

REGULACIÓN AGUDA DE LA MUSCULATURA LISA INTESTINAL DE ILEÓN Y COLON DE RATÓN POR POLIAMINAS

M. C. González-Montelongo^{1,3,*}, C. M. Ramírez², J. Marrero-Alonso^{1,3}, R. Marín^{2,3},
N. Fabelo^{1,3}, V. Martín^{1,3}, T. Gómez^{1,3} & M. Díaz^{1,3}

¹ Departamento de Biología Animal, Facultad de Biología

² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina

³ Instituto de Tecnologías Biomédicas (ITB)

Universidad de La Laguna. Tenerife, Islas Canarias

* mcmontel@ull.es

RESUMEN

Las poliaminas son policaciones alifáticos esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las células, estando también implicadas en multitud de mecanismos celulares en estados patológicos. Nuestros resultados demuestran que, tanto las poliaminas naturales como la poliamina sintética α -difluorometilornitina (DFMO), provocan la relajación de la actividad contráctil de la musculatura lisa longitudinal de ileon y colon de ratón. El efecto relajante de estas sustancias ocurre de manera rápida, reversible y dependiente de la dosis. Todas nuestras evidencias indican que este efecto inhibitorio es eminentemente extracelular, y tiene su origen en interacciones producidas sobre la membrana plasmática de las células musculares. Mediante análisis farmacológicos, hemos podido concluir que el efecto relajante de las poliaminas sobre el músculo ileal y colónico se debe, por un lado, al bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L, y por otro, a una modulación positiva de las conductancias a través de canales de K^+ . Finalmente, hemos encontrado que el número de cargas positivas de las poliaminas naturales guarda una clara relación estructura-función con su potencia inhibitoria.

Palabras clave: poliaminas, α -difluorometilornitina (DFMO), canales de Ca^{2+} tipo L, canales de K^+ , actividad peristáltica intestinal.

ABSTRACT

Polyamines are aliphatic polications that are essential for the normal growth and development of cells, being also involved in many cellular mechanisms responsible for different pathological states. Our results show that both, natural and synthetic polyamines provoke a dramatic inhibitory effect on mouse ileal and colonic contractile activity. The relaxing effect of these compounds occurs rapidly upon exposure to the intestinal muscle, and takes place in a reversible and dose-dependent manner. Overall, our evidences point to an extracellular effect triggered by interactions with targets at the plasma membrane of smooth muscle cells. By means of pharmacological tools, we have concluded that the relaxing effect

of polyamines are due to both, a blocking effect on L-type Ca^{2+} channels, and also a positive modulation of K^{+} conductances at the plasma membrane of intestinal muscle cells. Finally, our analyses have shown a structure-activity relationship between the number of positive charges in the polyamine molecule and its inhibitory potency.

Keywords: polyamines, α -difluoromethylornithine (DFMO), L-type Ca^{2+} channels, K^{+} channels, intestinal peristaltic activity.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas naturales, putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), son un grupo de policationes alifáticos (con 2, 3 y 4 cargas positivas a pH fisiológico) que se encuentran distribuidas ubicuamente tanto en células procariotas como eucariotas (PEGG [20]) y, dentro de estas últimas, en la gran mayoría de tejidos animales y vegetales (PEGG & MCCANN [21]). Si bien es cierto que hay muchas funciones biológicas de las poliaminas que no se han conseguido dilucidar, es mucho lo que se conoce acerca de su biología (HEBY [9]). Se han realizado multitud de investigaciones sobre su biosíntesis y degradación, y acerca de las propiedades moleculares de alguna de las enzimas que intervienen en estos procesos. Como se muestra en la Figura 1, el precursor para la biosíntesis de poliaminas en células animales es la L-ornitina, un intermediario del ciclo de la urea, derivado del aminoácido arginina, que es convertida a putrescina por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17), la primera enzima limitante en la síntesis de las poliaminas. La espermidina y la espermina son producidas posteriormente en dos reacciones consecutivas catalizadas por la enzima espermidina sintasa (SRM; EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (SMS; EC 2.5.1.22), respectivamente (PEGG & MCCANN [21]; SEILERN & DEZEURE [25]). En cada uno de estos pasos se incorpora un grupo aminopropílico (APG), proveniente de la S-adenosilmetionina descarboxilada (SAMdc), reacción catalizada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50), generándose 5'-metiltioadenosina (MTA). Si bien las reacciones llevadas a cabo por las enzimas espermidina y espermina sintasa son irreversibles, la espermina puede ser convertida a espermidina, y ésta a putrescina por la acción de dos enzimas, la espermina/espermidina N¹-acetiltransferasa (SSAT) y la poliamina oxidasa dependiente de FAD (PAO; EC 1.5.3.11) (SEILER *et al.*, [24]). La concentración de poliaminas en células animales está finamente regulada, principalmente por alteraciones en la actividad de la ODC, SAMDC y SSAT, ya que la acumulación de las poliaminas es citotóxica.

Los mecanismos por los cuales las poliaminas afectan al crecimiento celular y la proliferación no se han identificado. Se han encontrado concentraciones altas (mM) de poliaminas (mM) en tejidos con una tasa de renovación celular elevada, pero también en tejidos quiescentes (músculo o tejido neural) lo que sugiere que las poliaminas son importantes también para otros procesos que no implican crecimiento. Se ha observado que las poliaminas, en general, debido a su naturaleza policatiónica, son moléculas que potencialmente pueden interactuar con una gran variedad de dianas celulares. Uno de los primeros eventos descritos en el campo de las poliaminas son los efectos rápidos, entre los que habría que destacar la interacción con diversos canales iónicos (FICKER *et al.*, [4]; LOPATIN *et al.*, [12]) y otros receptores de membrana, afectando a la excitabilidad membranaria y los sistemas de segundos mensajeros (SCHUBER [22]). La naturaleza catiónica de estas sustancias las hacen compartir características comunes con determinados cationes inorgánicos como el

Mg²⁺ y el Ca²⁺, aunque, se dan diferencias fundamentales con estos cationes ya que las cargas positivas en las poliaminas se encuentran distribuidas a lo largo de la cadena alifática (SCHUBER [22]; WEIGER *et al.*, [31]).

En el músculo liso uterino, las poliaminas inhiben la actividad contráctil y eléctrica (MARUTA *et al.*, [14]), y en el músculo liso intestinal se ha demostrado que el efecto relajante de las poliaminas está asociado con el descenso de la cantidad de Ca²⁺ libre intracelular (NILSSON & HELLSTRAND [18]; SEILER *et al.*, [24]). También se sabe que las poliaminas pueden interactuar con los mecanismos liberadores de Ca²⁺ intracelular en músculo liso y estriado (PALADE [19]; SWÄRD *et al.*, [27]). Además de estos mecanismos de acción, las poliaminas son capaces de incrementar la sensibilidad al Ca²⁺ en la contracción del músculo liso permeabilizado por un mecanismo que implica una mayor fosforilación de la cadena ligera de la miosina, como resultado de un efecto inhibitorio sobre la actividad miosina fosfatasa. Con respecto a esto, algunos estudios demuestran que las poliaminas inducen la sensibilización de los sistemas contráctiles al Ca²⁺ (GONZALEZ-MONTELONGO *et al.*, [8]; SWÄRD *et al.*, [27]; SWÄRD *et al.*, [28]), promoviendo un incremento del nivel de fosforilación de la cadena ligera en tejidos intactos y permeabilizados, sugiriendo que cuando los niveles de poliaminas fluctúan también se ven afectadas las propiedades del aparato contráctil muscular.

