tejido.

En nuestros experimentos, la refrigeración durante 8 h de los haces de fibras extraídas de la gotera reticular, no implica ningún tipo de inhibición en las respuestas inducidas

por KCl, fenilefrina o EET. MURILLO (1981), trabajando con preparaciones de pilar de rumen de oveja, observa que se produce una inhibición parcial de la respuesta frente a la EET. DENAC y cols. (1991) utilizan preparaciones de gotera, sin refrigerar.

Para la preparación de soluciones libres de calcio a las que se añadía EGTA (0,1 mM) como quelante, utilizamos concentraciones inferiores a las que utilizan otros autores con este mismo fin. Hemos observado que esta concentración produce un efecto quelante adecuado, y presenta la ventaja de poder permanecer en contacto con las fibras largo tiempo sin alterar el tejido, siendo su efecto reversible. GODFRAIND y cols. (1983) en sus trabajos utilizan EGTA (0,2 mM); las concentraciones empleadas por otros autores oscilan entre 0,5-2 mM (BURGIN, 1979; NOUAILETHAS y cols., 1988; PLAZA y cols., 1992). WHEELER y WEISS (1979) determinan que la corriente de salida de calcio a través de la membrana celular aumenta en medios que contienen EGTA, ésto puede ser debido a que se incremente la permeabilidad de la membrana al calcio como resultado del "secuestro" del  $Ca^{2+}$  extracelular o de otros efectos inespecíficos no determinados.

Elegimos el nitroprusiato sódico y el verapamil, por ser dos compuestos que influyen en los movimientos del calcio, y

han sido descritos como fármacos relajantes de la musculatura lisa.

El verapamil inhibe la contracción y el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por elevadas concentraciones de  $\text{K}^+$ ; sin embargo, ejerce muy poco efecto sobre el influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por agonistas (VAN BREEMEN y cols., 1981; KARAKI y cols., 1984).

El nitroprusiato sódico, en algunos tejidos, inhibe la entrada de calcio al citosol a través de los canales operados por receptor, aboliendo en muchos casos la respuesta inducida por agonistas y no ejerciendo efecto sobre las inducidas por altas concentraciones de  $\text{K}^+$ . También puede disminuir la biodisponibilidad de calcio intracelular receptor dependiente, al incrementar el calcio de los depósitos intracelulares después de reaccionar con los grupos sulfidrilos presentes en la célula (ITHO y cols., 1983a; WATKINS y DAVIDSON, 1980; KARAKI y WEISS, 1984)

En los trabajos de MILANOV y STOYANOV (1984) y ARRUEBO (1986, 1987), llevados a cabo en preparaciones procedentes de proventrículos de óvidos, el verapamil y el nitroprusiato fueron utilizados para bloquear la entrada del calcio al interior celular a través de los VOC y ROC respectivamente.

## 5.2 DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### 5.2.1. Contracción inducida por KCl

La membrana celular es muy permeable al  $K^+$  y el potencial de membrana en reposo de la célula es muy cercano al de equilibrio del  $K^+$ . La concentración del ión  $K^+$  es alto en el interior de la célula con respecto de la concentración extracelular. Si aumenta la concentración de potasio se produce una despolarización por disminución del gradiente de concentración (KARAKY y cols. 1984).

En la musculatura lisa vascular, intestinal, etc. el potasio ha sido muy empleado para estudiar los fenómenos de contracción. También ha sido utilizado en musculatura lisa de proventrículos de rumiantes (ARRUEBO, 1987), y en preparaciones de suelo de la gotera reticular ha sido empleado por LOPEZ y cols. (1992).

En general se ha dicho que la contracción inducida por soluciones ricas en  $K^+$  se debe fundamentalmente a un efecto de despolarización de la membrana, que determina un aumento de la permeabilidad del  $Ca^{2+}$ , además de una liberación del calcio ligado a membrana y una liberación del calcio intracelular inducida por calcio (HAY y WADSWORTH, 1982). La respuesta a dosis submaximales de KCl se puede interpretar en

parte como un fenómeno debido a la liberación de neurotransmisores (VAN HOUTTE y VERBECIN, 1976; BORA 1977).

Las concentraciones que hemos utilizado en nuestro trabajo oscilan entre 8,8 mM y 42,4 mM, siendo 42,4 la  $CE_{m\acute{a}x}$  de acuerdo con lo expuesto por LOPEZ y cols. (1992). Esta dosis 42,4 mM de KCl, es una concentración baja comparándola con las empleadas en otros tejidos.

GODFRAIND y cols. (1983) en músculo liso de ileon de cobaya utiliza 100 mM, VAL ARANDILLA usa 50 mM con *Taenia coli* y ARRUEBO (1986 y 1987) en fibras procedentes de musculatura lisa ruminal de óvidos, emplea 62,68 mM.

KARAKI y cols. (1984a), realizaron un estudio comparativo de las concentraciones de  $K^+$  necesario para inducir una contracción por despolarización en fibras lisas de aorta de conejo (65,4 mM), aorta de rata (65,4 mM) e ileon de cobaya (45,4mM); observando que existe una mayor sensibilidad del músculo liso digestivo a la despolarización por  $K^+$  que el vascular.

Las respuestas de nuestras preparaciones a 42,4 mM, tanto en presencia como en ausencia de motilidad espontánea fueron de tipo excitatorio. Se caracterizan por ser una contracción de tipo fásico rápido, seguido de una pequeña

relajación y mantenimiento tónico (Registro 1, Gráfica 1). Siendo coincidentes con las obtenidas por LOPEZ y cols. (1992) en preparaciones de suelo de gotera reticular bovina y por ARRUEBO (1986 y 1987) en pared ruminal ovina.

La gran mayoría de los músculos lisos responden al aumento de  $K^+$  en el medio con contracciones con dos o más componentes (BOLTON 1979) que coinciden con nuestros resultados (HURWITZ y cols., 1980; KARAKI y cols., 1988; GABELLA, 1978).

Para BOLTON (1979) la respuesta de los distintos músculos lisos al  $K^+$  depende del tejido y de la concentración de  $K^+$ .

Gran número de nuestras preparaciones mostraron actividad espontánea, en este caso la respuesta fásica inicial se acompaña de contracciones superpuestas que en el componente tónico desaparecen. En los tejidos capaces de generar actividad eléctrica espontánea la fase inicial de la respuesta a altas concentraciones de  $K^+$  parece estar asociada con una descarga de potenciales en espiga, cuya amplitud disminuye según continúe la despolarización y desaparecen finalmente coincidiendo con la fase tónica (BOLTON, 1979).



En la respuesta a soluciones ricas en  $K^+$  el componente fásico depende teóricamente de la liberación de calcio por los depósitos intracelulares, mientras que el componente tónico es debido a la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular. HURWITZ (1980) indica que el KCl en ileon de cobayo induce a la aparición de estos dos tipos de componentes que están mediados por distintos tipos de VOC. La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de inactivación rápida daría lugar al componente fásico porque producen una liberación desde el retículo sarcoplásmico de calcio inducido por Calcio, los de inactivación lenta serían los responsables del mantenimiento tónico de la respuesta. Cuando el calcio penetra a través de los canales de inactivación lenta, actúa rellenando los depósitos intracelulares y activando los filamentos contráctiles (KARAKI y WEISS, 1988).

En este trabajo, hemos estudiado las respuestas producidas también por soluciones hipertónicas de KCl. Una vez valoradas las respuestas, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta inducida por soluciones isotónicas e hipertónicas. Cuando las contracciones inducidas por  $K^+$  en un medio hipertónico e isotónico son equivalentes, se nos permite excluir la participación del sistema de intercambio  $Na^+-Ca^{2+}$  en este tejido, ya que bajas concentraciones de  $Na^+$  extracelular junto con el efecto del  $K^+$ , favorecerían la

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el intercambio con el  $\text{Na}^+$  intracelular (BOVA y cols. 1988).

Aún teniendo en cuenta estas consideraciones, hemos elegido inducir la contracción de la musculatura lisa del suelo de la gotera reticular con  $\text{K}^+$  en medio isotónico, puesto que las soluciones hipertónicas pueden afectar la función muscular (KARAKI y cols. 1984b).

El músculo liso del suelo de la gotera reticular presenta una buena reproducibilidad de las respuestas provocadas por  $\text{K}^+$  (42,4 mM). Estas respuestas son reproducibles a intervalos de 30 min, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas.

Cuando en lugar de dosis únicas (42,4 mM) de  $\text{K}^+$  se realizaban curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de  $\text{K}^+$  (8,8-42,4 mM), tampoco existían diferencias estadísticamente significativas. La  $\text{CE}_{50}$  del  $\text{K}^+$  para  $\text{S}_1$  es 23,39 mM y para la  $\text{S}_2$  la  $\text{CE}_{50}$  es 26,90 mM (Gráfica 2A, Registro 3).

La concentración de calcio ionizado presente en el citoplasma va a determinar la tensión desarrollada por las proteínas contráctiles. La contracción de la fibra muscular lisa va a estar determinada por la entrada de calcio

procedente del medio extracelular, y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (BOLTON, 1979).

El estudio del origen del calcio que influye en la contracción de la musculatura lisa del suelo de la gotera, inducida por  $\text{K}^+$ , lo hemos estudiado mediante variaciones en la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y también mediante el empleo de sustancias "antagonistas" del  $\text{Ca}^{2+}$ .

La exposición de nuestras preparaciones a una solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{RTOCa}^{2+}$ ), durante 30 min, reduce la respuesta contráctil inducida por  $\text{K}^+$ . Se produce un pequeño componente fásico y se afecta principalmente el mantenimiento tónico de la respuesta. Esta respuesta no sólo se observa en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino también en un medio carente de  $\text{Ca}^{2+}$  más EGTA (0,1 mM) (Gráfica 2B, Registro 4A y 4C).

KARAKI y WEISS (1988) indican que en la respuesta contráctil inducida por  $\text{K}^+$  puede participar la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, cuando se elimina el calcio del medio extracelular y se le añade EGTA.

La presencia de EGTA en el medio impide que se produzca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a la superficie de la membrana. Las concentraciones de EGTA utilizado por nosotros (0,1 mM) es inferior a la empleada por otros autores, en fibras

procedentes de proventrículos (1mM) (ARRUEBO, 1986 y 1987). En nuestra experiencia no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las contracciones inducidas en presencia y ausencia de EGTA (Gráfica 2B). En este sentido podría ocurrir que la concentración de quelante utilizada no pueda desplazar totalmente el calcio unido a membrana. Pero en el caso de que fuera suficiente, el EGTA sería capaz de impedir el empleo de este calcio y por tanto su influencia del calcio ligado a membrana en la contracción inducida por potasio sería mínima.

ARRUEBO (1986) observa en músculo liso de pared de rumen ovino, que la respuesta al  $K^+$  se anula totalmente en un medio sin  $Ca^{2+}$  y sugiere que en la contracción inducida por despolarización con  $K^+$  no influyen los depósitos intracelulares de calcio.

También es importante mencionar que las preparaciones de gotera que presentan motilidad espontánea, no la pierden en ausencia de calcio.

Teniendo en cuenta que la gotera reticular es una zona de transición entre musculatura estriada (esófago) y lisa (rumen-retículo); los depósitos intracelulares de calcio podrían tener una importancia similar en la contracción a los de la musculatura estriada.

De acuerdo con los resultados expuestos hasta el momento, podemos indicar que la respuesta de la musculatura lisa del suelo de la gotera reticular, frente a soluciones ricas en  $K^+$  va a depender fundamentalmente, de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular y que los depósitos intracelulares de calcio pueden tener una ligera influencia.

Cuando el medio libre de  $Ca^{2+}$  (RTO $Ca^{2+}$  más EGTA) se sustituye por un medio con calcio (RT) se produce una recuperación de la respuesta. El efecto inhibitorio de la privación de calcio en nuestras preparaciones es reversible. ARRUEBO (1986) indica que el efecto de la privación de calcio es reversible en la pared de rumen de oveja, al igual que sucede en nuestros experimentos.

En un medio libre de calcio (RTO $Ca^{2+}$ ) se realizaron curvas dosis-respuesta a la adición de concentraciones crecientes de  $CaCl_2$  (0,1-10 mM), sobre la despolarización inducida por KCl (42,4 mM). Se aprecia una clara relación dosis-respuesta al calcio obteniéndose una  $DE_{m\acute{a}x}$  de 7 mM, una  $DE_{m\acute{i}n}$  de 0,25 mM y una  $DE_{50}$  de 1,92 mM. El uso de 9 concentraciones de calcio determina un fenómeno de agotamiento de la fibra alcanzándose un efecto máximo del 67%, ya que mantenemos la contracción inducida por potasio durante más de una hora, y en parte de este tiempo no hay calcio en el medio (Gráfica 5). Por esta razón consideramos

que para conseguir una curva dosis-respuesta al calcio cuyo efecto máximo fuese el 100% y además fuese reproducible, las concentraciones idóneas para la realización de los experimentos deberían ser 0,25 mM, 1 mM, 3 mM y 7 mM (Gráfica 6, Registro 5).

