

# Artículos originales

## Acción del verapamil sobre los canales cálcicos en el músculo liso vascular

JUAN CARLOS FASCIOLO

Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Dirección para separatas: Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, (5500) Mendoza, Argentina.

*Se estudió el mecanismo de inhibición de los efectos vasoconstrictores de diversas sustancias, por un antagonista del Ca, el verapamil. Se empleó el circuito de la arteria mesentérica anterior de la rata, perfundido con una solución de Tyrode, mediante una bomba de caudal constante. La presión de perfusión fue registrada con un strain-gauge. Las sustancias disueltas en la solución de Tyrode fueron inyectadas en "bolo" en un volumen de 50 µl en la cánula insertada en la arteria: ClK, 1 M; Cl<sup>2</sup>Ca, 1 M; noradrenalina (NA) 10 µg/ml; adrenalina (AD) 3 µg/ml; serotonina (ST) 40 µg/ml y vasopresina (VP) 4 U/ml. Cuando la solución de perfusión contenía Ca (2,5 mEq/l) todas las soluciones mencionadas produjeron vasoconstricción; el Cl<sup>2</sup>Ca mostró débil efecto. Mientras se infundía una solución de Tyrode conteniendo verapamil (10<sup>-5</sup> M) el efecto vasoconstrictor de las soluciones fue abolido y el del Cl<sup>2</sup>Ca reducido. Cuando el Ca estaba ausente, el ClK careció de efecto, y el de las demás sustancias se redujo. El verapamil también abolió todas las respuestas y redujo la del Ca. El agregado de 50 mEq de K al líquido de perfusión, conteniendo o no Ca, potencia el efecto vasoconstrictor de la NA, AD, ST y VP. El Cl<sup>2</sup>Ca aumenta considerablemente su respuesta. El verapamil fue capaz de suprimir los efectos vasoconstrictores, persistiendo una leve respuesta al Ca. Los resultados son consistentes con las siguientes interpretaciones: cuando la membrana de la célula muscular está polarizada (perfusión con Tyrode normal) el Ca puede ingresar al sarcoplasma, "pasivamente", a través del elevado gradiente electroquímico. Cuando se depolariza (50 mEq de K, con o sin Ca) el considerable ingreso del Ca se realiza a través de canales cálcicos accionados por los potenciales de membrana. Estos son muy efectivamente bloqueados por el verapamil. La inhibición del efecto de la NA, AD, ST y VP por el verapamil no resulta del bloqueo de estos canales cálcicos. Bloquea canales cálcicos acciona-*

*dos por los agonistas que permiten el ingreso al sarcoplasma del Ca fijado a la membrana celular. El efecto potenciador de las soluciones biperpotásicas (50 mEq/l) no es debido al ingreso del Ca extracelular y está relacionado con la depolarización celular.*

Fleckenstein y colaboradores<sup>1</sup> denominaron antagonistas del calcio a un grupo de sustancias capaces de inhibir el acoplamiento excitación-contracción en el miocardio de mamíferos. Estas sustancias suprimen en forma selectiva los potenciales lentos, debidos al ingreso transmembranal de Ca, sin afectar sensiblemente los potenciales rápidos, consecutivos al ingreso de sodio.<sup>2</sup>

El músculo liso vascular y en especial el de las arterias coronarias es muy sensible a la acción de los antagonistas del calcio, como fue demostrado por Goodfraind y Kaba<sup>3</sup> en 1969 y por Grein y Fleckenstein<sup>4</sup> en 1972.

Se cree que los antagonistas del calcio (verapamil, D600, diltiazem, nifedipina, etc.) bloquean canales que permiten el ingreso transmembranal de calcio al sarcoplasma.

El calcio puede ingresar al citoplasma a través de tres vías:<sup>5</sup> a) canales cálcicos que son accionados por potenciales de membrana y que se abren cuando la célula muscular lisa se depolariza. De acuerdo con nuestros resultados, estos canales permiten el ingreso de calcio del compartimiento extracelular. b) Canales cálcicos que son accionados por los receptores y se abren cuando el agonista se fija al receptor. Estos canales parecen facilitar el ingreso al citoplasma de Ca fijado a la membrana celular. d) Difusión transmembranal a favor del importante gradiente electroquímico entre el calcio extra e intracelular.

