

Veneno de *Latrodectus mactans* de Chile (Araneae, Theridiidae): su efecto sobre músculo liso

Fernando Romero M., Elena Altieri M., Mauricio Urrutia A. & Jorge Jara H.

Depto. de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Casilla 54-D, Temuco, Chile.
fromero@ufro.cl

Recibido 21-V-2002. Corregido 28-II-2003. Aceptado 20-III-2003.

Abstract: The venoms of *Latrodectus* sp. have been reported to induce contraction probably mediated by adrenergic and cholinergic transmitters. We have demonstrated that the venom of Chilean *Latrodectus mactans* contains neurotoxins that induce a contraction partially independent of transmitters release. Transmembrane mobility of Na^+ and Ca^{2+} ions and more specifically, the increase of cytoplasmic calcium concentration are responsible for tonic contraction in smooth muscle. Calcium may enter the cell by several ways, such as the voltage-dependent Ca^{2+} L-type channels and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. This study aimed to examine the participation of this exchanger in the tonic contraction of smooth muscle in vas deferens of rat induced by the venom of the Chilean spider *L. mactans*. Blockers of Na^+ channels (amiloride) and Ca^{2+} L-type channels (nifedipine), and a stimulator of the exchanger (modified Tyrode, Na^+ 80 mM) were used. Simultaneously, variations of the cytoplasmic concentration of Ca^{2+} were registered by microfluorimetry (Fura-2 indicator) in the presence of nifedipine. In presence of amiloride, dose-dependent inhibition of venom-induced contraction was observed, suggesting the participation of voltage-dependent Ca^{2+} L-type channels. The contraction was only partially inhibited by nifedipine and the Ca^{2+} cytoplasmic concentration increased, as assessed by the microfluorimetric registration. Finally, the venom-induced contraction increased in the presence of modified Tyrode, probably due to the action of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Taken together, our results support the idea that the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is active and may be, at least in part, responsible for the contraction induced by the venom of Chilean *L. mactans*.

Key words: *Latrodectus mactans*, spider venom, smooth muscle, calcium channels, sodium /calcium exchanger.

La araña *Latrodectus mactans* de Chile (Zapfe 1959), perteneciente al género *Latrodectus* Walckenaer, 1805 mundialmente distribuido, conocida como “araña del trigo” o “viuda negra”, habita en diversas regiones del país. Su mordedura a humanos genera un efecto sistémico conocido como “latrodectismo” o “aracnoidismo sistémico”, causando en algunos casos la muerte en adultos o niños (Scherone *et al.* 1957, Scherone 1966).

En Chile, se ha demostrado que el veneno de la araña *L. mactans* chilena, recolectada en las regiones VIII y IX, induce un efecto tónico sostenido en tejido muscular cardíaco y liso (Romero *et al.* 2000). En el músculo liso, el mecanismo de la contracción se relaciona, en-

tre otros, con la permeabilidad de los iones Na^+ y Ca^{2+} , que son moduladores de esta respuesta (Nouailhetas *et al.* 1985) con un componente rápido, fásico, y luego uno más lento y sostenido, tónico (Van Breemen *et al.* 1979, Bolton 1979, Aboulafia *et al.* 1987, Shimuta *et al.* 1990). Así mismo, siendo muy pequeños los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , la respuesta contráctil sería dependiente de su entrada desde el medio externo. Entre los mecanismos que intervienen en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular, los estudios de Sitrin y Bohr (1971) demostraron la importancia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, postulado por Reuter y Seitz (1968). Nouailhetas *et al.* (1985) observaron que, al inicio de la fase tónica, el descenso

de la concentración de Na^+ externo produce la aparición temprana del efecto máximo tónico, el cual se explicaría por un aumento de la activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inducida por el gradiente de concentración de sodio intra-extracelular. Recientes estudios acerca del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ han llevado a postular que este tipo de intercambiador posee una participación más relevante en la determinación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular que lo anteriormente propuesto (Iwamoto *et al.* 1992, Kim *et al.* 1999, Hisamitsu *et al.* 2001, Kraev *et al.* 2001, Schweda *et al.* 2001).

