

242.1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES ZARAGOZA

EFEECTO DE LA ADRENALINA SOBRE
MUSCULO LISO DE LA COLA DE
EPIDIDIMO DE RATA

T E S I S

Que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

ADRIANA MARGARITA MANDUJANO GUAJARDO

1 9 8 7



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	página
1. Introducción	1
2. Fundamentación del tema	3
2.1 Músculo liso. Generalidades	3
2.2 Inervación y transmisión adrenérgica en el músculo liso	4
2.2.1 Transmisión neuromuscular adrenérgica	4
2.3 Mecanismos adrenérgicos postsinápticos	5
2.3.1 Receptores adrenérgicos	6
2.4 Proceso contráctil en el músculo liso	9
2.4.1 Papel del calcio en el proceso de contracción del músculo liso	9
2.5 Aparato reproductor de la rata macho	15
2.5.1 Funciones del epidídimo	17
2.5.2 Inervación autonómica en el músculo liso epididimal	19
3. Planteamiento del problema	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
6. Material y Metodología	24
7. Resultados	35
8. Discusión	45
9. Conclusiones	48
10. Bibliografía	49

I N T R O D U C C I O N :

La Biología de la Reproducción, es una rama de las Ciencias Biológicas que abarca muchos de los fenómenos relacionados con la formación de los seres vivos. El presente trabajo, comprende una parte de esta ciencia en particular, y es la que está relacionada con la fisiología del epidídimo, órgano que forma parte del aparato reproductor masculino (7,10,27).

Desde principios de siglo se ha propuesto, que el epidídimo participa en forma importante en la maduración y transporte de los espermatozoides (1,3,4,5). El epidídimo está constituido por una capa de células secretoras y una pared de músculo liso, tejido que ha sido motivo de un gran número de estudios. Estas fibras musculares están inervadas principalmente por terminales adrenérgicas y en menor cantidad las colinérgicas (6,7,8,9). Esta inervación que es principalmente de tipo simpático, tiene como neurotransmisor a la noradrenalina y a la adrenalina, lo que implica que lógicamente la función adrenérgica juega un papel importante en la actividad del músculo liso (8,12,31,37).

El epidídimo es un órgano que se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cola, y se ha propuesto que durante la eyaculación, la región de la cola sufre una fuerte contracción, que se ha asociado con la activación de los receptores α -adrenérgicos presentes en las fibras musculares (4,9,12).

Al igual que en el músculo esquelético, existen evidencias de que en el músculo liso es necesaria la presencia del ión calcio para la activación del proceso contráctil. En los experimentos "in vitro", la mayoría de las respuestas contráctiles son inhibidas cuando la concentración de calcio intracelular no alcanza la concentración mínima ($10^{-5}M$) para la iniciación del proceso contráctil; lo cual puede ser debido a la eliminación del calcio externo o por la presencia de sustancias que son capaces de inhibir o bloquear la acción de dicho catión (bloqueadores de canales de calcio) (16,20,22,23).

Ahora bien, la medición de las respuestas fisiológicas en el músculo liso, se realizan con cierta facilidad cuando modelos empleados para este propósito, no son sofisticaciones sino al contrario, son modelos que por su relativa sencillez permiten llevar a cabo este tipo de estudios. Un ejemplo de esto lo tenemos al medir los cambios mecánicos en el músculo liso, cambios en la presión sanguínea, alteraciones de las vías respiratorias, etc.

Puesto que la cuantificación de estos parámetros son relativamente fáciles, estudios de este tipo han llevado a establecer las bases del entendimiento de la interacción, hormona-receptor y la caracterización y clasificación en clases y subclases, de los receptores adrenérgicos (20,32, 37).

Sin embargo, se ha estudiado poco acerca del mecanismo básico que ejercen los agonistas adrenérgicos en el músculo liso de la cola de epidídimo, en relación a los iones Ca^{++} , Sr^{++} y Ba^{++} extracelulares en preparaciones "in vitro" - (62,63,64).

Para realizar este trabajo se decidió utilizar como animal experimental a la rata macho, pues además de ser un animal de fácil manejo, se ha observado una gran similitud bioquímica, fisiológica y morfológica entre el aparato reproductor de la rata y el del hombre (4,7,11, 26).

En el presente trabajo se estudia "in vitro" el efecto de un agonista- α sobre músculo liso de la cola de epidídimo de rata en:

- 1o. Medios de incubación con diferentes concentraciones de calcio y sin calcio.
- 2o. Medios donde se añaden bloqueadores de canales de calcio.
- 3o. Medios donde se sustituye al Ca^{++} por Sr^{++} y Ba^{++} .

Con el propósito de conocer lo que estas variaciones repercuten sobre el fenómeno de la contracción.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

La función biológica de la reproducción es inherente a la materia viva e indispensable para perpetuar las especies; es además un fenómeno que incluye patrones complejos de conducta, en donde el comportamiento básico de apareamiento es innato en todos los mamíferos y es un proceso en donde se encuentran interrelacionados órganos y sistemas que al operar en conjunto, proporcionan los elementos necesarios para que se lleve a cabo la reproducción (27,28).

A continuación se señalan aspectos fundamentales en el conocimiento que se tiene acerca del músculo liso en general y del músculo liso del cual está formada la cola del epidídimo de la rata en particular, materia de este estudio.

2.1 MUSCULO LISO. GENERALIDADES

El músculo liso está ampliamente distribuido en el cuerpo de los vertebrados y su actividad contráctil es vital para el funcionamiento normal del cuerpo. Las partes contráctiles de las paredes de los vasos huecos y las cavidades tales como los vasos sanguíneos, el canal alimentario y el tracto genitourinario, están formados por capas de células musculares lisas, las cuales impulsan, mezclan o retienen el contenido que llevan en su interior. Por otro lado, el músculo liso está íntimamente asociado con otros tejidos y su contracción tiene de a mover a otras estructuras musculares que están cerca de él (19).

Asociado con su posición y su función, el músculo liso varía ampliamente en su patrón de actividad contráctil, por ejemplo: por un lado mantiene esta actividad más o menos continuamente como en el iris, los vasos sanguíneos o la uretra. Mientras que en otros casos, ocurren brotes ocasionales de actividad como resultado de un fenómeno, como es el caso de la defecación o el embarazo (19).

La actividad contráctil de cualquier músculo depende de un cierto número de factores tales como la interacción entre las células musculares y la influencia de los agentes externos tales como los nervios, las hormonas, etc.

Las células del músculo liso son pequeñas, en forma de eje y están estrechamente unidas, además frecuentemente se asocian con fibras reticulares y elásticas. La forma de las células y la ausencia de alineación de las proteínas -

contráctiles hacen capaz al músculo liso para que funcione aún cuando sufre grandes cambios en longitud, esto permite al músculo liso efectuar importantes funciones en las víceras huecas por ejemplo, permitiendo que intestino, vejiga, vasos sanguíneos y otras estructuras del cuerpo cambien los diámetros de sus luces de casi cero a valores muy altos.

El músculo liso esta inervado usualmente por ambas divisiones del Sistema Nervioso Autónomo, en donde la actividad nerviosa autonómica puede iniciar a modular la actividad muscular, pero sin estar bajo control voluntario.

Como en el músculo esquelético, se cree que en el músculo liso, la contracción resulta a partir de un incremento en la concentración de calcio intracelular $[Ca_i]$, la cual es normalmente disparada por la actividad eléctrica (potenciales de acción) en la membrana celular. En el músculo liso el aumento de los potenciales de acción, no es afectado por la tetrodotoxina (droga muy potente que inhibe los flujos de Na^+ al interior de la célula), pero es reducida por el Mn^{++} . Esto sugiere que la corriente al interior de la célula es llevada a cabo por el Ca^{++} el cual activa a las proteínas contráctiles. La actividad eléctrica puede ser espontánea o puede ser iniciada por la liberación de los transmisores liberados por los nervios (19,48).

2.2. INERVACION Y TRANSMISION ADRENERGICA EN EL MUSCULO LISO

La densidad de la inervación adrenérgica en el músculo liso varía considerablemente en diferentes órganos por ejemplo: es muy alta en el conducto deferente, en el iris, algunas partes del esfínter gastrointestinal, etc., pero muy baja en el útero, los ureteres y el músculo longitudinal del tracto gastrointestinal. Por otro lado se ha observado que en las diferentes células musculares lisas existen invaginaciones provocadas por la presencia de los nervios adrenérgicos (y colinérgicos) en forma de varicosidades nerviosas dentro de las cuales se encuentra almacenado el neurotransmisor que será liberado posteriormente durante la transmisión del impulso nervioso (24,45).

2.2.1 TRANSMISION NEUROMUSCULAR ADRENERGICA

El sistema nervioso central y periférico tienen fundamental importancia en el control de las funciones relacionadas con la reproducción, y es el sistema -

nervioso autónomo (SNA) el que interviene en la transmisión de estímulos sobre unidades sinápticas entre las neuronas pre y postganglionares que conforman a este sistema, a través de la liberación de los neurotransmisores. El SNA inerva a diferentes tipos de órganos de musculatura lisa como: el intestino, las glándulas y los órganos del aparato reproductor entre otros, los cuales están densamente inervados con fibras de tipo simpático y parasimpático y cuyos neurotransmisores principales son: la noradrenalina y la acetilcolina respectivamente. La adrenalina secretada por la médula renal no es normalmente un mediador de las terminaciones nerviosas, pero es liberada cuando se estimula el sistema nervioso simpático (27,29,30,31).

Todas las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de las catecolaminas: tirosina hidroxilasa, DOPAdescarboxilasa, dopamina β -descarboxilasa monoaminoxidasa (MAO) y algunos como la catecol-o-metiltransferasa (COMT), están presentes alrededor de la neurona adrenérgica. Las catecolaminas son almacenadas en las vesículas granulares junto con la cromogranina y la dopamina- β hidroxilasa. Durante la transmisión son liberadas dentro de la hendidura sináptica mediante un proceso de exocitosis, siguiendo su acción sobre la membrana muscular postsináptica. Las catecolaminas son removidas extensamente al ser recaptadas a nivel de la membrana presináptica, donde se reincorporan a los almacenamientos vesiculares o son degradados por la MAO (30,45).

2.3 MECANISMOS ADRENERGICOS Y POSTSINAPTICOS

Los procesos involucrados en la formación, el almacenamiento, la liberación y la activación de los neurotransmisores adrenérgicos son ya bien conocidos, pero se sabe menos acerca de los mecanismos que median las respuestas de las células efectoras (24). Algunas células del músculo liso tienen una inervación adrenérgica directa, pero muchas solamente son influenciadas indirectamente por la difusión de la noradrenalina que proviene de las terminales nerviosas distantes o a partir de los nervios de las paredes de los vasos sanguíneos vecinos o en otros tejidos adyacentes o bien por la adrenalina circulante, secretada por la médula suprarrenal (24).

2.3.1 RECEPTORES ADRENERGICOS

Quando los neurotransmisores se liberan de los nervios se combinan con sitios especializados de las células postsinápticas para iniciar una cadena de acontecimientos que causan los efectos clásicos de este tipo de nervios en un tejido en particular. Estos sitios especializados llamados por Langley "áreas receptoras" o "substancias receptoras", actualmente se denominan simplemente receptores (33).

La noradrenalina, la adrenalina y otras catecolaminas pueden causar excitación o inhibición de la contracción del músculo liso según el sitio, la dosis y la catecolamina elegida. La noradrenalina es la catecolamina más potente y proporcionalmente tiene una baja actividad como inhibidor, a diferencia de la isoprenalina (β -adrenérgico) que presenta una actividad inversa y la adrenalina es relativamente potente como excitante (31,36).