En este trabajo hemos estudiado el efecto de un antagonista del calcio, el verapamil, sobre las tres

vías de ingreso del calcio a la célula del músculo liso vascular.

## MATERIAL Y METODOS

Se empleó el circuito vascular de la arteria mesentérica de la rata perfundida con solución de Tyrode mediante una bomba de caudal constante.<sup>6</sup> La presión de perfusión, mantenida alrededor de 15 mmHg, fue registrada mediante un *strain gauge* y un registrador electrónico. Como el caudal se mantuvo constante, los cambios en la presión de perfusión obedecieron a modificaciones de la resistencia vascular. Las sustancias empleadas fueron disueltas en la solución de Tyrode e inyectadas "en bolo" en la cánula insertada en la arteria, en un volumen de 50  $\mu$ l. Las soluciones empleadas fueron: CLK 1 M;  $\text{Cl}^2\text{Ca}$ , 1 M; noradrenalina (NA) 10  $\mu$ g/ml; adrenalina (AD), 3  $\mu$ g/ml; serotonina (ST), 40  $\mu$ g/ml y vasopresina (VP) arginina 4 unidades/ml. La composición del líquido de perfusión, Tyrode modificado, fue (en mEq/l)  $\text{Na}^+$  134;  $\text{K}^+$  5;  $\text{Ca}^{++}$  2,2;  $\text{Cl}^-$  137;  $\text{HPO}_4$  4,2; glucosa 5,5 mM. La osmolaridad fue 285 mOsm/l y el pH 7,45. La solución de Tyrode hiperpotásica se preparó reemplazando 50 mEq de  $\text{ClNa}$  por CLK.

Las soluciones fueron perfundidas a 38°C mediante el auxilio de un baño termostático circulante.

## RESULTADOS

Antes de comenzar los experimentos se esperó un par de horas, después de la canulación de la arteria, para permitir la estabilización del preparado.

### *Perfusión con Ringer con calcio*

En 7 experimentos se inyectaron los agonistas, mientras el preparado era perfundido con una solución de Tyrode con contenido normal de calcio (Fig. 1). Las sustancias fueron inyectadas dos veces promediándose el ascenso de la presión de perfusión observado en ambas ocasiones. A continuación se perfundió, con el mismo caudal, una solución de Tyrode que contenía verapamil (isoptino)  $10^{-5}$  M y 20 minutos más tarde se repitió la inyección de las sustancias con efecto vasoconstrictor. En seguida se reinstaló la perfusión con solución de Tyrode durante 60 minutos, para observar la recuperación del efecto vasoconstrictor.

La Fig. 1 muestra que los efectos vasoconstrictores del CLK y de la serotonina (ST) fueron totalmente anulados por el verapamil, mientras que los de la noradrenalina (NA) y adrenalina (AD) fueron fuertemente reducidos. En cambio, la vasoconstricción producida por la vasopresina (VP) y por la solución de  $\text{Cl}^2\text{Ca}$  1 M fue poco afectada. La recu-

peración del efecto vasoconstrictor después de perfundir con Tyrode normal durante 60 minutos fue prácticamente nula para el CLK y la serotonina, pero importante para la NA y la AD.

### *Perfusión con una solución desprovista de calcio*

En experimentos anteriores pudimos comprobar<sup>7</sup> que el efecto vascular del CLK depende exclusivamente de la concentración de calcio en el líquido extracelular y que son suficientes 10 minutos de perfusión con una solución sin calcio para agotar el calcio extracelular y anular el efecto vasoconstrictor del  $\text{K}^+$ .