La inducción de la contracción de la musculatura lisa del suelo de la gotera reticular por altas concentraciones de potasio, dependen fundamentalmente de la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular al citosol. En este sentido BOLTON (1979) determina la existencia de dos tipos de canales de calcio presentes en la membrana celular: los VOC y los ROC. Los VOC se activan cuando el potencial de membrana disminuye y los operados por receptor, cuando se emplean sustancias estimulantes de unos receptores determinados, incluso no habiendo cambios en el potencial de membrana.

En 1977 FLECKENSTEIN describió la existencia de los denominados "bloqueantes de la entrada de calcio". Dentro de este grupo uno de los compuestos más representativos dentro de las fenilalquilaminas, es el verapamil.

El verapamil bloquea específicamente los VOC y reduce la entrada de calcio al interior de las células que previamente han sido despolarizadas por soluciones ricas en  $\text{K}^+$  (FLECKENSTEIN, 1977; BOLTON, 1979).

El verapamil y otros antagonistas orgánicos del calcio han mostrado un mayor efecto inhibitorio sobre la contracción de la fibra muscular lisa inducida por  $K^+$ , que sobre la inducida por agonistas; siendo su bloqueo más selectivo sobre los VOC (BOLTON, 1979; GODFRAIND, 1986).

En este trabajo hemos verificado el efecto inhibitorio del verapamil sobre la contracción inducida por soluciones ricas en  $K^+$  en la fibra de la musculatura lisa del suelo de la gotera reticular.

Se realizaron curvas dosis-efecto al verapamil ( $10^{-11}$ - $10^{-4}$  M), siendo la  $CI_{50}$  de  $3,89 \times 10^{-6}$  M (Gráfica 3, Registro 2).

LOPEZ y cols. (1992) observaron que la incubación de preparaciones de suelo de la gotera durante 30 min con verapamil ( $10^{-6}$  M), inhibía un 100% la respuesta inducida por soluciones ricas en  $K^+$  (42,4 mM).

ARRUEBO (1986) indica que una concentración de  $10^{-6}$  M de verapamil también inhibe un 100% la respuesta del músculo liso de pared de rumen ovino al  $K^+$ . Sugiriendo que la respuesta de esta fibra al  $K^+$  se basa en la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de los VOC.

PLAZA y cols. (1992) observaron que la actividad espontánea del duodeno de oveja, parece estar mediada por la entrada de calcio extracelular a través de los canales voltaje-dependientes, influyendo en cierto modo también la liberación de calcio intracelular.

La incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M) durante 30 min en medio libre de calcio inhibe totalmente la leve respuesta inducida por KCl (Gráfica 4B, Registro 4B). LOPEZ y cols. (1992), realizando una prueba semejante, pero con presencia de calcio en el medio, describen una inhibición del 100% (Gráfica 4A).

El efecto de la incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M) sobre la adición de concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  (0,25 mM, 1 mM, 3 mM y 7 mM), en la despolarización inducida por KCl (42,4 mM) en un medio  $\text{RT}0\text{Ca}^{2+}$ , determina una inhibición de la respuesta contráctil del 80% aproximadamente (Registro 5, Gráfica 7). Observamos que cuando la concentración de calcio supera 3,5 mM (concentración normal en el RT), se aprecia de forma más evidente un pequeño incremento en la respuesta.

Esto pudiera ser debido a que la modificación del gradiente pudiera activar otros mecanismos de paso de calcio. Por otro lado, el hecho de que el verapamil inhiba al 100% la contracción inducida por KCl (8,8-42,4 mM) (Gráfica 4) y tan



solo alcance un efecto del 80% cuando se estudia el efecto de dosis a acumulativas de  $\text{CaCl}_2$  sobre la depolarización inducida por 42,4 mM de KCl (Gráfica 7). Pudiera ser debido a que, como mencionan VAN HOUTTE y VERBEUREN (1976), y BORA y cols. (1977), esta concentración elevada de potasio produzca una liberación de neurotransmisores que active los ROC.

TRIGGLE y JANIS (1987), describen que la afinidad de los ligandos a los canales puede variar enormemente de acuerdo con la frecuencia de los estímulos y el potencial de membrana. Cuando se realiza un bloqueo, la actividad inhibitoria de un fármaco aumenta cuando aumenta la frecuencia de estímulos, reflejando una interacción preferencial del ligando sobre un determinado estado del canal. Estos hechos también podrían explicar esta diferencia en la inhibición del verapamil en la contracción inducida por potasio en dosis acumulativas o en dosis única.

En todos los experimentos en los que trabajamos con verapamil su efecto fue irreversible.

Estos resultados que hemos expuesto sugieren que la contracción del músculo liso del suelo de la gotera reticular de bóvidos, es debida principalmente a la entrada de calcio a través de canales específicos sensibles al verapamil. Estos

canales son los que BOLTON (1979) denomina canales voltaje-dependientes.

El nitroprusiato sódico es una sustancia perteneciente al grupo de los nitrocompuestos. KARAKI y WEISS (1984) sugieren que, en algunos tejidos, es un inhibidor de los canales operados por receptor, puesto que inhibe las contracciones provocadas por agonistas sin afectar las inducidas por despolarización, en determinados tejidos.

Las curvas dosis-respuesta de concentraciones acumulativas de nitroprusiato sódico sobre la contracción inducida por potasio (42,4 mM), dio lugar a una  $CI_{50}$  de  $1,9 \times 10^{-4}$  M (Gráfica 3, Registro 2). Estas concentraciones pudieran afectar la funcionabilidad celular. Los efectos conseguidos se podrían achacar bien a una inhibición por bloqueo o bien a una intoxicación celular. Por todos estos hechos elegimos una concentración más baja,  $10^{-6}$  M, y así poder comparar con los otros compuestos usados a la misma concentración.

Se estudió el efecto del nitroprusiato sobre la contracción inducida por KCl (8,8-42,4 mM), observándose que no inhibe la respuesta a concentraciones crecientes de potasio, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y la prueba realizada con

nitroprusiato sodico. La respuesta tampoco se modifica cuando se trabaja en un medio libre de calcio (Gráfica 4, Registros 3 y 4B).

Los resultados obtenidos por otros autores sobre el efecto que produce la incubación con nitroprusiato sódico en la despolarización inducida por  $K^+$  son semejantes a los nuestros. ARRUEBO y cols. (1987) sugiere que el nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por  $K^+$  en fibra lisa de pared de rumen de oveja. KARAKI y cols. (1984) observan que en *Taenia coli* de cobaya y en aorta de conejo el nitroprusiato no inhibe la respuesta al  $K^+$ , pero sí es efectivo en aorta de rata. Pero IMAI y KITAGAWA (1981) observaron que el nitroprusiato sódico no afecta a la contracción inducida por despolarización en fibras de colon de perro y sin embargo, produce inhibición del efecto contráctil en las preparaciones de aorta de este animal despolarizadas con  $K^+$ .

El hecho de que el nitroprusiato sódico, en nuestras preparaciones, posea efecto inhibitorio de un 20 % aproximadamente sobre la contracción inducida por  $CaCl_2$  en solución rica en potasio (42,4mM) (Gráfica 7), pudiera estar relacionado con la estimulación de los ROC por la liberación de neurotransmisores originada por la despolarización con una dosis máxima de potasio (VAN HOOTTE y VERBEUREN, 1976; BORA,

1977). Estos resultados coinciden con el efecto inhibitorio observado en la contracción inducida por fenilefrina (Gráfica 10). Estos hechos guardan relación con los resultados ya descritos para el verapamil.

Es importante resaltar, que las únicas referencias sobre la influencia del calcio en la contracción de la musculatura lisa de gotera, no concuerdan con nuestros resultados. Aunque son datos citados sin confirmar, OOMS (1987) supone que los ROC son los máximos responsables de la contracción del tejido y que los VOC apenas tienen importancia.

Los resultados que hemos obtenido indican la influencia del calcio extracelular y de los VOC en la contracción inducida por KCl.

### 5.2.2. Contracción inducida por fenilefrina

En la musculatura lisa gastro-intestinal la respuesta contráctil adrenérgica se debe fundamentalmente a los receptores  $\alpha_1$ ; puesto que, la estimulación de los  $\alpha_2$  al igual que la de los  $\beta$  origina relajación (FLOREZ, 1992).

La musculatura lisa de los proventrículos de los rumiantes se adapta al modelo general de la respuesta contráctil adrenérgica. VAN MIERT y HUISSMAN (1968) y TANEIKE y OHGA (1975) observan que en los proventrículos de óvidos y bóvidos la contracción se induce por estímulo de los receptores  $\alpha$  y la relajación por estímulo  $\beta$ . MURILLO (1981) discrepa de estos resultados indicando que en las preparaciones de pared ruminal de óvido, tanto el estímulo de receptores  $\alpha$  como  $\beta$  da lugar a contracción.

DENAC (1991) y Lucas (1992) trabajando con preparaciones de labios y suelo de gotera reticular describen que los receptores  $\alpha$  y más específicamente los  $\alpha_1$  son los responsables adrenérgicos de la actividad contráctil.

No se eligió un agonista adrenergico inespecífico como la noradrenalina ya que en trabajos anteriores se observó que estos compuestos no producía una respuesta homogénea y reproducible posiblemente debido a los diferentes predominios

receptoriales (DENAC, 1991; LUCAS, 1992a y 1992b) Por ello se ha trabajado con un agonista específico  $\alpha_1$ , la fenilefrina.

La fenilefrina induce una contracción fásica seguida de relajación leve y posterior mantenimiento tónico, en las fibras lisas del suelo de la gotera (Gráfica 8, Registro 6).

ARRUEBO (1986 y 1987) utiliza noradrenalina para conseguir una respuesta contráctil en las preparaciones de músculo liso de rumen ovino.

La respuesta contráctil de nuestras preparaciones a la fenilefrina es reproducible cada 30 min. soportando al menos tres estimulaciones (curvas  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ ) (Gráfica 9).

En un medio libre de  $Ca^{2+}$  más EGTA la respuesta de nuestras preparaciones frente a la fenilefrina se caracterizan por un marcado descenso en la respuesta tónica a partir del minuto ocho tras la adición de esta sustancia (Gráfica 10, Registro 6A).

ARRUEBO (1986 y 1987) indica que la respuesta inducida por noradrenalina en la pared de rumen de oveja se inhibe un 100% tras su incubación en un medio libre de calcio. Por ello sugiere que la contracción depende de la concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular.

BURGIN (1979) observó que la acetilcolina e histamina en preparaciones de rumen bovino provocan una contracción que también depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular y que son inhibidas en ausencia de calcio.

Las preparaciones de musculatura lisa vascular, cuando se incuban en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  sufren una inhibición del mantenimiento tónico de la respuesta a la noradrenalina, no afectándose el componente fásico de la misma (BEVAN y cols., 1963, VAN BREEMEN y cols., 1979).

CAVERO y cols. (1983) sugieren que en tejido vascular, cuando las respuestas contráctiles son inducidas por estimulación de los receptores  $\alpha_1$ , se produce una liberación del calcio almacenado en los depósitos intracelulares, y la activación de los receptores  $\alpha_2$  favorece la entrada de calcio extracelular.

SKARBY y ANDERSON (1984), por el contrario, postulan que la contracción inducida en musculatura lisa vascular por estimulación  $\alpha_1$  va a depender de la entrada al citosol del calcio presente en el medio extracelular.

Para KARAKI (1984), y KARAKI y WEISS (1988) la contracción fásica producida por la noradrenalina se debe fundamentalmente a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos

intracelulares. Si se suprime el calcio en el medio y se añade EGTA, se observa que la respuesta fásica tras la adición de noradrenalina no desaparece. Si esta operación se vuelve a repetir hay una inhibición completa de respuesta, debido al vaciamiento previo y a la falta de calcio en los depósitos. Después de un nuevo periodo de incubación en presencia de calcio, los depósitos intracelulares se rellenan, respondiendo nuevamente a la noradrenalina con una respuesta fásica.