Por otra parte, diversos bloqueadores han sido utilizados en el estudio de estas corrientes iónicas. Entre ellos el amiloride, el cual ejerce una inhibición competitiva que afecta la respuesta contráctil de la arteria caudal de rata, causando un bloqueo de corrientes de Na^+ de modo reversible en contracciones inducidas por receptores α -1-adrenoceptores (Sharma *et al.* 1988). El mismo bloqueador, en músculo liso de *Taenia* de cuy, induce relajación afectando la respuesta contráctil generada por aumento de concentración de K^+ en el medio externo (45.4 mM) o por el agonista adrenérgico Carbacol (10 μM) (Ozaki *et al.* 1987). Amiloride afectaría además, en diverso grado, a intercambiadores como Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Blaustein y Lederer 1999). Otro bloqueador utilizado es la nifedipina, reconocida por su efecto sobre canales lentos de Ca^{2+} en terminales nerviosas de músculo estriado (Nayler 1988). Sugiura y Ko (1997) demostraron que nifedipina es un potente inhibidor de la actividad de canales de calcio presinápticos en preparaciones mioneurales de rana, conejo y de diafragma de rata, entre otros. En músculo liso, la molécula bloquea la respuesta de excitación y contracción, por reducción de potencial en fibras musculares de pelvis renal de cuy (Takano *et al.* 2000), disminuyendo la concentración de Ca^{2+} citoplasmática, como fuera demostrado por Hashitani *et al.* (2001) en músculo liso de vejiga del mismo animal.

Los estudios de contractilidad realizados por nuestro equipo en conducto deferente de rata, han demostrado que el efecto inducido

por el veneno de la araña *L. mactans* chilena es parcialmente independiente de mediadores adrenérgicos y colinérgicos (Romero *et al.* 2000). Lo anterior, abre interrogantes acerca del mecanismo de acción de las toxinas sobre músculo liso, más aún, considerando que se han identificado receptores dependientes e independientes de calcio, para las neurotoxinas de la especie euroasiática de *Latrodectus* (especialmente estudiada ha sido la alfa-latrotoxina, α -LTX) (Uschkaryov *et al.* 1992, Krasnoperov *et al.* 1996). El objetivo de este trabajo es analizar la posible participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la respuesta contráctil tónica inducida por veneno de *L. mactans* de Chile en la musculatura lisa de conducto deferente de rata, mediante el uso de bloqueadores de canales iónicos y la medición de la variación de calcio citoplasmático asociada al desarrollo de tensión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de arañas: La captura de arañas hembras adultas de *L. mactans* de Chile se realizó en los meses de verano (diciembre 2000 y enero 2001) en zonas del Alto Bío Bío, en la VIII Región (72°16'51" W, 7°45'24" S), esencialmente de acuerdo con lo descrito por Romero *et al.* (2000). Los especímenes, en frascos individuales, fueron dejados en ayuno por 30 días, mantenidos con agua, para estimular la producción y concentración del veneno en las glándulas. Nuestro equipo ha recolectado arañas en la zona mencionada los tres últimos años, cuidando de no retirar ootecas.

Obtención de veneno: Las arañas fueron sumergidas en nitrógeno líquido y luego de 1 min trasladadas a una solución de tampón fosfato salino (PBS: NaH_2PO_4 0,1 M, Na_2HPO_4 0,01 M, NaCl 1,35 M), pH 7.4, a 4°C. Se retiraron los queléceros, seccionando la membrana que los adhiere a su base. Cada queléceros con su glándula de veneno, se depositó en un tubo con el tampón mencionado (25 pares de glándulas por 100 μl de PBS), siendo homogeneizados e inmediatamente centrifugados a

1 060 g por 15 min. El sobrenadante alicuotado, denominado veneno total (VT), se congeló de inmediato a -20°C , hasta su utilización. Para medir el contenido protéico de VT, se utilizó la técnica de Bradford (1976) con leves modificaciones (BioRad Protein Assay).