Sobre la base de estas observaciones, Ahlquist en 1948, propuso los términos: alfa (α) y beta (β) receptores, para los sitios de los músculos lisos donde las catecolaminas producen respuestas excitadoras e inhibidoras, respectivamente. Esta clasificación de los receptores se ha confirmado con la comprobación de que ciertos fármacos como la orciprenalina producen bloqueo selectivo de los efectos de los impulsos nerviosos adrenérgicos y de los agentes simpaticomiméticos en los receptores α . Mientras que en otros como el propanolol -- producen bloqueo β -adrenérgico (35,36,37).

Los receptores β pueden dividirse en receptores β -1- (principalmente en corazón) y en receptores β -2 (pulmones, vejiga, hígado, etc.), sobre las bases de la relativa selectividad de los efectos de agentes agonistas y antagonistas (34,35,47).

También parece haber dos subtipos de receptores α -adrenérgicos: los receptores α -1 que tiene probablemente su principal localización en sitios postsinápticos y por eso son responsables de la iniciación de sucesos postsinápticos excitadores. Los receptores α -2 se han localizado en las terminaciones nerviosas presinápticas. La activación de estos receptores produce la inhibición de la liberación del transmisor. En las terminaciones nerviosas adrenérgicas de los receptores α -2 parece mediar la inhibición de la liberación de la norepinefrina por la retroalimentación, mientras que en las terminaciones colinérgicas del tracto gastrointestinal, estos receptores son probablemente -

responsables de los efectos inhibidores de los agonistas α - adrenérgicos. Sin embargo no hay pruebas suficientes que permitan la clasificación de todos los -receptores α -adrenérgicos pre y postsinápticos como grupos farmacológicamente definidos y homogéneos (13,37,39).

Para la activación de los receptorés α es importante la presencia de un - grupo amino cuyo átomo de nitrógeno está protonado a pH fisiológico (7.4). En cambio para los receptores β la activación, depende de la presencia del grupo -OH- en posición meta en el núcleo del catecol y otro en posición β . El grupo amino es muy importante pues establece la diferencia de activación entre los receptores α y β , es decir en caso de que el grupo amino estuviese substituido por un grupo molecular voluminoso, la actividad α -agonista disminuiría -- notablemente y la actividad agonista β se exaltaría (35).

La adrenalina y sus congéneres producen una serie importante de efectos metabólicos, cuyas manifestaciones incluyen: Hiperglucemia, hiperlacticemia, hiperlipemia, mayor consumo de O_2 e hiperpotalasemia (44). El compuesto clave -- que interviene en la medición de estos efectos y de los de un gran número de -- hormonas, es el AMP cíclico (adenosin-3'-5'-monofosfato) (52). La adrenalina - aumenta la acumulación de AMP_c intracelular, activando (por vía de los receptores β) una enzima ligada a la membrana, la adenilciclase que cataliza la conversión del ATP en AMP_c, el cual inicia entonces una serie de actividades intracelulares que determina los efectos metabólicos característicos de las catecolaminas (Fig. 1).

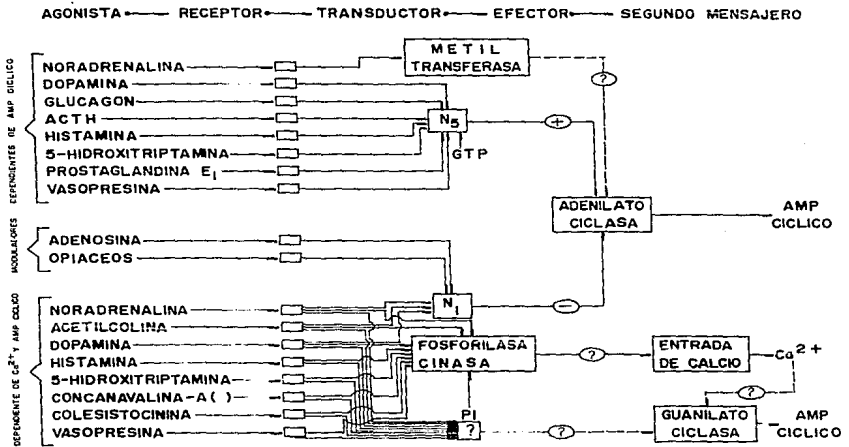


Fig. (1) Representa las diversas formas en las que el AMP_c media el efecto de diferentes sustancias (Berridge, M. J.; 1975)

2.4 PROCESO CONTRACTIL EN EL MUSCULO LISO

El músculo liso de cada órgano suele ser diferente del de los demás en varios aspectos: dimensiones físicas, organización de haces o láminas, tipo de -- respuesta a diversos estímulos, características de la innervación y funciones. -- Sin embargo para simplificar, los músculos lisos pueden dividirse en dos tipos principales: músculo liso de unidades múltiples y músculo liso visceral (16,31).

El músculo liso contiene exactamente las mismas substancias químicas que -- el esquelético, incluyendo a la actina y a la miosina. No tienen la misma dis-- posición especial periódica que se observa en las sarcómeras del músculo esque-- lético, lo cual se refleja en las diferentes respuestas globales entre dos ti-- pos de músculo, por ejemplo: un paso esencial para activar a la ATPasa (depen-- diente del Mg^{++}) de la miosina en el músculo liso, es la fosforilación de la ca-- dena ligera de actina. En el caso del músculo esquelético, la desfosforilación de la cadena ligera de actina para activar a la ATPasa (dependiente del Mg^{++}) -- es el paso esencial (31.16).

Otros estudios en el músculo liso sugieren que para una completa actividad de la ATPasa, aparte de la imprescindible presencia del calcio, son necesarios otros factores tales como: proteínas contráctiles y fosforilación de la cadena ligera, para lograr llevar la actividad enzimática a niveles requeridos que den lugar a la contracción (17.42).

Todo parece indicar que la máxima fuerza a desarrollar por el músculo de-- pendió de un número coordinado de eventos y actividad enzimática, que provoca -- los entrecruzamientos de filamentos y que en el músculo liso. esta tensión es más alta debido a la disposición de los filamentos que actúan paralelamente a lo largo de la célula muscular lisa. Tomando en cuenta la gran relación super-- ficie-volumen, característico de las células de músculo liso y debido al arre-- glo y orientación y filamentos delgados y cortos en el músculo liso, la célula es capaz de acortarse en mayor grado por unidad de área a diferencia del múscu-- lo esquelético, aunque cabe decir que la contracción en el músculo liso se pro-- duce de 4 a 20 veces más lento que el músculo esquelético (17.42).

2.4.1 PAPEL DEL CALCIO EN EL PROCESO DE CONTRACCION DEL MUSCULO LISO

La actividad contráctil es un fenómeno que realizan todos los músculos --

que conforman a los seres vivos y el músculo liso se rige bajo los principios básicos de acoplamiento, excitación-contracción (16-30).

La interacción entre las proteínas contráctiles: actina y miosina es la responsable de la contracción física del músculo liso, y está regulada por la calmodulina que es una proteína estructuralmente similar a la subunidad de calcio-troponina (el papel de la troponina-tropomiosina en el músculo liso, no ha sido bien establecida aún) del músculo esquelético. Esta calmodulina se une a la cadena ligera de miosina-cinasa activandola y conduciendo al músculo liso a la contracción, en presencia de suficientes cantidades de calcio iónico ($10^{-5}M$ a $10^{-7}M$) la calmodulina se disocia de la enzima miosínica cinasa y sucede la desfosforilación (16,23).

La mayoría de las membranas celulares del músculo liso constantemente están sufriendo cambios en la permeabilidad iónica, debido a una continua salida de moléculas neurotransmisores provenientes de los nervios autonómicos. Experimentos realizados en músculo liso sugieren que no existe equilibrio mutuo entre los iones Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , Mg^{++} y Ca^{++} , con respecto al potencial de reposo por lo que cualquier cambio en la permeabilidad de cualquier ión da lugar a un movimiento neto de ese ión dentro y fuera de la célula, lo que provoca los cambios en el potencial de membranas. Esto y el hecho de que el músculo liso tienen muchos mecanismos receptores para moléculas agonistas, permite que ocurran un gran rango de respuestas, pero también significa que poseen una bien desarrollada maquinaria para transportar iones y mantener un equilibrio constante y una filtración de iones dentro y fuera de las células (16, 17, 18).

En el músculo liso como en otro tipo de músculos, los iones calcio están considerados como agentes activadores de la maquinaria contráctil. Los estímulos que inducen a la contracción de este músculo, son responsables de iniciar reacciones celulares que permiten un incremento en la concentración de calcio libre citoplasmático el cual activará las proteínas contráctiles para producir el fenómeno de la contracción (Fig. 2).

Este calcio se ha localizado en la mitocondrias, el retículo sarcoplásmico y el núcleo (16,17,20,21).

Los iones calcio penetran desde el fluido extracelular hacia las células musculares lisas mediante un gradiente electroquímico cuando la membrana es despolarizada y la permeabilidad al calcio aumenta. También penetra en respuesta a la activación de receptores de membrana de varios agonistas (acoplamiento estímulo-permeabilidad) tales como: adrenalina, noradrenalina, isoprenalina, etc., (probablemente a través de un mecanismo que funciona operado por el receptor (17)).

Al penetrar los iones calcio a la célula (Ca^{++} extracelular) favorecen la liberación del calcio que está almacenado en cisternas o depósitos (Ca^{++} intracelular), lo que trae como consecuencia que los niveles de calcio en el interior de la célula se eleven de una concentración de 10^{-7} M a 10^{-5} M. Cuando esto sucede se activa la maquinaria contráctil y sobreviene la contracción. No obstante, es probable que el calcio que entra del exterior es rápidamente tomado por almacenes intracelulares (lo que implica que el calcio externo es necesario para llenar los depósitos internos), para ser utilizados posteriormente en el momento de la liberación del mismo (17,31).

También se ha sugerido que el sodio pudiera jugar un papel importante en el control del calcio intracelular (captación-expulsión) mediante un sistema de intercambio sodio-calcio dependiente del ATP, que pudiera expulsar al calcio cerca de la membrana celular de una manera similar a la descrita en células sanguíneas (17).

Por otro lado es importante señalar que el calcio unido a la superficie externa de la membrana plasmática, juega un papel como estabilizador que regula principalmente la conductancia al sodio. Sin embargo, el calcio unido a la membrana puede ser utilizado como fuente de iones calcio que acarrean carga a través de la membrana, favoreciendo la ocurrencia del potencial de acción (42).

Ahora bien. ¿Cuál es el mecanismo por el cual los iones calcio penetran al interior de la célula?

Se ha propuesto que el aumento de calcio intracelular en el músculo mismo sea:

- a) A través de vías de entrada al calcio (canales de Ca^{++}) operados por el receptor de membrana donde probablemente la activación de éstos -

receptores está relacionado con la modificación del metabolismo del fosfatidil - inositol. y de ésta manera se abran o activen las vías de entrada de Ca^{++} (53) (Fig. 3).