En esta serie de experimentos se perfundió en primer término y durante 30 minutos una solución sin calcio, y a continuación se observó el efecto producido por las sustancias inyectadas sobre la presión de perfusión. El hecho de que el CLK careciera de acción aseguraba la completa depleción del calcio extracelular. En seguida se perfundió durante 20 minutos la solución sin calcio que contenía verapamil, e inmediatamente se inyectaron los diferentes agonistas. La Fig. 2 muestra que el efecto de todos fue abolido y que no se observó recuperación alguna después de perfundir durante 60 minutos con solución de Tyrode sin calcio. En cambio, la recuperación fue completa cuando la preparación fue perfundida con una solución que contenía calcio.

### *Perfusión con una solución hiperpotásica*

El agregado de 50 mEq de CLK a las soluciones de Tyrode, con o sin calcio, que perfunden el preparado vascular, produce una potenciación de los efectos vasoconstrictores de los agonistas. El efecto es rápidamente revertido cuando se reinstala la perfusión con K normal. El mayor efecto de la solución hiperpotásica es sobre la vasoconstricción consecutiva a la inyección de la solución de 1 M de  $\text{Cl}^2\text{Ca}$ , que se incrementa muchas veces (Fig. 3). El agregado de verapamil a la solución de Tyrode hiperpotásica anula totalmente la potenciación del efecto del  $\text{Cl}^2\text{Ca}$ , obteniéndose respuestas similares a las observadas durante la perfusión con K normal (5 mEq/l).

## DISCUSION

En nuestros experimentos, el verapamil fue capaz de inhibir la vasoconstricción inducida por las sustancias ensayadas sin afectar mayormente la vasoconstricción dependiente de la inyección de  $\text{Cl}^2\text{Ca}$  1 M.

La vasoconstricción fásica producida por la solución de 1 M de CLK es debida al efecto depolari-

**VERAPAMIL Y EFECTO VASOCONSTRICTOR - CON  
Ca EXTRACELULAR -**

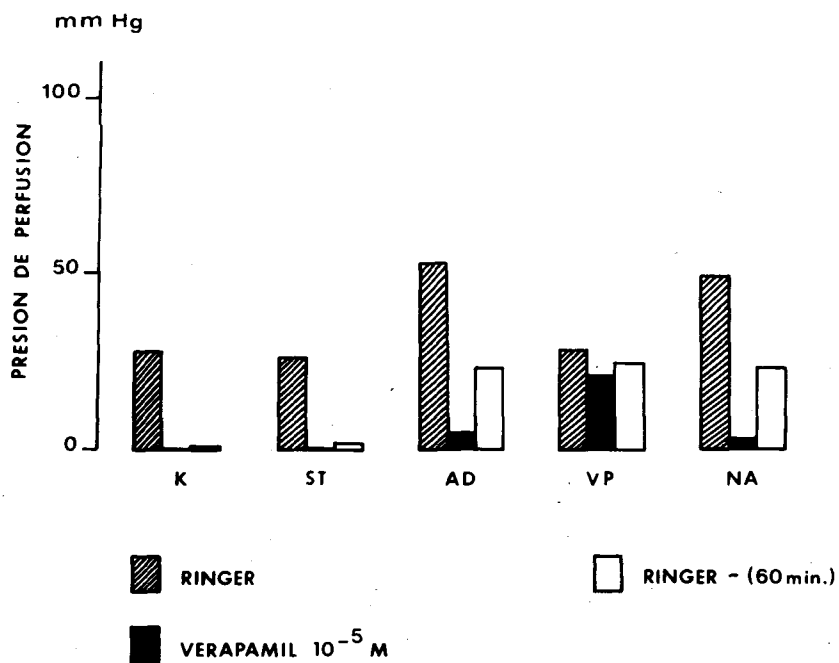


Fig. 1. Efecto del verapamil ( $10^{-5}$  M) sobre la vasoconstricción inducida por diversas sustancias: K, ClK 1 M; ST serotonina; AD, adrenalina; VP, vasopresina; NA, noradrenalina; Ca, Cl<sup>2</sup>Ca 1 M. La ordenada representa el ascenso de la presión de perfusión. La primera columna, el efecto cuando la preparación es perfundida con Tyrode con calcio. La segunda, con el agregado de verapamil durante 30 minutos. La tercera columna, 60 minutos después de perfundir la solución de Tyrode sin verapamil.