Varios estudios han demostrado que las poliaminas y sus derivados tóxicos tienen efectos sobre las corrientes de Ca²⁺ activadas por voltaje en neuronas (SCOTT *et al.*, [23]). Los mecanismos por los cuales las poliaminas interactúan con los canales de Ca²⁺ no están claros, pero se sugiere la unión directa al canal o a los sitios de regulación de éste (SCOTT *et al.*, [23]). La espermina en particular (una tetra-amina), está implicada en el bloqueo y la modulación de ciertos canales iónicos (SCOTT *et al.*, [23]; WILLIAMS [32]). La manera en la que la espermina promueve la relajación del tejido muscular liso ileal de cerdo es consecuencia del bloqueo de los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje, tanto desde el lado externo como del lado interno de la membrana plasmática (GOMEZ & HELLSTRAND [6]). Debido a que son moléculas largas y flexibles, pueden interactuar con el poro de un canal, entrar a su través, interactuar con zonas muy amplias de la proteína, y de esta forma modificar una región membranaria considerable. Sin embargo, otros autores han propuesto que el grado de hidratación de la molécula, más que su flexibilidad, sea el parámetro esencial que las convierte en bloqueantes de canales iónicos (WEIGER *et al.*, [31]). Así, la aplicación extracelular de espermina, la más flexible de las tres poliaminas, probablemente debido a la presencia de dos átomos de nitrógeno en medio de la molécula (ver figura 1), inhibe de forma reversible y dependiente de la dosis (la concentración causante del 50% de inhibición [IC₅₀] es de 1 mM) la actividad mecánica y eléctrica espontánea del músculo liso de colon de cerdo (WEIGER *et al.*, [31]), así como de la vena portal de rata en el rango milimolar (GOMEZ & HELLSTRAND [6]; NILSSON *et al.*, [17]).

El objetivo principal de este trabajo es dilucidar cuál es la naturaleza de la interacción que tienen las distintas poliaminas en la membrana plasmática del músculo liso intestinal (ileon y colon) de ratón. Nuestros resultados muestran que el efecto de la aplicación extracelular de las distintas poliaminas (en el rango mM), al igual que el inhibidor de la principal enzima biosintética implicada en la ruta (DFMO), es inhibitorio, rápido y reversible, sugiriendo que estas moléculas no necesitan entrar en el interior celular para bloquear la actividad de los canales iónicos y/o receptores de membrana involucrados en el acoplamiento excitación-contracción. Por lo tanto, los efectos de las poliaminas sobre la contracción del músculo liso intestinal son complejos y necesitan ser caracterizados tanto a nivel

de los eventos membrenarios como de las vías reguladoras intracelulares. Ya que las vías reguladoras intracelulares y de segundos mensajeros han sido parcialmente estudiadas por nuestro grupo (GONZALEZ-MONTELONGO *et al.*, [8]), en este trabajo se han abordado las interacciones que se desencadenan a nivel de la membrana plasmática sobre la musculatura lisa intestinal no permeabilizada de ileon y colon de ratón.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales utilizados

Como modelo de estudio se usaron ratones machos Swiss (CD1), con pesos que oscilaron en torno a los 30 g. Los animales se adquirieron del Servicio Estabulario de la Universidad de La Laguna. Los animales tuvieron acceso a comida y bebida *ad libitum* hasta el momento del experimento, cumpliendo en todo momento, con los requerimientos del Comité de Ética de la Universidad de La Laguna para el uso y el cuidado de los animales.

2.2. Preparación de los tejidos y soluciones

Los animales se anestesiaron con éter dietílico y se sometieron a una intervención quirúrgica con el fin de acceder hasta el tejido intestinal. Posteriormente se procedió a su sacrificio. Una vez identificados los distintos tramos intestinales usados en este estudio (ileon y colon), se extirparon longitudes máximas de 1.5 cm. A continuación se procedió a colocar los tejidos en solución salina fisiológica (PSS) fría cuya composición era: 126 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 1.44 mM Na₂PO₄, 0.56 mM NaPO₄ y 15 mM glucosa a pH 7.4. La solución PSS carente de calcio contenía la misma composición que la solución salina fisiológica pero en ausencia de CaCl₂ y suplementada con 25 µM de EGTA.

2.3. Procedimiento experimental

Con el fin de reproducir la actividad normal característica de estos tejidos, los diferentes tramos intestinales se transfirieron a baños de órganos en presencia de una solución salina libre de Ca²⁺ y a 37 °C en continuo burbujeo, y se les impuso una misma tensión basal de 0.5 g. La solución de incubación se reemplazaba cada 15 minutos, hasta que fue evidente la actividad peristáltica característica de cada tramo intestinal.

Tras el periodo de estabilización, los tejidos se sometieron a un pulso de 50 mM de KCl con el fin de alcanzar un máximo de contracción específica para cada tejido. Este máximo de contracción se determinó antes de comenzar cada experimento, con el fin de calcular el rango contráctil dinámico de cada tramo intestinal. Con posterioridad los tejidos eran lavados con PSS (al menos tres veces) antes de la aplicación de cada tratamiento.

2.4. Sistema de registro

El estudio sobre la actividad contráctil intestinal se realizó mediante el registro de la tensión isométrica desarrollada por la musculatura lisa longitudinal.

La fuerza contráctil desarrollada por cada tramo intestinal se determinó mediante un transductor de fuerza isométrico (TRI110, Letica, España), y la señal de voltaje generada se

digitalizó a una frecuencia de muestreo de 20 Hz, usando una tarjeta de adquisición A/D (LabPC+, National Instruments, Austin, TX), para ser almacenados posteriormente en el ordenador, gracias a un programa de análisis y adquisición de datos (PHYSKAN) desarrollado en nuestro laboratorio por uno de los autores (MD). Los datos fueron filtrados a un paso bajo de 5 Hz y analizados usando una serie de rutinas incluidas en el software de adquisición. Se usó de forma rutinaria el 20% del rango de actividad (20% RA) como referencia en los distintos registros mostrados a lo largo del estudio.

2.5. Contractilidad intestinal dependiente de Ca^{2+}

En estos experimentos, los tejidos fueron primeramente incubados con PSS en ausencia de Ca^{2+} , durante al menos 4 min. Cuando la señal alcanzó el estado estacionario se añadieron volúmenes pequeños de $CaCl_2$ (1 M) a la solución del baño a la concentración de calcio deseada, mientras se registraba continuamente la tensión isométrica que desarrollaba el tejido. Con el fin de obtener las curvas dosis-respuesta para el calcio en estos tejidos, se registraron las amplitudes máximas y mínimas de las contracciones a medida que se añadían concentraciones crecientes de $CaCl_2$.

2.6. Efectos de las poliaminas y el DFMO sobre la actividad contráctil

El estudio sobre la actividad espontánea se realizó en condiciones de registro continuo para los distintos tramos intestinales incubados en PSS. Tras el correspondiente periodo de estabilización, se registró la actividad espontánea durante 10 min. Estos datos de actividad fueron utilizados como control para la comparación con las actividades registradas tras la exposición a las diferentes drogas. Las distintas poliaminas (putrescina, espermidina o espermina), o el DFMO, disueltos en H_2O bidestilada, se añadieron directamente a la solución del baño mientras se registraba la actividad contráctil.

Las drogas permanecieron en la solución que bañaba el tejido durante todo el experimento. No obstante, debido al rápido efecto que promueven estas sustancias sobre la musculatura lisa intestinal, siempre fueron exposiciones cortas (pocos minutos). Cuando fue necesario estudiar la reversibilidad del efecto, se procedió al lavado con PSS (al menos 3 veces) de la solución del baño. Con el fin de registrar la actividad contráctil peristáltica típica de los distintos tramos intestinales se recuperó el tejido durante un periodo de, al menos, 10 min.

En algunos experimentos, los efectos del KCl y BAY K8644 sobre tejidos relajados con poliaminas se emplearon sobre la actividad contráctil con la adición de pequeños volúmenes de la solución stock directamente a la solución del baño.

2.7. Análisis matemático y estadístico

Las diferencias entre las medias muestrales se analizaron por análisis de varianza de una vía, ANOVA seguido del test *post hoc* de Tukey (se usó Kruskal-Wallis seguido del test *post hoc* de Games-Howell cuando fue necesario) o el test de la *t* de Student-Newman-Keuls. Los valores con $p < 0.05$ fueron considerados significativamente distintos. Los resultados están expresados como medias \pm S.E.M. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a una ecuación logística usando una herramienta de análisis de regresión lineal implementada en el software SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

2.8. Drogas

Las distintas poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), el BAY K8644 y el EGTA se adquirieron en Biosigma (España). El DFMO se obtuvo de Bachem (Cymit Química, España). Las distintas poliaminas y el DFMO fueron disueltos en H₂O bidestilada, y guardadas como soluciones madre a -20 °C hasta su uso. El BAY K8644 fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y almacenado como solución madre a -20 °C hasta su uso posterior. La concentración del solvente en el baño nunca excedió el 0.1%.