En nuestras pruebas hemos observado que en un medio libre de calcio, el componente tónico de la respuesta a la fenilefrina se reduce significativamente. El componente fásico de la respuesta durante los primeros ocho minutos no sufre una modificación significativa (Gráfica 10); por ello suponemos que durante este periodo los depósitos intracelulares están aportando el  $\text{Ca}^{2+}$  para que se produzca la respuesta contráctil. El efecto de la privación de calcio en el medio es totalmente reversible; de manera que si la fenilefrina indujera al vaciamiento de los depósitos intracelulares, éstos se rellenarían nuevamente al incubar la preparación en un medio RT coincidiendo con lo descrito por KARAKI y WEISS (1988).

El verapamil ( $10^{-6}$  M) produce una inhibición del 29-47% sobre la respuesta inducida por fenilefrina en las



preparaciones del suelo de gotera reticular de bóvidos (Gráfica 10 y 11, Registro 6B).

Sin embargo, en la musculatura lisa de rumen de ovino, la respuesta inducida por noradrenalina no es inhibida por la incubación previa con verapamil ( $10^{-6}$  M) (ARRUEBO y cols., 1987).

Para KARAKI y cols. (1979), el verapamil no inhibe la contracción fásica inducida por la noradrenalina en aorta de conejo.

En estudios realizados en músculo liso vascular CAVERO y cols. (1983) y VAN ZWIETEN y cols. (1985), han demostrado que las respuestas provocadas por la activación de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos son más resistentes a la acción de los antagonistas orgánicos del calcio que las inducidas por estimulación  $\alpha_2$ .

Cuando un agonista induce una respuesta contráctil de la fibra muscular lisa, se pueden provocar entre otros efectos, cambios en la permeabilidad de la membrana a iones monovalentes. Estos cambios producen un fenómeno de despolarización de la membrana que abre los VOC (CASTEELS y cols. 1977). Esto podría acontecer con la estimulación provocada por fenilefrina y por este motivo se podría inhibir

ligeramente la respuesta de la fibra muscular lisa del suelo de la gotera reticular de los bóvidos mediante la incubación con verapamil ( $10^{-6}$  M).

La incubación durante 30 min de las preparaciones del suelo de gotera reticular de bóvidos con nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M) determina una inhibición de la respuesta a la fenilefrina que oscila entre el 15-46% durante los seis primeros minutos de la respuesta. Es decir el componente fásico se ve disminuido (Gráfica 10, Registro 6B).

ARRUEBO y cols. (1987) describen que la respuesta a la noradrenalina de sus preparaciones se inhibe al 100% después de la incubación con nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M), por bloqueo de la entrada de calcio a través de los ROC.

Para KARAKI y WEISS (1984) el nitroprusiato sódico actúa, en aorta de conejo, como un inhibidor de la entrada de calcio a través de los ROC, y por ello anula la contracción inducida por noradrenalina, pero no la inducida por altas concentraciones de  $K^+$ .

Sin embargo en otros tejidos como *Taenia coli*, duodeno o íleon, el nitroprusiato no ejerce efecto sobre las contracciones inducidas por agonistas (BRADING y SNEDDON, 1980; KREEYE, 1980; ROSENBERGER y cols., 1979). KARAKI y

WEISS (1984) explican estos resultados considerando que en estos tejidos puede haber otra población de canales de calcio operados por receptor no sensibles al nitroprusiato.

A parte de estas consideraciones los nitrocompuestos parecen tener un efecto inhibitorio de la liberación de calcio intracelular o bien favorecer su secuestro, puesto que inhiben la contracción provocada por agonistas en medio libre de calcio (KARAKI y cols., 1984a,b). A este hecho se puede atribuir la inhibición parcial de la respuesta a la fenilefrina de las preparaciones de fibra muscular lisa de suelo de la gotera reticular de bóvidos después de su incubación con nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M). Además KARAKI y cols. (1979) sugieren que el componente fásico de la respuesta de la fibra lisa a la noradrenalina se debe a la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. Si tenemos en cuenta que el componente fásico, producido por la fenilefrina en el tejido objeto de nuestro trabajo, se debe también a la liberación de estos depósitos, estaría justificada la acción del nitroprusiato sobre las mismas.

El nitroprusiato carece de efecto sobre la respuesta tónica, que pudiera ser debida a la entrada de calcio a través de los ROC. Por lo tanto parece ser que el nitroprusiato no ejerce un bloqueo eficaz sobre los mismos, o bien que la entrada de calcio utilice otras vías

diferentes, para compensar el cierre de este paso. De cualquier manera el comportamiento de nitroprusiato sódico en ciertos tejidos aún no está suficientemente aclarado por lo que solo podemos hacer conjeturas sobre su actuación hasta que dispongamos de mas datos.

### 5.2.3. Contracción inducida por Estimulación Eléctrica Transmural

La estimulación eléctrica transmural según BRADING y SNEDDON (1980) permite estimular de forma selectiva la inervación intrínseca de la fibra lisa muscular, sin que se produzcan cambios en el potencial de membrana.

Para realizar la EET de las preparaciones del suelo de la gotera reticular de los bóvidos no disponíamos de ningún dato previo. Por este motivo fue necesario realizar la búsqueda de los parámetros óptimos de estímulo y la relación existente entre ellos.

Para comenzar nuestras pruebas, teníamos que determinar con que valores iniciábamos nuestro trabajo. Las condiciones que elegimos, se basaron fundamentalmente, en los datos de referencia procedentes de otros tejidos lisos de zonas próximas a la nuestra (proventrículos de rumiantes). En los trabajos realizados por MURILLO (1981) sobre fibra lisa de pilar de rumen de oveja se empleaban diferencias de potencial de 80 V, frecuencias de 10 Hz, pulsos de 40 ms y duración del estímulo 10 s. ARRUEBO (1986) en fibra circular de pared de rumen utilizó 80 V, 16 Hz, 40 ms y 10 s. TANEIKE y OHGA (1975) indican que los parámetros idóneos para la estimulación eléctrica transmural para preparaciones

procedentes de rumen, retículo y omaso de bóvidos son: voltaje supramaximal, 40-80 Hz, 1 ms y 2-40 s. Las condiciones de EET aplicadas sobre fibras lisas musculares del aparato digestivo de otras especies no rumiantes, difieren mucho de estas condiciones (KARAKI y WEISS, 1988; VAL ARANDILLA, 1991).

En nuestros experimentos comenzamos a trabajar con voltajes medios (50 V) y frecuencias inferiores a 1 Hz, con impulsos continuados. Elevamos progresivamente el voltaje sin obtener ningún tipo de respuesta; de manera que la capacidad de respuesta de nuestro tejido frente a frecuencias muy bajas es escasa e incluso nula. Contrastando con estos resultados KARAKI y WEISS (1988) obtienen con frecuencias muy bajas respuesta a la estimulación eléctrica en preparaciones de tejido vascular y en *Taenia coli* de cobaya.

Las primeras respuestas contráctiles frente a la EET las obtuvimos aplicando diferencias de potencial de 50 V con frecuencias de 20 Hz, pulsos de 1 ms y una duración del estímulo de 3 s. Con estos valores como referencia dejábamos fijos 3 de los parámetros y variábamos el cuarto, hasta que llegamos a determinar cuales eran las condiciones idóneas para cada tipo de experimentación.

De los resultados obtenidos, observamos que la frecuencia es el parámetro que más influye a la hora de provocar una contracción por EET en las preparaciones del suelo de la gotera. En las curvas frecuencia-respuesta a los hercios se aprecia claramente este hecho (Gráfica 15).

Como se observó en el apartado de resultados, los valores utilizados en los distintos tipos de experimentos, no coinciden con los valores necesarios para obtener una respuesta máxima. Empleamos estas condiciones porque la utilización de los parámetros máximos de estimulación, en algunos casos determinan un agotamiento prematuro de la fibra lisa de nuestras preparaciones, que impedían la realización de las pruebas.

Una vez determinados estos parámetros, establecimos la duración del intervalo entre impulsos, observando que si era de 2 min (Gráfica 12), las respuestas no eran homogéneas y se producía un agotamiento de las fibras muy marcado. El intervalo de 4 min, produjo una respuesta que se estabilizaba a los 30 min; en el tiempo que duró la prueba (2-5 h) no se observó una disminución de la respuesta contráctil.

Por ello, consideramos que los parámetros óptimos de estimulación en función de las pruebas a realizar son:

- Diferencia de potencial supramaximal: (70-100 V).
- Intervalos entre estímulos para estimulación continuada: 4 min.
- Intervalo entre estímulos para la realización de trenes de 5 impulsos con descanso de 15 min entre ellos: 3 min.
- Duración de los pulsos: 4 ms.
- Duración del estímulo: 5 s.
- Frecuencia para estimulación continuada: 30 Hz.
- Frecuencia para estimulación de trenes de impulsos con descansos de 15 min: 2, 6, 10, 20 y 30 Hz.

Bajo estas condiciones los experimentos realizados fueron homogéneos y reproducibles.

Las respuestas contráctiles obtenidas por estimulación eléctrica transmural son de carácter fásico y sincrónicas con el estímulo. Una vez finalizado éste aparece una relajación rápida que puede continuarse o no de una nueva contracción fásica, para finalmente alcanzar el tono inicial o descender por debajo del mismo (Registro 9).

Este tipo de respuestas es semejante a las obtenidas por MURILLO (1981) y ARRUEBO (1986) en músculo liso de pilar y músculo liso circular de rumen de oveja.



Comparando los parámetros, vemos que la gotera reticular es la que requiere impulsos más cortos (5 s, frente a 20-40 s en músculo circular de rumen y 8 s en músculo liso de pilar de rumen). La frecuencia que hemos utilizado es mayor que la usada por ARRUEBO (1986) y MURILLO (1981) (30 Hz frente a los 10-16 Hz de las preparaciones de rumen) e inferior a las utilizadas en rumen-retículo-omaso por TANEIKE Y OGHA (1975) (40-80 Hz).

Para poder comparar la energía que necesita cada tejido para producir una respuesta contráctil, nos basamos en la siguiente relación:

$$E_i = V_{\text{máx}} \times \text{T.I.}$$

$E_i$  = Energía por impulso

$V_{\text{máx}}$  = Voltaje supramáximo

T.I. = Tiempo total que está  
estimulado el tejido (s)

El T.I. se obtiene multiplicando la frecuencia ( $s^{-1}$ ) por la duración del pulso (ms) y por la duración de estímulo (s), todo ello dividido por mil, para expresarlo en segundos. Mediante este cálculo, hemos obtenido los siguientes valores de  $E_i$ : 0,6 s en la gotera reticular; 4 s en pilar de rumen; 6,4 s en músculo circular de rumen y desde 0,08 a 3,2 s en rumen-retículo-omaso. Por tanto, observamos que la gotera reticular necesita menos energía que el resto de la

musculatura lisa de proventriculos de rumiantes estudiados, a excepción del valor mínimo usado por TANEIKE y OGHA (1975). Se debe tener en cuenta, que el  $V_{\max}$  es muy parecido en todos ellos por lo que no lo hemos tenido en cuenta.

En nuestro trabajo elegíamos preparaciones con escasa o nula motilidad espontánea, para facilitar la valoración del efecto debido a este tipo de estimulación. Cuando el estímulo eléctrico coincide con una contracción espontánea no se puede establecer fidedignamente a que se debe el cambio de amplitud. Esta sumación de fuerzas es también descrita por MURILLO (1981) y ARRUEBO (1986) en sus trabajos.

Cuando las fibras presentan motilidad espontánea y se someten a EET, no se produce una abolición de la misma. Estos hechos también han sido descritos por MURILLO (1981) y ARRUEBO (1986). Además bajo estas condiciones después de una contracción inducida por EET, se produce otra espontánea de características variables en cuanto a amplitud y duración.

Por otro lado en las preparaciones procedentes de tejidos vascular o intestinal de otras especies podemos decir que se suelen asociar descargas puntuales con contracciones transitorias y descargas mantenidas con contracciones mantenidas (KARAKI y WEISS, 1988), mientras que en las

preparaciones procedentes del suelo de la gotera reticular de bóvidos se requieren descargas mantenidas durante 5 s para conseguir una contracción transitoria. Para lograr una contracción mantenida, nuestras preparaciones necesitaron estímulos constantes con intervalos muy cortos (menos de 1 min) que inducen una tetanización que incapacita a la fibra para responder.