Registro de contracción isométrica de músculo liso: Los segmentos de tejido que se utilizaron en los ensayos experimentales se obtuvieron de ratas Wistar machos, de un peso aproximado de 250 g sacrificadas por decapitación, a las cuales se les removió rápidamente los conductos deferentes (fracción epididimal). Los segmentos (3 cm) fueron colocados en cámara de órgano aislado termorregulado de 6 ml en solución Tyrode a 30°C , conteniendo (concentración en mM): NaCl 137, KCl 5.4, CaCl_2 2.7, MgCl_2 0.5, NaHCO_3 11.9, NaH_2PO_4 0.45 y glucosa 5.55, a pH 7.4, oxigenando con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2 . Los registros de actividad contráctil se realizaron a través de un transductor de tensión UFI modelo 1040 y un fisiopolígrafo Gilson Modelo ICM-5. La preparación se instaló con una tensión de reposo basal de 1 g. Luego de un período de estabilización de 60 min, se realizó el registro en las diferentes condiciones experimentales.

Series experimentales: Para la determinación de la respuesta máxima contráctil (control) se usó BaCl_2 0.01 M. Posteriormente, se lavó y estabilizó por 30 min en Tyrode. A continuación se registró la tensión inducida con dosis máxima de VT (84 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Las soluciones experimentales fueron utilizadas en las siguientes concentraciones finales: bloqueador de canal lento de Na^+ , amiloride (Sigma), 0.2, 0.02 y 0.002 μM ; bloqueador de canal tipo L de Ca^{2+} , nifedipina (Sigma), 0.5 μM ; solución activadora del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Tyrode conteniendo Na^+ 80 mM.

Los resultados fueron analizados estadísticamente (prueba t) con significancia $p < 0.05$ y se graficaron con el software GraphPad Prim.3_V.3.02.

Registro simultáneo de la variación del calcio citoplasmático y tensión muscular: El registro de la variación de concentración de Ca^{2+} citoplasmático se realizó mediante el mé-

todo de microfluorimetría, esencialmente de acuerdo con Ferreira *et al.* (2000). Utilizando Fura-2 1 μM como indicador, y bajo espectro de excitación alternada 340/380 nm, la fluorescencia (505 nm) se detectó en un espectrofluorómetro Fluoro-Max 2. Para el registro de tensión muscular se utilizó el sistema de microcámara con agitador descrito por los mismos autores.

RESULTADOS

Respuestas contráctiles a VT y a Ba^{2+} :

En condiciones de tensión basal producida por carga de 1 g en la preparación de conducto deferente de rata ($n=9$), BaCl_2 (0.01 M) indujo una respuesta control de contracción bifásica, en tanto que VT (84 $\mu\text{g}/\text{ml}$) generó una respuesta tónica sostenida en presencia de la concentración máxima de veneno (Fig. 1), equivalente a la generada por BaCl_2 .

Inhibición de la respuesta a VT al preincubar con amiloride: La respuesta contráctil tónica máxima de conducto deferente de rata ($n=9$), inducida por VT, sufre diferentes porcentajes de inhibición cuando la preparación es preincubada con amiloride (0.002, 0.02, y 0.2 μM), que es el bloqueador del canal lento de Na^+ . En el Cuadro 1 se observa que el porcentaje de bloqueo es dependiente de la concentración de amiloride (prueba t, $p < 0.05$). En la Fig. 2 se muestran registros típicos, correspondientes a un mismo protocolo.

Respuesta a VT en presencia de nifedipina: La nifedipina (500 nM), bloqueador específico de canales de Ca^{2+} tipo L, no altera la respuesta contráctil tónica basal inducida por VT (47 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($n=9$). En la Fig. 3, se observa que el VT induce efecto de respuesta tónica aún en presencia del bloqueador.

Aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en presencia de nifedipina: Los resultados de la determinación microfluorimétrica de Ca^{2+} en presencia de nifedipina y VT se observan en la Fig. 3b. El perfil de sensibilidad de calcio libre citoplasmático disminuye en presencia de nifedipina, y luego es incrementado al adicionar VT.

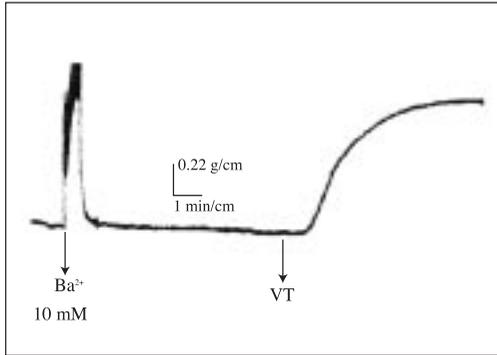


Fig. 1. Registro típico de contracción de conducto deferente en presencia de BaCl₂ (10mM) y VT (veneno total, 84 µg/ml). La tensión basal se obtiene con la carga de 1g. La calibración es de 0.22 g/cm de tensión vs. velocidad de registro 1 min/cm.

Fig. 1. Typical record of vas deferent contraction in the presence of BaCl₂ (10 mM) and VT (total venom, 84 µg/ml).

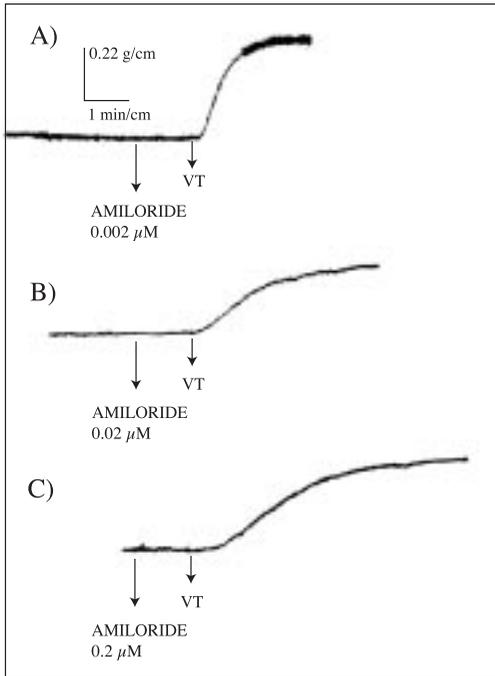


Fig. 2. Registro del bloqueo de la respuesta contráctil tónica de conducto deferente inducida por VT, cuando es preincubada con amiloride a 0.002 µM(A), 0.02µ M (B), y 0.2 µM (C). La calibración es de 0.22 g/cm de tensión vs. velocidad de registro 1 min/cm.

Fig. 2. Blockade by amiloride 0.002 µM(A), 0.02 M (B), y 0.2 µM (C) of the VT-induced tonic contraction (Tension: 0.22 g/cm; recording speed: 1 min/cm).

CUADRO 1

Aumento de tensión máxima en presencia de amiloride

TABLE 1

Increase in maximum tension in the presence of amiloride

Concentración de amiloride (µM)	Inhibición de la tensión*
0.002	26.0 ± 8.7 **
0.02	35.6 ± 9.6 **
0.2	48.1 ± 8.9 **

* En porcentaje de disminución de la tensión desarrollada por el control.

** (n = 9, p<0.05).

Aumento de la tensión en presencia de una disminución de [Na⁺] extracelular: La disminución de la concentración total de Na⁺ extracelular, de 149 a 80 mM, induce un aumento de la contracción tónica máxima desarrollada como respuesta a la aplicación de VT 84 µg/ml. En la Fig. 4 se observa un registro típico temporal de tensión transitorio. El incremento es de un 30.7 ± 6.7 % en la tensión (n=6), en relación con la respuesta control (prueba t, p<0.05) al adicionar VT 84 µg/ml.