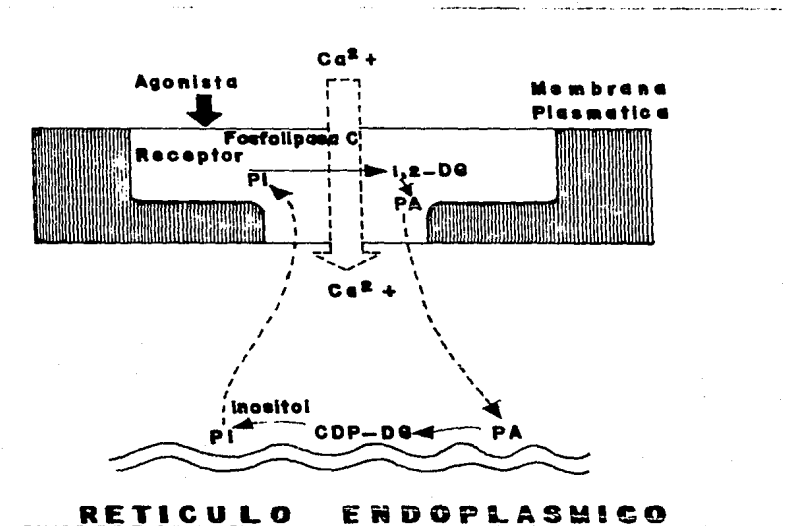


Fig. 3 Metabolismo del fosfatidilinositol en respuesta a la activación - de los receptores de membrana por agonistas apropiados, PI (fosfatidilinositol); PA (ácido fosfatídico); DG (diacilglicerol); modificado de Michall, 1975. (Holub, J.B., 1980).

b) A través de vías de entrada de calcio, dependientes del voltaje. Estas -- vías se han propuesto que se activan por despolarización de la membrana del -- músculo liso por medio de soluciones despolarizantes de K^+ (40-70 mM de KCl). A esta vía se le conoce generalmente como "canales lentos de calcio". Se han -- realizado estudios al respecto en células nerviosas tales como en los axones -- gigantes del calamar, en el axón del invertebrado *Aplysia*, en la membrana del -- fotorreceptor de la lapa, en células de músculo liso y músculo cardíaco de -- algunos vertebrados, en células secretoras tales como las del islote de páncreas -- y células secretoras de moco del "pie" del calamar *Ariolimax*, en células clo -- nales aisladas de tumores de pituitaria anterior de rata y en líneas celulares -- de feocromocitoma de rata (PC12). En todas estas células se ha demostrado la -- existencia de estas vías específicas de entrada de calcio, cuando ofrecen un -- potencial de acción en respuesta a un incremento del calcio (43). Estos cana -- les se caracterizan porque son susceptibles de ser bloqueados por sustancias -- denominadas bloqueadores de canales de calcio (para substancias de carácter -- inorgánico) y antagonistas del calcio (para substancias de carácter orgánico).

Se ha visto que al ser bloqueadas estas vías, la concentración de calcio -- intracelular (Ca_i), no se puede incrementar, por lo que es imposible que la ma -- quinaría contráctil se pueda activar, por lo tanto no puede haber contracción -- (23,43,53).

Los bloqueadores de los canales de calcio que se conocen son el: Co^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} , Cd^{++} , La^{++} , Mg^{++} , bloquean la entrada de canales de calcio. Y los antagonis -- tas de calcio tales como el Verapamil (Fig. 4), Nifedipina, Diltiazem e Ipo -- ve -- ratriil, inhiben la respuesta de substancias agonistas, responsables de inducir -- el fenómeno de la contracción (17,22,25,43).

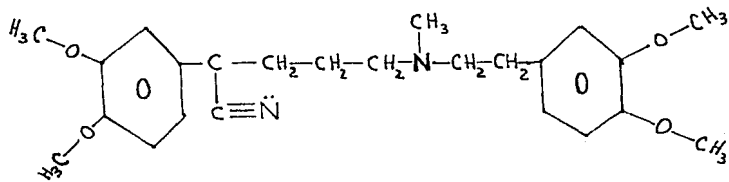


Fig. 4 Estructura química del Verapamil

Se han realizado estudios en diferentes músculos lisos en donde se ha probado lo anterior. En el miometrio de rata preñada, el efecto α -adrenérgico es abolido por la presencia de La^{++} , la cual tiene la capacidad de desplazar al calcio, previniendo así el flujo transmembranal (24). En células cardiacas se ha demostrado que el Verapamil (agente vasodilatador usado en terapia cardiovascular) inhibe la entrada de calcio a través de canales lentos de calcio, previniendo así el entrecruzamiento de los filamentos de proteínas contráctiles de manera que no se produce la sístole y se modifica la funcionalidad cardiaca (23). Los efectos inhibidores o relajantes de la Nifedipina, fueron estudiados sobre la actividad uterina en mujeres sanas y sobre tejido miometrial ("in vivo" e "in vitro" respectivamente) y se observó que la actividad se reduce considerablemente al disminuir la amplitud y la frecuencia de las contracciones; debido a lo anterior se le considera como una alternativa terapéutica muy interesante, en situaciones donde se desea disminuir esta actividad uterina (en casos de dismenorrea primaria) (22). Los efectos producidos por ciertos bloqueadores de canales de calcio como el Cd^{++} , ha resultado a veces dañino e irreversible, ya que los efectos devastadores de esta substancia se observaron a nivel vascular y en las células espermatogonias en animales de experimentación a los cuales se les fué administrado Cd^{++} por vía intramuscular, lo que trajo como consecuencia una disminución en la tasa de fertilidad. También se ha observado en el músculo liso del --útero, que el Cd^{++} inhibe la respuesta contráctil inducida por acetilcolina (20, 25).

2.5 APARATO REPRODUCTOR DE LA RATA MACHO

En la mayoría de los mamíferos, el aparato reproductor tiene las mismas caracteristicas anatómicas y funcionales, pero varía con la especie. El aparato reproductor de la rata macho está constituido de las siguientes partes, como se observa en la Fig.5:

- a) vesccula seminal
- b) próstata
- c) glándulas bulbouretrales (glándula coagulante, glándulas ampulares, uretrales y lóbulos prostticos)

- d) conducto deferente
- e) epidídimo
- f) testículos
- g) uretra
- h) pene

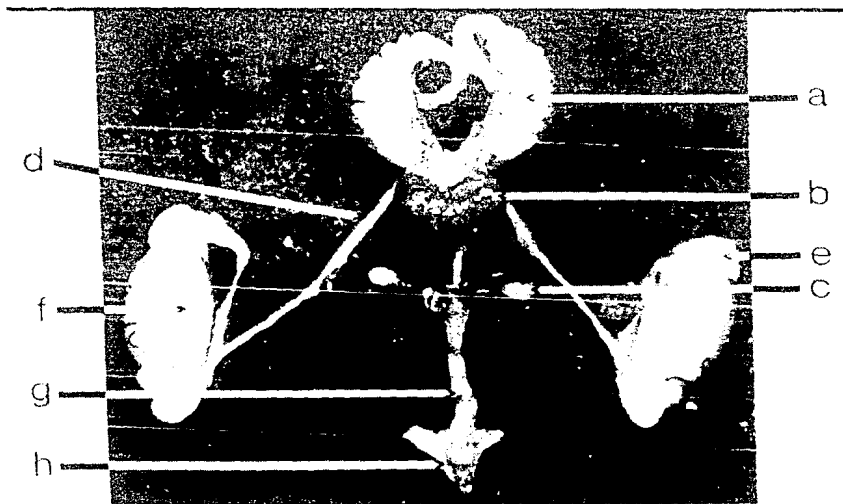


Fig. 5 Aparato reproductor de la rata macho (disección de laboratorio) donde se muestran las principales partes que lo conforman: a)vesícula seminal b)próstata c)glándulas bulbouretrales d)conducto deferente e)epidídimo- f)testículos g)uretra h)pene.

Una diferencia fundamental que se observa en el aparato reproductor de la rata macho con respecto al del hombre, es la presencia de una glándula coagulante cuya función es asegurar la fertilización del óvulo, mediante la secreción de un tapón mucoso que bloquea la entrada vaginal y que en el momen-

to del coito provoca que el semen que ha entrado, no pueda salir al exterior; este fenómeno no ocurre en el hombre ya que carece de esta glándula (3,26).

No obstante existe un órgano clave para el proceso de la reproducción: el epidídimo ó ducto Wolffiano análogo, que es común en todos los mamíferos, aves y reptiles (2,4,11)

El epidídimo en la rata macho es un órgano que está constituido por un -- conducto altamente plegado y que en la rata macho adulta mide de 3.5 a 3.6 metros de longitud. Este conducto se ha dividido convencionalmente en tres regiones: Cabeza (caput), Cuerpo (corpus) y Cola (cauda) y a la vez se ha dividido-histológicamente en seis zonas, las cuales están diferenciadas en base a las - células básicas que las constituyen:

Región de la Cabeza: comprende las zonas 1,2,3 y parte de la 4

Región de l Cuerpo: comprende restos de la zona 4

Región de la Cola: comprende las zonas 5 y 6 terminando en la unión con el duc to deferente.

Las variaciones citológicas de estas regiones y zonas y la actividad enzimática específica (enzimas que biodegradan a la testosterona), revela en alto grado la actividad bioquímica desarrollada en el interior de cada una de ellas, - todo esto para el desarrollo óptimo de los espermatozoides (10,11,39).

Una característica muy importante de este conducto epididimal es que es - un órgano andrógeno-dependiente. Esto ha sido demostrado en diferentes especies animales en donde el mantenimiento de la morfología normal y función del epidídimo, dependen de hormonas andrógenas; por lo que si se llegara a retirar el estímulo androgénico por castración, se produciría una marcada alteración estructural y disminución de las funciones en el aparato reproductor, las cuales pueden ser revertidas por la administración de compuestos androgénicos exógenos (3,5,38).

2.5.1. FUNCIONES DEL EPIDIDIMO

El epidídimo es el órgano de maduración y almacenamiento de los espermatozoides (producidos en los tubulos seminíferos) (27). Una parte de estos es-

permatozoides esta almacenado en la luz de los túbulos seminíferos y otra parte pasa a través de los conductos aferentes y deferentes, desde la red de Hayer y acompañado de las secreciones propias del eyaculado se depositan en el epidídimo (5,11). Durante este periodo de almacenamiento, los espermatozoides permanecen inactivos, debido a que liberan grandes cantidades de CO_2 y otros productos ácidos que deprimen intensamente la motilidad, pudiendo vivir hasta un mes en los túbulos seminíferos y en el epidídimo hasta ser eyaculados. Estos espermatozoides están expuestos a cambios anatómicos, bioquímicos y funcionales durante su trayectoria en el interior del conducto epididimal. Por lo que una de las funciones principales que lleva a cabo el epidídimo, es la de capacitar a los espermatozoides para que tengan poder fertilizante, mediante:

- a) Un proceso de maduración
- b) Transporte, depósito y selección de gametos masculinos
- c) Síntesis y secreción de hormonas esteroideas y otros productos, así como la absorción de fluidos a través de las membranas celulares.

con el fin de lograr hacer de ellos células viables para la fertilización (11, 26, 39, 40).

Una vez ocurridos los fenómenos de maduración en los espermatozoides, estos son transportados de la cabeza del epidídimo hacia la cola, mediante las contracciones peristálticas autónomas las cuales proporcionan la fuerza motora necesaria para el transporte. Ahí los espermatozoides son retenidos y almacenados en estado funcional durante varias semanas.

La integridad estructural, la adquisición de la capacidad fertilizante y la viabilidad de los espermatozoides, dependen de hormonas androgénicas (11, 15, 39, 40).

En el epidídimo también existe una actividad absorción de fluidos a través de la membrana, sobre todo de las moléculas y compuestos de bajo peso molecular. Este factor de permeabilidad actúa por diferentes mecanismos de transporte a través del epitelio epididimal, que son esenciales para un buen funcionamiento del intercambio de moléculas del exterior al interior y viceversa (41).

Algunos procesos que conducen a la maduración y viabilidad de los espermatozoides son: el transporte de la carnitina en la cabeza y cuerpo epididimal, la entrada de glucosa por difusión facilitada y el movimiento controlado de iones inorgánicos a través del epitelio, que además contribuyen en forma importante

te para el proceso de contracción (11,17).

2.5.2. INERVACION AUTONOMICA EN EL MUSCULO LISO EPIDIDIMAL

La actividad contráctil en el músculo liso se encuentra íntimamente relacionada con la inervación directa del SNA. La inervación de la mayoría de las células musculares lisas puede causar tanto efecto excitatorio como inhibitorio, que depende de la activación de los receptores α δ β , situados sobre la membrana celular muscular. El carácter de la respuesta de estos receptores, está bajo la influencia de hormonas y otros factores que son determinados por las condiciones de las células. Esto es: la ausencia de respuesta contráctil del músculo liso inducida por un α -agonista como la adrenalina, cuando no existe calcio externo. O por el contrario, la respuesta contráctil de segmentos de músculo liso inducida por adrenalina, posiblemente pueda ser explicado a través de la suposición de que la adrenalina al unirse a los receptores específicos (α -adrenérgicos) promueve el movimiento controlado de calcio externo cerca de la membrana celular lo que resulta en una acumulación de calcio cerca de la superficie de la membrana plasmática, donde se incrementa la permeabilidad al calcio (24).