3. RESULTADOS

3.1. Actividad espontánea y contracciones inducidas por CaCl₂ en ileon y colon.

Los músculos lisos de ileon y colon presentaron tanto la actividad peristáltica espontánea como el tono basal característico de cada tramo intestinal. Además, ambas propiedades fueron enteramente dependientes de la presencia de calcio en el medio extracelular. Así, la ausencia de calcio en la solución suprimió la actividad contráctil característica y redujo el tono basal medio, causando una relajación de la musculatura lisa intestinal (Fig. 2A-B, ileon y colon, respectivamente). La actividad espontánea no se vio afectada por la adición de volúmenes máximos del vehículo DMSO (Fig. 2C-D, ileon y colon, respectivamente) o H₂O bidestilada (datos no mostrados). La adición acumulativa de Ca²⁺ a la solución del baño dio como resultado un incremento gradual de la actividad peristáltica espontánea, así como el aumento progresivo del tono basal de los tejidos (Fig. 2E-F, ileon y colon, respectivamente). Los cálculos realizados, ajustados a una función logística no-lineal, mostraron que la EC₅₀ (concentración necesaria para desarrollar la mitad de la respuesta contráctil) fue de 1.81 mM de CaCl₂ para ileon y de 1.86 mM de CaCl₂ para colon (Fig. 2E-F, ileon y colon, respectivamente; paneles inferiores).

3.2. Efectos de las poliaminas y DFMO sobre la actividad contráctil

Con el fin de explorar los efectos de las distintas poliaminas y del inhibidor competitivo de la ruta, la a-difluorometilornitina (DFMO), sobre el peristaltismo espontáneo del tejido intestinal, se procedió a la exposición de estas sustancias sobre tramos intestinales de ileon y colon. Las tres poliaminas empleadas, putrescina, espermidina y espermina, características de células animales de mamíferos, inhibieron la actividad peristáltica de ileon y colon (Fig. 3A, ileon; Fig. 3D, colon). Asimismo, el inhibidor específico de la principal enzima de la ruta de las poliaminas (ODC), el DFMO, fue capaz de inhibir también la actividad peristáltica en un 92% y 94% para ileon y colon, respectivamente (Fig. 3B, ileon; Fig. 3E, colon). El DFMO se usó a la misma concentración (5 mM) usada comúnmente para inhibir irreversiblemente la ODC tanto en extractos celulares como citosólicos (BORDALLO *et al.*, [2]; KOENIG *et al.*, [10]). Las medidas del tono basal en respuesta a las incubaciones realizadas con las tres poliaminas y el DFMO revelaron una reducción significativa que varió entre el 80% y el 92% comparada con los controles en el caso del ileon (Fig. 3C), y entre el 86% y el 98% en el caso del colon (Fig. 3F). El efecto inhibitorio observado fue rápido (~ 10-30 segundos) tras la exposición tisular a las distintas sustancias en el rango milimolar. Las concentraciones estudiadas variaron dependiendo de la naturaleza policatió-

nica de la poliamina. Por ejemplo, para el caso de la tetramina espermina (1 mM) se alcanzaron efectos inhibitorios del 87% para ileon y del 98% para colon, observando una clara inhibición para concentraciones en el rango micromolar (500 mM) (datos no mostrados). Asimismo, para la triamina espermidina la concentración necesaria para inhibir la actividad contráctil del colon en un 86% fue de 1 mM en la solución del baño, mientras que para el caso del ileon fue necesario incrementar la concentración a 3 mM con el fin de obtener una reducción del 80%. Para la diamina putrescina se usaron concentraciones finales de 10 mM con el fin de obtener reducciones del tono basal medio y de la actividad contráctil en un 90% y 94% para ileon y colon, respectivamente.

3.3. Reversibilidad del efecto de las poliaminas y el DFMO

Como se ha mostrado, las distintas poliaminas y el inhibidor DFMO fueron capaces de inhibir la actividad peristáltica espontánea tanto en ileon como en colon de ratón (panel central de la Fig. 4A-D). Se observó que tras el lavado de estas sustancias con PSS (mínimo tres veces) y un periodo adicional de recuperación de unos 10 min., los distintos tramos intestinales recuperaron una actividad peristáltica espontánea similar a los periodos control (paneles derechos de la Fig. 4A-D). Como se puede observar para la diamina putrescina (10 mM) la eliminación de la poliamina (Fig. 4A, ileon; Fig. 4C, colon) permitió recuperar la actividad contráctil sin que se observasen diferencias sustanciales ni en el peristaltismo ni en el tono basal medio del tejido. Resultados similares se obtuvieron para el resto de poliaminas, espermidina (3 mM) y espermina (1 mM) en ambos tejidos (datos no mostrados). De la misma manera el DFMO inhibió la actividad peristáltica intestinal y disminuyó el tono basal medio de ambos tejidos. Los lavados con PSS y la eliminación del inhibidor de la solución hizo, por una parte, reaparecer la actividad peristáltica espontánea (Fig. 4B, ileon; Fig. 4D, colon) y, por otra parte, recuperar el tono basal medio en ambos tejidos. Si bien es cierto que en el caso del ileon tanto la actividad peristáltica tras el lavado (previa exposición a DFMO) como del tono basal medio recuperado por el tejido fue ligeramente inferior a la de sus controles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al respecto. Por todo ello, tanto las poliaminas como el DFMO demostraron tener efectos reversibles sobre el efecto relajante producido en ileon y colon de ratón.

3.4. Efectos del KCl y BAY K8644 sobre los tejidos relajados con putrescina y DFMO

Con el fin de dilucidar el grado de interacción que mantienen las poliaminas y el DFMO con la célula muscular lisa aplicadas extracelularmente e indagar en el mecanismo subyacente a la acción relajante sobre el músculo liso de ileon y colon, se realizaron una serie de experimentos con varios agentes químicos de acción conocida sobre diversas conductancias iónicas. Varios estudios han demostrado que las poliaminas tienen la capacidad de alterar la excitabilidad membranaria por modulación directa con determinados canales iónicos, incluyendo los canales de K^+ y de Ca^{2+} (FICKER *et al.*, [4]; GOMEZ & HELLS-TRAND [6]; GOMEZ & HELLSTRAND [7]; SNETKOV *et al.*, [26]; WILLIAMS [32]). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio sobre la musculatura lisa intestinal de ratón (DIAZ *et al.*, [3]; MARRERO-ALONSO *et al.*, [13]) sobre los canales de K^+ , sugieren que estos canales pudieran estar involucrados en el efecto relajante de las poliaminas y del DFMO. Así, un grupo de experimentos se orientaron a estudiar la adición de 50 mM de KCl sobre la musculatura lisa de ileon y colon previamente relajada con la poliamina (10 mM de

putrescina), o con el DFMO (5 mM) (datos no mostrados). Como se observa en la Fig. 5A el ileon relajado con putrescina (10 mM) respondió a la despolarización por KCl (50 mM) con un incremento transitorio de la tensión isométrica. Resultados similares se obtuvieron en preparaciones de colon (datos no mostrados), lo cual indica que los tejidos relajados con poliaminas y DFMO preservan la capacidad de responder a la despolarización por KCl.