Para poder determinar si la respuesta a la EET tiene un origen miogénico o neurogénico incubamos las preparaciones con TTX ( $10^{-6}$  M) observando que no existía ningún tipo de inhibición de la respuesta (Registro 13). Teniendo en cuenta que la TTX es un bloqueante de la conducción nerviosa que no afecta a las células musculares lisas (RITCHIE y COHEN., 1975), descartamos la participación del componente neurogénico.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por MURILLO (1981) Y ARRUEBO (1986) sobre musculatura de rumen de oveja, que describen una respuesta a la EET de tipo miogénico.

Por el contrario, TANIEKE y OGHA (1975), indican que la TTX inhibe totalmente la respuesta inducida por EET en rumen, retículo y omaso, describiendo la respuesta de carácter neurogénico.

DENAC (1991), en fibras procedentes de preparaciones de gotera reticular de bóvidos observa que la respuesta inducida por noradrenalina no se modifica por la incubación con TTX. Por esta razón, atribuye la contracción obtenida a la existencia de receptores a noradrenalina en la pared de la membrana y no a través de la liberación de otros neurotransmisores por estímulo presináptico.

Aunque nuestras pruebas difieren de las de DENAC (1991), en ambas se pone de manifiesto la naturaleza miogénica de estos tipos de respuesta.

Descartado el componente neurogénico que podría inducir la liberación de neurotransmisores que nos condujesen a conclusiones erróneas sobre la respuesta obtenida, pasamos a estudiar la influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  intra o extracelular en los fenómenos de contracción.

VAN BREEMEN y cols. (1980, 1981) sugiere que la contracción del músculo liso no vascular inducida por EET, depende de los movimientos y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e intracelular.

En primer lugar, para determinar la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la respuesta a la EET en músculo liso de gotera reticular, privamos de este catión a las preparaciones, mediante la

sustitución de RT por  $RTCa^{2+}$  más EGTA. Se observó una inhibición superior al 50% en la curva de frecuencias (Gráfica 16, Registro 10A y 10B). Este hecho sugiere que la influencia del calcio extracelular en este tipo de contracción es importante aunque no es mayor que la de los depósitos intracelulares.

ARRUEBO (1986) en preparaciones de músculo liso circular de rumen de oveja, destaca una fuerte inhibición de la respuesta a la EET, en ausencia de calcio (83,8%); este fenómeno es más marcado cuando se incorpora EGTA (1-2 mM) al medio (92,1%). En cambio nuestra prueba fue realizada en presencia de EGTA (0,1 mM), para evitar la reutilización de calcio liberado en cada estímulo, así como para quelar el fijado a la membrana.

No podemos determinar si se debe a que el calcio unido a membrana tiene una influencia menor en la contracción de la gotera reticular y mayor en músculo circular de rumen de oveja, o bien, si se debe a que las concentraciones de EGTA en el medio son distintas. En nuestro caso, aunque son inferiores a las de ARRUEBO (1986), creemos son suficientes para provocar fenómenos de quelación y no originar alteraciones funcionales de la membrana.

En las pruebas realizadas con estímulos de frecuencia fija ( 30 Hz, voltaje supramáx., 4 ms, 5 s) y en ausencia de calcio más EGTA (0,1 M), la preparación mantenía una respuesta equivalente a la obtenida en presencia de calcio frente a los estímulos durante unos 60 minutos y posteriormente producía un descenso progresivo en la amplitud de la contracción, pero no desaparecía incluso después de más de dos horas de estimulación eléctrica continuada. Este efecto de privación de calcio es totalmente reversible, ya que al reponer el  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio y suprimir el EGTA, la fibra recuperaba totalmente su capacidad de contracción inicial. Este hecho indica fundamentalmente un rellenado rápido de los depósitos intracelulares de calcio, que podría entrar a través de los canales convencionales y además pensamos que estarían implicados los canales de goteo, pues la entrada del catión a través de ellos se vería favorecido por la diferencia de gradiente entre ambos lados de la membrana.

La incubación de las preparaciones con verapamil y nitroprusiato sódico no produjo ninguna inhibición sobre la respuesta a la EET, que fuese estadísticamente significativa (Gráfica 17, Registro 11).

ARRUEBO (1986) describe que el verapamil es capaz de inhibir la respuesta de la fibra lisa circular de rumen de

óvido frente a la EET de manera altamente significativa y sugiere que la entrada de calcio al interior de la célula se produce a través de los VOC, activados por cambios en el potencial de membrana. Sin embargo, el nitroprusiato sódico no ejerce efecto alguno en la aparición de dicha respuesta. Los resultados que hemos obtenido con el nitroprusiato sódico coinciden con los de ARRUEBO (1986).

Teniendo en cuenta que la ausencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular, permite que se produzca una contracción cuya amplitud es el 50% del valor normal y que la utilización del verapamil o el nitroprusiato no modifica este tipo de respuesta, podríamos considerar que los VOC y los ROC no están implicados en los movimientos del calcio a través de la membrana celular durante la EET. O bien que trabajando con frecuencias altas (2-30 Hz) la eficacia de los bloqueantes está disminuida. BEATTIE y cols. (1986) describen la diferente eficacia de los bloqueantes en función del tipo de frecuencia empleada para inducir una contracción.

No obstante queda patente la importancia de la participación de los depósitos intracelulares de calcio en el fenómeno de contracción inducida por estimulación eléctrica transmural, que le confieren características de músculo estriado.

En este sentido la adición de cafeína (30 mM), no produce una contracción de las fibras como sucede en otros tejidos musculares estriados, seguida de un fenómeno de tetanización (ENDO, 1977; FABIATO, 1977).

La falta de efecto directo contráctil, indicaría que el posible vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio de forma brusca no es suficiente para desencadenar el fenómeno de contracción (Registro 12).

AHN (1988) indica que la cafeína sobre músculo liso tiene efectos duales, sobre tejido vascular induce una contracción transitoria debida a esa liberación de calcio y posteriormente un efecto inhibitorio; mientras que en otras preparaciones de músculo liso tratado con saponinas desarrolla una potente actividad inhibitoria de la contracción (SAVINEAU, 1988).

Estos autores dudan de la eficacia del empleo de cafeína en el estudio de los depósitos intracelulares de calcio. En nuestras preparaciones observamos que la cafeína provoca un fuerte desplazamiento de la curva a la derecha, que es mucho mayor cuando se priva de calcio extracelular a la preparación (Gráfica 18).



Es indudable que se ha producido un vaciamiento importante de los depósitos intracelulares, que parecen ser los máximos responsables de los fenómenos de contracción inducida por EET. Si hay presencia de calcio extracelular, es posible un rellenado de estos depósitos. Por el contrario en ausencia de calcio extracelular hay una abolición completa de la respuesta (Gráfica 18).

Teniendo en cuenta lo indicado por IINO (1990), sobre el vaciamiento de los depósitos  $S_\alpha$  y  $S_\beta$ , a través de cafeína e  $IP_3$  en el primer caso y sólo por  $IP_3$  en el segundo, En nuestro caso los depósitos intracelulares de calcio se corresponderían con los del compartimento  $S_\alpha$ . No tenemos pruebas complementarias suficientes para poder afirmar esta situación; siendo solamente una hipótesis y más teniendo en cuenta que IINO trabaja en un tejido diferente y que el comportamiento de las distintas musculaturas lisas no es siempre el mismo.

Otras teorías ponen de manifiesto que la inhibición de la cafeína en el proceso de contracción, tanto si ha sido inducida por  $K^+$ , como por noradrenalina o carbacol, (AHN, 1988; NOUAILHETAS, 1988) podría ser debida a la acción de ésta sobre la fosfodiesterasa, que a su vez está implicada en los procesos de la degradación del AMPc. Al aumentar la concentración de AMPc se produce una fosforilización de la

cadena ligera de miosina impidiendo el proceso de contracción  
(SAVINEAU, 1988).

## **6.- CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- 1.- El KCl (42,4 mM) induce sobre la musculatura lisa del suelo de la gotera reticular bovina, una contracción que se ve inhibida por el verapamil ( $10^{-6}$  M), por la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio y no se ve afectada por el nitroprusiato sodico ( $10^{-6}$  M).
- 2.- El verapamil ( $10^{-6}$  M) y el nitroprusiato ( $10^{-6}$  M) inhiben la contracción producida por concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  (0,25-7 mM) en una solución despolarizante y libre de calcio, en un 80 % y 20 % respectivamente.
- 3.- La fenilefrina ( $10^{-6}$  M) induce una contracción con un componente fásico y otro tónico en la musculatura lisa de la gotera reticular bovina. La ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , determina una inhibición parcial del componente tónico, el nitroprusiato ( $10^{-6}$  M) sódico del fásico y el verapamil ( $10^{-6}$  M) de ambos componentes.
- 4.- Los parámetros idóneos de estimulación eléctrica transmural en el músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina son: voltaje supramaximal (70-100 V), frecuencia 30 Hz, pulso 4 ms, duración del estímulo 5 s e intervalo entre estímulos 4 min. La contracción es sincrónica al estímulo y de tipo fásico.

- 6.- La respuesta a la estimulación eléctrica transmural es de tipo miogénico.
- 7.- El verapamil ( $10^{-6}$  M) y el nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$ M) no modifican la respuesta a la estimulación eléctrica transmural. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no desaparece la respuesta de este músculo liso a la estimulación eléctrica transmural, al menos durante 2 h de estimulación constante.
- 8.- La cafeína (30 mM) determina un efecto inhibitorio de la contracción inducida por estimulación eléctrica transmural, que se acentúa en ausencia de calcio.
- 9.- La importancia de la participación de los depósitos intracelulares de calcio en los fenómenos de contracción inducida por estimulación eléctrica transmural le confieren características de músculo estriado.

## 7.- RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio sobre el músculo liso del tercio anterior del suelo de la gotera reticular, con objeto de determinar el papel del calcio en los fenómenos de contracción de dicha fibra. Las respuestas contráctiles de esta fibra, han sido inducidas mediante el empleo de altas concentraciones de  $K^+$ , fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y estimulación eléctrica transmural, en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular. Como posibles antagonistas de los movimientos del calcio a través de la membrana celular, hemos utilizado verapamil ( $10^{-6}$  M) y nitroprusiato sódico ( $10^{-6}$  M).

En la despolarización inducida por  $K^+$ , el verapamil tiene una  $CI_{50} = 3,9 \times 10^{-6}$  M y el nitroprusiato sódico una  $CI_{50} = 1,41 \times 10^{-4}$  M. La ausencia de  $Ca^{2+}$  en el medio y el verapamil produce una inhibición de la contracción inducida por KCl (8,8-42,4 mM), pero no el nitroprusiato sódico. Frente a concentraciones crecientes de  $CaCl_2$  (0,25-7 mM) en una solución despolarizante, el verapamil inhibe un 80% la respuesta y el nitroprusiato sódico un 20%. En la respuesta contractil inducida por fenilefrina la ausencia de  $Ca^{2+}$  determina una inhibición del componente tónico; el nitroprusiato del componente fásico y el verapamil de ambos.

Los parámetros idóneos para lograr una respuesta contractil homogénea y reproducible mediante la estimulación eléctrica transmural son: voltaje supramáx., 50-80 V, 30 Hz, 4ms, 5 s. Esta respuesta es inhibida un 50% por la privación de calcio y no se modifica por la acción del verapamil ni del nitroprusiato sódico. La cafeína (30 mM) produce un fuerte efecto inhibitorio de la respuesta, que es más evidente en ausencia de calcio extracelular.

Por todo ello consideramos importante la influencia del calcio extracelular y la capacidad de almacenamiento del cation  $Ca^{2+}$  en los depositos intracelulares del músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina, que le confieren caracteres semejantes a la musculatura estriada.

## 8.- BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

- ADELSTEIN, R.S. and EISENBERG, E. 1980. Regulation and kinetics of the actin-myosin ATP interaction. Annu. Rev. Biochem., 49, 921-956.
- AHN, H.Y.; KARAKI, H.; URAKAWA, N. 1988. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in muscular and intestinal smooth muscle. Br. J. Pharmacol., 93, 267-274.
- AICKIN, C.C. 1987. Investigation of factors affecting the intracellular sodium activity in the smooth muscle guinean-pig urether. J. Physiol., 385, 483-505.
- ARRUEBO, P. 1986. Canales de calcio en músculo liso de rumen de oveja. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- ARRUEBO, M.P.; ALCALDE, I.; MURILLO, P. 1987. Papel del calcio sobre la contracción inducida por potasio y noradrenalina en rumen de oveja. Revista Española de Fisiología, 43, 3, 365-370.
- ASHIDA, T. and BLAUSTEIN, M.P. 1987. Regulation of cell calcium and contractility in mammalian arterial smooth muscle: the role of sodium-calcium exchange. J. Physiol., 392, 617-635.
- BAKER, P.F. and McNAUGHTON, P.A. 1976. The effect of membrane potential on the calcium transport systems in squid axons. J. Physiol., 260, 24.