**VERAPAMIL Y EFECTO VASOCONSTRICTOR - SIN Ca  
EXTRACELULAR -**

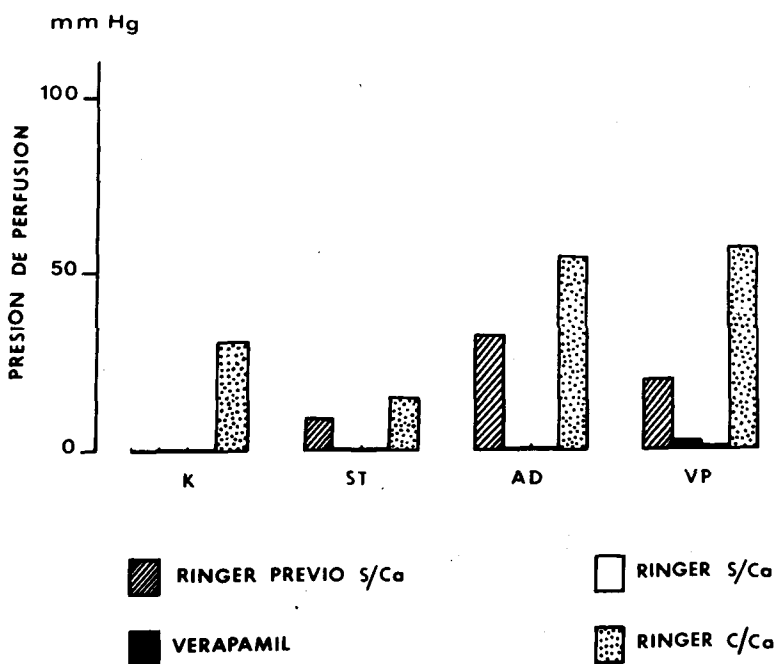


Fig. 2. Efecto del verapamil sobre la vasoconstricción inducida por diversas sustancias. El K no tiene efecto alguno cuando el preparado vascular es perfundido con una solución desprovista de calcio. El verapamil suprimió totalmente el efecto vasoconstrictor de los agonistas, que no se recuperó cuando se perfundió Tyrode sin calcio y sin verapamil durante 60 minutos. El efecto se recuperó rápidamente cuando se perfundió una solución conteniendo calcio.

zante de la misma, que produce la apertura de canales cálcicos accionados por voltaje, permitiendo así el ingreso de calcio extracelular, lo que aumenta la concentración del calcio sarcoplásmico, y pone en marcha el mecanismo contráctil. Cuando el líquido extracelular está desprovisto de calcio, la solución de ClK carece de toda acción vasoconstrictora.

La perfusión del preparado vascular con una solución de ClK 50 m M potencia considerablemente el efecto vasoconstrictor del  $Cl^2Ca$ , porque la depolarización mantiene abiertos los canales cálcicos, que permiten el ingreso al citoplasma de una cantidad de calcio mucho mayor.

El hecho de que el verapamil anule totalmente el efecto potenciador del K sobre el Ca, significa que estos canales, aún ampliamente permeabilizados por la depolarización, son efectivamente bloqueados por la droga.

En cambio, el verapamil no anuló el efecto vasoconstrictor, si bien modesto, de la solución de

$Cl^2Ca$ , cuando el preparado fue perfundido con solución de Tyrode normal y la célula del músculo liso se encontraba presumiblemente polarizada. Esto podría obedecer al hecho de que, cuando los canales cálcicos se encontraban cerrados, el calcio penetró al sarcoplasma por difusión a través de la membrana celular, a favor del importante gradiente electroquímico entre el calcio extra e intracelular. Esta difusión, naturalmente, no es afectada por el verapamil.

El efecto vasoconstrictor de la NA, AD, ST y VP es reducido pero no abolido cuando la concentración del calcio extracelular se aproxima a cero.<sup>7</sup> Obviamente, el efecto vasoconstrictor de estos agonistas no depende solamente de la movilización del calcio extracelular.