Con el objetivo de explorar los posibles efectos sobre los canales de Ca^{2+} , se usó a continuación el agonista de los canales de Ca^{2+} tipo L, BAY K8644, sobre la relajación inducida por las poliaminas sobre la musculatura intestinal. La aplicación de BAY K8644 (1 mM) a tejidos previamente relajados con putrescina promovió un incremento transitorio de la tensión isométrica, seguida de una actividad peristáltica espontánea que fue muy parecida a la de los tramos control para el caso del ileon (datos no mostrados), y menor en los tramos intestinales de colon (Fig. 5B) incluso bajo la presencia continua de la poliamina. Finalmente, nos propusimos estudiar los efectos del BAY K8644 y KCl añadidos secuencialmente, sobre ileon y colon previamente relajados con DFMO (5 mM). La adición del agonista BAY K8644 (1 μM), promovió una respuesta contráctil inmediata sobre la tensión basal de ambos segmentos intestinales y una recuperación parcial de la actividad peristáltica espontánea para los tramos intestinales de colon (Fig. 5C, panel derecho) siendo más evidente en ileon (Fig. 5C, panel izquierdo). La adición consecutiva de 50 mM KCl sobre los tejidos previamente recuperados por BAY K8644 promovió en ambos tejidos el incremento transitorio característico de la tensión isométrica en respuesta a la despolarización por KCl. Resultados similares se obtuvieron con las tres poliaminas en ambos tejidos (datos no mostrados).

4. DISCUSIÓN

Los datos que se presentan en este trabajo demuestran que las tres poliaminas que se encuentran de forma natural en células animales (putrescina, espermidina y espermita), son capaces de inhibir la actividad peristáltica espontánea, así como el tono basal de la musculatura lisa intestinal de ileon y colon de ratón. De igual forma se observó que el inhibidor competitivo de la principal enzima de la ruta biosintética de dichas poliaminas, el *N*-difluorometilornitina (DFMO), ejerce los mismos efectos sobre la musculatura lisa intestinal, lo cual se debe probablemente a la similitud estructural con las poliaminas naturales.

Se observó que la exposición extracelular a las distintas poliaminas y al DFMO sobre la musculatura lisa intestinal intacta promueve efectos relajantes rápidos (<30 s), efectos que son reversibles ya que las actividades contráctiles características de estos tejidos fueron recuperadas tras el lavado de las mismas. La rapidez de estos efectos junto al hecho de que estas sustancias tienen una baja velocidad de transporte a través de la membrana (saturables en el rango micromolar) (SEILERN & DEZEURE [25]), hace suponer que los efectos promovidos por las poliaminas, así como por el DFMO, son ejercidos sobre la membrana plasmática sin la necesidad de que penetren al interior celular.

Numerosos trabajos han demostrado que las poliaminas son causantes del bloqueo de distintos grupos de canales iónicos en la membrana plasmática (SCOTT *et al.*, [23]; WEIGER *et al.*, [31]; WILLIAMS [32]). Sin embargo, en todos ellos siempre se ha implicado a dos de las tres poliaminas -espermina y en menor medida espermidina- que han sido estudiadas en este trabajo. Si bien es cierto que la espermina y la espermidina tienen la capacidad de ejercer los efectos relajantes anteriormente descritos, la diamina putrescina (la primera poliamina que es capaz de biosintetizar una célula animal) también es capaz de pro-

mover efectos inhibitorios equivalentes en el mismo rango de concentraciones (10 mM). Nuestros resultados demuestran que todas las poliaminas son capaces de inhibir la actividad contráctil intestinal observándose la siguiente secuencia en la potencia de la inhibición: espermina > espermidina > putrescina, lo que indica que la eficacia inhibitoria está estrechamente relacionada con el número de cargas positivas distribuidas en la superficie de la molécula conformacionalmente flexible (SCHUBER [22]; WEIGER *et al.*, [31]). Esta relación interesante sugiere que la naturaleza catiónica de estas sustancias es clave en el grado de interacción electrostática que mantienen con los lugares de acción, y es por tanto determinante del efecto inhibitorio.

La ODC (ornitina descarboxilasa), la primera enzima de la ruta biosintética de las poliaminas en células animales, cuenta con un inhibidor competitivo estructuralmente relacionado con las poliaminas, el DFMO (METCALF *et al.*, [16]), que la inhibe irreversiblemente. El DFMO ha sido muy estudiado y usado con diversos fines, desde la investigación básica, hasta el uso simple o combinado en tratamientos contra el cáncer. Dado que los niveles de las poliaminas pueden ser manipulados farmacológicamente y pueden proporcionar información sobre las dianas implicadas en el mecanismo de acción, es concebible pensar que la alteración de los sistemas de poliaminas proporcione información sobre la interacción que puedan llegar a establecer con canales iónicos. De esta manera, demostramos en este estudio que el DFMO no sólo promueve efectos inhibitorios sobre la actividad contráctil del ileon y colon, sino que éstos ocurren a concentraciones (5 mM) usualmente empleadas para inhibir la ODC en extractos celulares y/o citosólicos. El DFMO es capaz de mimetizar el efecto relajante en el mismo rango de concentraciones y en el mismo intervalo de tiempo que las tres poliaminas ensayadas, siendo el efecto totalmente revertido tras el lavado (Fig. 4).

Se sabe que el origen y la propagación de la excitación del músculo liso gastrointestinal es consecuencia de la actividad eléctrica rítmica, causante de la contractilidad del músculo liso intestinal de forma sincrónica (SZURSZEWSKI [29]). Las fases de despolarización-repolarización de las ondas lentas de la musculatura lisa intestinal reflejan un balance entre la actividad dependiente de voltaje de los canales de Ca^{2+} (VSCC) y los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (LEE *et al.*, [11]). Por lo tanto, el hecho de que la maquinaria contráctil del ileon y colon fuese funcional después de la exposición a las distintas poliaminas y al DFMO hizo que nuestros experimentos se centraran en la posible interacción de estas sustancias con dianas moleculares en la membrana plasmática. En este sentido, se ha demostrado en células musculares lisas de arteria pulmonar de conejo (SNETKOV *et al.*, [26]) que las poliaminas, en el rango milimolar, pueden actuar sobre los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (SNETKOV *et al.*, [26]). De igual forma, la espermina y la espermidina tienen la capacidad de intervenir en la apertura intrínseca de ROMK1, un canal rectificador débil hacia dentro sensible a ATP (FICKER *et al.*, [4]), y que la espermina a bajas concentraciones es capaz de disparar de forma intrínseca los canales de K^+ rectificadores hacia dentro (FICKER *et al.*, [4]; LOPATIN *et al.*, [12]). Asimismo, se sabe que tanto el bloqueo de los canales de K^+ como la despolarización con altas concentraciones de potasio en el medio extracelular son causantes del incremento de la fuerza contráctil generada por el músculo gastrointestinal (MEISS [15]). Teniendo en cuenta que las poliaminas se transportan muy lentamente a través de la membrana plasmática (SEILERN & DEZEURE [25]) y que los efectos descritos en este estudio transcurren en pocos segundos (al igual que para el DFMO), nos planteamos buscar posibles interacciones de estas moléculas sobre la superficie celular.

La hipótesis que proponemos para el efecto relajante de las poliaminas y el DFMO está relacionada con las fases de despolarización-repolarización de las ondas eléctricas len-

tas de la musculatura lisa intestinal. Debido a que las poliaminas se han relacionado directamente con la modulación de las corrientes rectificadoras de los canales de K^+ (FICKER *et al.*, [4]; LOPATIN *et al.*, [12]) estudiamos la respuesta a la despolarización por KCl (50 mM). Observamos que la despolarización de los tejidos relajados con poliaminas y DFMO causa una contracción transitoria seguida de una inactivación reversible de la actividad contráctil. Si bien es cierto que no podemos confirmar una modulación completa del canal de K^+ por estas sustancias, el hecho de que las altas concentraciones de poliamina, putrescina (10 mM) y DFMO (5 mM) usadas en estos experimentos no supriman por completo la respuesta a la despolarización por KCl (50 mM) nos sugiere que las poliaminas relajan el músculo liso intestinal de ileon y de colon por hiperpolarización de la célula muscular lisa a través de la alteración de las conductancias al K^+ , los cuales juegan un papel importante en la regulación de la excitabilidad del sincitio gastrointestinal (VOGALIS [30]). Por lo tanto, la modulación de la actividad de los canales de K^+ por poliaminas podría disparar una corriente de salida que, eventualmente, podría desplazar el potencial de reposo de la membrana hacia valores más negativos resultando en una hiperpolarización de la célula muscular lisa.