- BALWIERCZAK, J.L.; SCHWARTZ, A. 1985. Specific binding of (3H)D-cis diltiazem to cardiac sarcolemmal and its inhibition by calcium. Eur. J. Pharmacol., 116, 193-194.
- BEAN, B.P. 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial celk: differences in kinetics, selectivity and pharmacology. J. Gen. Physiol. 86, 1-30.
- BEATTIE, D.T.; CUNNANE, T.C.; MUIR, T.C. 1986. Effects of calcium channel antagonist on action potential conduction and transmitter release in the guinea-pig vas deferens. Br. J. Pharmac., 89, 235-244.
- BEGHELLI, V.; CECCARELLI, A.; DEBENEDETT, A.; LUCARONI, A.; OLIVIERI, O. 1975. Distribuzione delle idinesterasi e delle monoaminossidasi in vari distretti del reticololumine di agnelli. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. 28, 377-383.
- BENHAM, C.D. and TSIEN, R.W. 1987. A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. Nature, 328, 275-278.
- BERRIDGE, M.J. and IRVINE, R.F. 1984. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature, 312, 315-321.
- BEVAN, J.A.; OSHER, J.V.; SU, C. 1963. Responses of vascular smooth muscle to potassium and its antagonism by phenoxybenzamine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 139, 216-221.

- BEVAN, J.A.; BEVAN, R.D.; HWA, J.J.; OWEN, M.P.; TAYO, F.M. and WINQUIST, R.J. 1982. Calcium intrinsic and extrinsic (myogenic) vascular tone. In: Calcium modulators. T. Godfraind; A. Albertini; R. Padelti (Eds.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- BLAUSTEIN, M.P. 1984. The energetics and kinetics of sodium-calcium exchange in barnacle muscles, squid axons and mammalian heart: the role of ATP. In: Electrogenic transport: Fundamental principles and Physiological implications. M.P. Blaustein and m. Lieberman (Eds.), Raven Press, New York.
- BOLTON, T.B. 1979. Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. Physiol. Rev., 3, 606-718.
- BOLTON, T.B. 1986. Calcium metabolism in vascular smooth muscle. Br. Med. Bull., 42, 421-429.
- BORA, L.; SHUCHLEIB, R.; HENRY, P. 1977. Effects of potassium on isolated canine coronary arteries. Modulation of adrenergic respon. Cir. Res., 41, 778-786.
- BORGATTI, G.; MATSCHER, A.; BEHELLI, V. 1959. La funzione del reticolo e della doccia esofagea nella coordinazione riflessa dell'attivita motoria dei pestomaci. Arch. Sci. Biol. 43, 33-56.
- BORLE, A.B. 1981. Control, modulation and regulation of cell calcium. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 90, 13-153.
- BOVA, S.; CARGNELLI, G. and LUCIANI, S. 1986. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx-dependent contraction of vascular smooth muscle by amiloride. Ann. N.Y. Acad. Sci. 488, 543-545.

- BOVA, S.; CARGNELLI, G. and LUCIANI, S. 1988. Na/Ca exchange and tension development in vascular smooth muscle: effect of amiloride. Br. J. Pharmacol., 93, 601-608.
- BRADING, A.; SNEDDON, T. 1980. Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea pig taenia coli in stimulation with carbachol. Br. J. Pharmacol., 70, 229-240.
- BRAUNWALD, E. 1982. Mechanism of action of calcium channel bloquing agents. New. Engl. J. Med., 28, 1618-1627.
- BRUGERE, H.; MIKHAIL, M.; LE BARS, . 1987. Effet de la vasopressine sur la fermeture de la gouttiere oesophagienne de la chèvre. Bull. Acad. Vet. de France, 60, 63-68.
- BUENO, L. and FIORAMONTI, J. 1983. Dopaminergic control of gastrointestinal motility. In: Veterinary Pharmacology and toxicology. Eds. Ruckebush, Y.; Toutain, P.L. and Kontz, G.D. pp. 283-298. MTP Press Limited, Lancaster.
- BURGUEN, H. 1979. The role of calcium in the mechanical performance of the cattle ruminal muscle. J. Vet. Pharmacol. Therap., 2, 305-311.
- BURGESS, G.M.; MCKINNEY, J.S.; FABIATO, A.; LESLIE, B.A.; PUTNEY, J.W. 1983. Calcium pools in saponen-permeabilized guinea-pig hepatocytes. J. Biol. Chem., 258, 15336-15345.
- CAPUTO, C.; DIPOLO, R. and BEZANILLA, F. 1986. Measurement of a Na-dependent  $Ca_i$ -activated membrane current in squid axons. Biophys. J., 49, 232a

- CARAFOLI, E. and LEHNINGER, A.L. 1971. A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. Biochem. J., 122, 681-690.
- CARBONE, E. and LUX, H.D. 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. Nature. 316, 440-443.
- CASTEELS, R.; KNAMURA, K.; KURIYAMA, M. and SUZUKI, H. 1977. The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. J. Physiol., 271, 41-61.
- CAUVIN, G.; LOUTZENHISER, R.; VAN BREEMEN, C. 1983. Mechanisms of calcium antagonists-induced vasodilatation. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23, 373-396.
- CAVERO, I.; SHEPPERSON, N.; LEFEURE, F.; LANGER, S.Z. 1983. Differential inhibition of vascular smooth muscle responses to  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  agonist by diltiazem and verapamil. Cir. Res., 52, 69-76.
- COMLINE, R.S. and TITCHEN, D.A. 1951. Reflex contraction of the oesophageal groove in young ruminants. J. Physiol (Lond), 115, 210-226.
- COMLINE, R.S. and TITCHEN, D.A. 1962. Control nervioso del estómago del rumiante. En: Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes de LEWIS, D. pp. 11-26. Ed. Acubia S.A. Zaragoza.
- COOKE, P. 1976. A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. J. Cell. Biol., 48, 539-556.

- COX, J.A.; COMTE, M.; MALNOE, A.; BURGER, D.; STEIN, E.A. 1984. Mode of action of the regulatory protein calmodulin. In: Metal ions in Biological Systems. Vol. 17. H. Sigel (Ed.), Marcel Dekker, New York.
- CROMPTON, M.; MOSER, R.; LUDI, H. and CARAFOLI, E. 1978. The interrelations between the transport of sodium and calcium of mitochondria of various mammalian tissues. Eur. J. Biochem., 82, 25-31.
- CROUCH, T.H. and KLEE, L.B. 1980. Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmoduline. Biochemistry, 19, 3692-3698.
- CURTIS, B.M. and CATTERALL, W.A. 1985. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP dependent proteinkinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2528-2532.
- CHADWICK, C.C.; SAITO, A.; FLEISCHER, S. 1990. Isolation and characteritaton of the inositol thiphosphate receptor from smooth muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2132-2136.
- CHAPMAN, H.W. 1986. Abomasal intubation of young calves. Can. J. Vet. Res, 50, 291-292.
- CHAPMAN, H.W.; BUTLER, D.G. and NEWELL, M. 1986. The route of liquid administered to calves by esophageal feeder. Can. J. Vet. Res., 50, 84-87.
- CHIN, J.H. 1986. Commentary: Differential sensitivity of calcium channels to ditry diopiridines. The modulated receptor hypothesis. Biochem. Pharmacol., 35, 4115-4120.

- CHURCH, D.C. 1974. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- DABROWSKA, R.; AROMATORIO, D.; SHERRY, J.M.F. and HARTSHORNE, D.J. 1977. Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. Biochem. Biophys. Res. Commu, 78, 1263-1272.
- DABROWSKA, R.; SHERRY, J.M.F.; AROMATORIO, D. and HARTSHORNE, D.J. 1978. Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. Biochemistry, 17, 253-258.
- DANIEL, E.E. 1985. The use of subcelular membrane fractions in analysis of control of smooth muscle function. Experientia, 41, 905-913.
- DE VUYST, A. 1974. El reflejo de cierre de la gotera esofágica. Zootechnia, 24, 241-242.
- DEL RIO ORTEGA, S. 1973. Desarrollo prenatal del estómago de la oveja "Ovis aries". Tesis Doctoral de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- DELLMANN, H.D. 1971. Histología veterinaria. Ed. Lea & Febiger.
- DENAC, M.; MARTI, J.; SCHARRER, E. 1990. Einfluß von Katecholaminen auf die glatte Muskulatur der Schlundrinne des Kalbes. Schweiz Arch. Tierheilk, 132, 491-496.
- DENAC, M.; KÜMIN, G. and SCHARRER, E. 1991. Effect of Noradrenaline on smooth Muscle Strips from the Reticular groove of Adult Cattle. J. Vet. Med., A38, 383-388.

- DEVINE, C.E.; SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P. 1971. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction couplin in mammalian smooth muscle. J. Cell. Biol., 52, 690-715.
- DILLON, P.F.; ASKOY, M.D.; DRISKA, S.P.; MURPHY, R.A. 1981. Myosin phosphorilation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. Science, 211, 495-497.
- DIPOLO, R. and BEAUGE, L. 1987. The squid axon as a model for studying plasma membrane mechanisms for calcium regulation. Hypertension, 10, 15-19.
- DISALVO, J.; GIFFORD, D.; BIALOGAN, C. and RÜEGG, J.C. 1983. An aortic spontaneously active phosphatase desphosphorilates myosin an inhibits actin-myosin interaction. Biochem. Biophys. Res. Commu., 111, 906-911.
- DROOGMANS, G.; RAYMAEKERS, L.; CASTEELS, R. 1977. Electro and pharmaconmechanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit car artery. J. Gen Physiol., 70, 129-148.
- EBASHI, S. 1980. Regulation of muscle contraction. Proc. R. Soc. Lon. (Biol.), 207, 259-286.
- ECKERT, R. and CHAD, J.E. 1984. Inactivation of Ca channels. Prog. Biophys. Md. Biol., 44, 215-267.
- EGGERMONT, J.A.; VROLIX, M.; RAEYMAEKERS, L.; WUYTACK, F. and CASTEELS, R. 1988. Ca<sup>2+</sup>-transport ATPases of vascular smooth muscle. Cir. Res., 62, 266-278.
- ELLENBERGER, V. und BRAUM, H. 1974. Handbuch der vergleichenden anatomie der haustiere. Ed. Springer Verlag-Berlin-Heidelberg-N.Y. pp. 435-446.



- ENCINAS, T.; SAN ANDRES, M.I., LUCAS, J.J.; ROS, J.M. 1989. Registro de la motilidad espontanea "in vitro" del suelo de la gotera reticular en bóvidos. Rev. Esp. Fisiol., 45, 367-372.
- ENDO, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev., 57, 1, 71-108.
- FABIATO, A.; FABIATO, F. 1977. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. Cir. Res., 40, 119-129.
- FALEMPIN, M.; MEJ, N.; ROUSSEAU, J.P. 1978. Vagal mechano receptors of the inferior thoracic esophagus the lower oesophageal sphincter and the stomach in the sheep. Arch. Eur. J. Physiol., 373 (1), 25-30.
- FAY, F.S.; COOKE, P.H.; CANADAY, P.G. 1976. Contractile properties of usdated smooth muscle cells. In: Physiology of smooth muscle. Eds. E. Bülbring y M.F. Shuba. Ed. Raven Press, New York.
- FILO, R.S.; BOHR, D.F. and RUEGG, J.C. 1965. Glycerinated skeletal and smooth muscle calcium and magnesium dependence. Science, 147, 1581-1583.
- FINKEL, A.S.; HIRST, G.D.S. and VAN HELDEN, D.F. 1984. Some properties of excitatory function currrents recorded from submucosal arterioles of guinean pig ileum. J. Physiol., 351, 87-98.
- FISHER, B.A. and BAGBY, R.M. 1977. Reorientation of myofilaments during contraction of a vertebrate smooth muscle. Am. J. Physiol., 232, C5-C14.

