

00346 7
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

**"EFECTO DE LA KETAMINA SOBRE LA
CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA,
SEROTONINA Y ACETILCOLINA EN EL CONDUCTO
DEFERENTE AISLADO DE RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLOGIA CELULAR
P R E S E N T A :
BIOLOGO. RAFAEL MOLINA BLAS



CIUDAD UNIVERSITARIA.

AGOSTO 1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

**"EFECTO DE LA KETAMINA SOBRE LA
CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA,
SEROTONINA Y ACETILCOLINA EN EL CONDUCTO
DEFERENTE AISLADO DE RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

BIOLOGO. RAFAEL MOLINA BLAS

Director de tesis:

DOCTOR HECTOR ANTONIO PONCE MONTER

CIUDAD UNIVERSITARIA.

AGOSTO 1997.





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado

OF. NUM P-305

**M ENC. HECTOR ANTONIO PONCE MONTER
PRESENTE.**

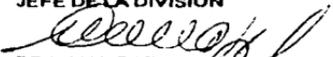
Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado como Director de Tesis del(a) alumno(a) RAFAEL MOLINA BLAS, quien desarrollo el Trabajo de Tesis titulado: EFECTO DE LA KETAMINA SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA, SEROTONINA Y ACETILCOLINA EN EL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA

Asi mismo, les comunico a los siguientes miembros que la Direccion de la Facultad, los ha designado como simodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los meritos para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

CARGO	GRADO.	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA	BERTHA GLORIA ORTEGA CORONA
PRIMER VOCAL	DR	GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN
SEGUNDO VOCAL	M ENC	HECTOR ANTONIO PONCE MONTER
TERCER VOCAL	DRA	MARIA GUADALUPE CAMPOS LARA
SECRETARIO	DR	RUBEN ROMAN RAMOS
SUPLENTE	DR	JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
SUPLENTE	DR	FELIPE VADILLO ORTEGA

Sin mas por el momento y en espera de su respuesta quedo de ustedes.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 14 de Febrero de 1997.
JEFE DE LA DIVISION


DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA
MCO/ASR/mm

Este trabajo fue realizado en la
Unidad de Investigación Biomédica
del Instituto Mexicano del Seguro
Social en la División de
Farmacología Experimental, bajo
la acertada dirección del

DOCTOR HECTOR PONCE
MONTER.

A mis Hijos Silvia Walewaka y

Rafael:

A ellos agradezco el impulso y amor que me han proporcionado a partir de su nacimiento y que forman la semilla de mi existir.

Mi amor, apoyo y compromiso.

A mi esposa :

Silvia Claudia por el esfuerzo mutuo que realizamos para seguir adelante y lograr nuestras metas, por sus frutos, cariño, apoyo y comprensión.

Nuestra unión, perseverancia y amor.

A mi Madre:

Quién me ha enseñado a luchar y continuar siempre adelante a pesar de las dificultades que se presenten en mi camino, a su ejemplo.

Mi admiración, agradecimiento y respeto.

A Diana Edna:

Para que valore sus metas y continúe siempre adelante con el esfuerzo de nuestra madre.

Mi cariño y apoyo.

A mi padre:

Por la perseverancia siempre impulsada para sus hijos.

A mi tía Ana:

Por el apoyo que nos ha brindado, importante para la realización de nuestros logros.

Gracias.

Con un sincero agradecimiento:

Al DOCTOR HECTOR PONCE MONTER

jefe de la División de Farmacología Experimental del Instituto Mexicano del Seguro Social, por su valiosa y acertada dirección en la realización de este trabajo experimental para la obtención de grado, así como por las facilidades técnicas proporcionadas para la elaboración de esta tesis.

Agradezco a los Doctores que integraron el Comité tutorial, por su revisión crítica y acertados comentarios que permitieron la culminación de este trabajo:

Doctores Bertha Gloria Ortega Coroná
Doctor Gerardo Helbert Vazquez Niz
M. en C. Hector Antonio Ponce Monter
Doctores Marie Guadalupe Campos Lara
Doctor Rubén Roman Ramos
Doctor José Manuel Betancourt Ruiz
Doctor Felipe Verdugo Ortaez
Doctores Graciela Delhumesu Orsag

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
I. 1 Morfofisiología del Vaso Deferente	2
I.1.1 Músculo Liso	4
I.1.2 Inervación Autónoma	7
I.1.3 Mecanismos de Traducción de la señal	11
I.1.4 Receptores Adrenérgicos	15
I.1.5 Receptores Serotonérgicos	17
I. 2 Anestesia	19
I.2.1 Anestesia	19
I.2.2 Clorhidrato de ketamina	22
I.2.3 Mecanismo de relajación inducido por el Clorhidrato de Ketamina	25
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
III. HIPOTESIS	32
IV. OBJETIVOS	33
V. MATERIAL Y METODOS	34
VI. RESULTADOS	45
VI.1 Efecto del clorhidrato de Ketamina sobre la contracción inducida por Noradrenalina en el Conducto Deferente Aislado de Rata	45
VI.2 Efecto del Clorhidrato de Ketamina en la Actividad Contráctil inducida por Serotonina en el tejido Muscular del Conducto Deferente	48

VI.3	Efecto de la Ketamina en las contracciones inducidas por Acetilcolina en las porciones Epididimal y Prostática del Conducto Deferente Aislado de Rata	51
VI.4	Efecto del Clorhidrato de Ketamina en la Actividad Contráctil obtenida por una solución despolarizante en el Conducto Deferente	53
VII.	DISCUSION	70
VIII.	BIBLIOGRAFIA	79

RESUMEN

Por su acción estimulante del sistema cardiovascular, el anestésico ketamina es ampliamente utilizado en pacientes con inestabilidad cardiovascular. Esta acción se ha explicado como: a) un efecto simpatomimético vía Sistema Nervioso Central, b) modulación de la actividad de los baroreceptores, c) inhibición de la recaptura de catecolaminas por las terminales simpáticas o d) un efecto inotrópico positivo sobre el miocardio. Sin embargo, se ha reportado que la ketamina produce un efecto bifásico sobre la presión sanguínea (hipotensión seguida de hipertensión). Con el fin de ampliar el conocimiento de las acciones de la ketamina sobre el músculo liso, se estudió el efecto de la ketamina sobre la respuesta contractil inducida por noradrenalina (NA), serotonina (5HT), acetilcolina (ACh) y una solución despolarizante de potasio (K^+), en el músculo liso de las porciones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata, mediante el análisis de registros isométricos de la actividad muscular generada por los diferentes agonistas. Se construyeron las curvas concentración-respuesta y se determinó gráficamente la concentración efectiva 50 (CE_{50}).

En este estudio se determinó al comparar la actividad mecánica del tejido muscular de las porciones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata, que la ketamina induce un efecto potencializador en las respuestas generadas por la NA y 5HT, este efecto es particular de estas aminas, debido a que la ketamina en concentraciones de anestesia no provocó este efecto en la respuesta inducida por ACh y una solución despolarizante de K^+ .

El posible mecanismo por el cual la ketamina induce una potenciación de las respuestas reguladas por los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico, es la inhibición de la recaptura del neurotransmisor, se ha comprobado que la ketamina inhibe el sistema de recaptura de la NA, específicamente la actividad de la monoaminooxidasa, así como la actividad de la enzima que inactiva a la 5HT, en la hendidura sináptica.

I. INTRODUCCION .

I. 1. MORFOFISIOLOGIA DEL VASO DEFERENTE .

El vaso deferente es un segmento de paredes musculares que forma parte del aparato reproductor del macho de los mamíferos y que se encuentra localizado entre el epidídimo y la uretra. En la rata macho, es un órgano que está constituido por un conducto de aproximadamente 6 cm. de longitud, por su tipo de inervación autónoma, este conducto tiene capacidad inherente a la contracción rítmica (Knobil, et al., 1993).

El vaso deferente está formado por músculo liso de tipo no vascular; anatómicamente este conducto se divide en dos regiones funcionales, una región cercana al epidídimo, que recibe espermatozoides móviles y una región cercana a la próstata, en donde depositan sus secreciones las vesículas seminales y la próstata para formar el semen, ambas regiones difieren no solo en su forma de actividad contráctil sino también en la sensibilidad de sus respuestas postsinápticas a diferentes agonistas de alfa-adrenoreceptores (MacDonald y McGrath, 1980; Brown y col., 1983; Sallés y Badia, 1991). La porción prostática, presenta mayor inervación noradrenérgica y contenido de noradrenalina endógena en comparación con la región epididimal (Fernández-Pardal y col., 1981; Sallés y Badia, 1993).

Por otra parte , el vaso deferente no debe ser considerado únicamente como un simple conducto que guía a los espermatozoides maduros del epidídimo a la uretra, debido a que además está formado de un epitelio complejo con funciones de absorción y secreción de sustancias o factores que regulan la contracción del músculo (Ratnasooriya y Wadsworth, 1990).

La actividad muscular de este tejido es el responsable del trabajo mecánico que el conducto deferente realiza para transportar a los espermatozoides, la cubierta muscular está formada por tres capas musculares: una capa longitudinal interna, una capa circular media y una capa longitudinal externa, las células musculares que se encuentran arregladas paralelamente al eje longitudinal del conducto su contracción tiende a acortar al vaso deferente en dirección a la uretra y la capa circular en donde los haces musculares se encuentran arregladas concéntricamente alrededor del eje longitudinal su contracción constriñe al lumen del conducto deferente principalmente durante el proceso de la eyaculación (Lesson, 1983; Knobil, 1993).

La función general de la actividad contráctil del músculo en el conducto deferente, es responsable del transporte de los espermatozoides a la región prostática, además de propulsar al 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 a los espermatozoides en el momento de la eyaculación (Yanagimachi, 1981).

El vaso deferente se encuentra rodeado por tejido conectivo que contiene fibroblastos, colágena, fibras elásticas, vesículas sanguíneas, vesículas linfáticas, fibras nerviosas, macrófagos, leucocitos y capas concéntricas de músculo liso; sus funciones principales son sostener a las fibras musculares y transmitir la tensión producida por la contracción de una fibra a la siguiente.

I. 1. 1. MUSCULO LISO .

La actividad mecánica es generada por el deslizamiento de proteínas contráctiles de las células musculares. Un complejo sistema mecano-electroquímico se encarga de este deslizamiento y de su conversión en la contracción muscular (Bremel y col., 1977; Bremer y Aebi, 1992)

Existen hormonas y/o neurotransmisores que ejercen sus efectos sin penetrar en la célula, estas moléculas informacionales con sus receptores específicos se encuentran acoplados a varios sistemas efectores o modificadores responsables de generar la señal interna y que se han denominado segundos mensajeros, los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), así como la concentración de calcio intracelular, son los principales efectores que regulan una infinidad de procesos celulares (Bolton, 1979; Somlyo & Somlyo, 1994).

El calcio, es particularmente importante porque el incremento de los niveles intracelulares de este catión controla procesos tales como, la contracción muscular, la exocitosis, la permeabilidad de la membrana, el metabolismo y la división celular (Ebashi, 1977).

La actividad mecánica del músculo liso es dependiente de la interacción de proteínas contráctiles entre la actina y miosina en un proceso análogo al modelo de deslizamiento de filamentos contráctiles del músculo estriado. En este modelo, las cabezas de las moléculas de miosina que se encuentran empaquetadas dentro de los filamentos gruesos realizan un ciclo de alta y baja afinidad para unirse a las moléculas de actina en una reacción dirigida por la hidrólisis de ATP, la actividad contráctil ocurre como un resultado de la translocación de las cabezas de miosina unidas a la actina desde un ángulo de 90° a 45° con respecto al eje longitudinal de los filamentos actino-miosina (Ford y col., 1994) En el músculo estriado, la organización de los filamentos gruesos (miosina) y delgados (actina) tienen un arreglo altamente ordenado con una estructura típica en bandas, la organización de los filamentos en el músculo liso es menos aparente (Sobieszek, 1977).

En el músculo liso, la composición de los filamentos delgados comprende actina, tropomiosina y otras proteínas unidas al sarcolema como la vinculina, metavinculina, alfa-actinina y la talina. En el sarcoplasma, los filamentos delgados se insertan en cuerpos densos fusiformes formados principalmente de alfa-actinina y que tienen una analogía funcional a las líneas Z del músculo estriado.

Se ha postulado, la participación de estos cuerpos densos junto con los filamentos intermedios constituidos principalmente por mentina y / o desmina en la formación de una red tridimensional que permite mantener la forma de las células musculares, así como la elongación durante su contracción.

La actividad contráctil del músculo liso esta regulada por el flujo de iones de calcio a nivel intracelular. Los iones de calcio activan la maquinaria contráctil permitiendo el proceso de acoplamiento excitación-contracción de las fibras musculares (Ebashi, 1977, Karaki & Weiss, 1988), existen diferentes mecanismos que permiten la entrada de iones de calcio que incluyen la entrada a través del sarcolema por canales operados por voltaje, el intercambio iónico de Na^+ - Ca^{2+} y los canales de calcio operados por receptor, así como la liberación de este ión a partir de almacenes intracelulares, como el retículo sarcoplásmico o de otros sitios intracelulares vía inositol- trifosfato (Villa, A. 1993).