Nuestros resultados muestran así mismo que la inhibición inducida tanto por la diamina putrescina como por el DFMO sobre la actividad contráctil de ileon y colon pudo ser parcialmente revertida por la aplicación del BAY K8644, agonista de canales de Ca^{2+} tipo L. De hecho, la aplicación del derivado dihidropiridínico restauró, al menos parcialmente, la actividad peristáltica espontánea e incrementó el tono basal de los tejidos previamente relajados con putrescina y DFMO. Este hecho apunta a una modulación negativa de los canales de Ca^{2+} tipo L por parte de las poliaminas.

En efecto, este estudio demuestra que existe una relación del grado de aminación de la molécula (y por tanto de cargas positivas sobre su superficie) con la concentración a la cual se produce la inhibición de la actividad peristáltica espontánea de la musculatura lisa intestinal tanto de ileon como de colon. Además, en el músculo liso intestinal, la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L implica una caída del tono basal y la desaparición de la actividad espontánea. Esto es debido principalmente a que estas proteínas son las que suministran la mayor fuente de entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, y son responsables de la actividad rítmica gastrointestinal. Nuestros resultados demuestran que los canales de Ca^{2+} quedarían regulados negativamente tanto por poliaminas como por DFMO. Estos resultados sugieren que estas sustancias inhiben la actividad peristáltica del músculo liso intestinal por inhibición de las corrientes de Ca^{2+} a través de canales tipo L en la célula muscular. Los mecanismos por los cuales las poliaminas interactúan con los canales de Ca^{2+} no están claros, si bien se ha sugerido la unión directa al poro del canal o con los sitios de regulación (SCOTT *et al.*, [23]). Estos resultados están de acuerdo con los previamente descritos (GOMEZ & HELLSTRAND [6]), donde la espermina 1 mM consigue inhibir las corrientes restauradas por la dihidropiridina BAY K8644.

A raíz de estos hallazgos, proponemos que tanto las poliaminas naturales, como el DFMO, son capaces de activar las conductancias de los canales de K^+ dependientes de voltaje conduciendo a la célula muscular lisa a una pequeña hiperpolarización que sería suficiente para mantener los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje lejos de su umbral de activación. La reducción de la entrada de Ca^{2+} de forma rítmica al interior celular, junto con la reducción del potencial de membrana, tendería a mantener los canales de K^+ en un estado conformacionalmente cerrado. Cuando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son obligados a abrirse por la presencia del agonista dihidropiridina (BAY K8644), el efecto dual de la entrada masiva de calcio al interior celular así como el estado del potencial de membra-

na, podría disparar la activación de los canales de K^+ de alta conductancia. Esto promovería un flujo de K^+ hacia el exterior que, conjuntamente con los canales de K^+ dependientes de voltaje, iniciaría una rápida hiperpolarización de la célula muscular lisa, causando la oscilación rítmica y rápida de la actividad contráctil en presencia del BAY K8644 tanto en ileon como en colon. Por lo tanto, la inhibición macroscópica rápida de la actividad contráctil sería consecuencia por un lado de la activación de canales de K^+ y la inhibición de canales de Ca^{2+} tipo L en la membrana plasmática de células musculares lisas intestinales.

Las altas concentraciones de poliaminas (mM) necesarias para producir el efecto relajante del músculo intestinal sugieren que el efecto es más farmacológico que fisiológico. En consecuencia, el uso terapéutico de determinados análogos de las poliaminas que actualmente son usados para los tratamientos de la hipermotilidad intestinal (BERGERON *et al.*, [1]), bien podrían englobar la inhibición de la actividad del canal de Ca^{2+} , así como la modulación positiva del canal de K^+ , como se sugiere en este estudio para la putrescina y el DFMO.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra por primera vez que la diamina putrescina, así como el inhibidor que bloquea la enzima responsable de su síntesis, el DFMO, promueven efectos inhibitorios agudos sobre la actividad lisa gastrointestinal.

Los resultados sugieren que el efecto es extracelular y directo, y no se deben a una acción desde el lado intracelular resultante del transporte transmembranario de las poliaminas hacia el interior celular.

La espermina es un inhibidor mucho más potente que la espermidina y que la putrescina. Esta observación sugiere que el número de cargas positivas de las poliaminas determina el tipo de interacciones electroestáticas sobre los canales iónicos, de forma que la potencia inhibitoria presenta una relación estructura-actividad que sigue la secuencia: espermina > espermidina > putrescina.

Tanto la putrescina como el DFMO parecen actuar a través de un mecanismo común que involucraría, por un lado, la modulación positiva de la conductancia de los canales de K^+ y, por otro, la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L de la membrana plasmática, induciendo una relajación de la musculatura lisa intestinal de ileon y colon.

6. AGRADECIMIENTOS

Financiado por los proyectos PI042460 (ISCIII, FISS), PI0422005/041 (Gobierno de Canarias) y SAF2007-66148-C02-02 (Ministerio de Educación y Ciencia). JMA es becario del subprograma de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia. Agradecemos a Rafael Robayna y Alicia Sacramento (Universidad de las Palmas de gran Canaria) su colaboración en los ensayos de poliaminas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BERGERON, R.J., G.W. YAO, H. YAO, W.R. WEIMAR, C.A. SNINSKY, B. RAISLER, Y. FENG, Q. WU, & F. GAO. 1996. Metabolically programmed polyamine analogue antidiarrheals. *Journal of Medicinal Chemistry*. 39(13): 2461-2471.

- [2] BORDALLO, C., J.M. RUBIN, A.B. VARONA, B. CANTABRANA, A. HIDALGO, & M. SANCHEZ. 2001. Increases in ornithine decarboxylase activity in the positive inotropism induced by androgens in isolated left atrium of the rat. *European Journal of Pharmacology*. 422(1-3): 101-107.
- [3] DIAZ, M., C.M. RAMIREZ, R. MARIN, J. MARRERO-ALONSO, T. GOMEZ, & R. ALONSO. 2004. Acute relaxation of mouse duodenum by estrogens: evidence for an estrogen receptor-independent modulation of muscle excitability. *European Journal of Pharmacology*. 501(1-3): 161-178.
- [4] FICKER, E., M. TAGLIALATELA, B. WIBLE, C. HENLEY, & A. BROWN. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science*. 266(5187): 1068-1072.
- [5] GERNER, E.W. & F.L. MEYSKENS. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*. 4(10): 781-792.
- [6] GOMEZ, M. & P. HELLSTRAND. 1995. Effects of polyamines on voltage-activated calcium channels in guinea-pig intestinal smooth muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 430(4): 501-507.
- [7] GOMEZ, M. & P. HELLSTRAND. 1999. Endogenous polyamines modulate Ca²⁺ channel activity in guinea-pig intestinal smooth muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 438(4): 445-451.
- [8] GONZALEZ-MONTELONGO, M.C., R. MARIN, T. GOMEZ, & M. DIAZ. 2006. Androgens differentially potentiate mouse intestinal smooth muscle by non-genomic activation of polyamine synthesis and Rho-kinase activation. *Endocrinology*. 147(12): 5715-5729.
- [9] HEBY, O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*. 19(1): 1-20.
- [10] KOENIG, H., A.D. GOLDSTONE, & C.Y. LU. 1988. Polyamines are intracellular messengers in the b-adrenergic regulation of Ca²⁺ fluxes, [Ca²⁺]_i and membrane transport in rat heart myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 153(3): 1179-1185.
- [11] LEE, J.C.F., L. THUNEBERG, I. BEREZIN, & J.D. HUIZINGA. 1999. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *American Journal Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 277(2): G409-G423.
- [12] LOPATIN, A.N., E.N. MAKHINA, & C.G. NICHOLS. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. 372(6504): 366-369.
- [13] MARRERO-ALONSO, J., B. GARCIA MARRERO, T. GOMEZ, & M. DIAZ. 2006. Functional inhibition of intestinal and uterine muscles by non-permeant triphenylethylene derivatives. *European Journal of Pharmacology*. 532(1-2): 115-127.
- [14] MARUTA, K., Y. MIZOGUCHI, & T. OSA. 1985. Effects of polyamines on the mechanical and electrical activities of the isolated circular muscle of rat uterus. *Japanese Journal of Physiology*. 35(6): 903-915.