- FLECKENSTEIN, A.; TRITTHART, H.; FLECKENSTEIN, B.; HERBST, A.; GRUN, G. 1969. A new group of competitive Ca-antagonists (I provera-tril, d-600, prenylamine) with highly potent inhibition effects on excitation-contraction coupling in mamalian myocardium. Pluegers Arch., 307, R-25.
- FLECKENSTEIN, A. 1977. Specific pharmacology of calcium in myocardium cardiac pacemarkers and vascular smooth muscle. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 17, 149-166.
- FLECKENSTEIN, A. 1981. Pharmacology and electrophysiology of calcium antagonists. En: Calcium antagonism cardiovascular therapy: experience with verapamil. Ed. A. Zanchetti and D.M. Krikler. Excerpta media. Amsterdam-Oxford-Princeton. Pp. 10-29.
- FLOREZ, J. 1992. Acciones de los fármacos II: Mecanismos moleculares. En: Florez, J.; Armijo, J.A. y Mediaville A., Farmacología humana. 2ª Ed. Cap. 2. Masson-Salvat Barcelona. España.
- GABELLA, G. 1978. Efecto of potassium on the mechanical activity of taenia coli, uterus and portal vein of the guinea-pig. Q.J. Physiol., 63, 125-146.
- GABELLA, G. 1981. Structure of smooth muscles. En: Smooth Muscle: an assessment of current knowledge. Bülbring, E.; Brading, A.F.; Jones, A.W. and Tomita (Eds.). Arnold. London.
- GABELLA, G. 1984. Structural apparatus for force transmission in smooth muscles. Physiol. Rev., 64, 455-477

- GLOSSMAN, H.; FERRY, D.R.; LUBBECKE, T.; MENES, R.; HOFMANN, F. 1982. Calcium channel: direct identification with radio lig and binding studies. Trends, Pharmacol. Sci., 3, 431-437.
- GODFRAIND, T.; MILLER, R.; LIMA, S. 1983. Effects of yohimbine, rauwolscine and corynanthine on contractions and calcium flukes induced by depolarization and prostaglandin F<sub>2α</sub> in rat aorte. J. Pharmacol., 80, 115-121.
- GODFRAIND, T.; MILLER, R.; WIBO, M. 1986. Calcium antagonism and calcium entry blockade. Pharmacol. Rev., 38, 321-416.
- GODINHO, H.P.; GETTY, R. 1982. Sistema nervioso de los rumiantes. En: Anatomía de los Animales Domésticos. Sisson y Grossman. Ed. Robert Getty (I). 5ª Ed. 1982. Salvat. Barcelona.
- GOODENOUGH, D.A. and REVEL, J.P. 1970. A fine structure analysis of intercelular functions in the mouse liver. J. Cell. Biol., 45, 272-290.
- GRUETER, C.A.; BARRY, B.K.; McNAMARA, D.B. 1980. Coronary arterial relaxation and tuanylateciclase activation by cigarette smoke N-nitrosonor-nicotine and nitric oxide. J. Pharmacol. Exp. Ther., 214, 9-15.
- GRUETER, C.A.; GRUETER, D.Y.; LYON, J.E.; KADONITZ, P.J.; IGNARRO, L. 1981. Relationship between cyclic guanosine 3'-5' monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by gliceril trinitrate,

- nitroprusside, nitrite and nitrit oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. J. Pharmacol. Exp. Ther., 219, 181-186.
- GUILHERMET, R.; MATHIEV, C.M.; TOULEC, R. 1974. Observations on the closure of the esophageal groove in the calf. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 13, 715-718.
- HABEL, R.E. 1970. Guide to the dissection of domestic ruminants. Ed. Ithaca. N.Y. By the author.
- HABEL, R.E. 1982. Sistema digestivo de los rumiantes. En: Anatomía de los Animales Domésticos. Sisson y Grossman. 5ª Ed. 1982. Salvat. Barcelona (I). Pp. 902-1003.
- HAGIWARA, S. and BYERLY, . 1981. Calcium channel. Annu. Rev. Neurosci., 4, 69-125.
- HAGIWARA, S. 1983. Membran potential-depent in channels in cel membrane: Phylogenetic and developmental approaches. Raven Press. New York.
- HARTSHORNE, D.J. 1980. Biochemical bases for contraction of vascular smooth muscle. Chest., 78, 140-149.
- HARTSHORNE, D.J. and GORECKA, A. 1980. Biochemistry of the contractile proteins of smooth muscle. In: Handbook of Physiology. The cardio vascular sistem. Vol. 2. D.F. Bohr; A.P. Somlyo and M.V. Sparks Jr. (Eds.). American Physiological Society Bethesda.
- HEDDE, R.D. and WARD, G.M. 1973. Strontium as an indicator of rumen by-pass efficacy. J. Dairy Sci., 56, 1567-1569.

- HENDERSON, R.M. 1975. Cell-to-cell contacts. In: Methods in Pharmacology. Vol. 3. E.E. Daniel and M.D. Paton (Eds). Plenum Pres, New York.
- HENRICKSON, R.C. 1970. Developmental changes in the structure of prenatal ruminal epithelium, basals infildings and glycogen and glycolalix. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 109, 15-19.
- HESS, P. and TSIEN, R.W. 1984. Mechanisms of ion permeation through calcium channels. Nature, 309, 453-456.
- HESS, P.; LANSMAN, J.B. and TSIEN, R.W. 1984. Different modes of Ca channel gatin behaviour fauvoured by dihidropyridine Ca agonist and antagonist. Nature, 311, 538-544.
- HESS, P.; LANSMAN, J.B. and TSIEN, R.W. 1985. Mechanisms of calcium channel modulation by dihydropyridine agonist and antagonist. In: Control and manipulation of calcium movement. J.R. Parratt (Ed.). Raven Press. New York.
- HILLE, B. 1984. Na and K channels of axon. In: Ionic channels of excitable membranes. Sunderlan, Massachusetts: Sinauer associates. Pp. 58-75.
- HOFMANN, R. 1969. Zur topographie und morphologie des wiederk äuermagens im himblick aufseine funktion. Paul Parey Verlag. Berlin. Hamburg. pp. 127-166.
- HUDGINS, P.M. and WEISS, R.U. 1968. Differential effect of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine histamine and potassium. J. Pharmacol. Exp. Ther., 159, 77-91.

- HURWITZ, L. 1986. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26, 225-258.
- HUXLEY, A.F. 1977. Review lecture: Muscular & contraction. J. Physiol. Lond., 243, 1-43.
- IMAI, S.; KITAGANA, Y. 1981. A comparison of the differential effects of nitroglycerin, nifedipine and papaverine on contractures induced in vascular and intestinal smooth muscle by potassium and lanthanum. Jap. J. Pharmacol., 31, 193-199.
- IINO, M. 1990. Calcium release mechanisms in smooth muscle. Japan J. Pharmacol., 54, 345-354.
- IRVINE, R.F. 1986. Calcium transients: mobilization of intracellular calcium. Br. Med. Bull., 42, 369-374.
- ITOH, T.; KAGIWARA, M.; DITAMURA, K. and KURIYAMA, H. 1982. Roles of stored calcium on the mechanical response evoked in smooth muscle cells of the porcine coronary artery. J. Physiol., 322, 107-125.
- ITOH, T.; KURIYAMA, H. and VENO, H. 1983a. Mechanisms of the nitroglycerine induced vasodilatation in vascular smooth muscle of the rabbit and pig. J. Physiol., 343, 233-252.
- ITOH, T.; KURIYAMA, H. and SUZUKI, H. 1983b. Differences and similarities in the noradrenaline and caffeine induced mechanical responses in the rabbit mesenteric artery. J. Physiol., 379, 609-629.

- ITOH, T.; KANMURA, Y.; KURIYAMA, M.; SASAGURIT, T. 1985. Nitroglycerine and isoprenaline induced vasodilatation: assessment from the actions of cyclic nucleotids. Br. J. Pharmacol., 84, 393-406.
- JANIS, R.A.; TRIGGLE, D.I. 1984. 1-4 Dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel antagonists and activators: a comparison of binding characteristics with pharmacology. Drug. Dev. Res., 4, 257-274.
- JOCKUSH, B.M.; ISENBERG, G. 1981. Interaction of the  $\alpha$ -actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3005-3009.
- JOHNS, A.; LEIJTEN, P.; YAMAMOTO, H.; HWANG, K. and VAN BREEMEN, C. 1987. Calcium regulation in vascular smooth muscle contractility. Am. J. Cardiol., 59, 18A-23A.
- KAMM, K.E.; STULL, J.T. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 593-620.
- KANAYA, S., ARLOCK, P.; KATZUNG, B.G.; HONDEGHEM, L.M. 1983. Diltiazem and Verapamil preferentially block inactivated cardiac calcium channels. J. Md. Cell. Cardiol., 15, 145-148
- KANO, U.; KAWAGUCHI, N.; ASARI, M.; WAKUI, S. 1988. Morphogenesis of the longitudinal folds situated on the floor of the reticular groove. Jpn. J. Vet. Sci., 50 (3), 821-824.
- KARAKI, H. and WEISS, G.B. 1984. Calcium channels in smooth muscle. Gastroenterology, 87, 960-970.

- KARAKI, H.; NAKAGAWA, H.; URAKAWA, N. 1984a. Comparative effects of verapamil and sodium nitropruside on contraction and <sup>45</sup>Ca uptake in the smooth muscle of rabbit aorta, rat aorta and guinea pig taenic coli. Br. J. Pharmacol., 81, 394-400.
- KARAKI, H.; MURAKAMI, K.; NAKAGAWA, H. and URAKAWA, N. 1984b. Nitroglycerine indece biphasic relaxation in vascular smooth muscle of rat aorta. Br. J. Pharmacol., 81, 387-392.
- KARAKI, H.; AHN, H.Y and URAKAWA, N. 1987. Caffeine-induced contraction in vascular smooth muscle. Arch. Int. Pharmacolyn., 285, 60-71.
- KARAKI, H. and WEISS, G.B. 1988. Minireview: calcium release in smooth muscle. Life Sci., 42, 11-122.
- KAUFFMAN, R.; BAYER, R.; RODENKIRCHEN, P., MANNHOLD, K. 1982. Differentiation of calcium antagonistic drugs with respect to their myocardial effects. En: Hypertrophic cardiomyopathy. Ed. M.Kaltenbach and S. Epstein. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York. Pp. 276-284.
- KAY, R.N.B. and RUCKEBUSCH, Y. 1971. Movements of the stomach compartments of a young bull during sucking. Br. J. Nutr., 26, 301-309.
- KAY, R.N.B.; ORSKOV, E.R.; WENHAM, G. 1972. Radiographic studies of the oesophagus and stomach of the suckling lamb and kid. Proceedings of the Physiological Society. 2-3.



- KEENE, J.J.; SEIDEL, C.L.; BOHR, D.F. 1972. Manganese on calcium flux and norepinephrine induced tension in arterial smooth muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 139, 1083-1085.
- KHALIL, R.; LODGE, N.; SAIDA, K. and VAN BREEMEN, C. 1987. Mechanism of calcium activation on vascular smooth muscle. J. Hypertension, 5, S5-S15.
- KIMURA, J.; NORMA, A. and IRISAWA, A. 1986. Na/Ca exchange current in mammalian heart cells. Nature, 319, 596-597.
- KITAMURA, N.; YAMADA, J.; YAMASHITA, T. 1986. Immunohistological study on the distribution of neuron-specific enclase and peptide containing nerves in the reticulorumen and the reticular groove of cattle. J. Comp. Neurol., 248 (2), 223-234.
- KITAMURA, N.; YAMADA, J.; YAMASHITA, T. 1987. Distribution of methionine-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-inmunereactive nerves in the forestomach of cattle. Am. J. Vet. Res., 48 (11), 1631-1637.
- KLEE, C.B. and VANAMAN, T.C. 1982. Calmodulin. Adv. Prot. Chem., 35, 213-321.
- KLEVIT, R.E.; BLUMENTHAL, D.K.; WEMMER, D.E. and KREBS, E.G. 1985. Interaction of calmodulin and a calmodulin binding peptide from myosin light chain kinase: major spectral changes in both occur as the result of complex formation. Biochemistry, 24, 8152-8157.
- KOPER, S. and MUCHA, M. 1983. A cineradiographic method for recording the function of the oesophageal groove in lambs. Acta Physiol. Pol., 34, 539-545.