Por otra parte, la relajación ocurre cuando las concentraciones de calcio intracelular están por abajo de 10^{-7} M, como resultado del eflujo de calcio por los sitios de unión intracelular. El calcio puede actuar en un sitio receptor asociado con la molécula de miosina que involucra la fosforilación de la molécula de miosina activando a la cinasa de la cadena ligera de la miosina, esta actividad de fosforilación de la miosina indica el inicio de la contracción muscular (Sobieszek, 1977; Harberle & Hemric, 1993).

I. 1. 2. INERVACION AUTONOMA

La mayoría de los músculos lisos tienen una función específica que se lleva a cabo de manera intermitente o continuamente a lo largo de vida del animal, de acuerdo con su posición y función los músculos lisos varían ampliamente sus patrones de actividad. Los patrones temporales y espaciales de dicha actividad dependen de las propiedades membranales de las células musculares lisas, la interacción entre ellas y de su inervación.

La actividad espontánea puede dar lugar a un tono continuo o a ondas de contracción, las hormonas y/o neurotransmisores, ya sean excitatorios o inhibitorios, modifican esta actividad o restablecen su estado de reposo (Creed, 1979, Sims y col., 1988).

Numerosos estudios de la inervación autónoma del músculo liso del aparato reproductor del macho se han realizado gracias a las técnicas histoquímicas de fluorescencia (Falck y col., 1962), inmunocitoquímica, autoradiografía y microscopía para la localización de catecolaminas (Pérez y col., 1983).

El sistema nervioso central y periférico tienen una fundamental importancia en el control de las funciones relacionadas con la reproducción; el sistema nervioso autónomo, es el que interviene en la transmisión de estímulos sobre unidades sinápticas entre las neuronas pre y postganglionares que conforman este sistema, a través de la liberación de neurotransmisores.

El sistema nervioso autónomo, inerva a diferentes órganos de musculatura lisa: el intestino, las glándulas y los órganos del aparato reproductor, entre otros, los cuales están densamente inervados con fibras de tipo parasimpático y simpático (Ganong, 1994; Dodd y Role, 1991).

Desde un punto de vista clásico el músculo liso del conducto deferente tiene una inervación dual la inervación parasimpática, con acetilcolina como transmisor químico y una inervación simpática, con noradrenalina como transmisor. Las neuronas colinérgicas activan receptores muscarínicos (excitatorios) y las neuronas noradrenérgicas activan receptores adrenérgicos alfa (excitatorios) y beta (inhibitorios), según el tipo de tejido o especie (Anstey y Birmingham, 1980; Dodd y Role, 1991).

El conducto deferente de la rata tiene una inervación adrenérgica muy rica que se encuentra asociada con los vasos sanguíneos y con los haces del músculo liso. Esta inervación está constituida de neuronas adrenérgicas cortas que se originan en los ganglios pélvicos localizados cerca del plexo hipogástrico. Una característica importante de las neuronas adrenérgicas cortas es la regulación del metabolismo de su neurotransmisor por hormonas sexuales (Fernández-Pardal y col., 1981; MacDonald y McGrath, 1984).

Todas las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de las catecolaminas: DOPAdescarboxilasa, dopamina-beta-descarboxilasa, monoaminooxidasa (MAO), la tirosina hidroxilasa 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 dopamina-beta-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, en donde se reincorporan a los almacenes vesiculares o son degradados por la MAO (Ganong, 1994)

Por otra parte, existe diferenciación regional en la densidad de la inervación a lo largo del vaso deferente, la tendencia es que en la región prostática se presente mayor densidad, además existen diferencias en la sensibilidad de los adrenoreceptores a lo largo del vaso deferente (Mac.Donald y McGrath, 1980; Sallés and Badia, 1991).

La contracción del conducto deferente puede ser estimulada por agonistas adrenérgicos del tipo alfa e inhibida por agonistas adrenérgicos beta, existen evidencias experimentales que concluyen que la sensibilidad del aparato reproductor del macho a las catecolaminas varía según la especie, así como el estado endocrino del animal (MacDonald y McGrath, 1984) y que los cambios en la motilidad del vaso deferente durante la eyaculación se deben a la afinidad de los adrenoreceptores por el neurotransmisor durante este proceso

La inervación colinérgica en el conducto deferente es escasa pero presenta una distribución uniforme de axones colinérgicos en las capas musculares de este conducto principalmente en la capa muscular media.

En la rata, la proporción de nervios colinérgicos es mayor en la región epididimal que en la prostática, la función de estas neuronas colinérgicas podría constituir una parte de la estimulación excitatoria de las fibras musculares del conducto durante el transporte de los espermatozoides o la probable interferencia de la transmisión adrenérgica como un agente de retroalimentación negativa

Además de la inervación adrenérgica y colinérgica, el músculo liso del conducto deferente tiene la influencia directa de otros neurotransmisores putativos, como la dopamina (Leedham y Pennefather, 1982) y la serotonina, que tienen acceso a este tejido por difusión de terminales nerviosas de los vasos sanguíneos o de otros tejidos adyacentes.

De acuerdo con estudios de fluorescencia histoquímica, farmacológicos o de microscopía electrónica, los únicos almacenes identificables de serotonina en los conductos del aparato reproductor del macho se encuentran en compartimentos intravesiculares, coexistiendo con la noradrenalina, en las fibras nerviosas adrenérgicas (Hay y Wadsworth, 1982), aunque los límites de detección de estas técnicas no son lo suficientemente sensibles para permitir la exclusión definitiva de almacenes de aminas en otro tipo celular, como por ejemplo compartimentos microvasculares en células endoteliales, células cebadas (Jaim-Etcheverry y col., 1969, Campos, 1987). La serotonina es liberada de los almacenes por desgranulación y/o exocitosis. Se ha demostrado, la existencia de receptores a serotonina en el conducto deferente, pero no se ha establecido que esta amina presente una función moduladora de las contracciones de este órgano (Seong y col., 1990).

I. 1. 3. MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL .

La mayoría de las hormonas en último término influyen sobre las células blanco, ya sea alterando las propiedades de las células individuales o las velocidades de síntesis de las proteínas existentes o bien iniciando la síntesis de otras nuevas. Para que esto pueda realizarse, las señales extracelulares deben ser transformadas en señales internas, mediante un proceso denominado transducción, que comprende desde el momento de la activación del receptor hasta la formación del segundo mensajero (Somlyo & Somlyo, 1994).

Se han determinado diferentes sistemas de transducción de señal a nivel celular, cualquier sistema que actúe a través de receptores de la superficie celular y que genere señales intracelulares involucra cuatro componentes principales: la hormona o neurotransmisor, un receptor activado, una proteína transductora denominada proteína G por requerir para su funcionamiento nucleótidos de guanina y finalmente un efector membranal.

a) Sistema de adenilato ciclasa.

Este sistema fue descrito por Sutherland y Rail al estudiar la acción de la adrenalina y el glucagon sobre la transformación del glucógeno en glucosa en células hepáticas demostrando que al tratar membranas aisladas de hepatocitos con adrenalina (en presencia de ATP) se inducía la síntesis de una pequeña molécula mediadora que podía sustituir a la hormona activando a la glucógeno fosforilasa. El mediador fue identificado en 1959, como AMP cíclico (Alberts y col., 1994).

Se ha establecido que muchas hormonas provocan un aumento en la concentración intracelular de AMPc activando a la enzima adenil ciclasa que cataliza la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) en AMPc, y que se localiza en la superficie interna de la membrana celular siendo un sitio receptor específico. Se ha sugerido que el AMPc actúa como "segundo mensajero" propagando el efecto de la hormona (primer mensajero) a toda la célula.

La transmisión de mensajes mediados por AMPc a través de la membrana, se lleva cabo por los siguientes eventos: la activación del receptor, que provoca un cambio conformacional que le permite interactuar con una proteína G acopladora, sensibilizándola al GTP, que a su vez activa a la enzima, adenilato ciclasa, localizada en la superficie interna de la membrana, que cataliza la reacción de conversión de ATP en AMPc (Hathaway y col., 1989). Existen varios tipos de proteínas G, algunas de ellas actúan sobre la enzima adenilato ciclasa, en forma activatoria, llamadas G_s, otras lo hacen en forma inhibitoria, llamadas G_i (García-Sainz, 1987).

El incremento de los niveles de AMPc sirve para activar un tipo de enzima específico, una proteína cinasa. Una cinasa, es una enzima que transfiere un fosfato de un donador (generalmente del ATP) a un aceptor (otra proteína). La modificación de una proteína por una unión covalente de un grupo fosfato tiene un efecto importante sobre su actividad, inhibiéndola o activándola.

b) Sistema Fosfoinosítidos- Calcio.

Al igual que el AMPc, el calcio libre intracelular, parecía ser el producto de la transducción de señales a través de la membrana. En 1947, se demostró que la inyección intracelular de una pequeña cantidad de calcio provocaba la contracción de una fibra de músculo esquelético (Mathews y col., 1990). Robert Mitchell, en 1975, advirtió una estrecha correlación entre la capacidad de una señal externa para estimular el recambio de fosfatidilinositol y la movilización de calcio dentro de la célula (Berridge, 1987).

Actualmente, el mecanismo de transducción por esta vía es la siguiente: la hormona y / o neurotransmisor al interactuar con su correspondiente receptor, induce la hidrólisis de un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol 4, 5, difosfato (PIP₂) por la activación de la enzima fosfolipasa C a través de una proteína G denominada G_q. Los productos de la hidrólisis del PIP₂, el inositol 1, 4, 5, trifosfato (IP₃) y el 1, 2, diacilglicerol (DAG) funcionan como mensajeros intracelulares.

El inositol trifosfato cuya naturaleza hidrosoluble le permite difundir hacia el citoplasma celular tiene la capacidad de interactuar con receptores intracelulares localizados en la superficie del retículo endoplásmico (Spat y col., 1986) la activación de estos receptores induce la apertura de un canal que promueve la liberación de calcio de este almacén intracelular, provocando un aumento en la concentración de calcio citosólico, que desencadena procesos tales como la contracción del músculo liso, la ruptura de glucógeno y la excitotoxicidad (Michell, 1985).

El ion calcio es un factor de acoplamiento capaz de activar múltiples enzimas dependientes del complejo calcio- calmodulina.

El otro producto de la hidrólisis del PIP_2 , el diacilglicerol, un compuesto hidrofóbico que permanece unido a la membrana, se encarga de activar directamente a la proteína cinasa-C, la cual ocasiona la modificación covalente (fosforilación) de múltiples enzimas y proteínas provocando cambios en su actividad, así como la propagación de la señal hormonal en muchas células.

La importancia del proceso de transducción de los fosfoinosítidos es que está involucrado en varios procesos celulares que van desde la modulación del metabolismo, la secreción de enzimas y hormonas, la contracción muscular, la transmisión sináptica e incluso el crecimiento celular.

I. 1. 4. RECEPTORES ADRENERGICOS .

Las acciones del neurotransmisor noradrenalina y de la hormona adrenalina son mediadas por receptores adrenérgicos. El concepto de la existencia de distintos receptores adrenérgicos fue desarrollada por Ahlquist (1948), al reportar dos diferentes rangos de ordenes de potencia de distintas drogas en varios sistemas efectores. Se dedujo que estos ordenes de potencia correspondían a dos subtipos diferentes de receptores, clasificados como alfa y beta adrenérgicos (Minneman, 1988), posteriormente Berthelsen propuso que los receptores alfa podrían ser subclasificados. el receptor del músculo liso vascular que media la contracción fue denominado alfa₁, mientras que el receptor presináptico fue definido como alfa₂ (Fain y García, 1980).

Evidencias recientes sugieren, que los receptores alfa₁- adrenérgicos no tienen las mismas propiedades en todos los tejidos. La existencia de distintos subtipos de receptores α_1 con una localización postsináptica preferentemente (Docherty, 1984) , ha sido determinada por estudios de unión a radioligandos lo que dio origen a una definición consistente de subtipos de receptores alfa_{1A} , alfa_{1B} (Minneman, 1988) y alfa_{1C} (Perez y col., 1991)

Por otra parte, los receptores beta pueden dividirse en receptores beta₁ , localizados principalmente en el corazón y en receptores beta₂, localizados en la vejiga, pulmones, hígado, etc., en base a la selectividad de los efectos de agentes agonistas y antagonistas observados en diversas preparaciones experimentales (Minneman, 1988).

El surgimiento de técnicas biomoleculares no solo ha confirmado la clasificación de estos receptores sino que además ha permitido realizar estudios estructurales y funcionales de los receptores adrenérgicos. La reciente purificación de estos receptores y la clonación de sus genes ha permitido obtener una amplia información concerniente a su estructura y función.

Los receptores alfa ₁ adrenérgicos son receptores transmembranales, la activación de estos receptores por catecolaminas afecta una variedad de funciones celulares, tales como, la contractilidad en el músculo liso y cardíaco, la gluconeogénesis en el hígado, etc., a través de mecanismos dependientes de calcio (Kunos, 1984). Estas glucoproteínas trans-membranales tienen la capacidad de acoplarse con la proteína " G " (Roth, 1986), así como la habilidad para estimular a la fosfolipasa C (Lefkowitz y col., 1988).

Actualmente, existen evidencias experimentales que indican que las contracciones del conducto deferente, se encuentran moduladas predominantemente por receptores del tipo alfa₁-adrenérgicos (Aboud y col., 1993).