- [15] MEISS, R.A. 1987. Mechanical properties of gastrointestinal smooth muscle. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press. 273-329.
- [16] METCALF, B.W., P. BEY, M.J. DANZIN, M.J. JUNG, P. CASARA, & J.P. VEVERT. 1978. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *Journal of the American Chemical Society*. 100: 2551-2553.
- [17] NILSSON, B.O., M. GOMEZ, R. SANTIAGO CARRILHO, I. NORDSTROM, & P. HELLSTRAND. 1995. Differential actions of exogenous and intracellular spermine on contractile activity in smooth muscle of rat portal vein. *Acta Physiologica Scandinavica*. 154(3): 355-365.
- [18] NILSSON, B.O. & P. HELLSTRAND. 1993. Effects of polyamines on intracellular calcium and mechanical activity in smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *Acta Physiologica Scandinavica*. 148(1): 37-43.
- [19] PALADE, P. 1987. Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. III. Block of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release by organic polyamines. *Journal of Biological Chemistry*. 262(13): 6149-6154.
- [20] PEGG, A.E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochemical Journal*. 234(2): 249-262.
- [21] PEGG, A.E. & P.P. MCCANN. 1982. Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 243(5): C212-C221.
- [22] SCHUBER, F. 1989. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochemical Journal*. 260(1): 1-10.
- [23] SCOTT, R.H., K.G. SUTTON, & A.C. DOLPHIN. 1993. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends in Neurosciences*. 16(4): 153-160.
- [24] SEILER, N., F. BOLKENIUS, & O. RENNERT. 1981. Interconversion, catabolism and elimination of the polyamines. *Medical Biology*. 59(5-6): 334-346.
- [25] SEILERN, N. & F. DEZEURE. 1990. Polyamine transport in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry*. 22(3): 211-218.
- [26] SNETKOV, V.A., A.M. GURNEY, J.P. WARD, & O.N. OSIPENKO. 1996. Inward rectification of the large conductance potassium channel in smooth muscle cells from rabbit pulmonary artery. *Experimental Physiology*. 81(5): 743-753.
- [27] SWÄRD, K., B.O. NILSSON, & P. HELLSTRAND. 1994. Polyamines increase Ca^{2+} sensitivity in permeabilized smooth muscle of guinea pig ileum. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 266(6): C1754-C1763.
- [28] SWÄRD, K., M.D. PATO, B.O. NILSSON, I. NORDSTROM, & P. HELLSTRAND. 1995. Polyamines inhibit myosin phosphatase and increase LC_{20} phosphorylation and force in smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 269(3): C563-C571.
- [29] SZURSZEWski, J.H. 1987. Electrophysiological basis of gastrointestinal motility. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York. 383-422.
- [30] VOGALIS, F. 2000. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *Journal of Autonomic Pharmacology*. 20(4): 207-219.

- [31] WEIGER, T.M., T. LANGER, & A. HERMANN. 1998. External action of di- and polyamines on maxi calcium-activated potassium channels: an electrophysiological and molecular modeling study. *Biophysical Journal*. 74(2): 722-730.
- [32] WILLIAMS, K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal*. 325(2): 289-297.

FIG. 1

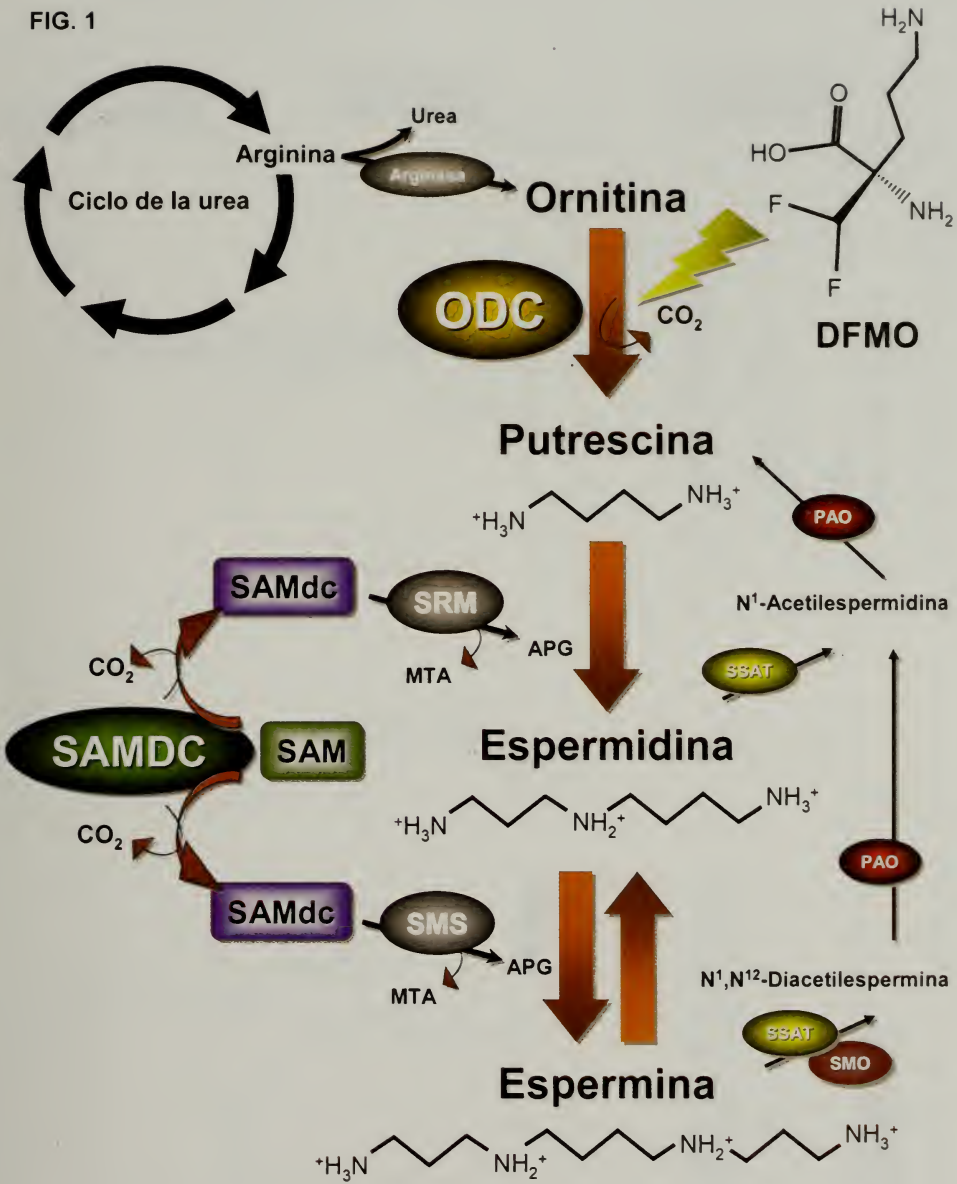


Figura 1. Metabolismo de las poliaminas en células animales. El metabolismo de la arginina, que procede del ciclo de la urea a través de la acción de la arginasa, promueve la formación de ornitina. La ornitina es descarboxilada para producir putrescina y CO_2 por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17). La espermidina y espermina son sintetizadas posteriormente en dos reacciones consecutivas llevadas a cabo por la espermidina (SRM; EC 2.5.1.16) y espermina sintasas (SMS; EC 2.5.1.22), respectivamente; con la incorporación de un primer y segundo grupo aminopropílico (APG), provenientes de la descarboxilación de la S-adenosilmetionina (SAM) para generar S-adenosilmetionina descarboxilada (SAMdc) (donante de APG) por la acción del la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50) y la liberación final de 5'-metiltioadenosina (MTA). Si bien es cierto que estas dos últimas reacciones son irreversibles, la espermina puede ser convertida a espermidina, y ésta a putrescina, por la acción de la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) tratándose de una propilaminoacetiltransferasa que monoacetila espermidina y que puede mono- o diacetilar espermina.