El verapamil, aun en ausencia de calcio extracelular, bloquea efectivamente la acción de los cuatro agonistas mencionados. Este bloqueo se ejerce a nivel de los canales cálcicos, que son accionados por los receptores y que se abren cuando éstos son

## EFECTO VASOCONSTRICCIÓN DEL $Cl^2Ca$ 1M

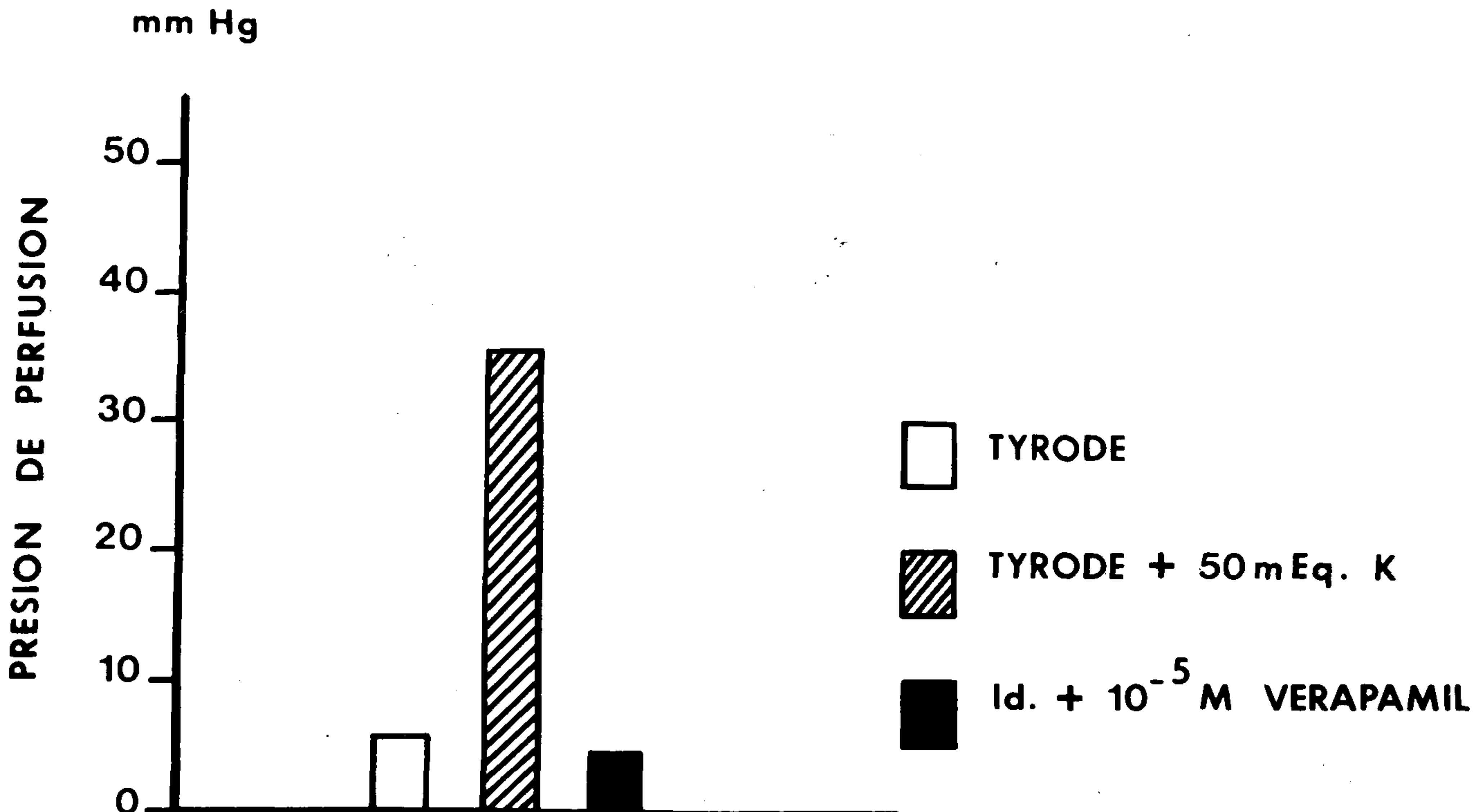


Fig. 3. Potenciación del efecto del calcio por la perfusión hiperpotásica e inhibición por el verapamil. Promedio de cinco experimentos. El agregado de 50 mEq de  $K^+$  a la solución de perfusión potenció dramáticamente el efecto de la inyección de 1 M de  $Cl^2Ca$ . El verapamil abolió totalmente la potenciación del efecto por el ClK, pero no suprimió totalmente el efecto del  $Cl^2Ca$ .