- KRAHMER, R.; SCHRÖEDER, L. 1982. Anatomía de los Animales Domésticos. Ed. Acubia. Zaragoza.
- KREYE, V.A.W. 1980. Sodium nitroprusside approaches to wards the elucidation in its mode of action. Trends. Pharmacol. Sci., 1, 384-388.
- KUKOVETZ, W.R.; POCH, G. and HOLZMANN, . 1981. Cyclic nucleotides and relaxation of vascular smooth muscle. En: Vasodilatacion. P.M. Vanhoutte y Leusen (Eds.). Raven Press. New York.
- LAMBERT, P.S. 1948. The development og the stomach in the ruminant. Brit. Vet. J., 103, 302-310.
- LEWIS, D. 1962. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Ed. Acribia. Zaragoza.
- LITWIN, W.J. 1980. Cell membrane features of rabbit arterial smooth muscle. Cell. Tissue Res., 212, 341-350.
- LOPEZ, C.; RODRIGUEZ, C.; SAN ANDRES, M.D.; ENCINAS, T.; SAN ANDRES, M. 1992. Efecto del verapamil sobre la contracción inducida por potasio en el suelo de la gotera reticular de bóvidos. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Córdoba. Pág. 107.
- LOWY, J.; POULSEN, F.R.; VICBERT, P.J. 1970. Myosin filaments in vertebrate smooth muscle. Nature, 225, 1053-1054.
- LUCAS, J.; RODRIGUEZ, C.; SAN ANDRES, M.; BALLESTEROS, E. 1992(a). Comportamiento farmacológico "in vitro" de la gotera reticular bovina (I). Respuesta colinérgica. Farmacología Clín. Exp., 391.

- LUCAS, J.; RODRIGUEZ, C.; DE VICENTE, L.; SAN ANDRES, M.; BALLESTEROS, E. 1992(b). Comportamiento farmacológico "in vitro" de la gotera reticular bovina (II). Respuesta adrenérgica. Farmacol. Clin. Exp., 391.
- MCDONALD, T.F.; PELZER, D.; TRAUTWEIN, N. 1984. Cat ventricular muscle treated with D-600 characteristics of calcium channel block and unblock. J. Physiol., 352, 217-241.
- MARTIN, P. und SCHAUDER, W. 1935. Lehrbuch der anatomie der Haustiere III. Band II Teil. Verlag von Schickundt un Ebner. Stuttgart. pp. 184-187.
- MARTINDALE. 1989. The Extra Pharmacopoeia. 29<sup>th</sup> Edition The Pharmaceutical Press. London. England.
- MEANS, A.R.; VAN BERKUMM, F.A.; BAGCHI, I.; LU, K.P.; RASMUSSEN, C.D. 1991. Regulatory functions of calmodulin. Pharmacol. Ther., 50, 255-270.
- MEYER, L.W.; FISCHER, E.H.; KREBS, E.K. 1964. Activation of skeletal muscle phospholyase b kinase by  $Ca_{2+}$ . Biochemistry, 3, 1033-1039.
- MICHEL, G.; SCHWARZE, E.: 1984. En: Schwarze, E.; Schröder, L. y Michel, G. Compendio de anatomía veterinaria. Vol. 6. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España.
- MIKHAIL, M.; BRUGERE, H.; LE BARS, H.; COLVIN, H. 1988. Stimulated esophageal groove closure in adult goats. Am. J. Vet. Res., 49, 1713-1715.

- MILANOV, M.P.; STOYANOV, I.N.; BOEV, K.K. 1984. Electro-mechanical coupling in the complex stomach smooth muscle. Gen. Pharmac., 15, 99-105.
- MOREL, N. and GODFRAIND, T. 1984. Sodium-calcium exchange in smooth muscle microsomal fractions. Biochem. J., 218, 421-427.
- MORGAN, J.P.; MORGAN, K.G. 1984. Alteration of cytoplasmic ionized calcium levels. J. Physiol., 357, 539-551.
- MURILLO, P. 1981. Fisiofarmacología del pilar de rumen en ovino. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- MUTOH, K.; WAKURI, H. 1988. Light and electron microscopy on the glands observed in the reticular groove of the sheep. Jpn. J. Vet. Sci., 50 (1), 159-167.
- NAYLER, W.G. 1980. Calcium antagonists. Eur. Heart J., 1, 225-237.
- NAYLER, W.G.; POOLE WILSON, P. 1981. Calcium antagonists definition and mode of action. Basic. Res. Cardiol., 76, 1-15.
- NEWHOOK, J.C. and TITCHEN, D.A. 1974. Effects of vagotomy, atropine hexametonium and adrenaline on the destination in the stomach of liquids sucked by milk fed lambs and calves. Journal of Physiology, 237, 243-258.
- NEWHOOK, J.C. and TITCHEN, D.A. 1976. Cineradiography of the reticular groove reflex in sheep by clenidine. J. Vet. Med., A-38, 265-270.

- NICHOLLS, D.G. 1986. Intracellular calcium homeostasis. Br. Med. Bull., 42, 353-358.
- NICHOLSON, T. and BELKHIRI, M. 1991. The inhibition of the Reticular Groove Reflex in Sheep by Clonidine. J. Vet. Med., A-38, 263-270.
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. 1981. The anatomy of the domestic animals Vol III "The circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestic animals. Ed. Verlag. Paul Parey. Berlin-Hamburg.
- NOMINA ANATOMICA VETERINARIA. 3<sup>a</sup> Ed. (1983). Together with Nomina Histologica, 2<sup>nd</sup> ed. 1983, published by intern. Comm. Vet. Anat. Nomencl. World Association of Veterinary Anatomists, Ithaca, N.Y.
- NOUAILHETAS, V.; LODGE, N.; TWORT, C.; VAN BREEMEN, C. 1988. The intracellular calcium stores in the rabbit trachealis. Br. J. Pharmacol., 157, 165-172.
- NOWYCKY, M.; FOX, A.P. and TSIEN, R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature. 316, 440-443.
- OHASHI, M.; TAKAYANAGI, I.; SEKINE, A.; OKOMURA, K.; HEITARDA, I. 1983. The actions of sodium nitroprusside and diltiazem on calcium, potassium and histamine-induced contractile responses in isolated rabbit basilar artery, aorta, taenia coli and tracheal smooth muscle. J. Pharm. Dyn., 6, 487-495.

- OHYO, Y.; KITAMURA, K. and KURIYAMA, H. 1988. Regulation of calcium current by intracellular calcium in smooth muscle cells of rabbit portal veni. Cir. Res., 62, 375-383.
- OOMS, L.A.A.; DEGRYSE, A.; WEYNS, S.; RUCKEBUSCH, Y. 1987. Drug induce effects on reticular groove reflex, erupation and rumination. En: Physiological and pharmacological aspects of the reticulo-rumen. Ed. Martinus, Nijhoff Publishers.
- ORSKOV, E.R. and BENZIE, D. 1969a. Using the oesophageal groove reflex in ruminants as a means of by passing rumen fermentation with high-quality protein and other nutrients. Proc. Nutr. Soc., 28 (30A).
- ORSKOV, E.R. and BENZIE, D. 1969b. Studies on the esophageal groove reflex in sheep and on the potential use of the groove to prevent the fermentation of food in the rumen. Brit. J. Nutr., 23, 420-425.
- ORSKOV, E.R.; BENZIG, D. and KAY, R.N.B. 1970. The effects of feeding procedure on closure of the esophageal groove in young sheep. Brit. J. Nutr., 24, 785-795.
- ORSKOV, E.R. 1988. Fisiología del estómago de los rumiantes. En: Nutrición proteica de los rumiantes. Ed. Acribia S.A. pp. 8-18. Zaragoza.
- OSMAN, A.H.K. and BERG, R. 1982. The histogenesis of the tunica mucosa of the estomach of the eqyphian water buffalo *Bos bubalis* 3. Histogenesis of the mucosa of the ventricular sulcus oesophageal groove. Anat. Anz., 151 (4), 375-379.

- PANCHAMUKHI, G.G.; MUDHOLKAR, D.R.; SRIVASTAVA, H.C. 1975. Pre-natal development of the buffalo (*Bubalus bubalis*) stomach part 1. Organogenesis of the stomach. Indian J. Anim. Sci., 45 (9), 638-647.
- PANCHAMUKHI, B.G.; SRIVASTAVA, H.C. 1975. Histogenesis of the rumen of the buffalo (*Bubalus bubalis*) stomach. J. Vet. Med. (C), 8, 97-105.
- PANCHAMUKHI, B.G.; MUDHOLKAR, D.R.; SRIVASTAVA, H.C. 1977. Pre-natal development of the buffalo (*Bubalus bubalis*) stomach (III). Early histogenesis. Indian J. Anim. Sci., 48 (6), 473-476.
- PANCHAMUKHI, B.G.; MUDHOLKAR, D.R. 1978. A note on cornification in the prenatal for stomachs of the buffalo (*Bubalus bubalis*). Indian J. Anim. Sci., 48 (6), 473-476.
- PANCHAMUKHI, B.G.; SRIVASTAVA, H.C. 1982. Histogenesis of the reticular groove of the buffalo (*Bubalus bubalis*) stomach. Am. J. Vet. Res., 43 (2), 346-349.
- PELAGALLI, G.V.; LANGELLA, M.; BUDETTA, G.; PAINO, G. 1974. Morpho structural features of the innervation of the oesophageal groove. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 50 (23-24), 2049-2052.
- PELAGALLI, G.V.; LANGELLA, M.; BUDETTA, G. PAINO, G. 1975. Sulla innervazione delle docia esofagea nei grossi ruminanti. Atti. Soc. Ita. Sci. Vet., 28, 428-430.

- PERNKOPH, E. 1931. Die entwicklung des verderdarmes insbesondere des magens der wiederkäuer. Eine vergleichend-embriologische studie. Zschr. Anat., 94, 462-490.
- PHILLIPSON, A.T. 1946. The physiology of digestion in the ruminant. Vet. Rec., 58, 81.
- PLAZA, M.A., DE PEDRO, M.J., ARRUEBO, M.P.; MURILLO, M.D. 1992. Papel del calcio sobre la actividad espontánea del duodeno de oveja. XXV Congreso Nacional de ls S.E.C.F. Córdoba 13-17 de Septiembre 1992.
- RAEBURN, D. 1987. Calcium entry blockin drugs: their classification and sites of action in smooth muscle cells. Med. Biol., 65, 175-180.
- RASMUSSEN, H. 1986. The calcium messeger system. New Engl. J. Med., 314, 1094-1101.
- RITCHIE, J.M.; COHEN, P.J. 1975. Cocaine, procaine and other sinthetic local anethesis. En Goodman L.S. and Gilman A. "The pharmacological basis of therapeutics" (5ª Ed). McMillan Publishing Co. Inc. New York.
- ROSENBERGER, L.B.; TICKU, M.K.; TRIGGLE, D.E. 1979. The effects of Ca<sup>2+</sup> antagonists on mechanical responses and Ca<sup>2+</sup> movements in guinea pig longitudinal ileal smooth muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol., 57, 333-347.
- RUBIN, R.P. 1982. Calcium on cellular secretion. Ed. Plenum Press. New York.



- RUCKEBUSCH, Y. and KAY, R.N.B. 1971. Sur le réflexe de fermentation de la gouttière oesophagienne. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 11, 281-282.
- RUCKEBUSCH, Y. 1983. Pharmacology of reticulo-ruminal motor function. J. Vet. Pharmacol. Therap., 6, 245-272.
- SAIDA, K. 1981.  $Ca^{2+}$  and depolarization-induced  $Ca^{2+}$  release in skinned smooth muscle fibers. Biochem. Res., 453-455.
- SAIDA, K. 1982. Intracellular  $Ca^{2+}$  release in skinned smooth muscle. J. Gen. Physiol., 191-202.
- SAIDA, K. and VAN BREEMEN, C. 1984. Characteristics of the norepinephrine sensitive  $Ca^{2+}$  store in vascular smooth muscle. Blood vessels, 21, 43-52.
- SANGUINETTI, M.C.; KASS, R.S. 1984a. Voltage-dependent block of calcium channel current in the cell cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. Cir. Res., 55, 336-348.
- SARMIENTO, J.G.; JANIS, R.A.; LINCOLN, T.M. 1981. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates calcium uptake by smooth muscle microsomes. Fed. Proc., 40, 551.
- SAVINEAU, J.P. 1988. Caffeine does not contract skinned uterine fibers with a functional  $Ca^{2+}$  store. European J. Pharmacol., 149, 187-190.
- SCHATZMANN, H.J. 1982. The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. In: Membrane transport of calcium. E. Canfori (Ed.), Academic Press, New York.