I. 1. 5. RECEPTORES SEROTONERGICOS .

La 5-hidroxitriptamina (serotonina ó 5HT) es una monoamina biogénica con una gran variedad de respuestas funcionales via la estimulación de diversos receptores en el sistema nervioso central, en las terminaciones nerviosas y en una gran variedad de tejidos con musculatura lisa.

La primera clasificación de los receptores de serotonina fue realizada por Gaddum y Picarelli, con base a sus diferentes acciones sobre diversas preparaciones experimentales de musculo liso, concluyendo que las acciones de la serotonina fueron mediados por dos diferentes mecanismos y receptores, un receptor denominado " M " (sensible a la morfina) localizado en los ganglios parasimpáticos , causando una liberación de acetilcolina de las terminaciones nerviosas postganglionares y un receptor " D " (sensible a la dibenzilina) localizado en el músculo liso. Posteriormente se identificó a un receptor sensible a la ergotamina, denominado receptor " E ", que induce una vasoconstricción de la carotida de perro (Villalon y col., 1995).

La clasificación y terminología de los receptores a serotonina " M ", " D " y " E " fue aceptada, sin embargo existian algunas respuestas a la serotonina que no se ajustaban a estos criterios. Con la aplicación de técnicas de unión a radioligandos, se ha reconocido la existencia de una gran variedad de tipos y subtipos de receptores, con diferentes grados de afinidad a la serotonina (Peroutka y Synder, 1979; Villalon y col., 1995).

Por tal motivo, se estableció una nomenclatura con criterios estandarizados para clasificar a los distintos receptores a serotonina en cuatro categorías: los receptores 5HT₁, 5HT₂, 5HT₃ y 5HT₄ y sus subtipos correspondientes (Humphrey y col., 1993), lo que ha permitido sugerir que la categoría de receptores del tipo 5HT₁ y sus subtipos (5HT_{a,b d, e}) tienen de forma general la función de regular la dilatación arterial, la inhibición presináptica de la transmisión simpática, así como la participación en mecanismos neurogénicos, conductuales, metabólicos, endocrinos y cardiovasculares, a través del sistema efector de acoplamiento negativo a la adenilato ciclasa (Villalón y col., 1993, 1995).

Por otra parte, los receptores que regulan la contracción del músculo liso, la vasodilatación y broncoconstricción, así como la agregación de las plaquetas, son categorizados en la clase de receptores 5HT₂ (5HT_{2 a, b y c}), a partir de una modulación utilizando el sistema efector de los fosfoinosítidos (Cohen y col., 1985; Campos y col., 1990; Villalón y col., 1995).

Los receptores de la categoría 5HT₃, presentan funciones de estimulación ganglionar, regulan la liberación de catecolaminas por las neuronas simpáticas y parasimpáticas en el corazón, estos receptores se encuentran acoplados a canales iónicos para ejercer sus acciones vía despolarización de membranas (Villalón y col., 1993, 1995).

El último de los tipos de receptores a serotonina descubierto fue el receptor 5HT₄ y es relacionado con fenómenos de taquicardia, estimulación miocárdica y la activación del sistema colinérgico para mediar las contracciones del íleo de cobayo (Villalón, 1995).

I. 2.1. ANESTESIA

En la antigüedad, los procedimientos quirúrgicos no eran aplicables, debido a que el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y la base racional del tratamiento quirúrgico era escaso, como por ejemplo, la técnica aséptica y la prevención de infecciones en heridas eran desconocidas, además no existía alguna técnica anestésica viable. Por todos estos factores, las operaciones quirúrgicas eran escasas y la mortalidad era frecuente.

Existían algunos medios para minimizar el dolor quirúrgico, por ejemplo, drogas como el alcohol, hashis y derivados del opio, se administraban por vía oral, así como el uso de métodos físicos como la aplicación de hielo o la transformación de un miembro anatómicamente afectado en forma isquémica mediante el empleo de torniquetes (Green, 1971).

En 1846, William T. G. Morton introdujo el óxido nitroso y realizó la primera demostración pública de anestesia quirúrgica, de esta manera, surgió el interés de químicos y médicos de este período para producir anestésicos ideales, como por ejemplo, el éter, cloroformo, ciclopropano y relajantes musculares esqueléticos (agentes bloqueadores neuromusculares), entre otros (Green, 1971, Mc Intyre, 1959).

Finalmente en la década 1940, los anestesiólogos utilizaron al curare para obtener una relajación muscular que sólo se podía lograr mediante niveles profundos de anestesia general, durante los siguientes años varios sustitutos sintéticos se utilizaron clínicamente.

Los agentes anestésicos intravenosos se utilizaron a principios de este siglo, sin embargo, las drogas disponibles eran pocas e insatisfactorias, por ejemplo Lundy (1935), demostró la utilidad clínica del tiopental (tiobarbitúrico de acción rápida), el cual se consideró útil como agente anestésico, pero las dosis requeridas provocaban rápidamente una severa depresión de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, por tal motivo debido a los efectos secundarios de estos agentes se ha limitado su utilidad clínica a situaciones especiales (Andersen y Grabenstein, 1966).

El estado de anestesia general esta caracterizada por una inhibición de la percepción de todas las sensaciones inducidas por la administración de drogas. El estado de anestesia apropiado para los procedimientos quirúrgicos puede lograrse con una gran variedad de drogas administradas de manera individual o por combinación de otros fármacos.

Los anestésicos generales pueden administrarse por diferentes vías pero se prefiere la vía intravenosa e inhalatoria, debido a que cuando se utilizan estas técnicas la dosis efectiva y la cronología de acción son altamente previsibles (Smith y col. 1989).

- Clasificación de anestésicos generales de uso actual por su vía de administración.

Anestésicos generales por inhalación:

- Oxido nitroso (*Monóxido de dinitrógeno*)
- Halotano (*2-bromo-2-cloro-1, 1, 1-trifluoretano*)
- Enflurano (*1-cloro, 1,2,2-trifloretil, difluor-metil- éter*)
- Metoxiflurano (*2,2 dicloro,1,1-difluoretíl- metil- éter*)
- Isoflurano (*1-cloro,2, 2, 2-trifloroetil diflorometil éter*)

Presentan una duración relativamente breve en su efecto o acción y provocan una depresión circulatoria con reducción profunda de la presión arterial.

Anestésicos generales intravenosos:

-Barbitúricos:

- *Tiopental sódico*
- *Metohexital sódico*
- *Traminal sódico*

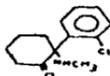
-Disociativos

- *Arnicicloalquiaminas (Clorhidrato de ketamina)*

Los barbitúricos provocan hipotensión, depresión respiratoria, laringoespasmos y broncoespasmos, entre otras complicaciones.

I. 2. 2. CLORHIDRATO DE KETAMINA .

En 1965 se introdujo un anestésico intravenoso denominado clorhidrato de ketamina, que ha sido ampliamente utilizado en humanos y animales (Domino y col., 1965; Mc Carthy, 1965) Este anestésico general es de tipo amina y el nombre sistemático de este compuesto es: clorhidrato de 2-(o-clorofenil) - 2-metilaminociclohexanona, su fórmula estructural es la siguiente:



Debido a que los anestésicos generales de tipo inhalatorio y barbitúrico presentan reacciones secundarias en los sistemas nervioso, circulatorio y respiratorio, caracterizados por un decremento en la circulación y en la actividad metabólica cerebral (Shapiro, 1975); inhibición de la actividad contráctil del miocardio (Altura y Altura, 1975), así como de la frecuencia respiratoria (Hirsham y col., 1975), el clorhidrato de ketamina, se introdujo como una alternativa en el empleo de un anestésico general de naturaleza no-barbitúrico que no presentara reacciones secundarias sobre el sistema respiratorio y cardiovascular (Chen y col., 1966).

El empleo de este anestésico, ha demostrado su viabilidad en ciertas situaciones clínicas particulares, es de rápida acción en el organismo y presenta un gran margen de seguridad, debido a que no provoca una severa depresión cardiorespiratoria, como ocurre en la gran mayoría de agentes anestésicos viables (Marietta y col, 1977).

Sin embargo, diferentes investigaciones han demostrado que la ketamina a concentraciones de anestesia general produce un incremento en la presión sanguínea, frecuencia cardiaca y en el flujo sanguíneo periférico en el humano, así como en otras especies de mamífero (Corssen y Domino, 1966; Virtue y col., 1967; Traber, 1968; Chang y col., 1969; Dundee y Wyant, 1974; Hug, 1979; Pagel y col., 1992)

Diferentes investigaciones se han realizado para determinar si la ketamina ejerce acciones directas sobre el músculo liso, así como sus propiedades fisiológicas y farmacológicas sobre el músculo liso de tipo vascular y no vascular. A este respecto, se ha sugerido que concentraciones plasmáticas de ketamina asociados con la inducción de anestesia quirúrgica producen un incremento en el flujo sanguíneo cerebral asociado con un decremento de la contracción vascular de la arteria mesentérica y cerebral del perro (Takeshita y col., 1972; Fukuda y col., 1983), así como una depresión en la contractilidad del miocardio (Pagel y col., 1992)

Por otra parte, se ha reportado que la ketamina (10^{-5} a 10^{-3} M) inhibe en forma dependiente de la dosis las contracciones inducidas por norepinefrina, epinefrina, angiotensina II, vasopresina y por una solución despolarizante de potasio en el músculo liso vascular de la rata (Altura y col., 1980), estas acciones inhibitorias observadas por la adición de la ketamina en el medio de incubación se presentan tanto en el inicio como después de inducir las contracciones (Altura y col., 1980)

Por otra parte, se ha determinado que la ketamina también relaja las contracciones inducidas por varios agonistas en el músculo liso del tipo no vascular en concentraciones comparables con las que se presentan en el plasma sanguíneo durante la anestesia (Lundy, 1974, 1975, Calixto y col., 1983, 1985; Little y col., 1983), por ejemplo la ketamina en el útero de la rata ejerce un efecto inhibitorio de tipo inespecífico, dependiente de la concentración, en la actividad contráctil inducida por Oxitocina o por una solución despolarizante de Potasio (Calixto y col., 1981; Calixto y Loch, 1985).

Otro tipo de músculo liso no vascularizado en el que se ha observado que el clorhidrato de ketamina (10^{-4} a 10^{-3} M) inhibe las contracciones inducidas por estímulos de campo eléctrico es el íleo aislado de cobayo (Little y col., 1983, Smith, 1987), así como el tejido bronquial (Lundy, 1974, 1975).

I. 2. 3. MECANISMO DE RELAJACION INDUCIDO POR EL CLORHIDRATO DE KETAMINA .

Se han realizado diferentes investigaciones, con el objeto de determinar el mecanismo de acción de la ketamina sobre el músculo liso (Altura y col., 1980, Fukuda y col., 1983; Little y col., 1983; Calixto y col., 1985, Ratz y col, 1993)

Se ha establecido que la relajación muscular provocada por la ketamina en el tejido vascular, no involucra la participación de nucleótidos de adenosina, prostaglandinas, receptores colinérgicos o receptores adrenérgicos, como fue determinado, con base al análisis de las contracciones inducidas a preparaciones de músculo liso vascular utilizando antagonistas farmacológicos de estas moléculas, como fueron la fentolamina (bloqueador del alfa-adrenoreceptor), el clorhidrato de propanonol (bloqueador del beta-adrenoreceptor), la atropina (bloqueador del receptor de acetilcolina) o la indometacina (bloqueador de la síntesis de prostaglandinas). Estas observaciones permitieron sugerir, que la ketamina actúa directamente sobre el músculo liso, a nivel de membrana plasmática, por un mecanismo diferente a la unión de los receptores antes mencionados (Altura y col, 1980).

Por otra parte, se ha determinado que la ketamina inhibe las contracciones inducidas por una solución despolarizante de potasio en el músculo liso vascular y no vascular, por lo que, se ha sugerido que la ketamina interfiere competitivamente con el paso de calcio transmembranal al interior de

las células musculares, debido a que las contracciones inducidas por una solución despolarizante, son principalmente asociadas con un incremento en el flujo de los iones de calcio después de la despolarización del sarcolema (Fukuda y col., 1983; Calixto y col.; 1983, 1985).

Se ha observado que la ketamina potencializa el efecto inhibitorio de las catecolaminas por inhibición del mecanismo de recaptura neuronal (Taube y col., 1976) y extaneuronal (Lundy y Frew, 1981), también activa la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas (Lundy y col., 1973). Además bloquea las contracciones inducidas por adrenalina y noradrenalina en el músculo liso vascular, las cuales son dependientes de la liberación de calcio de almacenes intracelulares (Alton y col., 1980) debido a que la ketamina puede entrar con facilidad a las células musculares (Cohen, 1973).

Recientemente, se ha identificado que el mecanismo de relajación que provoca la ketamina sobre el tejido muscular, se debe principalmente a la reducción de la actividad de los canales operados por voltaje que movilizan calcio a través de la membrana plasmática al interior de las células musculares, específicamente los canales de tipo "L", compitiendo con los iones de calcio por los sitios de unión de este ion asociados a los canales "L".

Además existen evidencias de una reducción en la liberación de calcio intracelular del retículo sarcoplásmico, como consecuencia de la interferencia de la actividad del fosfatidilinositol sobre este organelo. A este respecto, se sugiere que esta interferencia se deba a una inhibición en la producción de fosfatidilinositol por la fosfolipasa C (Ratz y col., 1993; Kanmura y col., 1993).