ocupados por los agonistas respectivos. Estos canales no dependen del calcio extracelular, si por calcio extracelular entendemos el *pool* cálcico del que depende el efecto del K y que comprende el calcio en solución, o ligado en forma muy laxa a la membrana celular. Probablemente depende del calcio fijado más firmemente a la membrana celular, que es llevado al interior de la célula muscular cuando el receptor es ocupado por el correspondiente agonista.

Como no existen receptores celulares para el K<sup>+</sup>, este mecanismo no puede ser responsable de la vasoconstricción potásica, que se explica, como ya fue señalado, por su efecto depolarizante sobre la membrana celular.

Creemos que la participación del calcio celular y extracelular en la vasoconstricción producida por la NA, AD, ST y VP puede ser interpretada de la siguiente manera. La fijación del agonista al receptor permite que calcio fijado a la membrana ingrese al sarcoplasma y contribuya de alguna manera a la liberación de calcio endocelular, fijado al retículo sarcoplásmico, las mitocondrias u otras organelas celulares. Los agonistas causan, además, alguna depolarización de la célula, que origina la apertura de canales que permiten el ingreso del calcio extracelular, que contribuye al aumento de la concentración del calcio sarcoplásmico y al efecto contráctil del agonista. El verapamil bloquea ambos canales cálcicos y suprime el efecto vasoconstrictor de los agonistas.

El verapamil, a la dosis empleada en estos experimentos (10<sup>-5</sup> M), no bloquea en forma similar el efecto vasoconstrictor de los agonistas empleados. La acción inhibidora más intensa fue sobre la ST, menor en el caso de la AD y NA y pequeña en el caso de la VP. Esto indicaría que las moléculas portadoras de calcio de los canales correspondientes a los diferentes agonistas presentan diferencias que podrían explicar su desigual sensibilidad frente al verapamil.

## CONCLUSIONES

El verapamil 10<sup>-5</sup> M perfundido durante 20 minutos bloqueó el efecto vasoconstrictor de K<sup>+</sup>, ST, NA, AD y VP, sobre los vasos mesentéricos de la rata.

El efecto más intenso fue sobre el K<sup>+</sup> y la ST y el menor sobre la VP. El efecto del verapamil es también intenso cuando los vasos mesentéricos son perfundidos con una solución sin calcio.

El efecto vasoconstrictor del Cl<sup>2</sup>Ca fue considerablemente potenciado por la perfusión con una solución hiperpotásica (50 mEq de K<sup>+</sup>/litro) y esta potenciación fue bloqueada por el verapamil.

El verapamil bloquea canales cálcicos accionados

por voltaje que permiten el ingreso de calcio extracelular al sarcoplasma.

También bloquea canales cálcicos accionados por los receptores, pero la entrada "pasiva" de calcio no es afectada por la droga.