DISCUSIÓN

Confirmando hallazgos anteriores (Romero *et al.* 2000), observamos que las toxinas contenidas en el veneno de arañas *L. mactans* de Chile inducen una respuesta contráctil tónica sobre músculo liso de conducto deferente de rata. Los estudios de Grider *et al.* 1988 demostraron que la respuesta tónica en el músculo liso es dependiente de la entrada de Ca²⁺ a la célula, debido al tamaño reducido de los depósitos intracelulares del ion. Por su parte, Klöckner (1996) demostró, en células aisladas de arteria coronaria de cuy, que la respuesta a Ba²⁺, al usar este ion el mismo canal que el Ca²⁺, puede ser usada como control de respuesta tónica máxima. Por lo anterior, la respuesta máxima observada en presencia de VT en el conducto deferente, podría estar relacionada con

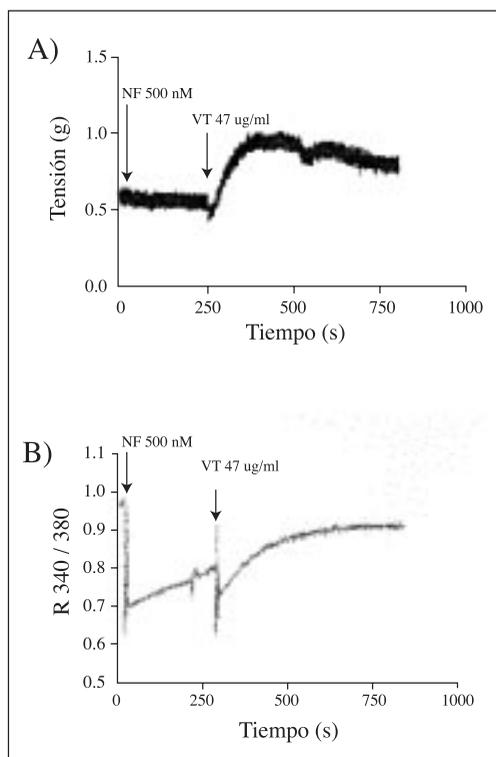


Fig. 3. Registro simultáneo de tensión y variación de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . (a) Respuesta de tensión de conducto deferente de rata a nifedipina (NF = 500 nM) y su acción en presencia de VT. (b) Variación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático medida por microfluorimetría (indicador $1\mu\text{M}$ de Fura-2), bajo el espectro de excitación, razón 340/380 nm en presencia de nifedipina y VT.

Fig. 3. Simultaneous registration of tension and Ca^{2+} cytoplasmic concentration. (a) Vas deferent response to nifedipine (NF = 500 nM) and his action in the presence of VT (47 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (b) Microfluorimetry (indicator Fura-2, $1\mu\text{M}$) record of Ca^{2+} cytoplasmic concentration in the presence of nifedipine and VT.

la movilización de calcio desde el medio extracelular, ya que es comparable en magnitud de tensión a la desarrollada cuando el tejido está en presencia sólo de bario (Fig. 1).

Por otra parte, la presencia de amiloride, el cual bloquea los canales de Na^+ y también diversos intercambiadores, induce sobre el registro temporal de contracción del conducto deferente una reducción de la amplitud de ten-

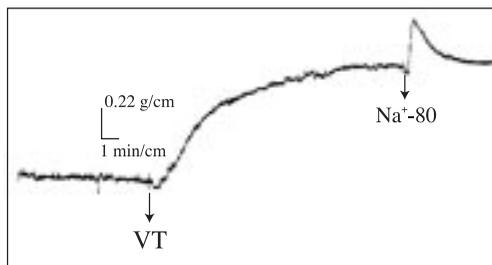


Fig. 4. Registro típico de incremento transitorio ($30.7 \pm 6.7\%$) en la contracción tónica máxima del conducto deferente de rata en respuesta a VT, al reducir la concentración de Na^+ del medio de 149 a 80 nM. La calibración es de 0.22 g/cm de tensión vs. velocidad de registro 1 min/cm.