Así mismo, un mecanismo adicional se ha demostrado en el útero de rata, la actividad de la ketamina es potencializada por la teofilina indicando que la ketamina puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa del 3' 5-monofosfato de adenosina (Mukai y col., 1981), lo que involucra un aumento en el flujo del calcio hacia el medio extracelular, así como la recaptura de este ion por organelos intracelulares (Takayamagi y col., 1980; Oashi y Takayanasi, 1983).

Sin embargo Little y colaboradores (1983), así como Smith (1987) han reportado que la ketamina en el íleo aislado de cobayo (10^{-4} y 10^{-3} M) inhibe las contracciones inducidas por estímulos de campo eléctrico y que la naloxona revierte parcialmente el efecto inhibitorio, estas observaciones, permiten sugerir que la ketamina en este tejido, tiene acciones específicas sobre los mecanismos de transmisión de opiáceos para producir de manera parcial o total su acción depresiva

Una observación controversial fue realizado por Altura y colaboradores (1980), en una preparación de músculo liso del tipo vascular, específicamente la aorta de rata, al analizar el efecto de la ketamina sobre las contracciones inducidas por serotonina observaron que estas contracciones fueron potencializadas a bajas concentraciones de ketamina, así mismo el empleo del ácido metilamida y el clorhidrato de metilsergida (antagonistas de los receptores serotoninérgicos) abolen esta interacción sinérgica, además el inhibidor de la recaptura neural de serotonina (fluoxetina) sustituye parcialmente el efecto potencializador de la ketamina en las contracciones inducidas por serotonina.

Por lo tanto, la ketamina en presencia de calcio potencializa la unión de serotonina a sus receptores vasculares previniendo su activación e impidiendo su recaptura neuronal.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .

La administración de agentes intravenosos, es un método común ampliamente utilizado para producir sedación y anestesia general en procedimientos quirúrgicos, pediátricos, dentales, etc. (Koga y col., 1994; Shapiro y col., 1994; Retrack y col., 1996; Pullents y col., 1996).

La ketamina, es un anestésico disociativo que por sus propiedades físicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas, su empleo presenta varias ventajas, este compuesto induce anestesia, sedación y analgesia; así como mantiene la capacidad residual funcional, provoca broncodilatación y evita una depresión cardiovascular (Hass y Harper, 1992)

Por su acción estimulante del sistema cardiovascular, el anestésico ketamina es ampliamente utilizado en pacientes con inestabilidad cardiovascular (Kanmura y col., 1993; Katz y col., 1993). Se ha sugerido que esta acción se lleve a cabo por alguno de los siguientes mecanismos:

- a) Un efecto simpatomimético vía Sistema Nervioso Central.
- b) Una modulación de la actividad de los baroreceptores.
- c) Por una inhibición de la recaptura de las catecolaminas por las terminales simpáticas o
- d) Un efecto inotrópico positivo sobre el miocardio.

Sin embargo, se han reportado diferentes investigaciones que muestran que este anestésico de tipo no barbitúrico, tiene múltiples efectos sobre diferentes sistemas fisiológicos como por ejemplo, el sistema respiratorio, el cardíaco, en el flujo sanguíneo cerebral, periférico, etc. algunos de estos efectos son considerados indeseables.

Por ejemplo, se ha reportado que la ketamina produce aumento en la presión sanguínea y del flujo sanguíneo periférico en algunas especies de mamíferos, incluyendo al hombre (Dundee y Wyant, 1974). La acción estimulante cardiovascular de la ketamina es única en los anestésicos generales, este efecto en algunos pacientes puede ser adverso, debido a que induce hipertensión severa

A este respecto, se ha sugerido que en la rata, concentraciones plasmáticas de ketamina asociadas con la inducción de anestesia quirúrgica producen relajación y también potenciación de la contracción del músculo liso vascular (Alta y col., 1980), es decir una efecto bifásico (primero hipotensión seguido de hipertensión). Así, se ha reportado que la ketamina (10^{-5} a 10^{-3} M) inhibe en forma dependiente de la dosis las contracciones del músculo liso vascular inducidas por adrenalina, noradrenalina, angiotensina II, vasopresina y por una solución despolarizante de potasio, por el contrario, la ketamina (10^{-6} a 10^{-4} M) potencia en forma específica las contracciones inducidas por serotonina en el músculo liso vascular aislado de rata.

Por otra parte, también se ha reportado que la ketamina relaja las contracciones inducidas por varios agonistas en el músculo liso no vascular durante la anestesia (Lundy y col., 1974; 1975, Altura y col., 1980; Little y col., 1983; Fukuda y col., 1983; Qian y col., 1996; Hirota y col., 1996).

En otro tipo de músculo liso no vascular como el tejido bronquial, la ketamina produce una relajación (Lundy y col., 1974), y en el útero aislado de rata, la ketamina tiene efecto inhibitorio inespecífico muy parecido al efecto de la papaverina sobre este tejido (Calixto y Loch, 1985)

De tal manera, que existen diferentes investigaciones que demuestran que este anestésico de tipo disociativo interfiere con la función de varios tipos de músculo liso. Por lo tanto, es importante investigar el efecto de la ketamina sobre otro tipo de músculo liso no vascular perteneciente al sistema del tracto reproductor del macho, particularmente la porción epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata adulta, debido a que éste órgano se considera abundantemente inervada por varicosidades noradrenérgicas y con una alta población de receptores postsinápticos alfa-1 adrenérgicos (Ashoori y Tomita, 1983).

Por lo antes expresado, se estudiará el efecto de la ketamina sobre la contracción inducida por noradrenalina, serotonina y acetilcolina en la porción epididimal y prostática del conducto deferente aislado de ratas adultas. Con la finalidad de investigar si la ketamina interfiere con los mecanismos de transmisión noradrenérgica, serotoninérgica o colinérgica en estas porciones del tracto reproductor del macho y de esta forma explicar algunos de los efectos adversos de este anestésico.

III. HIPOTESIS

Con la premisa de que existen variaciones individuales en la sensibilidad a la ketamina que producen efectos colaterales indeseables principalmente a nivel del sistema cardiovascular, se propone que al estudiar su efecto sobre un tejido muscular no vascularizado, rico en inervaciones adrenérgicas, la estimulación de este sistema, sea debida a una potenciación en los mecanismos de neurotransmisión de las aminos biogénicas de este tejido muscular.

IV. OBJETIVOS.

- Determinar el efecto farmacológico de la ketamina sobre la contracción inducida por Noradrenalina en la porción Epididimal y Prostática del conducto deferente de rata adulta.

- Caracterizar el efecto farmacológico de la ketamina en la contracción inducida por serotonina sobre el conducto deferente.

- Valorar el efecto de la acetilcolina en cada una de las regiones funcionales del conducto deferente aislado de rata y determinar si la incubación con ketamina afecta su comportamiento contráctil.

V. MATERIAL Y METODOS .

- OBTENCION DE LOS CONDUCTOS DEFERENTES.

Se utilizaron ratas macho adultos de la cepa Sprague Dawley con un peso corporal aproximado de 200 gramos y una edad promedio de 12 semanas.

Los animales fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de luz / oscuridad (12 / 12 horas) en cajas de poliuretano, formando grupos de 7 animales por lote, en un cuarto a temperatura de 21- 22º C. El alimento consistió de comida especial para roedores marca Purina y agua ad libitum, con una ventilación apropiada

Las ratas seleccionadas al azar fueron sacrificadas por dislocación cervical, posteriormente fueron fijadas en una tabla de cirugía, la pared abdominal de los mismos fue lavada con etanol al 95% y rasurada. Se realizó una incisión abdominal con la finalidad de exponer el aparato reproductor.

Los conductos deferentes fueron separados y colocados dentro de una caja de Petri de plástico estéril conteniendo solución salina fisiológica Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) a una temperatura de 37º C., con la finalidad de eliminar los restos de grasa, tejido conectivo y sangre utilizando un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss).

Una vez aislados y liberados del tejido conectivo que envolvía a los conductos, los tejidos se perfundieron con ayuda de una jeringa desechable de 1 ml cargada con solución fisiológica.

La solución fisiológica KRB presentó la siguiente composición milimolar: Glucosa 11; NaHCO_3 , 20; NaCl , 120; KCl , 4.6; KH_2PO_4 , 1.2 ; MgSO_4 , 1.2 y CaCl_2 , 1.5 mM. El pH se ajustó a 7.4 con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 95% O_2 / 5% CO_2 durante 20 minutos.

De cada conducto deferente se obtuvieron dos segmentos de aproximadamente un centímetro de longitud, uno de la región cercana al epididimo y otro de la porción cercana a la próstata. Los segmentos se colocaron en un papel filtro y por presión se extrajo el fluido intraluminal de cada una de las regiones del conducto deferente aislados.

- REGISTRO ISOMETRICO DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DE LOS SEGMENTOS DEL CONDUCTO DEFERENTE.

Cada uno de los segmentos obtenidos de la región epididimal y prostática del conducto deferente fueron transferidos y montados en una cámara de incubación para tejidos aislados con un volumen de 10 ml conteniendo solución fisiológica KRB a una temperatura de 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire.

Los segmentos fueron colocados de manera vertical, un extremo del tejido se fijó a la base de la cámara y el otro se unió mediante hilo seda (4-0) al transductor de tensión. De esta forma, la actividad contráctil de los tejidos fue codificada y transcrita en forma de registros isométricos por medio de un sistema convencional que consiste de un transductor de tensión Grass modelo FTO3 conectado a un polígrafo Grass modelo 7B.

El dispositivo de registro de actividad contráctil isométrica se calibró a 1 gramo de tensión, de tal forma, que 1 gramo de tensión equivale a 2 cm del trazo poligráfico. Posteriormente, cada uno de los tejidos se tensionaron a 1 gramo y se estabilizaron durante una hora en el baño de incubación, renovando la solución cada 10 minutos antes de ser expuestos a los fármacos, estandarizadas las condiciones y equilibrados los tejidos en cada experimento, se procedió al inicio del registro de las contracciones espontáneas del tejido.

- SOLUCIONES FARMACOLOGICAS.

Además de la solución Krebs-Ringer-Bicarbonato antes descrita se emplearán las siguientes soluciones:

KRB-Ketamina: Composición mM del KRB más la adición de Clorhidrato de Ketamina (Ket) en una concentración final de 300 micromolar en solución, a las concentraciones de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} Molar.

KRB-Noradrenalina: Composición mM del KRB más la adición de Noradrenalina (NA) a las concentraciones de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} Molar.

KRB-Serotonina Composición mM del KRB más la adición de sulfato de creatinina de serotonina (5HT) a las concentraciones de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} Molar.

KRB-Acetilcolina: Composición milimolar del KRB más la adición de Cloruro de Acetilcolina (Ach) utilizando las concentraciones desde 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} Molar.

KRB-Despolarizante: La composición milimolar fue la misma a la solución de KRB excepto en las concentraciones de KCl de 20-60 mM.

- ACTIVIDAD CONTRACTIL ESPONTANEA DE LOS TEJIDOS DE MUSCULO LISO DEL CONDUCTO DEFERENTE.

La actividad contráctil espontánea se registró durante 20 minutos al iniciar cada experimento. Los fármacos (Noradrenalina, Serotonina y Acetilcolina) se añadieron directamente al baño de incubación en un volumen que nunca excedió de 20 μ l de las soluciones apropiadas para obtener las concentraciones finales requeridas. En todos los casos las drogas se dejaron actuar durante 5 minutos; después de ese tiempo el tejido se lavó dos veces con KRB fresco y precalentado a 37° C.

- CURVA CONCENTRACION-RESPUESTA A KETAMINA.

Los segmentos de la región epididimal y prostática del conducto deferente (n= 15) incubados y estabilizados durante una hora fueron tratados con diferentes concentraciones de Ketamina (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , y 10^{-4} M), por un periodo de cinco minutos en cada concentración, para determinar si el clorhidrato de ketamina afectaba la tensión basal (actividad fisiológica del tejido), lavando el tejido dos veces con solución KRB precalentada a 37° C después de la exposición a cada una de las diferentes concentraciones del fármaco.

-CURVA CONCENTRACION-RESPUESTA A NORADRENALINA.

Los segmentos del tejido del conducto deferente (porción epididimal y prostática) incubadas durante una hora en solución KRB, se sometieron a diferentes concentraciones de Noradrenalina (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M) adicionándose 10 μ l en el baño de incubación por periodos de cinco minutos, lavando el tejido dos veces con solución fresca de KRB después de la exposición a cada una de las diferentes concentraciones.

- EFECTO DE LA KETAMINA EN LA CURVA CONCENTRACION-RESPUESTA A NORADRENALINA .

Una vez que se determinó la concentración de ketamina (300 μ M) que presentó un efecto en la actividad contráctil de los segmentos epididimal y prostático de conducto deferente de aislado de rata se realizó la curva concentración-respuesta a noradrenalina a partir de los datos generados de 15 repeticiones.