## SUMMARY

*The inhibitory mechanism of a calcium antagonist, verapamil, on the vasoconstrictor effect of various substances was investigated. The vascular circuit of the anterior mesenteric artery of the rat was perfused with a modified tyrode solution with a rotary pump of constant output. The perfusion pressure was registered with a "strain gauge" and recorded electronically. The different substances were dissolved in the tyrode solution and injected "in bolus" in a 50 µl volume, in the cannula inserted in the artery. The concentration of the solution were: KCl, 1 M; Ca Cl<sup>2</sup>, 1 M; noradrenaline (NA), 10 µg/ml; adrenaline (AD), 3 µg/ml; serotonin (ST), 40 µg/ml, and vasopressin (VP) 4 units/ml. When the vascular preparation was perfused with a Ca containing tyrode solution, all the solutions induced vasoconstriction and increased the perfusion pressure. The effect of 1 M CaCl<sup>2</sup>, however, was small. After persusing the same solution but with 10<sup>-5</sup> M verapamil, the effects of KCl and serotonin were abolished, that of NA and AD drastically reduced, while the vasoconstrictor effect of VP CaCl<sup>2</sup> only slightly affected. When a calcium free tyrode solution was perfused the KCl solution was devoid of vascular effects and the vasoconstrictor responses to NA, AD, ST and VP was reduced to different levels. Verapamil 10<sup>-5</sup> M abolished the vasoconstrictor effect of the four agonists, but did not reduce substantially that of the 1 M solution of CaCl<sup>2</sup>. By adding 50 mEq of K<sup>+</sup> to the tyrode solution, the vasoconstriction induced by NA, AD, ST and VP was clearly enhanced. The vasoconstriction resulting from the injection of the 1 M solution of CaCl<sup>2</sup> was dramatically potentiated, more than five times the previous effect. Verapamil added to the hiperpotassic solution cancelled the vascular effect of the four agonists and the potentiation of the vasoconstriction induced by the CaCl<sup>2</sup>. These results are consistent with the following interpretation: When the smooth muscle cells are fully polarized, extracellular Ca can enter the sarcoplasma only diffusing through the plasma membrane, giving rise to a modest vasoconstriction, not affected by verapamil. When the cells are depolarized by a high K<sup>+</sup> solution, Ca channels, operated by changes in voltage, are opened, allowing the entrance of larger amounts of extracellular CA, thus inducing*

an important vasoconstrictor effect. This potential operated Ca channels were very effectively blocked by, verapamil. NA, AD, ST and VP retain most of their vasoconstrictor effect when the vascular preparation was perfused with a Ca free solution and the concentration of extracellular Ca approaches zero. Verapamil inhibits the vascular effects of these agonists, blocking Ca channels, operated by receptors, that allow the entrance of Ca attached to the plasma membrane, when the receptor is occupied by the agonist.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Fleckenstein A, Tritthart H, Fleckenstein B, Herbst A, Grün G: A new group of competitive Ca-antagonists (Iproveratril, D 600, Premylamine) with highly potent inhibitory effects on excitation-contraction coupling in mammalian myocardium. *Pfluegers Arch* 307: R 25, 1969.
2. Fleckenstein A: Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the production or prevention of myocardial lesions. In: Harris P, Opie L: Calcium and the Heart. Proceedings of the Meeting of European Section of the International Study Group for Research in Cardiac Metabolism, p 135. Academic Press, New York, 1970.
3. Goodfriend T, Kaba A: Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized smooth muscle. *Br J Pharmacol* 36: 549, 1969.
4. Grün G, Fleckenstein A: Die elektromechanische Entkoppelung der glatten Gefäßmuskulatur als Grundprinzip der Coronar dilatation durch 4-(2'-Nitrophenil) 2-6 dimethyl 1-4 dihidro-pyridin 3-5 dicarbonsäure dimethyl ester (Bay a 1040, Nifedipin). *Arzmeimittelforsch* 22: 334, 1972.
5. Weiss GB: Sites of action of calcium antagonists in vascular smooth muscle. Calcium antagonists, p 83. American Physiological Society, 1981.
6. Mc Gregor DD: The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response on perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol (London)* 177: 21, 1965.
7. Fasciolo JC: Ca pools in the contraction of arterial smooth muscle induced by several agonists. *Hypertension* 2: 515, 1984.



**Fasyma s.c.a.**

Instrumental Científico

**ELECTROCARDIOGRAFOS EN CUOTAS**  
marca Suzuken, fabricado en Japón

- Portátil.
- Opera conectado a la red de 220 V, con batería interna recargable, o con batería externa de 12 V.
- Dos velocidades de papel.
- Trazado firme.
- Protección contra desfibrilación.
- Garantía y service asegurados.
- Repuestos y consumibles originales.

**Bartolomé Mitre 1495 — (1037) Capital Federal**

**T. E.: 45-1999/0303**