El músculo liso de los órganos internos del aparato reproductor del macho están inervados por terminales adrenérgicas cortas que difieren en varias propiedades fisiológicas y farmacológicas con las neuronas adrenérgicas "largas"-convencionales. En el epidídimo, especialmente en la región de la cola, existe este tipo de neuronas "cortas". La distribución de estas fibras varía a lo largo del conducto epididimal, es decir es menos densa en el conducto deferente y en las partes proximales del ducto epididimal, mientras que se va haciendo más densa en la región de la cabeza y un poco más en la región del cuerpo hasta que adquiere una abundante densidad en la región de la cola (9,12).

Por su tipo de inervación autónoma, el ducto epididimal tiene una capacidad inherente para la contracción rítmica. Además otros estudios fisiológicos realizados en la parte superior del ducto epididimal, reportan que esta actividad contráctil puede estar controlada por hormonas circulantes, mientras que en la parte baja (cuerpo y cola) el control neuronal es más preciso, debido a la

inervación más abundante (7).

Las investigaciones realizadas "in vivo" sobre el epidídimo de rata en relación a la actividad contráctil, probando diferentes fármacos autonómicos, demostraron que existe una respuesta tanto a agentes α -adrenérgicos (adrenalina noradrenalina, etc.) como a agentes β -adrenérgicos (oxiprenalina); así como también con la acetilcolina lo que sugiere la existencia de adrenoceptores α y β , de naturaleza estimulatoria y receptores colinérgicos también de naturaleza excitatoria (9).

Todo parece indicar que la inervación autónoma (simpática y parasimpática) juega un papel muy importante sobre la actividad contráctil del epidídimo, controlando funciones específicas de esta actividad, como el fenómeno de la eyaculación.

Recientemente se ha propuesto que durante la eyaculación, la región distal (cola) sufre una fuerte contracción, la cual se ha asociado con la activación de los receptores α -adrenérgicos presentes en la membrana celular de las fibras musculares de la cola del epidídimo (9,15,46).

Generalmente se acepta que la función de la actividad contráctil, es responsable del transporte de los espermatozoides, desde los túbulos seminíferos hacia el epidídimo y a la próstata. Además de propulsar el semen dentro de la uretra durante el reflejo de emisión; también se encarga de eliminar a los espermatozoides no eyaculados hacia los conductos urinarios y finalmente de expulsar los espermatozoides en el momento de la eyaculación cuando se produce una fuerte contracción de la cola, sitio donde se almacenan los espermatozoides que van a servir para la fecundación (9,15).

A continuación mostramos en la Fig. 6 un cuadro que engloba los posibles factores que creemos que intervienen en la regulación de la actividad contráctil de la cola del epidídimo.

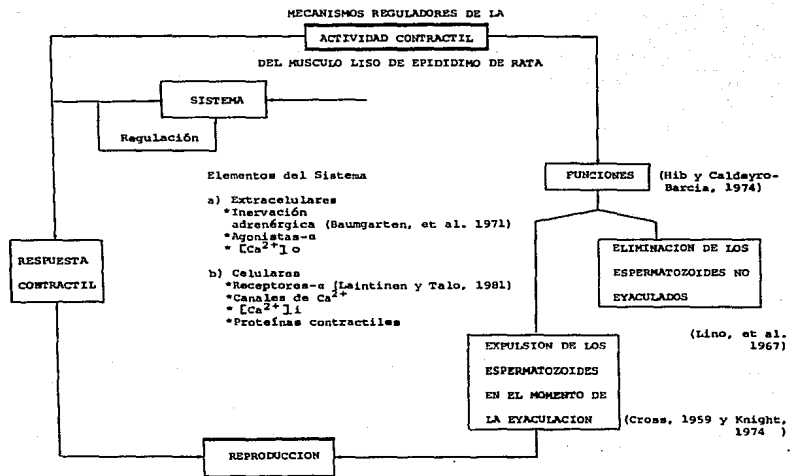


FIG.6 . El esquema representa una serie de factores que se interrelacionan entre sí para redundar finalmente en el fenómeno de la reproducción.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad aún permanecen oscuros algunos aspectos fisiológicos relacionados con la reproducción, ya que la investigación en este campo ha mostrado que tales aspectos, varían de especie a especie. En el caso particular del funcionamiento fisiológico del músculo liso epididimal no hay muchos estudios al respecto. Se han realizado algunos trabajos sobre tejido muscular liso del conducto deferente y epididimal de la rata, cobayo, ratón, etc., en los cuales se ha probado el efecto de fármacos de índole autónomo y ciertas drogas. Pero aunque se han hecho este tipo de estudios de investigaciones, el mecanismo básico de la neurotransmisión y las bases iónicas de la contracción en la región de la cola del epidídimo bajo condiciones "in vitro", ha sido poco estudiada (9,15,46,49).

Por otro lado cabe mencionar que si bien es cierto que día a día los estudios de investigaciones enfocados a este terreno son muchos y muy variados, también es cierto que paralelamente se realizan estudios enfocados a "controlar" - un proceso acelerado que es consecuencia del mismo fenómeno de la reproducción: la actual sobrepoblación y que en nuestro país representa un grave problema, ya que todavía existe una gran mayoría de la población en donde la educación y las tendencias religiosas son un tope que impide que tanto la mujer como el hombre, usen medidas anticonceptivas (66,65)

Aún hoy en día es muy común que el uso de anticonceptivos este destinado - exclusivamente para la mujer, ya que aún cuando para el hombre ya existen varios métodos anticonceptivos tales como píldoras, aerosoles y la vasectomía, todavía se muestra renuente a someterse a estas medidas preventivas de concepción, por lo que difícilmente suelen usar los anticonceptivos (28,4)

Por ello un estudio fisiológico enfocado a conocer los mecanismos básicos de la contracción del conducto epididimal podría proporcionar información que de algún modo sirviera para el desarrollo de nuevas formas de anticoncepción - en el macho, así como, también fomentar la creación de nuevos agentes terapéuticos.

4. HIPOTESIS

La actividad contráctil del músculo liso de la cola del epidídimo de rata, es inducida por la activación de los receptores α -adrenérgicos presentes en la membrana celular, por lo que tal fenómeno, producirá un aumento de la entrada de Ca_{ex} a través de vías específicas lo que provocará que entre en funcionamiento la maquinaria contráctil. Pero si estas vías específicas son bloqueadas entonces el Ca_i no se incrementará y no se producirá ninguna respuesta contráctil al estímulo adrenérgico.

5. OBJETIVOS

Para corroborar ó rechazar la hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

- 5.1 Determinar la curva dosis-respuesta de la adrenalina sobre segmentos de cola de epidídimo de rata.
- 5.2 Determinar la dependencia al calcio extracelular de la respuesta contráctil del epidídimo, inducida por adrenalina en presencia o ausencia de calcio.
- 5.3 Determinar si el Sr^{++} y el Ba^{++} , sustituyen al calcio en el fenómeno de acoplamiento excitación-contracción.

6. MATERIAL Y METODOLOGIA

cajas de petri (15 X 100 mm)
frascos ámbar de boca ancha (250 y 500 ml)
matraces aforados (5-10-100-500 y 1000 ml)
pipetas graduadas (0.1-0.2-1-2-5-10- y 20 ml)
probetas (50-100- y 500 ml)
vasos deprecipitados (50-100-250-500 y 1000 ml)

agujas hipodérmicas desechables (23 x 14 mm)
escobillones para matraces
espátulas de acero (3 pulgadas de largo)
estuche de disección
gasa
hilo quirúrgico (000)
jeringas desechables (10 ml)
manguerillas de hule con boquilla de plástico
mangueras de hule (2 mm de diámetro)
marcadores de tinta permanente
papel aluminio
pisetas de plástico (125-500 ml)
recipientes de plástico con tapa (125-500-1000 ml)
tapones de hule con horadaciones

EQUIPO

baño circulador con bomba (LAB-LINE)
baño metabólico (LAB-LINE)
balanza analítica (SARTORIUS)
balanza granataria (OHAUS)
jeringas de vidrio (adaptadas para baño de incubación)
transductor de tensión (GRASS FT-03)
placa de agitación magnética con agitador (LINDBERG)

polígrafo para registro (GRASS 7B)
 potenciómetro (BECKMAN)
 refrigerador doméstico (ACROS)
 tanque con mezcla gaseosa de 95% O₂/5% CO₂

REACTIVOS

agua deionizada
 bicarbonato de sodio (BAKER)
 bitartrato de adrenalina (BAKER)
 cloruro de bario (BAKER)
 cloruro de estroncio (BAKER)
 cloruro de calcio (BAKER)
 cloruro de cobalto (BAKER)
 cloruro de potasio (BAKER)
 cloruro de magnesio (BAKER)
 cloruro de sodio (BAKER)
 dextrosa (Sigma Co.)
 Verapamil (Knoll, Lab)

6.1 SOLUCIONES Y FARMACOS UTILIZADOS

* Solución Ringer Krebs-bicarbonato/normal (R-normal) (55)

<u>substancia</u>	<u>concentración</u> (mM)
NaCl	18.8
KCl	4.7
MgCl ₂	1.2
CaCl ₂	2.5
NaHCO ₃	23.8
KH ₂ PO ₄	1.2
glucosa	5.5

ajustada a pH 7.4

*Solución Ringer Kreks-bicarbonato/calcio (R-Ca)

Es de composición igual a la anterior (R-normal), pero para fines descriptivos se le designó R-Ca (ver más adelante en metodología)

* Solución Ringer Krebs-bicarbonato/sin calcio (R-sin calcio)

<u>substancia</u>	<u>concentración (mM)</u>
NaCl	18.8
KCl	4.7
MgCl ₂ *	3.7
NaHCO ₃	23.8
KH ₂ PO ₄	1.2
glucosa	5.5

ajustada a pH 7.4

*se omitió el CaCl₂ y se aumentó el MgCl₂.

A esta solución se le agregó ECTA (100 uM) para disminuir las trazas de calcio existentes en la solución (24).

Como el cambio en la concentración externa de cualquier ión en una solución -- puede alterar la permeabilidad de la membrana a otros iones, se aumentó en forma isomolar la concentración de MgCl₂, para evitar la despolarización y disminución de la resistencia de la membrana (67)

* Solución Ringer Krebs-bicarbonato/estroncio (R-Sr)

Es de composición semejante a R-Ca sólo que aquí se sustituyó isosmolarmente al Ca por el Sr (2.5 mM). Ajustada a pH 7.4.

* Solución Ringer Krebs-bicarbonato/sin estroncio (R-sin Sr)

Es de composición semejante a R-sin Ca. Ajustada también a pH 7.4

* Solución Ringer Krebs-bicarbonato/bario (R-Ba)

Es de composición semejante a R-Ca, sólo que aquí se sustituyó isosmolarmente - al Ca por Ba (2.5 mM). Ajustada también a pH 7.4

* Solución de adrenalina (A)

<u>substancia</u>	<u>concentración (M)</u>
bitartrato de adrenalina	10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁵
	10 ⁻⁴ 10 ⁻³ 10 ⁻²

Se preparó una solución madre(STOCK) de bitartrato de adrenalina (333.6 mg/100-ml) en solución R-normal recién preparada.