Posteriormente se determinó la actividad de la concentración del clorhidrato de ketamina (300 μ M) en la respuesta contráctil inducida por noradrenalina en este tejido realizándose el siguiente protocolo:

- a) Se realizó una curva concentración-respuesta a noradrenalina (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M) de las regiones epididimal y prostática.

b) Los segmentos de músculo liso se preincubaron con 300 μM de clorhidrato de ketamina durante diez minutos en solución fisiológica antes de la adición de cada concentración del fármaco, permitiendo la construcción de una segunda curva concentración-respuesta a noradrenalina (10^{-7} - 10^{-4} M) y se determinó el efecto de la preincubación con ketamina sobre las contracciones inducidas por la noradrenalina en el músculo liso del conducto.

c) Se realizó una tercera curva concentración-respuesta con el objeto de determinar el efecto de la ketamina sobre la contracción inducida en cada una de las concentraciones de noradrenalina empleadas, cada concentración de noradrenalina se dejó actuar sobre el tejido durante 3 minutos, posteriormente se adicionó el clorhidrato de ketamina en una concentración de 300 μM y se registró su efecto, lavando dos veces con KRB antes de cada tratamiento.

- EFECTO DE LA KETAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL INDUCIDA POR SEROTONINA-

Las tiras de músculo liso de las regiones epididimal y prostática del conducto deferente se expusieron durante cinco minutos a diferentes concentraciones de serotonina (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M), se obtuvo la curva concentración-respuesta a serotonina y se calculó la concentración efectiva media de los datos obtenidos de 15 repeticiones.

Posteriormente los segmentos epididimal y prostático incubados durante una hora en solución KRB se expusieron a las diferentes concentraciones de serotonina en presencia de la concentración óptima de ketamina antes y durante la contracción inducida, se construyó la curva concentración- respuesta bajo estas condiciones experimentales, siguiendo el siguiente protocolo:

- a) Se realizó la curva concentración- respuesta a serotonina
- b) Los segmentos del conducto deferente se preincubaron durante diez minutos en presencia de clorhidrato de ketamina ($300 \mu\text{M}$).
- c) Se indujo la curva concentración respuesta a serotonina y se determinó el efecto de la ketamina preincubada.
- d) Se determinó el efecto de la ketamina sobre la contracción inducida en cada concentración de serotonina (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M), actuando durante tres minutos, se construyó del registro isométrico la curva concentración-respuesta.

- CURVA CONCENTRACION- RESPUESTA A ACETILCOLINA.

Las porciones de tejido del conducto deferente aislados de rata adulta macho incubadas por una hora en solución fisiológica KRB, precalentada a 37°, con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 95% de O₂ / 5% de CO₂, se expusieron a diferentes concentraciones de Acetilcolina (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ y 10⁻⁴ M) por un periodo de 5 minutos, lavando el tejido dos veces con solución KRB antes de adicionar la respectiva concentración de Ach. Posteriormente, en base a los registros isométricos de 15 repeticiones se construyó la curva concentración-respuesta para este fármaco.

Se valoró el efecto de la preincubación durante 10 minutos del clorhidrato de ketamina, así como su efecto sobre la respuesta contráctil inducida por la acetilcolina en las porciones de tejido de la región prostática y epididimal del conducto deferente de rata siguiendo el protocolo experimental.

- CURVA CONCENTRACION- RESPUESTA DE LA REGION EPIDIDIMAL Y PROSTATICA A UNA SOLUCION DESPOLARIZANTE .

Cada uno de los segmentos aislados del conducto deferente incubados durante una hora, en las cámaras de incubación, conteniendo solución krebs ringer bicarbonato a una temperatura de 37° C. con un burbujeo constante de una mezcla de carbógeno, se sometieron a la inducción de su actividad contráctil con una solución despolarizante de cloruro de potasio a 40mM.

a) se construyó la curva concentración-respuesta a diferentes concentraciones de la solución despolarizante

b) Se preincubó durante diez minutos con clorhidrato de ketamina y se valoró su efecto en las contracciones inducidas con KCl

c) Se valoró el efecto de la ketamina (300 μ M) sobre la contracción inducida con la solución despolarizante, la solución se dejó actuar durante diez minutos y posteriormente se adicionó al medio a la ketamina y se dejó actuar durante 5 minutos y se obtuvieron los registros.

- ANALISIS ESTADISTICO

Una vez llevado a cabo el registro gráfico de la actividad contráctil del conducto deferente inducido por Noradrenalina, Serotonina Acetilcolina y de una solución despolarizante de potasio, así como el efecto de la ketamina en estas respuestas, se midió la tensión generada del trazo poligráfico obtenido en cada uno de los registros isométricos de la actividad contráctil de los tratamientos con fármacos.

Los datos numéricos generados de la actividad contráctil de las porciones de tejido de la región epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata, de 15 repeticiones por agonista contráctil, fueron expresados en gramos de tensión, posteriormente se procedió a construir respectivamente las curvas concentración-respuesta de los diferentes fármacos utilizados en este estudio.

Las contracciones inducidas por Noradrenalina, Serotonina y Acetilcolina se consideraron como el 100% en todos los experimentos respectivamente, y se compararon con las respuestas que se obtuvieron en presencia de Ketamina en las condiciones experimentales antes mencionadas.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se determinó mediante la prueba paramétrica *t* de Student para datos no pareados con un nivel de significancia $P = 0.05$ (Wayne, 1988) La sensibilidad de los agonistas fue expresada como el logaritmo negativo del CE_{50} , las concentraciones efectivas 50 (CE_{50} : concentración del fármaco que produce la mitad de la respuesta máxima) se determinaron gráficamente de acuerdo con el método de Tallarida y Murray, 1981.

- REACTIVOS.

Todos los reactivos utilizados para preparar la solución de KRB fueron de grado analítico. Se utilizó agua bidestilada para preparar la solución de KRB. El sulfato de creatinina de serotonina, clorhidrato de L- arterenol (noradrenalina) y el cloruro de Acetilcolina fueron suministradas por la firma comercial Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo).

VI. RESULTADOS.

VI. 1. Efecto del clorhidrato de ketamina sobre la contracción inducida por noradrenalina en el conducto deferente aislado de rata.

Se valoró el efecto del clorhidrato de ketamina en la actividad farmacológica de diferentes agonistas mediante el análisis de los registros isométricos de la actividad contráctil del músculo liso de las porciones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata .

De los registros generados durante la incubación y estabilización de ambas porciones del conducto deferente aislado de rata, se determinó que no se producía ninguna tensión basal o actividad espontánea propia de los tejidos .

En el panel A de las figuras 1 y 2 se observan los trazos poligráficos de la actividad muscular generada por los segmentos epididimales y prostáticos inducidos por diferentes concentraciones de noradrenalina desde 10^{-7} a 10^{-4} molar. La representación del trazo poligráfico indica que la noradrenalina indujo una respuesta contráctil en las regiones epididimal y prostática del vaso deferente aislado de rata en función de la concentración administrada .

La actividad isométrica del músculo indica que dependiendo de la concentración de noradrenalina adicionada al medio de incubación, existió un mayor incremento en la amplitud (gramos de tensión) y frecuencia de las contracciones en el músculo liso de la región epididimal, lo que indica un aumento en la sensibilidad de la respuesta contráctil en esta porción de tejido a la noradrenalina.

En el panel B, de las figuras 1 y 2, se observan los trazos poligráficos obtenidos de la actividad muscular de las regiones de estudio del conducto deferente; valorando el efecto de la preincubación durante 10 minutos con ketamina antes de adicionar cada una de las concentraciones de noradrenalina, la representación gráfica de los trazos poligráficos de esta actividad muestran que existe una potenciación en las respuestas inducidas por noradrenalina, que se observa en la amplitud y en la proporción de las contracciones de ambas regiones en relación a los registros típicos de la actividad control de estas regiones (panel A).

La ketamina en una concentración de anestesia (300 μ M), no desarrolló ningún efecto en la tensión basal del tejido muscular de ambas regiones del conducto deferente, como se observa en los registros isométricos de la actividad durante la preincubación con ketamina (figuras 1 y 2, panel B).

El efecto de la ketamina sobre las contracciones inducidas por diferentes concentraciones de noradrenalina es reversible, debido a que esta actividad farmacológica es removida de los tejidos después de los lavados tisulares con solución fisiológica Krebs-Ringer-Bicarbonato.

La sensibilidad a la noradrenalina de la región epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata fue analizada a partir de la curva concentración-respuesta, la cual fue construida de las respuestas contráctiles generadas al administrar noradrenalina en concentraciones crecientes sobre el músculo liso de estas regiones del conducto deferente; la actividad contráctil muscular inducida generó curvas de tipo sigmoide. La concentración efectiva cincuenta y la respuesta máxima fueron determinados directamente en forma gráfica (Tallarida y Murray, 1981).

Las curvas concentración-respuesta a noradrenalina de las regiones epididimal y prostática del conducto deferente se muestran en la figura 3, en ambas regiones se observó que la respuesta contráctil fue dependiente de la concentración administrada en el sistema experimental (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M).

Los resultados indican que la respuesta máxima contráctil del conducto deferente en ambas regiones fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en la región epididimal que en la región prostática, indicando que el tejido muscular de la región epididimal es más sensible a la noradrenalina con una respuesta máxima de 1.15 gramos de tensión en relación a la región prostática de 0.66 gramos (fig. 4 y 5).

Al valorar el efecto de la preincubación de la ketamina en la curva concentración-respuesta de la actividad contráctil de la región epididimal inducida por noradrenalina (fig. 4), se determinó que la curva en presencia de ketamina ($300 \mu\text{M}$) muestra un desplazamiento paralelo a la izquierda, de

tal manera, que la respuesta máxima de la curva a noradrenalina preincubada con ketamina presenta un incremento significativo ($p < 0.05$) con respecto a la curva control. Al igual la efectividad del fármaco (CE_{50}) fue potencializada significativamente por la preincubación del tejido con ketamina (tabla I).

En lo que respecta al efecto de la preincubación de la porción prostática con ketamina antes de la inducción con cada una de las concentraciones de noradrenalina (fig. 5), se determinó que existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la curva control, presentando el mismo comportamiento con un desplazamiento de la curva hacia la izquierda, lo que indica una potenciación de la respuesta inducida en presencia de ketamina.

Estos datos indican que la ketamina incrementa la potencia y eficacia de la noradrenalina para inducir la actividad contráctil en ambos tejidos del conducto deferente aislado de rata (Tabla I y II).

VI. 2. Efecto del clorhidrato de ketamina en la actividad contráctil inducida por serotonina en el tejido muscular del conducto deferente.

Otro de los neurotransmisores utilizados en el diseño experimental para caracterizar el efecto farmacológico de la ketamina a concentraciones plasmáticas de anestesia en la rata macho ($300 \mu\text{M}$) fue la serotonina. Se analizaron los trazos poligráficos obtenidos de la actividad contráctil inducida por diferentes concentraciones de serotonina (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M).

La representación poligráfica de las contracciones obtenidas en el tejido muscular de las porciones epididimal y prostática del conducto deferente (figuras 6 y 7, panel superior), indica que la serotonina también induce una respuesta contráctil en estos segmentos de tejido, además la actividad contráctil se ve incrementada en forma dependiente de la concentración de serotonina empleada en el sistema de inducción.

La preincubación de los tejidos aislados durante 10 minutos con clorhidrato de ketamina en el medio de incubación, antes de ser expuestos a las diferentes concentraciones de serotonina, provocó un incremento de la respuesta contráctil a la serotonina en ambas regiones, como se observa en el aumento de la amplitud y en la frecuencia de las contracciones (figura 6 y 7, panel inferior).

El efecto potencializador de la ketamina es reversible debido a que al removerlo durante los lavados con solución fisiológica el efecto desaparece.

Al comparar ambas regiones se observa que la región epididimal presentó una mayor sensibilidad a la serotonina (figura 8).

Comparando estadísticamente los datos de las curvas concentración-respuesta a la serotonina, en presencia o ausencia de ketamina en la región epididimal, se determinó la existencia de diferencias significativas entre ambas curvas ($p < 0.05$), en relación a la concentración de serotonina empleada para la inducción (figura 9), la respuesta máxima fue de 0.5 gramos de tensión en la concentración de $10^{-4}M$ de serotonina, la concentración efectiva media tuvo un incremento significativo ($p < 0.05$), lo que indica la existencia de un efecto

potencializador de la ketamina bajo estas condiciones de anestesia, como lo indica el desplazamiento paralelo a la izquierda de la curva construida en presencia de ketamina (tabla I)

Este desplazamiento a la izquierda de la curva concentración-respuesta a la serotonina en presencia de ketamina también se observa en la curva de la actividad contráctil de la porción prostática (fig. 10) con diferencias significativas ($p < 0.05$), al igual que en la respuesta máxima y la CE_{50} (tabla II).

Estos resultados indican que la ketamina actúa sobre este músculo potencializando el mecanismo serotoninérgico que induce un trabajo mecánico en el conducto deferente de la rata, provocando una mayor sensibilidad y efectividad en la región epididimal en relación al efecto en la región prostática.

VI. 3. Efecto de la ketamina en las contracciones inducidas por acetilcolina en las porciones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata.

Con el objeto de determinar si el efecto potencializador de la ketamina era exclusiva de las aminas biogénicas, se determinó su efecto sobre el sistema parasimpático del conducto deferente.

A partir de los registros típicos originados de la actividad mecánica inducida por la acetilcolina en ambas porciones del conducto deferente se construyeron las curvas concentración-respuesta a acetilcolina.

Al analizar la curva concentración-respuesta de las contracciones producidas en la región epididimal y prostática, se puede determinar que la respuesta inducida es dependiente de la concentración de acetilcolina administrada al medio de incubación, además se observan diferencias significativas en la respuesta máxima entre ambas regiones, existiendo una mayor sensibilidad a este neurotransmisor en la región epididimal, con una respuesta máxima de 0.9 g de tensión inducida por una concentración del orden de $10^{-4}M$ de acetilcolina (Figura 11).