Fig. 4. Typical record of transient increase ($30.7 \pm 6.7\%$) in tonic contraction of vas deferens while reducing external Na^+ concentration from 149 to 80 nM (Tension: 0.22 g/cm; recording speed: 1 min/cm).

sión de modo dependiente de la concentración (Fig. 2), lo que confirma que al atenuar la excitabilidad se altera la conductancia iónica de Ca^{2+} y se reduce el tono muscular, como fuera demostrado por Pitt y Knox (1996) en fibras musculares lisas de tráquea humana. Nuestros resultados permiten sugerir que el bloqueo de la corriente de Na^+ compromete la respuesta de excitabilidad de la fibras musculares lisas del conducto deferente, afectando el ingreso de Ca^{2+} a través de los canales voltaje dependientes tipo L. Sin embargo, parte del efecto observado podría deberse a que el sitio de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de las células musculares lisas del conducto deferente de rata, se viera afectado en su funcionamiento.

Dado que el resultado obtenido con amiloride permite postular que la contracción inducida por VT es, en gran parte, dependiente de Ca^{2+} externo ligado a corriente de canales de Ca^{2+} tipo L, se usó nifedipina (bloqueador de este tipo de canales), para realizar un registro simultáneo de variación de Ca^{2+} citoplasmático, obtenido por microfluorimetría, y de contracción isométrica. De modo paradójico, observamos que VT, aún en presencia de nifedipina, produce aumento de la tensión isométrica y aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma (Fig. 3). Es necesario comentar que,

antes de la aplicación de VT, durante el bloqueo con nifedipina, existe un paulatino aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático que no alcanza a generar tensión (Fig. 3b), el cual probablemente se debe a ingreso por difusión. Estos resultados implican que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático producto de la acción de VT está dependiendo de mecanismos distintos al del ingreso vía canales tipo L, entre los cuales podría estar el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Por otra parte, Nouailhetas *et al.* (1985), en ñeón de cuy, demostraron que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es sensible a una reducción de la concentración de Na^+ extracelular, activándose e induciendo una respuesta tónica sostenida. También Pitt y Knox (1996) relacionaron la activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con el desarrollo de tono muscular liso. Para verificar si el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ opera correctamente durante la inducción de contracción por VT, redujimos la concentración del Na^+ extracelular. Los resultados (Fig. 4) muestran que se desarrolla una tensión adicional transitoria ($30.7 \pm 6.7\%$) debida al estímulo del intercambiador, el cual, por lo tanto, no estaría siendo afectado por VT.

Estas evidencias, en conjunto, permiten postular que, entre otros posibles mecanismos de acción del veneno que contribuyan a elevar la concentración de Ca^{2+} intracelular, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ puede tener una participación activa en la tensión tónica máxima observada en las fibras longitudinales del conducto deferente de rata en presencia de veneno de la araña *L. mactans* de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a María Etsuko y Alice Ferreira su colaboración en la determinación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático; a Dolly Standen la lectura crítica del presente manuscrito y sus valiosos comentarios. Agradecemos también el financiamiento de este trabajo por el Proyecto DIUFRO 2006 y Proyecto FONDECYT 1010729.