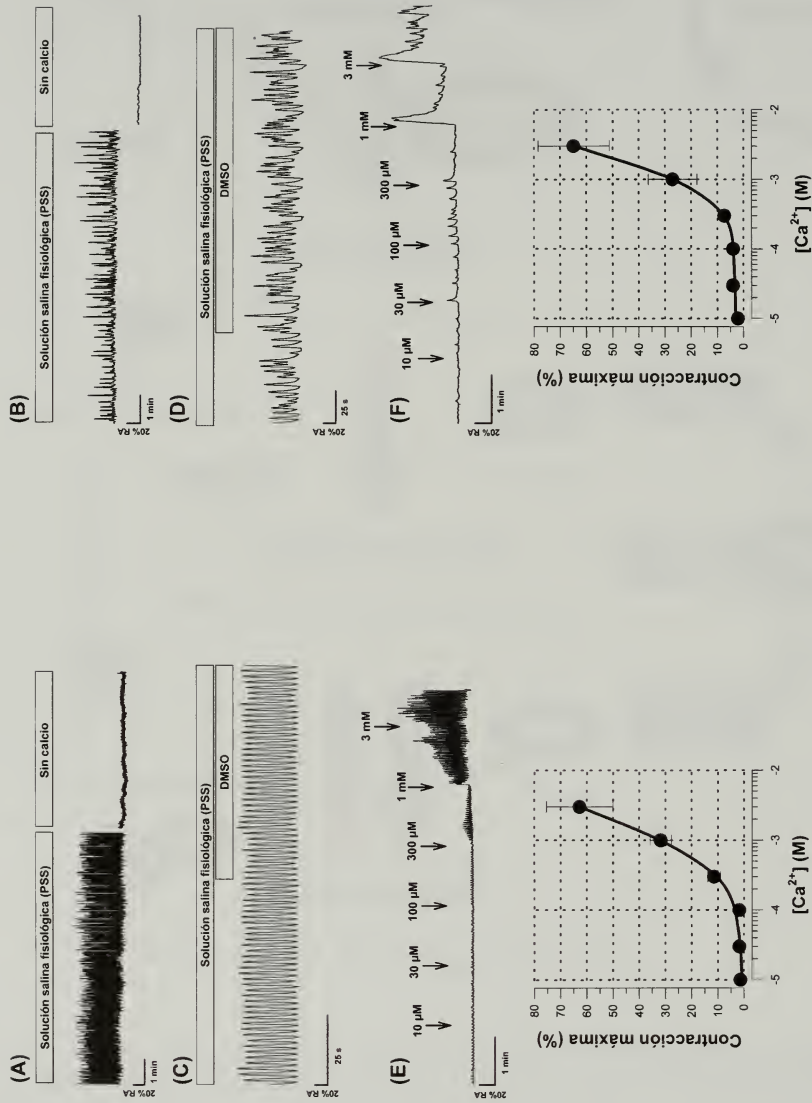


Figura 2. Caracterización de la actividad contráctil de ileon y colon. Registros representativos de la tensión isométrica en músculo liso ileal (A) y colónico (B) de ratón tanto en solución salina fisiológica como en respuesta a soluciones libres de calcio. Las señales isométricas de los tramos intestinales de ileon (C) y de colon (D) no se modifican sustancialmente por la adición del vehículo utilizado en los experimentos (DMSO, 0.1%). (E,F) Registros de la contractilidad muscular inducida por la adición acumulativa de CaCl₂ para ileon y colon, respectivamente. Las gráficas inferiores muestran las curvas dosis-respuesta para las contracciones inducidas por CaCl₂ en ileon y colon de ratón macho. Los valores están expresados como medias ± S.E.M. de, al menos, 4 preparaciones diferentes.

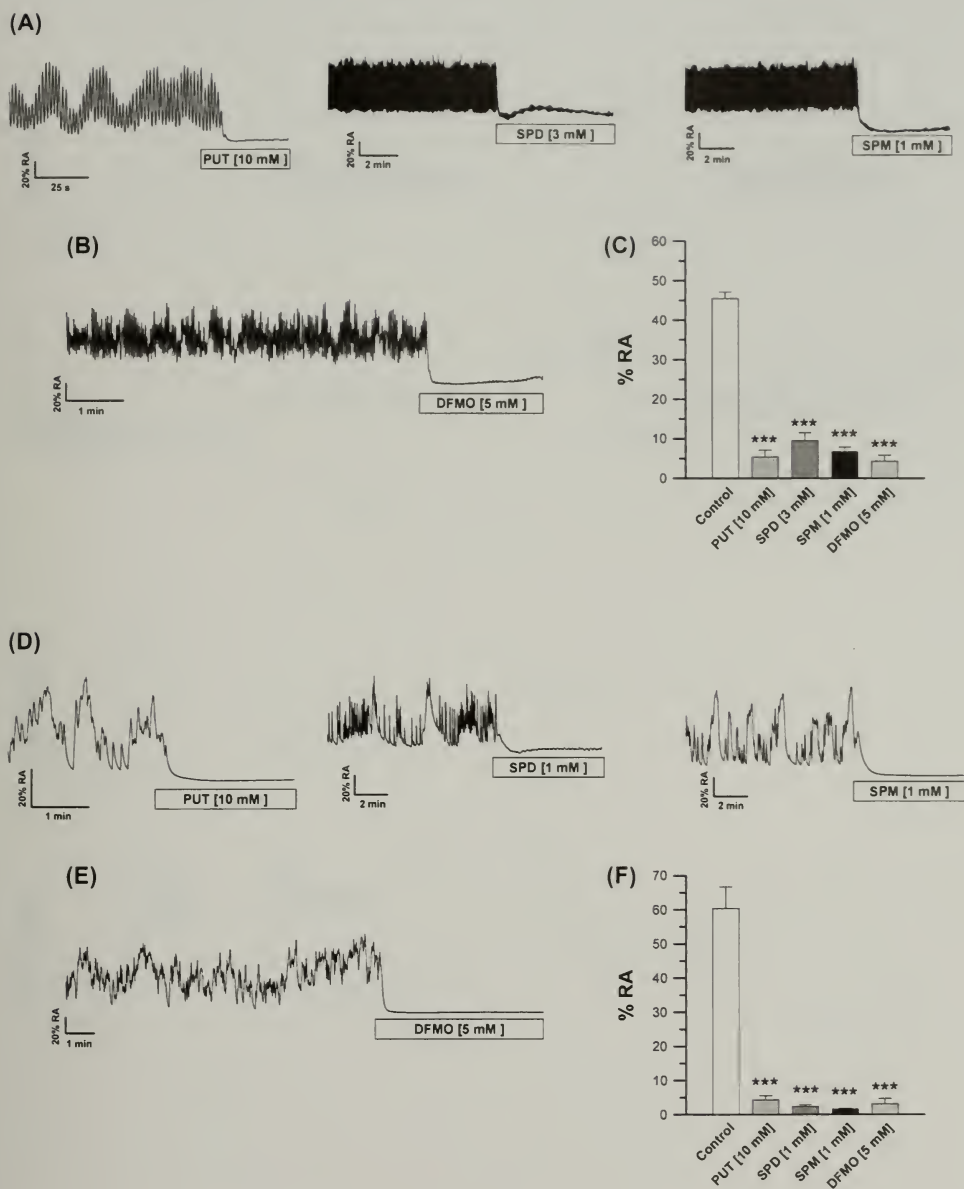


Figura 3. Relajación de la musculatura lisa intestinal de ileon y colon por poliaminas y DFMO. Trazados representativos de los efectos relajantes promovidos por las distintas poliaminas [putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm)] y del a-difluorometilornitina (DFMO) sobre el tono basal de la actividad contráctil espontánea de ileon (A-C) y colon (D-F), respectivamente. La putrescina se añadió a concentraciones finales de 10 mM (n = 9) con el fin de obtener un efecto relajante completo. Resultados similares se obtuvieron para la espermina a 1 mM (n = 7) y DFMO a 5 mM (n = 5), tanto en ileon como en colon. La espermidina se ensayó a 3 mM (n = 7) y 1 mM (n = 9) en ileon y colon, respectivamente. Los gráficos (C,F) muestran el efecto de las distintas poliaminas y DFMO sobre el tono basal medio de los tejidos. Los resultados están expresados como medias \pm S.E.M. de, al menos, 5 preparaciones diferentes en ileon y 3 en colon. *** Estadísticamente diferentes de los controles con una probabilidad de $P < 0.005$.