* Solución de cobalto

<u>substancia</u>	<u>concentración (mM)</u>
-------------------	---------------------------

cloruro de cobalto	1.0
--------------------	-----

Esta solución se preparó diariamente con R-normal

* Solución de Verapamil

<u>substancia</u>	<u>concentración (μM)</u>
-------------------	--

Verapamil	0.1
-----------	-----

Esta solución se preparó diariamente con R-normal

6.2 METODOLOGIA

6.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Se utilizaron ratas macho adultas (3 meses de edad promedio) de la cepa - Sprague-Dawley con un peso entre 250-300 gramos.

Los animales fueron mantenidos higiénicamente en cajas de poliuretano formando grupos de 6, en un cuarto a temperatura de 21-22°C. El alimento consistió en comida especial para roedores marca Purina y agua ad libitum.

A los animales se les sacrificó por decapitación y fueron diseccionados: los testículos, los epidídimos y los conductos deferentes y de ahí se colocaron inmediatamente en una solución Ringer krebs-bicarbonato/normal, ajustada a pH 7.4, con burbujeo de una mezcla gaseosa de 5% CO₂ en O₂.

Una vez que se aislaron los epidídimos y fueron liberados del tejido conjuntivo que los envolvía, se perfundieron por la parte del conducto deferente - con ayuda de una jeringa desechable cargada con solución R-normal.

Ya lavados todos los conductos, se obtuvieron segmentos de un centímetro - de longitud (10 mm), los cuales fueron cortados a una distancia de 10 cm de la unión del conducto deferente con la región de la cola del epidídimo (Fig.7).

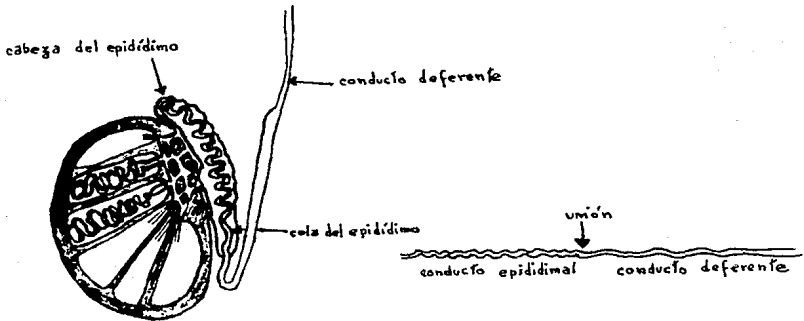


Fig. 7. Obtención de los segmentos del conducto epididimal para los experimentos.

6.2.2. METODO DE REGISTRO

Los segmentos de 1 cm de longitud de cola de epidídimo de rata, se montaron en un baño de incubación para registro de actividad contráctil isométrica, sujetando con un hilo de seda (000) ambos extremos del segmento. Una punta se unió a la base del baño de incubación y el otro extremo se unió al transductor de tensión. Cada cámara de incubación tenía un volúmen de 5 ml de solución R-normal, burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 en O_2 y a una temperatura constante de 37°C (fig. 8).

El tejido se tensionó a 100 mg y antes del desarrollo de cada protocolo experimental, se dejó estabilizar por un período de una hora. Una vez establecido el período de equilibrio del tejido, se inició el registro de las contracciones espontáneas en un lapso de 10 minutos, registros que fueron utilizados como controles.

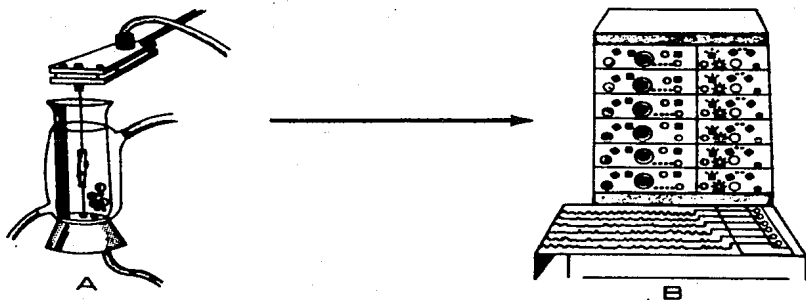


Fig.8. Representa : A) cámara de incubación y B) transductor de tensión. con tejido.

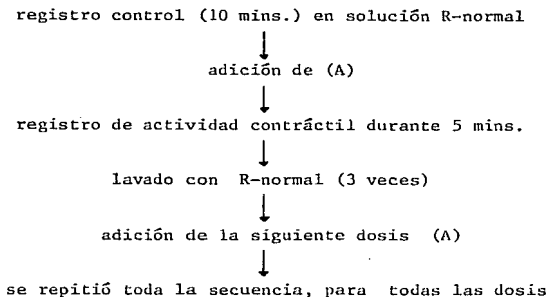
6.2.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Construcción de la curva dosi-respuesta

Se utilizó un grupo de 6 segmentos de cola de epidídimo para este protocolo experimental. A cada uno de los segmentos colocados en los baños de incubación, se le fué agregando la solución de (A)*, en dosis crecientes, comenzando por la dosis más baja (10^{-8} M) hasta construir la curva.

* Adrenalina

DIAGRAMA DE TRABAJO

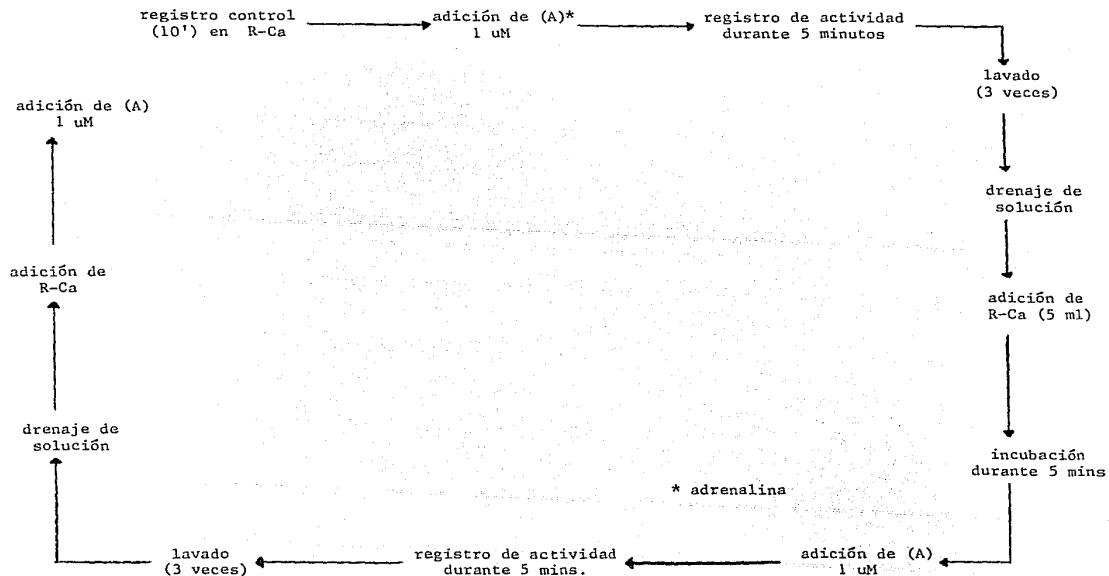


B) Determinación de la dependencia al calcio extracelular de la respuesta contráctil de la cola de epidídimo, inducida por (A).

Para este protocolo experimental se utilizó un grupo de 6 segmentos de cola de epidídimo de rata. A cada uno de los segmentos colocados en los baños de incubación se le agregó $1 \mu\text{M}$ de (A)* bajo las siguientes condiciones de incubación:

*esta concentración de (A) $1 \mu\text{M}$ fué la dosis con la cual se obtuvo la respuesta máxima al construir la curva dosi-respuesta y correspondió a 1×10^{-6} M.

MEDIO CON CALCIO ——— SIN CALCIO ——— RESTAURACION DE CALCIO

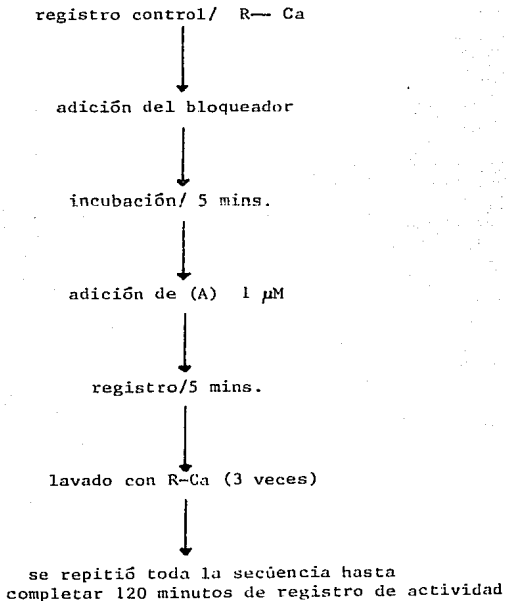


La secuencia del diagrama se repitió, hasta completar 180 minutos de registro de actividad.

C) Determinación del efecto que producen los bloqueadores de canales de calcio, sobre la contracción inducida por (A) $1 \mu\text{M}$.

Para este protocolo experimental se utilizó un grupo de 8 segmentos de cola de epidídimo de rata. A un grupo de 4 segmentos de tejido se le incubó con la dosis inhibitoria 50 (DI-50) de cloruro de cobalto (1 mM). Y al otro grupo se le incubó con la DI-50 de Verapamil ($0.1 \mu\text{M}$), siguiendo el orden del siguiente diagrama de trabajo:

DIAGRAMA DE TRABAJO

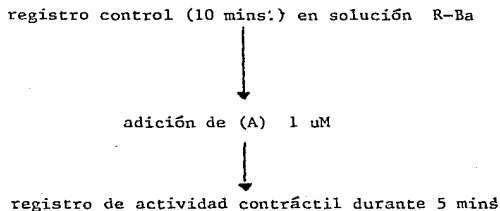


D) Determinación del efecto producido sobre el fenómeno de contracción debido al reemplazo de Sr^{++} y Ba^{++} en los medios de incubación.

Para este protocolo experimental se utilizó a un grupo de 6 segmentos de - cola de epidídimo de rata. A cada uno de los segmentos colocados en los baños - de incubación, se le agregó 1 μM de (A) bajo las siguientes condiciones de incubación: (ver diagrama de trabajo en la siguiente página)

DIAGRAMA DE TRABAJO

Medio de incubación: R-Ba



NOTA: debido a las características que presentó este ión en el medio de incubación (ver resultados) sólo se siguieron los pasos anteriores.

6.3 PROCESAMIENTO DE DATOS

De los registros obtenidos en los protocolos experimentales, se obtuvieron las áreas bajo la curva; con ayuda de un planímetro de Hruden y se calcularon - los promedios y desviaciones estandar para cada medición.

Los resultados se sometieron a la prueba "t" Student, para estimar y con - trastar las medias poblacionales bajo la suposición de que los datos siguieron - una distribución normal.

7. RESULTADOS

7.1 CURVA DOSIS RESPUESTA DE ADRENALINA EN SEGMENTOS DE COLA DE EPIDIDIMO DE RATA.

De la administración de adrenalina en dosis crecientes sobre músculo liso de la cola de epidídimo de rata, se obtuvieron respuestas contráctiles graduales que correspondieron a una curva dosis-respuesta de tipo sigmoide (Fig.9).

La Fig.10 muestra la curva dosis-respuesta sobre la cual se calculó gráficamente la DE-50 que correspondió a la concentración de 8×10^{-7} M. También se muestra la concentración de adrenalina sobre la cual se obtuvo la respuesta máxima y que correspondió a 1×10^{-6} M. La Fig. 11 muestra el registro obtenido al aplicar la concentración de adrenalina $1 \mu\text{M}$ (1×10^{-6} M) en donde se observó un incremento en la tensión basal y frecuencia de las contracciones.