Al evaluar las curvas concentración-respuesta de los segmentos de la región epididimal en presencia o ausencia de la preincubación con ketamina (figura 12), se observa que no existen diferencias significativas en cada una de

las respuestas a las diferentes concentraciones del fármaco e incluso se observa que la curva en presencia de ketamina presenta un ligero desplazamiento a la derecha sin diferencias significativas entre ambas curvas, lo que indica un decremento de la actividad contráctil epididimal, como se determinó al valorar la respuesta máxima y concentración efectiva 50 (Tabla I)

Al evaluar el efecto farmacológico de la ketamina en las contracciones inducidas por acetilcolina en la región prostática también se observa que no existen diferencias significativas entre ambas curvas (figura 13) y que existe un desplazamiento no significativo a la derecha lo que indica un decremento no significativo ocasionado en la actividad inducida por acetilcolina por la preincubación con ketamina en concentraciones de anestesia.

Al analizar estadísticamente la respuesta máxima y la concentración efectiva media de ambas regiones se determinó que no existieron diferencias significativas (tabla 1 y 2), lo que indica que la ketamina no afectó la eficacia o potencia de la acetilcolina en la respuesta contráctil inducida.

VI. 4 Efecto del clorhidrato de ketamina en la actividad contráctil obtenida por una solución despolarizante en el conducto deferente.

En la figura 14 y 15 se observan las curvas concentración-respuesta obtenidas de las diferentes concentraciones de cloruro de potasio en el medio de incubación (20-60 mM), el empleo de una solución despolarizante de K^+ fue con el objeto de inducir en la región epididimal y prostática una actividad mecánica guiada por la entrada de calcio al interior de las células musculares a través de canales operados por voltaje y evaluar el efecto de la preincubación de ketamina o sobre las contracciones inducidas

Al valorar las respuestas inducidas por cloruro de potasio (10 - 60 mM) en el tejido epididimal y prostática, en presencia o ausencia de ketamina (300 μ M), se observa que las curvas control inducidas por la solución de K^+ fueron significativamente reducidas en presencia de ketamina. En los gráficos de la respuesta contráctil de los tejidos en respuesta a la solución despolarizante, se puede determinar que el clorhidrato de ketamina presentó un significativo antagonismo negativo al inhibir la respuesta inducida por la despolarización, en todas las concentraciones de KCl empleadas en el medio de incubación.

Los cambios inducidos por la ketamina en la respuesta máxima y la concentración efectiva cincuenta de la noradrenalina, serotonina y acetilcolina, en ambas regiones de tejido muscular liso de tipo no vascularizado del conducto deferente se representan en las tablas I y II.

El análisis estadístico mediante la prueba de t de Student para datos no pareados demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en los parámetros de noradrenalina y serotonina, la ketamina aumentó la eficacia y potencia de estas aminas en la actividad contráctil inducida tanto en la región epididimal, como prostática del conducto deferente, asimismo la ketamina no presentó cambios significativos en los parámetros de acetilcolina en ambas regiones del conducto deferente.

Estos aspectos junto con los resultados observados en la sensibilidad y respuesta a las diferentes concentraciones empleadas para noradrenalina, serotonina, acetilcolina y una solución de KCl en el modelo experimental empleado en este estudio nos permiten establecer que la ketamina ejerce efectos farmacológicos en la actividad contráctil modulada por estos agonistas, este anestésico presentó un efecto potencializador en las respuestas de noradrenalina y serotonina, y un efecto inhibitor en la actividad inducida por la solución despolarizante y acetilcolina, por lo tanto, la ketamina presenta diferentes acciones fisiológicas según el neurotransmisor implicado

REGION EPIDIDIMAL

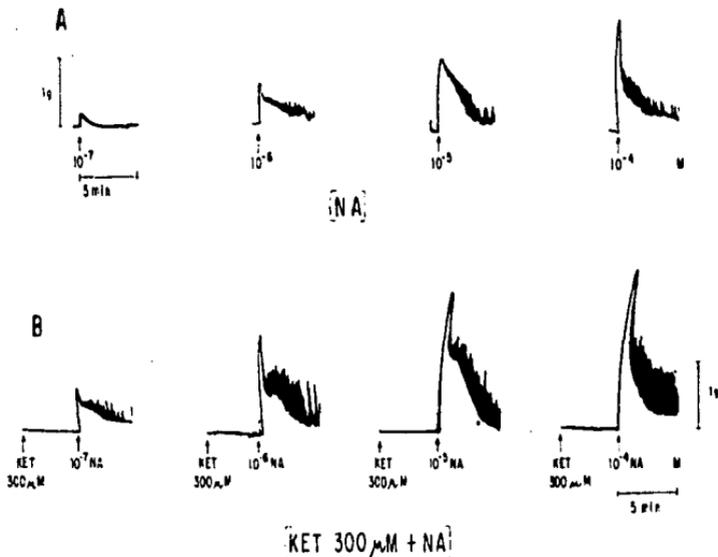


FIGURA 1. TRAZOS TÍPICOS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL DE LA REGION EPIDIDIMAL DEL VASO DEFERENTE DE RATA A NORADRENALINA.

A, CONTROL CON NORADRENALINA (NA 10^{-7} - 10^{-6} M)

B, EFECTO DE LA PREINCUBACION CON CLORHIDRATO DE KETAMINA (KET 300 μM) EN LA RESPUESTA INDUCIDA CON NORADRENALINA

REGION PROSTATICA

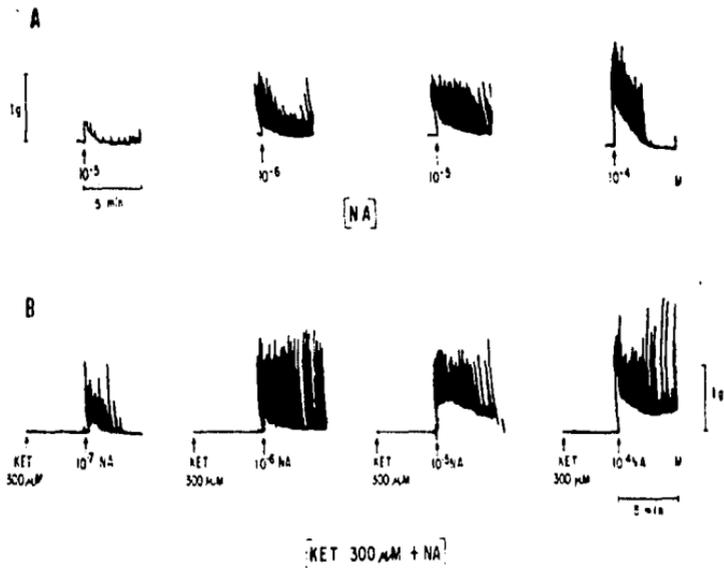


FIGURA 2. TRAZOS TÍPICOS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL DE LA REGION PROSTATICA DEL VASO DEFERENTE CE RATA A NORADRENALINA
 A, CONTROL CON NORADRENALINA [NA 10^{-7} - 10^{-4} M]
 B, EFECTO DE LA PREINCUBACION CON CLORHIDRATO DE KETAMINA [KET 300 μ M] EN LA RESPUESTA INDUCIDA CON NORADRENALINA

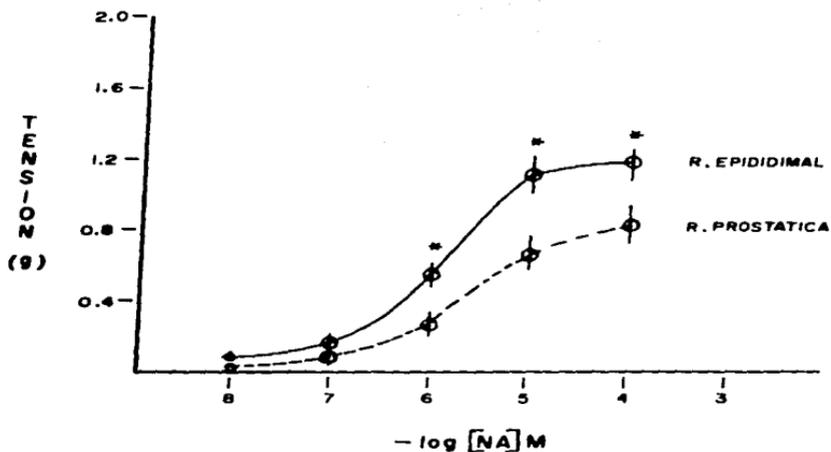


Figura 3

Curvas concentración-respuesta a noradrenalina $[NA]$ de las regiones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* $P < 0.05$

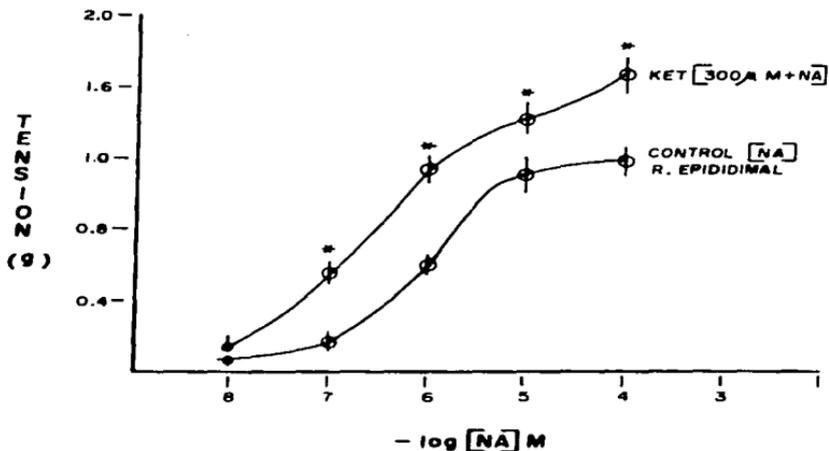


Figura 4

Efecto del Clorhidrato de Ketamina [KET 300 μ M] en la respuesta contráctil a noradrenalina [NA] en la región epididimal del conducto deferente de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* $P < 0.05$

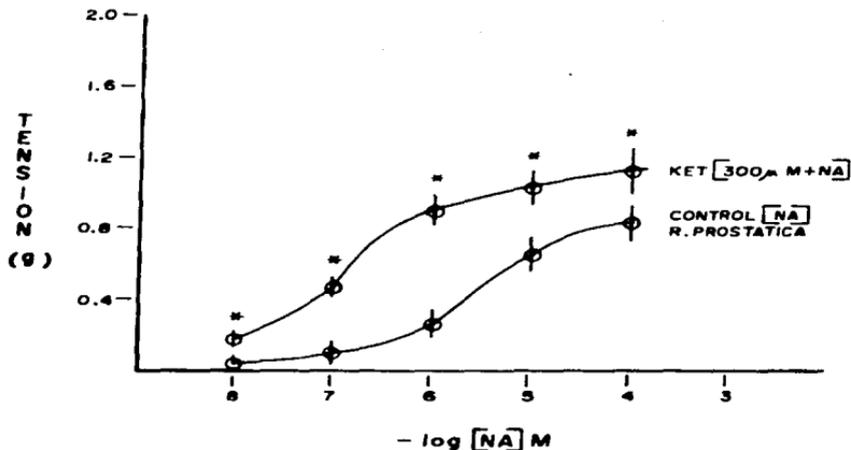


Figure 5

Efecto del Clorhidrato de Ketamina [KET 300 μM] en la respuesta contráctil a noradrenalina [NA] en la región prostática del conducto deferente aislado de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos, y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* P < 0.05

REGION EPIDIDIMAL

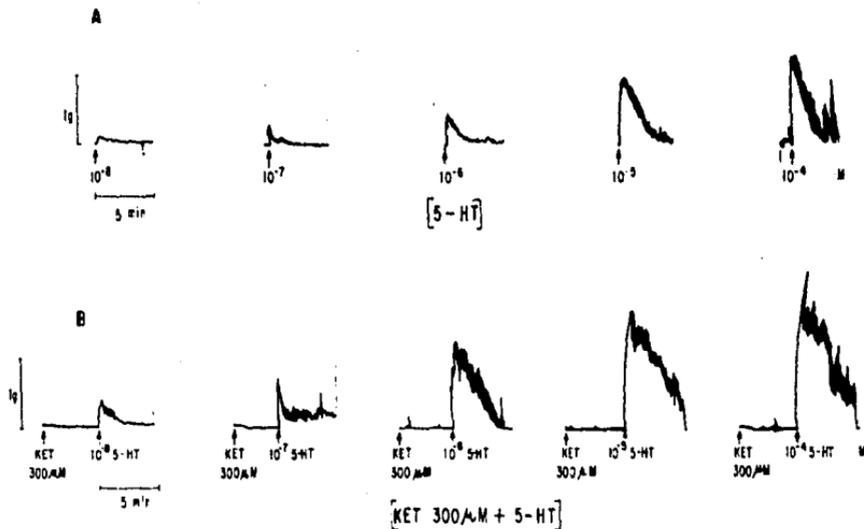


FIGURA 6. TRAZOS TÍPICOS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL DE LA REGION EPIDIDIMAL DEL VASO DEFERENTE DE RATA A SEROTONINA

A - CONTROL

B - EFECTO DE LA PREINCUBACION CON CLORHIDRATO DE NETAMINA [KET 300 μM]

REGION PROSTATICA

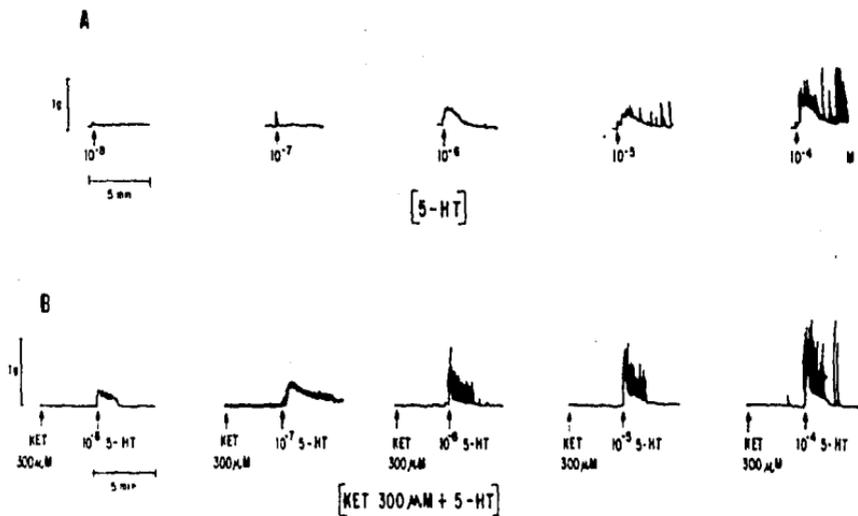


FIGURA 7. TRAZOS TÍPICOS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL DE LA REGIÓN PROSTATICA DEL VASO DEFERENTE DE RATA A SEROTONINA.