- SCHOLZ, H.; MIKHAIL, M. 1987. Untersuchungen zur Nutzung der Schwindrinnenkontraktion in der Behandlung innerer Erkrankungen der erwachsenen Rinde 1. Mitteilung: Auslösbarkeit der Schwindrinnenkontraktion durch intravenöse Verabreichung Vasopressin. Tierärztl. Umschau, 42, 280-287.
- SCHENK-BABER, B.; SCHNORR, B.; WEYRAUCH, K.D. 1985. Afferent nerve endings in the forestomach mucous membrane of the sheep and goat. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. (Leipz.), 99 (5), 773-784.
- SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. 1983c. Activation of calcium channels by novel 1-4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics smooth muscle stimulants. Arzneim. Forsch., 332, 1268-1272.
- SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. 1983b. Novel dihydropyridines with putative inotropic action through activation of Ca<sup>2+</sup> channels. Nature, 303, 535-537.
- SEREN, E. 1975. Enfermedades de los estómagos de los bóvidos. T. 1. Ed. Acribia. Zaragoza.
- SHEU, S-S. and BLAUSTEIN, M.P. 1986. Sodium/calcium exchange and the regulation of cell calcium and contractility in cardiac muscle, with a note about vascular smooth muscle. In: the heart and cardiovascular system. H.A. Fozzard, E. Haber, R.B. Jennings, A.M. Katz and H.E. Morgan (Eds.), Raven Press, New York.

- SHOENBERGZ, C.F.; HASELGROVE, J.C. 1974. Filaments and ribbons in vertebrate smooth muscle. Nature, 249, 152-154.
- SIEGMAN, M.J.; BUTLER, T.M.; MOOERS, S.U.; DAVIES, R.E. 1976. Calcium-dependent resistance to stretch and stress relaxation in testing smooth muscle. Am. J. Physiol., 231, 1501-1508.
- SISSON, S. and GROSSMAN, J.D. 1953. The anatomy of the domestic animal. 4<sup>a</sup> ed. W.B. Saunders. Philadelphia. pp. 447-484.
- SISSON, S. and GROSSMAN, J.D. 1982. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 5<sup>a</sup> ed. Ed. Salvat. Barcelona.
- SKARBY, T.; ANDERSSON, K.E. 1984. Contraction mediating  $\alpha$ -adrenoreceptors in isolated human omental, temporal and pial arteries. J. Auton. Pharmacol., 4, 219-229.
- SMALL, J.V. 1974. Contractile units in vertebrate smooth muscle cells. Nature, 249, 324-327.
- SOMLYO, A.P.; DEVINE, C.E.; SOMLYO, A.V.; RICE, R.V. 1971. Sarcoplasmic reticulum and temperature-dependant contraction of smooth muscle in calcium-free solution. J. Cell. Biol., 51, 722-741.
- SOMLYO, A.P.; DEVINE, C.E.; SOMLYO, A.V.; RICE, R.V. 1973. Filament organization in vertebrate smooth muscle. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Biol., 265, 223-229.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; SHUMAN, H; ENDO, M. 1982. Calcium and monovalent ions in smooth muscle. Fed. Proc., 41, 2883-2890.

- SOMLYO, A.P.; BOND, M. and SOMLYO, A.V. 1985. Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly in vivo. Nature, 314, 622-625.
- SOMLYO, A.P.; BRODERICK, R. and SOMLYO, A.V. 1986. Calcium and sodium in vascular smooth muscle. Ann. N.Y. Acad. Sci., 488, 228-239.
- SPEEDING, M. 1982. Assesment of  $Ca^{2+}$ -antagonistic effect of drugs in  $K^+$  depolarized smooth muscle. Differentiation of antagonistic subgroups. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 318, 234-240.
- STENMAN, S.; VAHERI, I. 1978. Distribution of a mayor connective tissue protein, fibronectin in normal human tissues. J. Exp. Med., 147, 1054-1064.
- STEWART, A.A.; INGERBRITSEN, T.S. and COHEN, P. 1983. The protein phosphatases involved in a celular regulation 5. Purification and properties of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein phosphatase (2B) from rabbit skeletal muscle. Euro. J. Biochem., 132, 289-295.
- STINSON, A.L.W. and CALHOUN, M.L. 1976. In: Testbook of veterinary histology. Dellman, H.D. and Brown, E.M. Digestive Sistem. 1976. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 237-242.
- SULLIVAN, L.J.; BRIGGS, A.H. 1968. Effects of manganese on the reponse of aortic strips to angiotensin and norepinephrine contractions. J. Pharmacol. Exp. Ther., 161, 205-209.

- SUZUKI, H. 1981. Effects of endogenous and exogenous noradrenaline on smooth muscle of guinea-pig mesenteric vein. J. Physiol., 321, 495-512.
- SYBERTZ, E.J.; DESDERIO, D.M.; TETZLOFF, G.; CHIV, P.J.S. 1986. Phorbol dibutyrate contractions in rabbit aorta: calcium dependence and sensitivity to nitrovasodilators and BR-cyclic GMP. J. Pharmacol. Exp. Ther., 239, 78-83.
- TAMARGO, J.; VALENZUELA, C. 1987. Fármacos antiarrítmicos. En: Farmacología y su proyección a la clínica. 15ª Ed. Ed. Oteo. Madrid. España. Pp. 465-480.
- TAMARGO, J. y DELPON, E. 1992. Antagonistas del calcio. En: Florez, J., Arruebo, J.A. y Mediaville, A. Farmacología humana (2ª Ed). Cap. 39. Ed. Masson-Salvat. Barcelona.
- TANEIKE, T; OHGA, A. 1975. Intrinsic innervation of isolated smooth muscle of ruminant forestomach. Jap. J. Vet. Sci., 37, 301-311.
- WAYLOR, E.W. 1980. Mechanisms of actomyosin ATPase and the problem of muscle contraction. CRC Crit. Rev. Biochem., 6, 103-164.
- TOWART, R.; SCHRAMM, M. 1984. Recent advances in the pharmacology of the calcium channels. Trends Pharmacol. Sci., 5, 111-113.
- TRIGGLE, D.J.; JANIS, R.A. 1987. Calcium channel ligands. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 27, 347-369.
- TSIEN, R.W.; ELLINOR, P.T.; HORNE, W.A. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. Trend in Pharmacol. Sci., 12, 349-355.

- VAL ARANDILLA. 1991. Dihidropiridinas. Efecto en ileon de cobaya y sistema nervioso central de rata. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Madrid.
- VAN BREEMEN, C.; FARINAS, B.R.; GERABA, P.; McNAUGHTON, E.D. 1972. Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx. Cir. Res., 30, 44-54.
- VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P. and LOUTZENHISER, R. 1979. Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. Pharmacol. rew., 30, 167-208.
- VAN BREEMEN, C.; HWANG, O.; MEISHERI, K. 1981. The mechanism of inhibition action of diltiazem on vascular smooth muscle contractibility. J. Pharmacol. Exp. Ther., 218, 459-463.
- VAN BREEMEN, C.; CAUVIN, C.; JOHNS, A.; LIEJTEN, P.; YAMAMOTO, H. 1986a. Ca<sup>2+</sup> regulation of vascular smooth muscle. Fed. Proc., 45, 2746-2751.
- VAN BREEMEN, C.; LIEJTEN, P.; YAMAMOTO, M.; AARONSON, P.; CAUVIN, C. 1986b. Calcium activation of vascular smooth muscle. Hypertension, 8, II89-II95.
- VAN BREEMEN, C.; CAUVIN, G., YAMAMOTO, H.; ZSCHAUER, A. 1987. Vascular smooth muscle calcium channels. J. Cardiovasc. Pharmacol., 10, S-10-S-15.
- VAN HOUTTE, P.M.; VERBEUREN, T.J. 1976. Inhibition by acetylcholine of the norepinephrine release evoked by potassium in canine in saphenales veins.

- VAN HOUTTE, P.M. 1987. The expert committee of the World Health Organization on classification of calcium antagonists: the niewpoint of the rapporteur. Am. J. Cardiol., 59, 3A-8A.
- VAN HOUTTE, P.M.; BOHR, D.F. 1981. Calcium entry blockers and the cardiovascular system. Fed. Prod., 40, 2.581.
- VAN MIERT, A.S.; HUISSMAN, E.A. 1968. Adrenergic receptors in the wall of sheep. J. Pharm. Pharmac., 20, 495-496.
- VAN ZWIETEN, . 1985. Calcium antagonistic-terminology classification and composition. Arzneim. Forsch. Drug. Res., 35, 298-301.
- VERBIST, J.; DROOGMANS, G.; WUYTALD, F.; CASTEELS, R. 1986. Ca<sup>2+</sup> distribution and its regulation in smooth muscle cells. In: Central and peripheral Mechanisms of Cardiovascular regulation. A. Magro; W. Oswald; D. Reis; P. Vanhoutte (Eds.). Plenum Press, New York.
- VIBERT, P.J.; HASELGROVE, J.C.; LOWY, J.; POULSEN, F.R. 1982. Structural changes in actin-containing filaments of muscle. J. Mol. Biol., 71, 757-767.
- VIVO, J.M.; ROBINA, A. 1990. El desarrollo del estómago del vacuno: Análisis desde el prisma morfológico y morfométrico. Parte I: Observaciones morfogénicas asociadas al bloque ruminoreticular. Anat. Histol. Embryol., 19, 208-221.
- VIVO, J.M.; ROBINA, A. 1991. El desarrollo del estómago del vacuno: Análisis desde el prisma morfológico y morfométrico. Parte II: Observaciones morfogénicas

- asociadas al bloque omaso-abomásico. Anat. Histol. Embryol., 20, 10-17.
- VIVO, J.M.; ROBINA, A. 1991. El desarrollo del estómago del vacuno: Análisis desde el prisma morfológico y morfométrico. Parte III: Reconstrucción espacial y morfometría. Anat. Histol. Embryol., 20, 18-29.
- WAKURI, H.; MUTOH, K. 1972. The fine structure of the cattle oesophageal gland with special reference to the myoepithelial cells. Kitasato Arch. Exp. Med., 45, 45-50.
- WAKURI, H. 1980. The organo-histology of the domestics animals. Lecture out line and Laboratory Guide, 2<sup>nd</sup> ed. Gakuosha, Tokyo. pp. 31-38.
- WALSH, M.P.; DABROWSKA, R.; HINKINS, S. and HARTSHORNE, D.J. 1982a. Calcium independant myosine light chain kinase of smooth muscle. Preparation by limited chymotryptic digestion of the calcium ion dependent enzyme, purification and caracterizacion. Biochemistry, 21, 1919-1925.
- WARDROP, J.D. 1961. Some preliminary observations on the histological development of the forestomachs of the lamb (1): Histological changes due to age in the period from 46 day of the foetal life to 77 days of postnatal life. J. Agri. Sci., 57, 335-341.
- WARNER, E.D. 1958. The organogenesis and early histogenesis of the bovine stomach. Am. J. Anat., 102, 33-63.



- WATKINS, R.W.; DAVIDSON, W.F. 1980. Comparative effects on nitroprusside and nitroglycerin actions on phasic and tonic components of arterial smooth muscle contraction. Eur. J. Pharmacol., 62, 191-200.
- WATSON, R.H. 1944. Studies on deglutition in sheep (I). Observation on the course taken by liquids through the stomach of the sheep at various ages from birth to maturity. Bull. Council Sci. Ind. Res. Austr., 180, 1-94.
- WATSON, R.H. and JARRET, I.G. 1944. Studies on deglutition in sheep (II). Observations on the influence of the cooper salts on the course taken by liquids into the stomach of the sheep. Bull. Counc. Sci. Ind. Austr., 180, 95-126.
- WATSON, S.; ABBOTT, A. 1992. Ca<sup>2+</sup> channels. Trends in Pharmacological Sciences, Suppl. 331.
- WESTER, J. 1930. The rumination reflex in the ox. Vet. J. (London), 36, 401-410.
- WHEELER, E.; WEISS, G. 1979. Correlation between response to norepinephrine and removal of <sup>45</sup>Ca from high-affinity binding sites by extracellular EDTA in rabbit aortic smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Therap., 211, 2, 353-359.
- WIBO, M.; MOREL, N.; GODFRAIND, T. 1981. Differentiation of Ca<sup>2+</sup> pump linked to plasma membrane and endoplasmic reticulum in the microsomal fraction from intestinal smooth muscle. Biochem. Biophys. Acta, 649, 651-660.

WUYTACK, F.; RAYEMAEEKERS, L.; DE SCHUTTER, G. and CASTEELS, R. 1982. Demonstration of the phosphorylated intermediates of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in a microsomal fraction and in a ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) ATPase purified from smooth muscle by means of calmodulin affinity chromatography. Biochem. Biophys. Acta, 693, 45-52.

YAMAMOTO, H. and VAN BREEMEN, C. 1985. Inositol, 1-4-5-triphosphate releases calcium from skinned cultured smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 270-274.

ZERNING, G. 1991. Clinical future for  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists looks more promising. Tips, 12, 439-442.