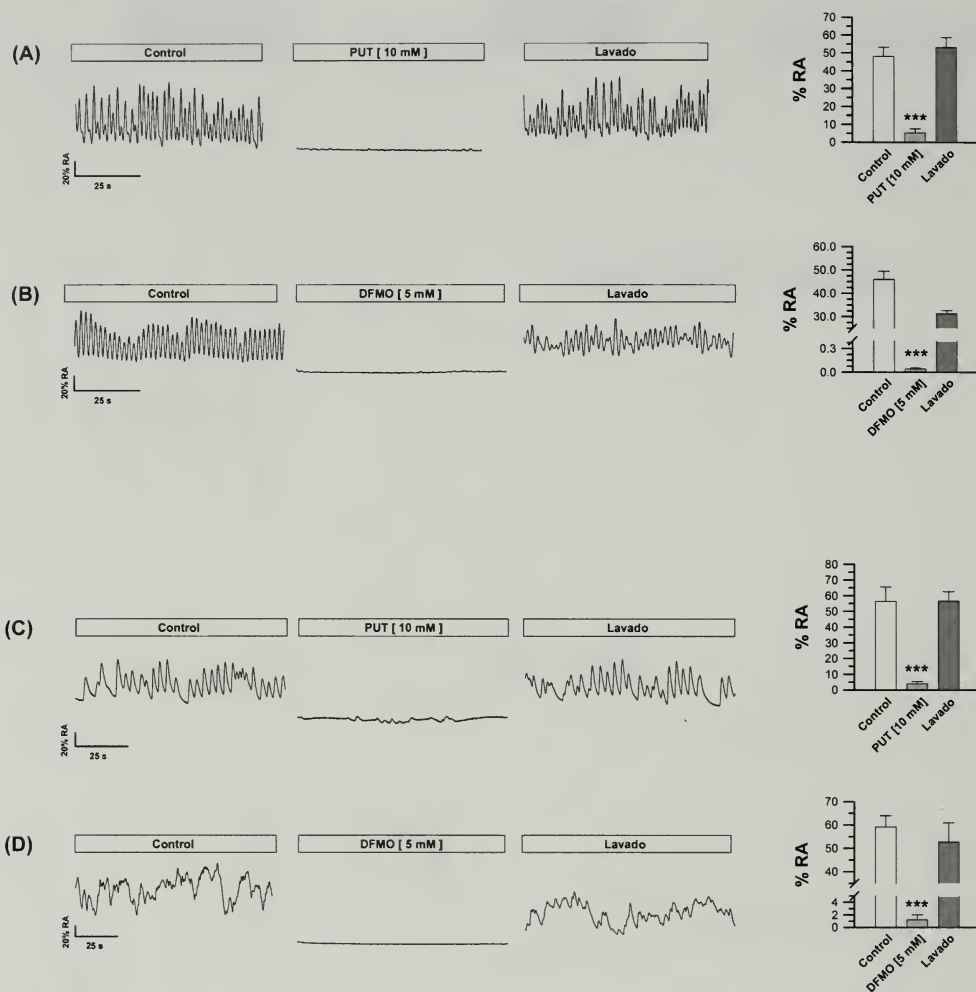


Figura 4. Reversibilidad del efecto relajante promovido por la poliamina y DFMO en ileon y colon. El efecto inhibitorio de las poliaminas (se muestra el efecto relajante de 10 mM de putrescina, PUT) y de 5 mM de DFMO son reversibles, tanto en ileon (A,B) como en colon (C,D), observándose una recuperación del tono basal y la actividad peristáltica después de los lavados. Los trazados correspondientes a los lavados se obtuvieron transcurridos 10 min., después de reemplazar la solución que contenía la putrescina o el DFMO en la solución del baño. Todos los registros fueron obtenidos de la misma preparación que la del periodo control (panel izquierdo), el tratamiento con putrescina o DFMO en el baño (panel central) y tras varios minutos después del lavado (panel derecho) de cada experimento realizado. Los diagramas de barras recogen las comparaciones entre las medias de las tensiones isométricas en respuesta al efecto relajante de las moléculas. Los trazados son representativos de, al menos, 5 experimentos diferentes. Los resultados están expresados como medias \pm S.E.M. *** Estadísticamente diferentes de los registros control con una probabilidad de $P < 0.005$.

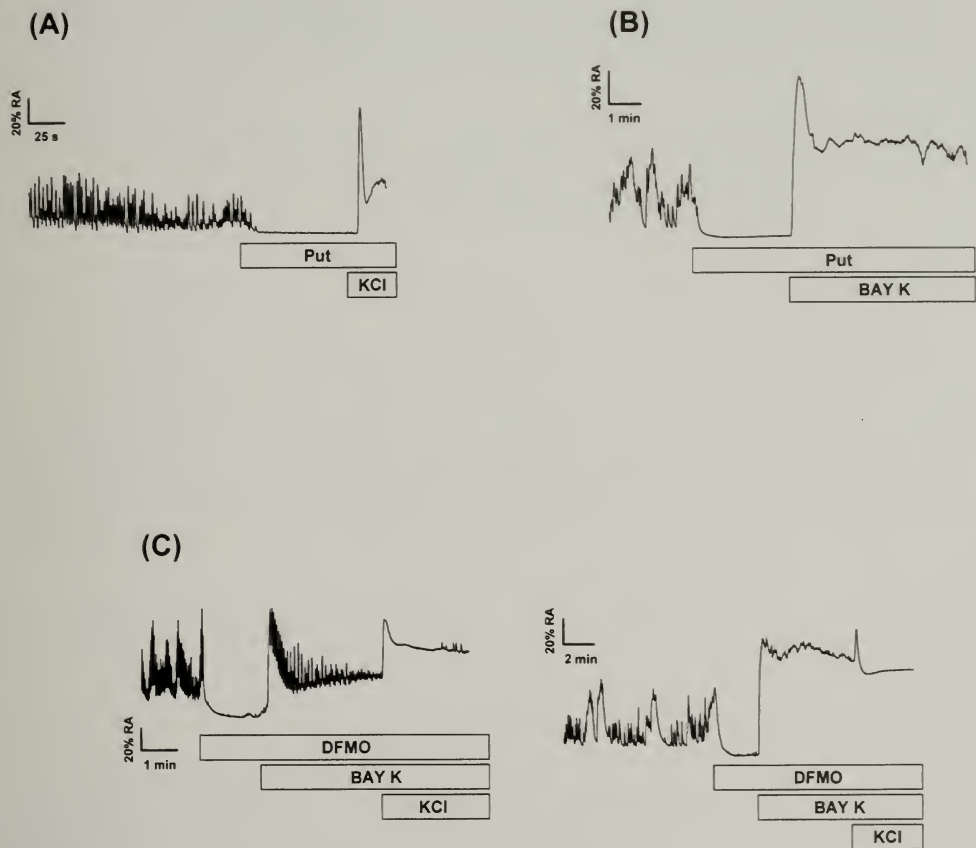


Figura 5. Efectos del KCl y BAY K8644 sobre los tejidos relajados con poliamina o DFMO. (A) Efecto del KCl (50 mM) sobre el músculo ileal previamente relajado con poliamina (se muestra el efecto de 10 mM de putrescina, PUT). (B) Efecto de 1 mM de BAY K8644 sobre el tejido colónico previamente relajado con poliamina (se muestra el efecto de 10 mM de putrescina, PUT). (C, D) Efectos de la adición secuencial de 1 mM de BAY-K8644 y 50 mM de KCl sobre tejidos musculares de ileon (C) y colon (D) relajados con 5 mM de DFMO. Los registros son representativos de tres experimentos diferentes.