A.- CONTROL

B.- EFECTO DE LA PREINCUBACION CON CLORHIDRATO DE KETAMINA (KET 300 μ M)

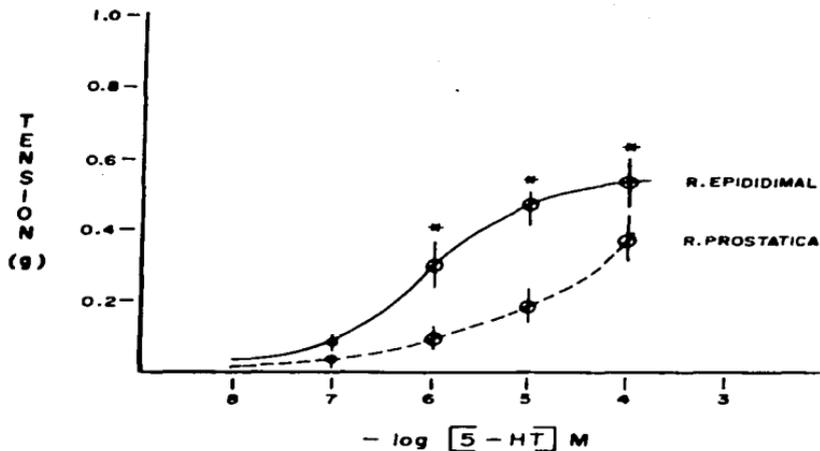


Figura 8

Curvas concentración-respuesta a *Serg-tonina* de las regiones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de Student.

* $P < 0.05$

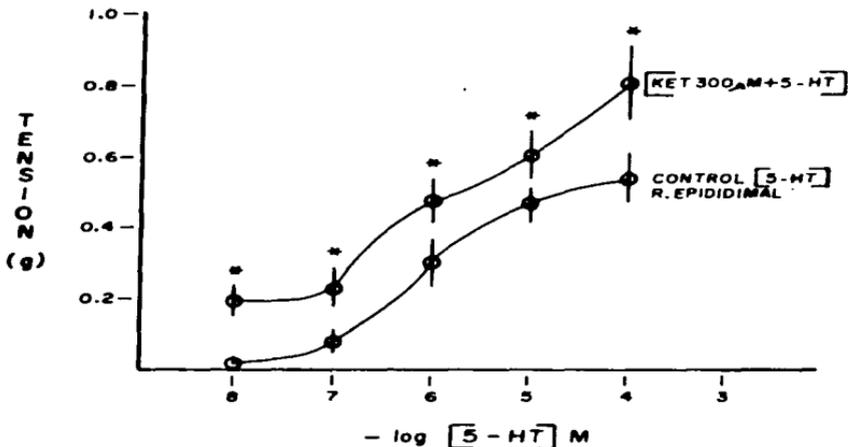


Figura 9

Efecto de Clorhidrato de Ketamina [KET 300 μ M] en la respuesta con - tráctil a serotonina [5-HT] en la región epididimal del conducto deferente de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* $P < 0.05$

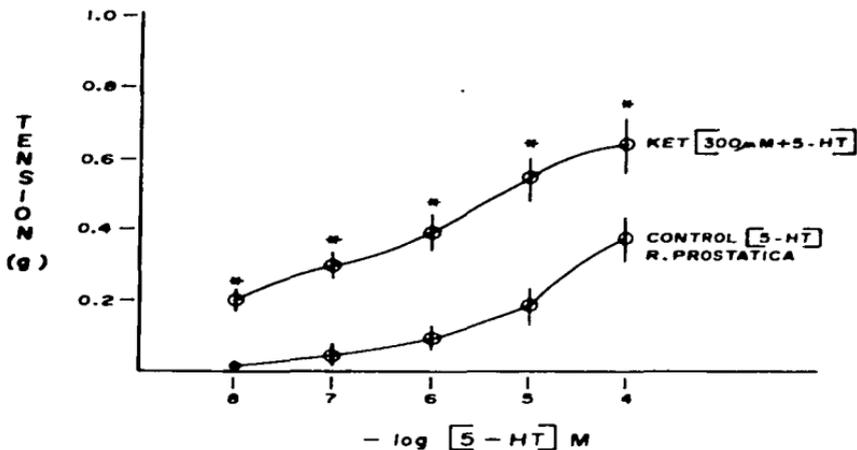


Figura 10

Efecto de Clorhidrato de Ketamina
 $[KET 300 \mu M]$ en la respuesta con-
 tráctil a serotonina $[5-HT]$ en la re-
 gión prostática del conducto deferente
 aislado de rata.

Los valores representan el promedio
 de 15 experimentos y las líneas ver-
 ticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante
 la prueba t de Student.

* $P < 0.05$

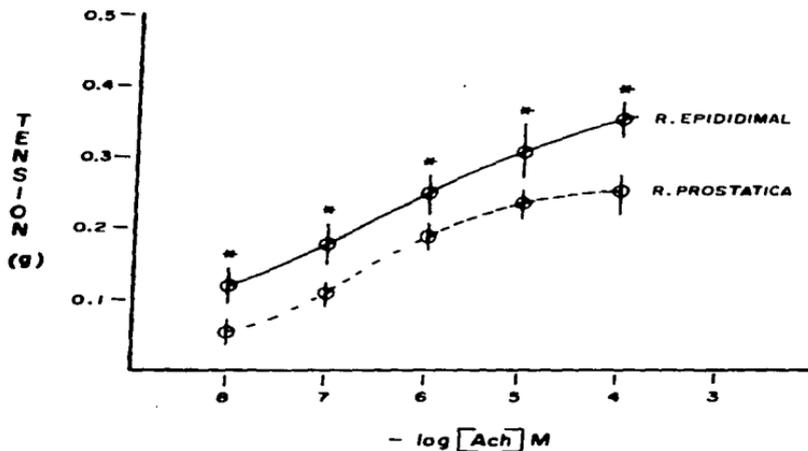


Figura 11

Curvas concentración - respuesta a Acetilcolina de las regiones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estandar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de Student.

* $P < 0.05$

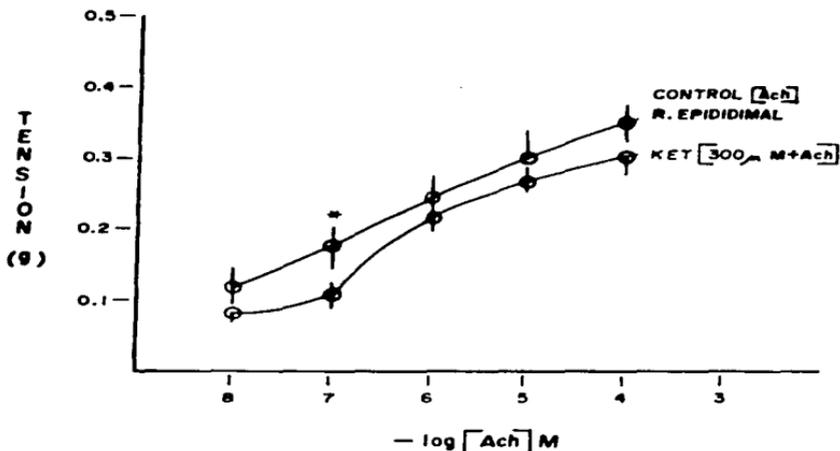


Figura 12

Efecto del Clorhidrato de Ketamina [KET 300 μ M] en la respuesta contráctil a Acetilcolina [ACh] en la región epididimal del conducto deferente aislado de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* $P < 0.05$

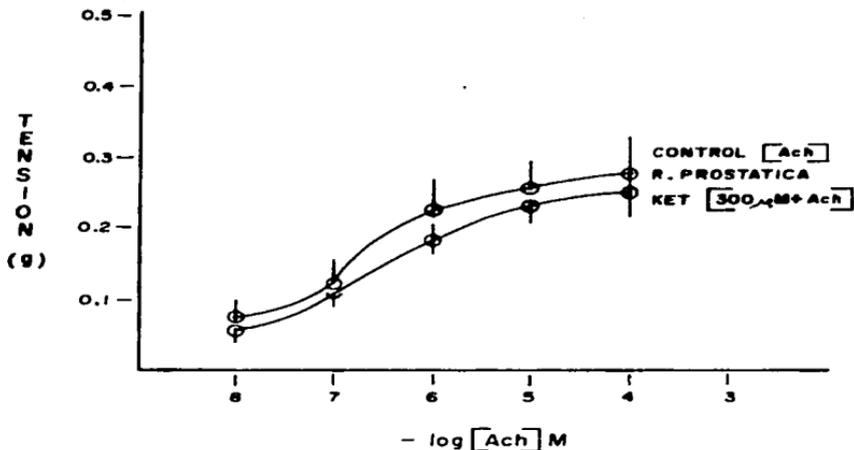


Figura 13

Efecto del Clorhidrato de Ketamina $[KET 300 \mu M]$ en la respuesta contráctil a Acetilcolina $[ACh]$ en la región prostática del conducto deferente aislado de rata.

Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* $P < 0.05$

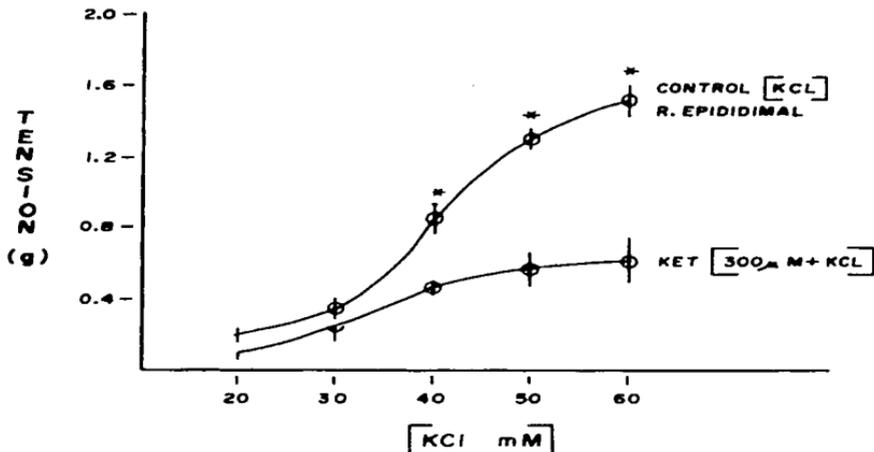


Figura 14

Efecto del Clorhidrato de Ketamina [KET 300 μM] en la respuesta contráctil a una solución despolarizante [KCl] en la región epididimal del conducto deferente aislado de rata. Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

* P < 0.05

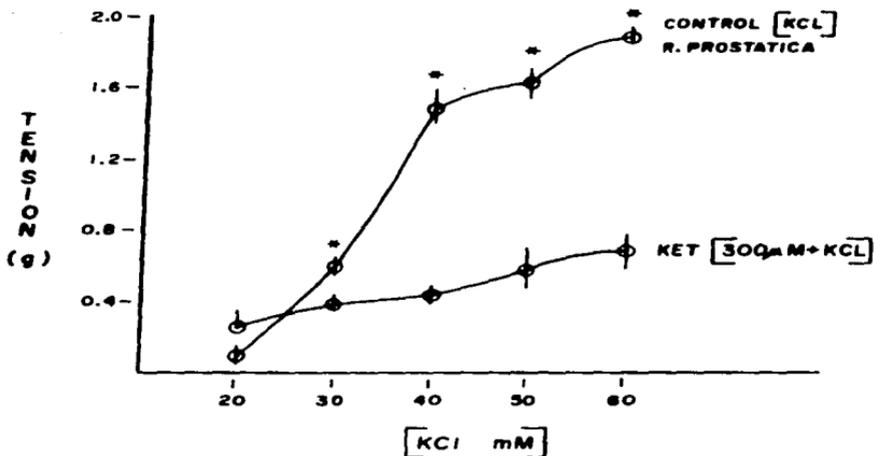


Figura 15

Efecto del Clorhidrato de Ketamina [KET300µM] en la respuesta contráctil a una solución despolarizante [KCl] en la región prostática del conducto deferente aislado de rata. Los valores representan el promedio de 15 experimentos y las líneas verticales la desviación estándar.