RESUMEN

El veneno de arañas del género *Latrodectus* induce contracción de músculo liso de mamíferos, postulándose como posible mecanismo la liberación de mediadores adrenérgicos y colinérgicos. El veneno de *Latrodectus mactans* de Chile contiene neurotoxinas que inducen actividad contráctil en músculo liso en forma parcialmente independiente de actividades adrenérgicas y colinérgicas, lo que deja abiertas interrogantes sobre el mecanismo de acción del veneno. La respuesta tónica en músculo liso depende de la movilidad de los iones sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) y, más específicamente, de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. Una de las vías de ingreso del calcio al músculo liso, además de los canales tipo L de Ca^{2+} , es el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En el presente trabajo se estudia la posible participación de este intercambiador en la respuesta tónica inducida por el veneno sobre músculo liso del conducto deferente de rata, en un modelo de órgano aislado. Utilizando bloqueadores de canales de Na^+ (amiloride) y Ca^{2+} (nifedipina) y una solución estimuladora del intercambiador (Tyrode pobre en sodio), se realizaron registros de tensión isométrica inducida por el veneno. Simultáneamente al uso de nifedipina, se registraron las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmática mediante microfluorimetría. Se observó que la inhibición de la contracción en presencia de amiloride depende de su concentración, mostrando una participación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la contracción. En presencia de nifedipina, la contracción inducida por el veneno sólo fue parcialmente inhibida, y la microfluorimetría mostró un aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en presencia del bloqueador, lo que indica una participación de otros mecanismos para el ingreso de Ca^{2+} a la célula. Por último, al disminuir la concentración de Na^+ extracelular se estimuló la contracción tónica en un 30.7%, atribuible, al menos en parte, al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Estos resultados permiten proponer que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se encuentra activo durante la contracción tónica inducida por el veneno de *L. mactans* de Chile y podría ser uno de los responsables del desarrollo de tensión.

REFERENCIAS

- Aboulafia J., H. Capocci, T.B. Paiva & A.C.M. Paiva. 1987. Sodium-dependence of the non-specific desensitization of the guinea-pig ileum induced by acetylcholine and histamine. *Br. J. Pharmacol.* 90: 347-353.
- Bezanilla, F. & E. Stefani. 1994. Voltage-dependent gating of ionic channels. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 819-846.
- Blaustein, M.P. & W.J. Lederer. 1999. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Phys. Rev.* 79: 763-854.

- Bolton, T.B. 1979. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brading, A., E. Bülbüling & T. Tomita. 1969. The effect of sodium and calcium on the action potential of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 200: 637-654.
- Bülbüling, E. & H. Kuriyama. 1963. Effect of changes in the external sodium and calcium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 166: 29-58.
- Ferreira, A.T., R. Neri, M.E.M. Oshiro & H. Kanaide. 2000. Simultaneous registration of contraction and cytosolic calcium ($[Ca^{2+}]_i$) of smooth muscle strips using front-surface fluorimetry. *J. Fluoresc.* 10: 223-228.
- Grider, J.R. & G.M. Makhoulf. 1988. Contraction mediated by Ca^{2+} release in circular and Ca^{2+} influx in longitudinal intestinal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 432-437.
- Hashitani, H., H. Fukuta, H. Takano, M.F. Klemm & H. Suzuki. 2001. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol.* 530: 273-286.
- Hisamitsu, T., H. Ohata, T. Kawanishi, T. Iwamoto, M. Shihgehawa, H. Amano, S. Yamada & K. Momose. 2001. A mechanism of Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores coupling to the Na^+/Ca^{2+} exchanger in cultured smooth muscle. *Life Sci.* 69: 2775-2787.
- Holman, M.E. 1958. Membrane potentials recorded with high resistance micro-electrodes; and the effects of changes in ionic environment on the electrical and mechanical activity of the smooth muscle of the taenia coli of the guinea-pig. *J. Physiol., London* 141: 464-488.
- Huddart, H. 1981. Calcium regulation in ileal smooth muscle-I. Sodium-calcium counter exchange. *Gen. Pharmac.* 12: 155-160.
- Iwamoto, T., K. Harada, F. Nakajima & T. Sukamoto. 1992. Effects of ouabain on muscle tension and intracellular Ca^{2+} level in guinea-pig aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 224: 71-76.
- Kim, J.K., S.J. Kim, Y.C. Kim, I. So & K.W. Kim. 1999. Influence of extracellular Na^+ removal on cytosolic Ca^{2+} concentration in smooth muscle cells of rabbit cerebral artery. *J. Smooth Muscle Res.* 35: 135-145.
- Klößner, U. 1996. Voltage-dependent L-type calcium channels in smooth muscle cells, pp. 1-12. *In* T.B. Bolton y T. Tomita (eds.). *Smooth Muscle Excitation*. Academic, Londres.
- Kraev, A., B.D. Quednau, S. Leach, X.F. Li, R. Winkfein, M. Perizzolo, X. Cai, R. Yang, K.D. Philipson & J. Lytton. 2001. Molecular cloning of a third member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, NCKX3. *J. Biol. Chem.* 276: 23171-23172.
- Krasnoperov V.G., R. Beavis, O.G. Chepomy, A.R. Little, A.N. Plotnikov & A.G. Petrenko. 1996. The calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin is not a neurexin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 227: 868-875.
- Nayler, W.G. 1988. *Calcium Antagonists*. Academic, Londres, 347 p.
- Nouailhetas, V.L.A., S.I. Shimuta, A.C.M. Paiva & T.B. Paiva. 1985. Calcium and sodium dependence of the biphasic response of the Guinea-pig ileum to agonists. *European J. Pharmacol.* 116: 41-47.
- Ozaki H., T. Kojima, T. Moriyama, H. Karaki, N. Urakawa, K. Kohama & Y. Nonomura. 1987. Inhibition by amiloride of contractile elements in smooth muscle of guinea-pig taenia cecum and chicken gizzard. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 370-377.
- Pitt, A. & A. Knox . 1996. Molecular characterization of the human airway smooth muscle Na^+/Ca^{2+} exchanger. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 15: 726-730.
- Reuter, H. & N. Seitz. 1968. The dependence of calcium efflux for cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol., London* 195: 451-470.
- Romero, F., E. Altieri, C. Quiñehual & A. Cayuqueo. 2000. Actividad contráctil de músculo papilar cardíaco y conducto deferente de rata inducido por veneno de la araña *Latrodectus mactans* de Chile. *Gayana* 64: 161-170.
- Scherone, H. 1966. Latrodectismo y loxoscelismo en Chile, incidencia, características clínicas, pronóstico, tratamientos y prevención. *Mem. Inst. Butanta.* 33: 207-212.
- Scherone, H., G. Niedmann, L. Bahamonde & J. Bonnefoy. 1957. Algunas alteraciones cardiovasculares observadas en el latrodectismo. *Bol. Chile. Parasit.* 12: 29-35.