7.2 DEPENDENCIA AL CALCIO EXTRACELULAR DE LA RESPUESTA CONTRACTIL DEL EPIDIDIMO INDUCIDA POR ADRENALINA

7.2.1 Adición de adrenalina $1 \mu\text{M}$ sobre segmentos de cola de epidídimo en diferentes medios de incubación con calcio.

En la Fig.12-A se muestra el registro de las contracciones producidas por el músculo liso, al adicionar la adrenalina en un medio con calcio y en un medio sin calcio y se observó como en un medio sin calcio (R-sin Ca) la adrenalina fué incapaz de producir incremento en la actividad contráctil del músculo. Y por el contrario, en un medio con calcio (R-Ca), la respuesta a la adrenalina se recuperó (6.46 VS 0.74 ; $P < 0.001$).

La diferencia entre la respuesta inicial con R-Ca v con R-sin Ca, se muestra en la Fig .13. la cual fué significativamente diferente ($P < 0.001$): mientras que en la respuesta contráctil al restituir al calcio al medio fué semejante al control.

7.2.2 Incubación de los segmentos de cola de epidídimo en presencia de bloqueadores de canales de calcio.

En la Fig.14-A se muestra el registro de la respuesta del músculo antes y des -

pués de la incubación con cobalto, y se observó como la respuesta contráctil a la adrenalina fué abolida en un 50% aproximadamente.

En la Fig.14-B se observa un fenómeno similar, cuando se incuban los segmentos en presencia de Verapamil, la respuesta a la adrenalina se inhibe un 50% aproximadamente.

7.3 EFECTO DE LA SUSTITUCION DEL CALCIO POR LOS IONES ESTRONCIO Y BARIO EN EL FENOMENO DE ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION

7.3.1. Adición de adrenalina $1 \mu\text{M}$ sobre segmentos de cola de epidídimo en un medio con estroncio.

En la Fig.12-B se muestra el registro de la respuesta contráctil inducida por adrenalina a la dosis de $1 \mu\text{M}$ en presencia y ausencia de estroncio. En un medio donde se sustituyó al Ca^{++} por Sr^{++} , la adrenalina produjo respuesta contráctil del músculo liso. Por otro lado cuando se restaura estroncio al medio, después de incubación con R-sin Sr, la respuesta a la adrenalina se recupera.

La diferencia entre la respuesta inicial con R-Sr y con R-sin Sr se muestra en la Fig.15, la cual fué significativamente diferente (6.90 VS 1.02 ; $P < 0.001$). Mientras que en la respuesta contráctil al restituir el estroncio al medio, --- fué semejante al control.

7.3.2 Adición de adrenalina $1 \mu\text{M}$ sobre segmentos de cola de epidídimo de rata en un medio con bario.

En la Fig.12-C se muestra el registro de las contracciones espontáneas producidas por el músculo cuando se sustituyó al calcio por bario, en donde inicialmente se produce una fuerte contracción, la cual fué disminuyendo debido a la falta de calcio en el medio externo, bajo estas condiciones al adicionar adrenalina, no se observó ningún efecto de contracción del músculo liso de la cola de epidídimo.

Las diferentes respuestas de los segmentos de cola de epidídimo de rata en medios de incubación de: R-Ca R-Sr y R-Ba inducidos por adrenalina $1 \mu\text{M}$, se observa en la Fig.16, en donde se aprecia que entre la respuesta contráctil con R-Ca y R-Sr no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$). Mientras que con respecto a la respuesta obtenida con R-Ba, si hubo diferencia significativa (6.46 VS 0.54; $P < 0.001$ y 6.90 VS 0.54 ; $P < 0.001$)

CURVA DOSES RESPUESTA DE COLA
DE EPIDÍDIMO DE RATA "in vitro"
A LA ADRENALINA

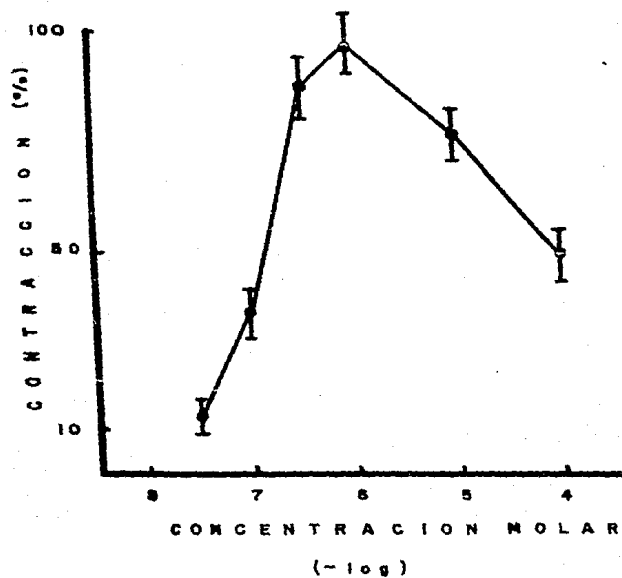


Fig.9 Curva dosis-respuesta correspondiente a la acción de la adrenalina sobre el tono, de segmentos de cola de epidídimo de rata. Obsérvese la concentración de adrenalina con la que se obtuvo la respuesta máxima ($1 \times 10^{-6} M$)

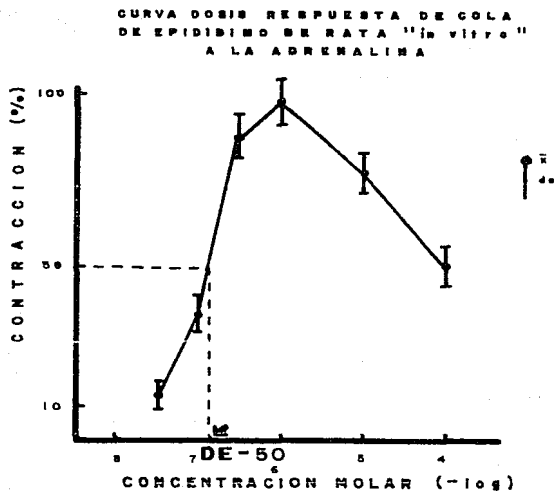


Fig.10 Curva dosis-respuesta correspondiente a la acción de la adrenalina sobre segmentos de cola de epidídimo de rata de la cual se obtuvo gráficamente la DE-50 que correspondió a la concentración de 8×10^{-7} M.

RESPUESTA CONTRACTIL DE LA CAUDA DE
EPIDIDIMO DE RATA "in vitro" A $1 \mu\text{M}$
DE ADRENALINA

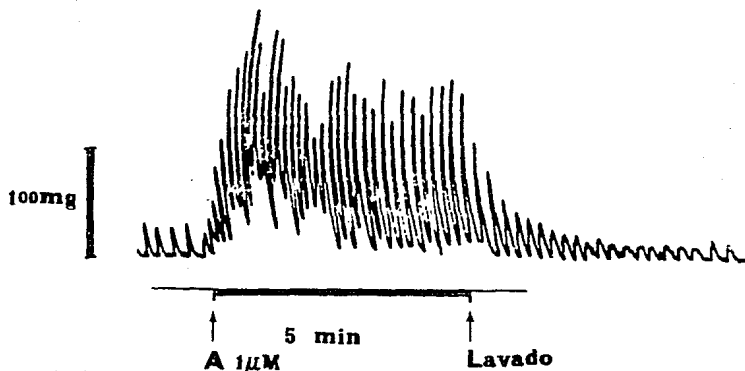


Fig. 11 Registro de la contracción muscular de la cola de epidídimo de rata en --
respuesta a el estímulo adrenérgico de la adrenalina. Obsérvese el aumen
to de amplitud y frecuencia con respecto al control, que produjo $1 \mu\text{M}$ --
de adrenalina.

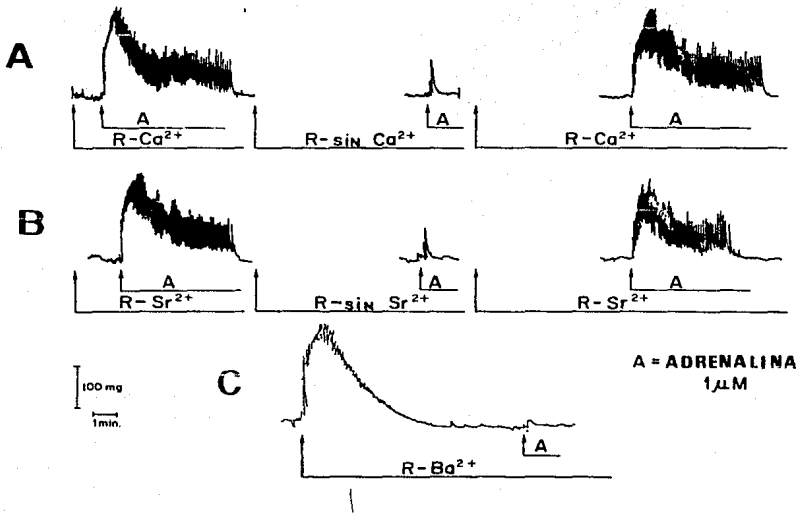


Fig.12 Respuesta contráctil de segmentos de cola de epidídimo en diferentes medios. A) respuesta al estímulo adrenérgico en un medio con: calcio-sin calcio-restitución del calcio. B) respuesta al estímulo adrenérgico en un medio con: estroncio-sin estroncio-restitución del estroncio y C) respuesta al estímulo adrenérgico con bario. Obsérvese como la respuesta se deprime en ausencia de calcio y estroncio, y se recupera al retornar las iones al medio. En el caso del bario la respuesta se deprime considerablemente.

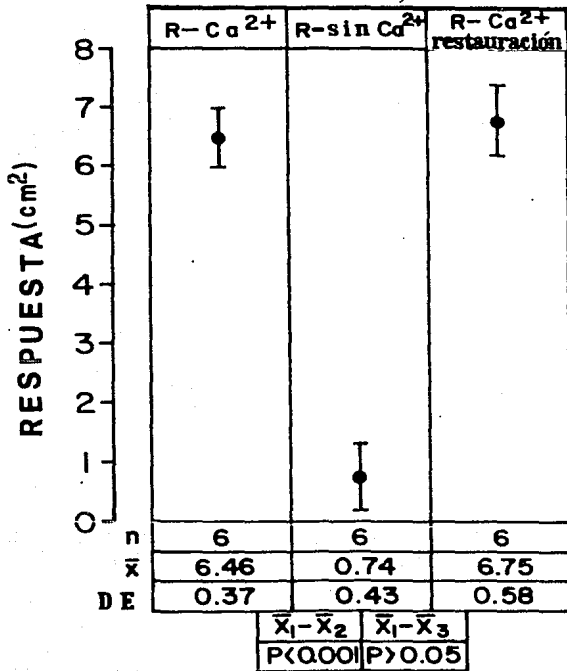


Fig.13 Valores estadísticos que establecen las diferencias significativas entre la respuesta a la adrenalina en presencia y ausencia de calcio, de segmentos de cola de epidídimo de rata.

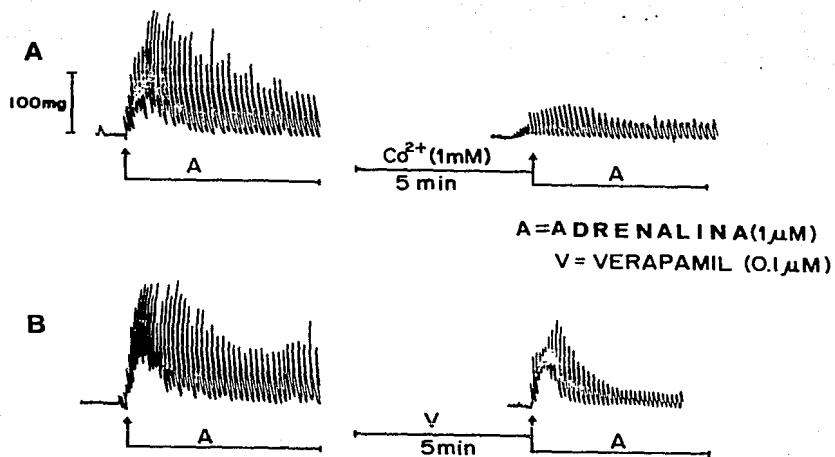


Fig.14 Efecto de los bloqueadores de canales de calcio sobre segmentos de cola de epidídimo de rata. A) efecto bloqueador del cobalto sobre la respuesta contráctil al estímulo adrenérgico. B) efecto inhibitor del Verapamil sobre la respuesta contráctil al estímulo adrenérgico.

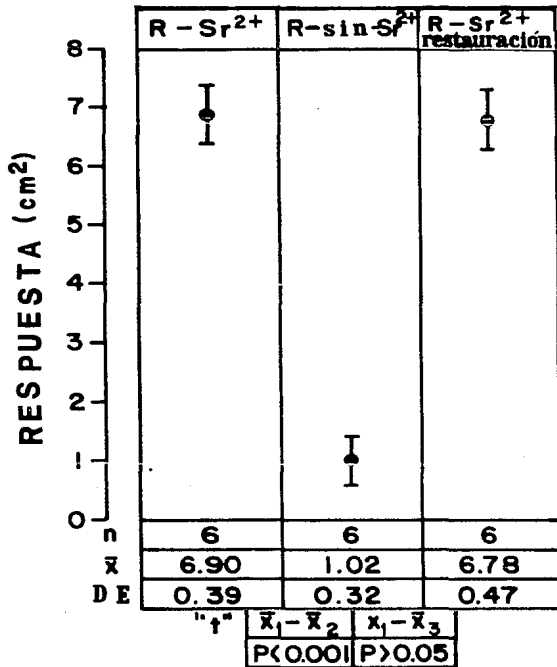


Fig.15 Valores estadísticos que establecen las diferencias significativas entre la respuesta a la adrenalina, en presencia y ausencia de estroncio, de segmentos de cola de epidídimo de rata.

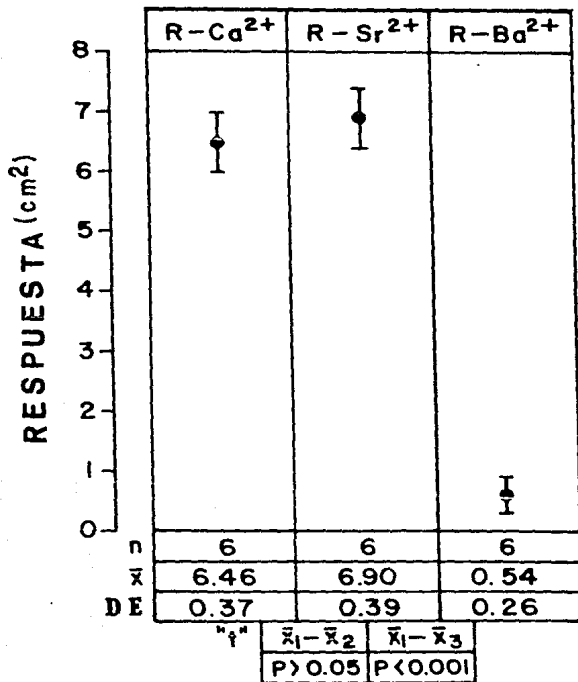


Fig.16 Valores estadísticos obtenidos de las diferentes respuestas contráctiles en medios con calcio estroncio y bario.

8. D I S C U S I O N

El análisis de los resultados muestra como la adrenalina logró incrementar la amplitud y la frecuencia de las contracciones del músculo liso de la cola de epidídimo de rata, en un medio con calcio lográndose obtener (de todas las respuestas con diferentes concentraciones de adrenalina) un registro en donde hubo una respuesta máxima del músculo al estímulo adrenérgico, la cual correspondió a 1×10^{-6} M. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Laitinen y Talo, quienes probaron el efecto de varios agentes agonistas α y β (entre ellos la adrenalina) sobre segmentos de cola de epidídimo de rata "in vitro" (49).

Los datos obtenidos en este trabajo coinciden con los de otros autores, en que muestran que al estimular los nervios hipogástricos en preparaciones in situ o al adicionar adrenalina a segmentos de la cola de epidídimo de rata "in vitro" se produce un aumento de la actividad contráctil del músculo liso del epidídimo de rata (9,14,15,46).

Estos resultados sugieren que es muy probable que la actividad contráctil de la cola de epidídimo, se ve incrementada cuando se estimulan los adrenoreceptores de la membrana, (en base al hecho de que existe una inervación α -adrenérgica — abundante en la cola del epidídimo) (7,9,12).

Al probar el efecto de la adrenalina (1×10^{-6} M) sobre segmentos de cola de epidídimo de rata en presencia y ausencia de calcio externo, se observó esencialmente una respuesta satisfactoria a la adrenalina en presencia de calcio y ausencia de respuesta cuando no hubo calcio en el medio de incubación.

Es muy probable que lo anterior pudiera explicarse me diante el hecho de que la contracción del músculo liso de la cola del epidídimo que se produce al activarse los adrenoreceptores, esté relacionado con la entrada de Ca^{++} al medio intracelular (50,51).

Se han propuesto dos mecanismos por medio de los cuales la activación de los receptores- α , producen un incremento de calcio intracelular:

- a) induciendo la movilización del calcio de almacenes intracelulares.
- b) induciendo la entrada de calcio a través de la membrana plasmática.

Se ha observado que en algunos tejidos como la glándula salival es necesaria la presencia de calcio externo para lograr una respuesta- α — (56,57).

En otros tejidos como el hígado, al parecer el principal mecanismo interno de activación es la movilización de calcio intracelulares (52,54,58,59). Y en hepatocitos de rata se ha observado que la activación de los receptores α -adrenérgicos, involucran alteraciones en el metabolismo del calcio y al parecer existe un aumento en el recambio de fosfatidilinositol (PI) celular, que se cree juega un papel clave como segundo mensajero en el metabolismo celular del calcio a nivel del proceso estimulación-efecto (60,61).

Por otra parte en contraposición con lo anterior en donde se manifiesta la necesidad del calcio, para que se lleve a cabo la contracción, está el hecho de que en ausencia de calcio no se observó ninguna respuesta al estímulo adrenérgico. Existen estudios que apoyan lo anterior en donde la respuesta contráctil es rápidamente deprimida en músculos lisos expuestos a soluciones libres de calcio y particular ente si se agrga EGTA al baño de incubación (24). Otros estudios realizados en segmentos de taenia coli de cobayo, comprueban lo anterior al no producirse ninguna respuesta a la adrenalina en ausencia de calcio (24).

Por otro lado, al comprobar que efectivamente no había contracciones en ausencia de calcio, se restituyó nuevamente con calcio el medio, lográndose recuperar la respuesta contráctil a la adrenalina. Los anteriores resultados concuerdan con estudios realizados en músculo liso uterino en donde al remover el calcio del medio de incubación, las contracciones producidas por la acetilcolina disminuyen gradualmente y la respuesta se recupera al adicionar calcio al medio (20). Efectos similares suceden en músculo liso intestinal del cobayo (21).

Fue evidente el hecho de que al incubar los segmentos de cola de epidídimo en soluciones conteniendo bloqueadores de canales de calcio, la respuesta a la adrenalina se vió sumamente abatida, pues aún en presencia de un medio con calcio, no hubo respuesta. Esto puede explicarse con base en el hecho de que el Verapamil bloquea las entradas de calcio activadas por el receptor α -adrenérgico y la respuesta a la adrenalina se ve notablemente disminuida.

Esto se ve apoyado por estudios hechos en vena portal de cobayo donde en presencia de Verapamil, la respuesta a la noradrenalina se ve notablemente disminuida (24)

Con respecto al cobalto, también es muy probable que bloqueara la entrada de canales lentos de calcio (ver punto 2.4.1 inciso (b)), impidiendo de esta --

manera que el calcio penetre al interior de la célula, en el momento del estímulo adrenérgico. Nuestros resultados coinciden con estudios hechos sobre músculo liso y estriado en donde el potencial de acción se ve abolido por pequeñas - concentraciones de cobalto, níquel y manganeso (18,63).

Al comparar los datos obtenidos en un medio con calcio y en un medio con - estroncio, se observó que la respuesta a la adrenalina en segmentos de cola de epidídimo en ambos medios fué similar y no hubo diferencia significativa. Lo anterior nos indica que el estroncio es capaz de substituir al calcio en el efecto miogénico y probablemente en el efecto electrogénico, como sucede en otros tejidos (18,20,62,63).

No así en el caso de la sustitución del bario por calcio en donde inicialmente este ión produce una contracción y luego relajación completa, en estas condiciones la adrenalina no causó ningún efecto.

Este fenómeno constrictor inicial inducido por bario se ha observado en otros músculos lisos tales como la arteria mesentérica de rata (64).

Lo anterior nos indica que el bario no substituyó al calcio en el efecto miogénico y electrogénico, ya que la diferencia de respuesta en ambos medios fué considerable.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Fué necesaria la presencia del ión calcio para que se produjera la contra-cción de los segmentos de la cola de epidídimo de rata, en presencia de un estímulo adrenérgico.
- 9.2 En un medio con calcio, el cobalto y el Verapamil fueron capaces de inhibir la contra-cción de segmentos de músculo liso de la cola de epidídimo, en pre-sencia de un estímulo adrenérgico, debido a que bloquearon la entrada de ca-nales de calcio.
- 9.3 El estroncio fué capaz de reemplazar al calcio en su función de activador - de el proceso contra-ctil, ya que los segmentos de la cola del epidídimo en un medio con estroncio se contra-jeron en presencia de un estímulo adrenérgico.
- 9.4 El bario no fué capaz de substituir al calcio en su función de activador de el proceso contra-ctil en segmentos de cola de epidídimo ya que aunque inicialmente se produce una fuerte contra-cción seguida de una completa relaja-ción; en un medio donde el calcio ha sido reemplazado por bario, el músculo no se contra-jo en presencia de un estímulo adrenérgico y ausencia de calcio.

B I B L I O G R A F I A

1. Moore, C.R y Quick, W.J. (1924) Properties of the gonadas as controller of somatic and physical characteristics VII. Vasectomy in rabbit. *Am.J.Anat.* 34:317.
2. Reid, B.L. y Cleland, K.W. (1957) The structure and function of the epididymidis. I. The histology of the rat epididymidis. *Aust.J.Zool.* 5:223-246.
3. Brandes, D. (1974) Male accessory sex glands. Cap.2, New York: Academic Press, pag: 18-44.
4. Spring-Mills, E. y E.S.E., Hafez (1979) Male accessory sexual organs. En *Human - Reproduction: Conception and Contraception*, E.S.E., Hafez (eds) and T.N. New York: Harper & Row, Cap.2, pags. 63-101.
5. Glover, T.D. (1980) Recent progress in the study of male reproductive physiology: Testis stimulation, sperm formation, transport and maturation (epididymal -- physiology), semen analysis, storage and artificial insemination. En: Greep, R.O. *Reproductive Physiology Series One*, NTP International Review of Science, Butterworths University Park Press, pags. 222-267.
6. Martan, J. (1969) Epididymal histochemistry and physiology. *Biol.Reprod.* I: - 134-154.
7. Sjostrand, N.O. (1981) Smooth muscle of vas deferent and others organs in the male reproductive tract. En: *Smooth muscle: an assessment of current knowledge*, Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. & Tomita, T. (eds), Edwards Arnold Ltd. London, pags. 367-376.
8. Baumgarten, H.G., Falck, B., Holstein, S.F., Owan, T. (1968) Adrenergic innervation - of the human testis, epididymidis, ductus deferent and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Z.Zellforsch.* 90:81.
9. Hib, J y Caldeyro-Barcia, R. (1974) Neurohormonal control of epididymal contractions. En: *Physiology and Genetics of Reproduction*, Part B, Cap.34, E.M. Coutino, F. Feels (eds) New York Academic Press, pags. 111-126.
10. Hoffer, P.A. y Greengberg, J. (1978) The structure of the epididymidis efferent ductulus and ductus deferent of the guinea pigs: Aligth microscope study. *Anat. Rec.*, 190: 659-678.
11. Rodrigues, P.A. (1980) Anatomía y fisiología del aparato genital masculino. En: *Esterilidad e Infertilidad en el humano.* Cap.12, Ed. Panamericana, 1a. edición, Ed. Argentina, pags. 544-549.
12. Baumgarten, H.G.; Holstein, A.F. y Rosengren, E. (1971) Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of musculature of the ductuli efferent, ductus deferent and ductus epididymidis of man. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.*, 120:37-39.
13. Steppeler, A.; Tanaka, T. y Starke, K. (1978) A comparison of pre and postsynaptic -adrenergic effect of phenylephrine and tamazoline on blood vessels of the rabbit in vivo . *Naunyn Schmiedeberg Arch.Pharmacol.*, 304:223-230.