- Schweda, F., H. Seebauer, B.K. Krämer & A. Kurtz. 2001. Functional role of sodium-calcium exchange in the regulation of renal-vascular resistance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F155-161.
- Sharma R.V., L.M. Bendhack & R.C. Bhalla. 1988. Mechanism of inhibition of rat caudal artery contraction by amiloride. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12: 152-159.
- Shimuta S.I., C.A. Kanashiro, M.E.M. Oshiro, T.B. Paiva & A.C.M. Paiva. 1990. Angiotensin II desensitisation and Ca^{++} and Na^{+} fluxes in cultured intestinal smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 1215-1221.
- Sitrin, M.D. & D.F. Bohr. 1971. Ca and Na interaction in vascular smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol.* 220: 1124-1128.
- Siugura, Y. & C-P. Ko. 1997. Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 17: 1101-1111.
- Sommerville, L.E., & D.J. Hartshorne. 1986. Intracellular calcium and smooth muscle contraction. *Cell Calcium* 7: 353-364.
- Takano, H., Y. Nakahira & H. Suzuki. 2000. Properties of spontaneous electrical activity in smooth muscle of the guinea-pig renal pelvis. *Jpn. J. Physiol.* 50: 597-603.
- Uschkaryov Y.A., Petrenko A.G., Geppert M. & T.C. Sudhof. 1992. Neurexins: synapsis cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257: 500.
- Van Breemen, C., S. Aaronson & R. Loutzenhiser. 1979. Sodium-calcium interaction in mammalian smooth muscle. *European J. Pharmacol.* 30: 167.
- Zapfe, H. 1959. Clave para determinar familias y géneros de arañas chilenas. *Inv. Zool. Chilena* 5: 133-140.