14. Cross, B.A. y Glover, T.D. (1958) The hypothalamus and seminal emission, *J. Endocrinol.*, 16:385-395.
15. Knight, T.W. (1974) A qualitative study of factors affecting the contractions of the epididymidis and ductus deferent of the ram. *J. Reprod. Fert.*, 40: 19-29.
16. Perry, S.V. y Grand, A.J.R. (1979) Mechanisms of contractions and the specialized protein components of smooth muscle. *Med. Bull.*, Vol. 35, No. 3, pags: 219-226.
17. Brading, A.F. (1979) Maintenance of ionic composition in the smooth muscle. -- *Brith. Med. Bull.*, Vol. 35, pags: 227-234.
18. Holman, M.E. y Neild, T.O. (1979) Membrane properties of smooth muscle. *Brith. Med. Bull.*, Vol. 35, No. 3, pags: 235-241.
19. Creed, K.E. (1979) Functional diversity of smooth muscle. *Brith. Med. Bull.*, Vol. 35, No. 3, pags: 243-247.
20. Daniel, E.E.; Sehdev, H. y Robinson, K. (1962). Mechanisms for activation of smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 42(5): 228-257.
21. Hurwitz, L. y Joiner, D.P. (1970) Mobilization of cellular calcium for contraction in the intestinal muscle. *Am. J. Physiol.*, Vol. 218, No. 1, pags: 12-19.
22. Ulsten, U.; Anderson, K.E. y Forman, A. (1978) Relaxing effect of Nifedipine on the nonpregnant human uterus "in vitro" and "in vivo". *Obstetrics and Gynecology.*, Vol. 52, No. 4: 436-441.
23. Guerrero, R.J. y Martín, S.S. (1984) Verapamil: Full spectrum calcium channel - blocking agent: An overview. *Med. Res. Rev.*, Vol. 4, No. 1, pags: 87-109.
24. Bulbring, E. (1979) Postjunctional adrenergic mechanisms. *Brith. Med. Bull.*, Vol. 35, No. 3, pags: 285-293.
25. Johnsons, A.D. (1977) The influence of cadmium on the testis. Chapter 20. En: -- *The testis.* editado por A.D. Johnsons y W.R. Gomes. Academic Press, pags: 565.
26. Spring-Mills, E. y Hafez, E.S.E. (1980) Male accessory sex glands. Vol. 4, Elsevier/ North-Holland. Biomedical Press. Amsterdam.
27. Case, J.F. (1979) *Biology.* Cap. 21, 2a. edición, MacMillan Publishing Co. Inc., - New York Press., pags: 447-471.
28. Villee, C.A. (1982) *Biología.* 5a. parte., Ed. Panamericana, 6a. edición., México, pags: 418-501.
29. Baker, J.J.W. y Allen, G.E. (1970) *Biología e Investigación Científica.* Cap. 11, editorial F.E.I.S.A., Bogotá, pags: 270-310.
30. Ganong, W.F. (1978) *Manual de Fisiología Médica.* Caps. 2 a 16, Ed. El Manual Moderno S.A., 6a. ed., México, pags: 21-221.
31. Guyton, A.C. (1971) *Tratado de Fisiología Médica.* Caps. 8-10; 54., Ed. Panamericana, 4a. ed., México.

- 32.- Putney, J.W. Jr.; Parcd, R.D.; Leslie, B.A.; Weiss, S.J.; Van de Walle C.M. y Marier, S.H. (1978). Recent advances in the pharmacology of adrenoreceptors, . Elsevier/North-Holland. Biomedical Press, Amsterdam., pages: 35-43.
- 33.- Day, D.M. (1981). Farmacología del Sistema Nervioso Autónomo., Ed. El Manual Moderno, S.A., México.
- 34.- Lands, A.M.; Arnold, A.; Mc. Auliff, J.P.; Luduena, F.P. y Brown, R.G. Jr. (1967). Differentiation of receptor system activated by sympathomimetic amines., Nature, 214: 597-598.
- 35.- Korolkovas, A. y Burckhaltor, J. (1978). Compendio esencial de Química Farmacéutica., Ed. Reverté S.A., España.
- 36.- Mayer, E.S. (1982). Transmisión neurohumoral y Sistema Nervioso autónomo.- En: Las bases farmacológicas de la terapéutica., 6a. ed. por: Goodman, G.A. Goodman, S.L. y Gilman, A., ed. Médica Panamericana.
- 37.- Berthelsen, S. y Pettinger, W.A. (1977). A functional basis for classification of alfa-adrenergic receptor., Life Science, Vol. 21; 595-606'
- 38.- Hafez, E.S.E. (1977). Techniques of human andrology., Cap. VII., Elsevier/North-Holland Publishing Co. Amsterdam., pags: 68-73.
- 39.- Amelar, R.D.; Dubin, L.; Walsh, P.C. (1980). Infertilidad en el varón., Ed. Panamericana, Buenos Aires.
- 40.- Mancini, R.E. y Martini, L. (1974). Epididymal environment and maturation of spermatozoa, . En: Male Fertility and Sterility., New York Academic Press, pags: 459-478.
- 41.- Endo, M.; Kitazawa, T.; Yagi, S.; Lino, M. y Kakuta, Y.,(1977). En: Casteels R. Godfrain, T. & Ruegg, J.C. eds), Excitation-contraction coupling in - - smooth muscle., pags:199-209 (Proceeding of the International Symposium held in Louvian, 12-14 July 1977 and the Erwin-Riesch Symposium in Heidelberg, 15-16 July 1977). Elsevier/North -Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 42.- Hinton, B.T. y Howard, S.S. (1981) Permeability characteristics of epithelium in the rat caput epididymidis., J. Reprod. Fert. (63) 95-99.
- 43.- Hagiwara, S. y Byerly, L. (1981). Calcium channel., Anm. Rev. Neurosc., 4: 69-125.

- 44.- Himms-Hagen, J. (1967), Sympathetic regulation of metabolism., *Pharmacol. Rev.*, 19: 367-461.
- 45.- Burnstock, G. (1979). Autonomic innervation and transmission in the smooth muscle., *Brith. Med. Bull.*, Vol. 35, No. 3: 255-262.
- 46.- Hib., J. (1976). Effects of autonomic drugs on epididymal contractions., - *Am., Fert. Soc.*, Vol. 27. No. 8: 951-956.
- 47.- Johansson, S.R.M. (1982). Regulation of the beta-adrenergic system in uterine smooth muscle., *Lindkoping University Medical Dissertations.*, No. 27: 7-54.
- 48.- Shuba, M.F.; Gurkovskaya, A.V.; Klevetz, M.J.; Kochemasova, N.G. y Taranenko, V.M. (1976). En: *Bulbring, E & Shuba, M.F. (eds) Physiology of smooth Muscle.*, Pags: 347-355. Raven Press, New York.
- 49.- Laitinen, L. y Talo, A. (1981). Effect of adrenergic and cholinergic drugs on electrical and mechanical activities of the rat cauda epididymidis " in vitro"., *J. Reprod. Fert.*, 63: 205-209.
- 50.- Somlyo, A.P. y Somlyo, A.V. (1981) *Vascular Smooth Muscle.*, En: *Normal --- structure, pathology, biochemistry and biophysics.*, *Pharmacol. Rev.* 20: -- 197-272,
- 51.- Triggle, D. J. (1972). Adrenergic receptor., *Annu. Rev. Pharmacol.*, 12: 185-196.
- 52.- Rall, T.W. (1972). Role of adenosine-3'-5'-monophosphate (cyclic AMP) in actions of catecholamines., *Pharmacol. Rev.*, 24: 399-410.
- 53.- Bolton, T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and others substances on smooth muscle., *Physiol. Rev.*, 56: 606-718.
- 54.- Blackmore, P.F.; Dehoge, J.P. y Exton, C. (1978). Studies on alpha-adrenergic innervation of hepatic glucose output., *J.Biol., Chem.* 254: 6495-6950.
- 55.- Burges, G.M. y Jenkinson, D.H. (1979). Effects of catecholamines, ATP and - ionophore A23187 on potassium and calcium movement in isolated hepatocytes., *Nature (Lond)* 279: 544-546.
- 56.- Berridge, M.J. (1975). The interaction of cyclic nucleotide and calcium

- in the control of cellular activity., En: *Advances Cyclic Nucleotides.*, Vol. 6 (P. Greengard and G.A. Robinson, eds) Raven Press, New York, pags: 122-131.
- 57.- Selinger, Z.; Batzri S.; Eirmel, S. y Sherman (1973). Calcium and energy requirement for K^+ release mediated by epinephrine alpha-receptor in rat parotid slices. *J. Biol. Chem.*, 248: 369-372.
- 58.- Blackmore, P.F.; Morks, J.L.; Breenley, F.T. y Exton, J.H. (1978). Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output., Relationship between alpha-adrenergic stimulation of calcium efflux and activation of phospholipase in isolated rat liver parenchymal cells., *J. Biol. Chem.*, 253: 4851-4858.
- 59.- Chen, J.L.; Babcock y Lardy, H.A. (1978). Norepinephrine, vasopressin, glucagon and A23187 efflux of calcium from an exchangeable pool in isolated rat hepatocytes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 2234-2238.
- 60.- Holub, J.B. (1982). Nutritional, biochemical and clinical aspect of inositol and phosphatidylinositol metabolism., *J. Physiol. Pharmacol.*, 62:1-8.
- 61.- Fain, J.N. y García-Sainz (1980). Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 ph₁ and adenylate cyclase inhibition in alpha effect of catecholamines., *Life Science.*, 26: 1183-1194.
- 62.- Uvelius, B. y Sigurffsson, B. (1981) Stimulatory effect of Ba^{2+} on contractile activity in the smooth muscle of the rat portal vein., *Acta. Physiol. Scand.*, 113: 201-205.
- 63.- Rivalet, B. y Beigelmans, P.M. (1981). Effects of divalents cations on beta--cells electrical., *Am. J. Physiol.*, 241 (Cell Physiol): C59-C67.
- 64.- Northover, B.J. (1968). The effect of drugs on the constrictions on isolated -depolarized blood vessels in response to calcium or barium., *Br. J. Pharmacol.*, 34: 417-428.
- 65.- Correa, G. (1986). "El paraíso perdido". En: *Revista Proceso (Semanario de Información y Análisis)* No. 519, pags: 18-21.
- 66.- Despertad: Control de la natalidad (Juan Pablo II en marcha) *Revista de carácter religioso*; May 22, Vol. 61, No. 10, 1980.
- 67.- Chiaradini, D.J.; Sánchez, J.A. y Stefani E. (1980) Effect of calcium withdrawal on mechanical threshold in skeletal muscle fibres of the frog., *J. Physiol.*, Vol. 303, Pag. 153.