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student.

*P < 0.05

TABLA I

Parámetros que describen el comportamiento de la región epididimal del conducto deferente aislado de rata en presencia de ketamina.

REGION EPIDIDIMAL

Agonista contráctil	Control		Preincubación con ketamina 300 μ M	
	CE ₅₀ (M)	R _{max} (g)	CE ₅₀ (M)	R _{max} (g)
NA	1.05 \pm .11 \times 10 ⁻⁶	1.15 \pm 0.11	2.52 \pm .31 \times 10 ⁻⁷ **	1.62 \pm 0.16 **
5-HT	1.21 \pm .14 \times 10 ⁻⁶	0.51 \pm 0.06	4.83 \pm .57 \times 10 ⁻⁷ **	0.78 \pm 0.08**
Ach	4.72 \pm .6 \times 10 ⁻⁶	0.87 \pm 0.07**	3.65 \pm .52 \times 10 ⁻⁶ **	0.96 \pm 0.09**

Agonista contráctil: NA = Noradrenalina; 5-HT = Serotonina; Ach = Acetilcolina. CE₅₀ = Concentración efectiva 50, (M = Molar); R_{max} = Respuesta máxima, (g = gramo).

Los valores representan el promedio de 15 experimentos \pm el error estándar.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student para datos no pareados.

* P < 0.05

N.S. = Diferencia no significativa.

TABLA II

Parámetros que describen el comportamiento de la región prostática del conducto deferente aislado de rata en presencia de Ketamina.

REGION PROSTATICA

Agonista contráctil	Control		Preincubación con Ketamina 300 μ M	
	CE ₅₀ (M)	R _{max} (g)	CE ₅₀ (M)	R _{max} (g)
NA	$2.5 \pm .32 \times 10^{-6}$	0.66 ± 0.06	$1.02 \pm .12 \times 10^{-6}$ *	1.09 ± 0.11 *
5-HT	$7.03 \pm .91 \times 10^{-6}$	0.32 ± 0.03	$7.54 \pm .98 \times 10^{-6}$ *	0.61 ± 0.05 *
Ach	$1.23 \pm .17 \times 10^{-5}$	0.52 ± 0.04 **	$1.06 \pm .14 \times 10^{-5}$ **	0.57 ± 0.06 **

Agonista contráctil: NA = Noradrenalina; 5-HT = Serotonina; Ach = Acetilcolina. CE₅₀ = Concentración efectiva 50; (M = Molar); R_{max} = Respuesta máxima, (g = gramo).

Los valores representan el promedio de 15 experimentos \pm el error estándar.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student para datos no pareados.

* $P < 0.05$

N.S. = Diferencia no significativa.

VII. DISCUSION.

La finalidad de este estudio fue evaluar las propiedades farmacológicas del clorhidrato de ketamina en la actividad contráctil inducida por noradrenalina, serotonina y acetilcolina en las porciones epididimal y prostática del conducto deferente, utilizando como modelo experimental al conducto deferente aislado de rata, debido a que el tejido muscular de este órgano se encuentra inervado y regulado principalmente por el mecanismo noradrenérgico, además existen evidencias que en la neurotransmisión del conducto deferente participan la acetilcolina (Anstein y Birgmingham, 1980) y probablemente la serotonina (Cohen y col., 1984).

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron valorar el efecto del clorhidrato de ketamina en el músculo liso de las porciones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata, mediante el análisis de registros isométricos de la actividad muscular generada por los diferentes agonistas.

La valoración de la actividad mecánica del conducto deferente, mostró que este tejido muscular no vascularizado no presentó ninguna actividad espontánea, por lo cual se puede inferir que las respuestas generadas en este tejido se deban principalmente a la estimulación química inducida por los agonistas del sistema simpático y parasimpático empleados en este estudio (Wali y Hayter, 1989).

En este estudio se determinó al comparar la actividad mecánica del tejido muscular de las porciones epididimal y prostática del conducto deferente aislado de rata, que la ketamina induce un efecto potencializador en la respuesta generada por noradrenalina y serotonina, este efecto es particular de estas aminas, debido a que el clorhidrato de ketamina en concentraciones de anestesia (300 μ M) no induce este efecto en la actividad mecánica generada por acetilcolina y una solución despolarizante

Altura y col., (1980), investigaron el efecto de la ketamina sobre el músculo liso vascular, determinando que la ketamina inhibe en forma dependiente de la dosis las contracciones mecánicas de la vena porta y de la arteria aorta, además de inducir un decremento en la sensibilidad y respuestas de estos tejidos a diferentes agonistas vasoactivos. Sin embargo, la ketamina potenció las contracciones del tejido muscular vascularizado de la aorta y vena porta inducidas por serotonina a bajas concentraciones; este comportamiento de la ketamina fue similar a la potenciación de la respuesta contráctil inducida por la noradrenalina y serotonina en el músculo liso no vascular de ambas regiones del conducto deferente analizados en este estudio.

Este efecto potencializador en la respuesta adrenérgica y serotoninérgica de la ketamina en el conducto deferente de la rata, podría explicar el efecto estimulador del sistema cardiovascular (Lee & Hou, 1995), debido que este sistema se encuentra regulado principalmente por receptores adrenérgicos del tipo α_1 .

En el modelo experimental utilizado en este estudio, se ha determinado por métodos de fluorescencia, microscopía y afinidad, que este tejido se encuentra altamente innervado por varicosidades noradrenérgicas con su receptor principal α_1 , que regula dicha actividad (Mac Donald & McGrath, 1980).

Al comparar ambas regiones, se determinó que existe una sensibilidad a los agonistas empleados, en base a las valoraciones realizadas en los registros típicos de la actividad de estos tejidos, tanto en la tensión generada, como en la frecuencia de las contracciones

De tal manera, se determinó que el conducto deferente presenta dos tipos de respuesta contráctil, una respuesta dependiente de las vías noradrenérgicas y una segunda respuesta, de tipo no noradrenérgico, dependiente de la serotonina y acetilcolina. Por otra parte, se observa que ambos tejidos presentan una sensibilidad y reactividad en la respuesta a los diferentes agonistas empleados en este estudio, en el siguiente orden de efectividad: noradrenalina > serotonina > acetilcolina, sugiriendo un significado fisiológico principalmente a nivel de la regulación contráctil de este tejido.

Se ha determinado, que en la región prostática se encuentra una mayor innervación noradrenérgica, con respecto a la región epididimal, además presenta un mayor contenido de noradrenalina endógena, sin embargo en este estudio farmacológico, se determinó que existe una mayor respuesta a la noradrenalina

en la región epididimal, esto puede indicar que los receptores de esta región tienen una mayor afinidad por el neurotransmisor, es decir, una mayor sensibilidad a estos agonistas en la región epididimal (Mac Donald & Mc Grath, 1980; 1984).

Es importante mencionar que el conducto deferente presenta movimientos musculares que permiten el paso de los espermatozoides, así como el contacto con las secreciones de la próstata y de las vesículas seminales, por lo tanto existe una regulación constante para mantener estos movimientos, asimismo, es posible que la sensibilidad de los receptores adrenérgicos sea menor en la región prostática, como un mecanismo que asegure que la expulsión de los espermatozoides se lleve a cabo en el momento que las señales nerviosas disparen y alcancen el umbral que activa a los receptores para iniciar las contracciones del conducto durante la eyaculación.

Por otra parte, en el modelo experimental empleado se pudo determinar que el conducto deferente presenta una reactividad farmacológica regional a la serotonina, indicando una posible regulación de esta indolamina en la actividad contráctil del conducto deferente de rata, los almacenes identificables al igual que la histamina son almacenes intravesiculares, coexistiendo con la noradrenalina en las terminaciones nerviosas, así como en almacenes periféricos, tales como células cebadas (Campos, 1986). La existencia de serotonina, así como la respuesta de ambas regiones del conducto deferente aislado de rata, sugiere que este neurotransmisor participe directamente sobre este tejido de músculo liso no vascular, o regule vía estimulación de las neuronas postsinápticas la liberación de noradrenalina principalmente a nivel de la región prostática durante la eyaculación.

Se han realizado diferentes investigaciones para determinar la existencia de receptores a serotonina en el conducto deferente. Cohen y col., (1984), realizaron un detallado estudio farmacológico con el objeto de identificar la presencia y acción de receptores serotoninérgicos en diferentes tejidos de músculo liso no vascular, empleando inhibidores específicos e inespecíficos de receptores 5HT₁ y 5HT₂ (ketanserina y 1-NP), determinando en el conducto deferente que estos antagonistas no inhibieron la respuesta a la serotonina, sin embargo, al utilizar la prazosina (inhibidor de receptores α_1 adrenérgicos) fue inhibida la contracción inducida por la serotonina, de tal manera que la contracción inducida por serotonina en el conducto deferente es mediada por la vía noradrenérgica, un mecanismo similar a la arteria del ojo, en la cual se ha establecido que la actividad de la serotonina presenta un efecto directo sobre la acción postsináptica de los receptores adrenérgicos α_1 (Black y col., 1981, Campos, 1987), sin descartar la posibilidad que la serotonina potencialice la liberación de noradrenalina de los nervios del conducto deferente.

En lo que respecta al efecto del sistema parasimpático por la ketamina, se observa que en este modelo experimental, la ketamina induce en la respuesta de los tejidos a la acetilcolina, un comportamiento de tipo inhibitorio, debido a que la curva inducida en presencia ketamina, presenta un desplazamiento de tipo inotrópico negativo, lo que implica que la ketamina actúe en este sistema bloqueando el transporte de los iones de calcio al interior de la célula, como se ha sugerido que actúa de manera inespecífica sobre diferentes

agonistas tanto en músculo liso vascular como no vascular (Calixto y col., 1983; Hirota y col., 1995), este efecto inhibitorio puede explicar los efectos vasodilatadores que presenta la ketamina en diferentes sistemas orgánicos (Qian y col., 1996).

Este efecto se evaluó al analizar los resultados de las contracciones inducidas por una solución despolarizante, se observó que la ketamina induce un decremento de tipo competitivo de las contracciones inducidas por la entrada de calcio, específicamente que existe una inhibición directa de los canales de calcio dependientes del voltaje (tipo L), como se ha determinado mediante técnicas de patch clamp en células de músculo liso de la vena porta de conejo (Yamazaki y col., 1992) y músculo liso intestinal (Hirota y col., 1995).

Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la ketamina pueda interferir en sitios intracelulares, debido a que se ha reportado que la ketamina puede atravesar con facilidad la membrana (Cohen y col., 1984), o también se ha propuesto que este anestésico actúe por una inhibición indirecta de la actividad de las proteínas G y/o de la fosfolipasa C, es decir, una inhibición del mecanismo de traducción de señales guiada por los fosfoinosítidos, como ha sido propuesto por otros investigadores (Kanmura, 1993).

El efecto estimulador de la ketamina ha sido atribuido a su acción simpatomimética (Wong, 1974), a su modulación en la actividad de los baroreceptores (Dowdy & Kaya, 1968), la inhibición de la recaptura neuronal de catecolaminas por las terminaciones nerviosas sinápticas (Lundy, 1980; Fukuda y col., 1986).

El aspecto que la ketamina no inhibió las respuestas inducidas por noradrenalina y serotonina e incluso las potencializó, indica que este anestésico facilita la unión de estas aminas a sus respectivos receptores, los cuales actúan movilizando iones de Ca^{2+} transmembranal, así como el flujo de calcio de almacenes intracelulares, o bien impide la inactivación del neurotransmisor permitiendo que la amina se mantenga en contacto con sus receptores

El posible mecanismo por el cual la ketamina induce una potenciación de las respuestas reguladas por el sistema noradrenérgico y serotoninérgico, es la inhibición de la recaptura del neurotransmisor, se ha comprobado por otros investigadores que la ketamina inhibe el sistema de recaptura de la noradrenalina, específicamente la actividad de la monoaminoxidasa, así como la inhibición de la enzima de recaptura que inactiva extraneuronamente a la serotonina en la hendidura sináptica.

En este estudio, se comprobó que el efecto de la ketamina no se debe a que este provoque una secreción de noradrenalina endógena de los almacenes internos de las varicosidades noradrenérgicas o que actúe en forma agonista sobre estos tejidos, debido a que al analizar la actividad de ambas regiones del conducto durante la preincubación con la ketamina no induce ninguna actividad mecánica de los tejidos, es decir no afectó la tensión basal de los tejidos, por otra parte, este efecto es a nivel de membrana porque inmediatamente después que los tejidos fueron lavados, la actividad potencializadora desaparece, es decir, no existe un efecto tardío en la respuesta si este compuesto estuviera dentro de las células musculares.

Por lo antes expresado, se puede sugerir que la ketamina actúe en forma diferencial según el tipo de tejido, específicamente al tipo de receptor, la ketamina puede decrementar o inhibir las respuestas por antagonismo de los canales de calcio operados por voltaje (tipo L), o interfiriendo en la producción de fosfoinosítidos. Mientras que en otros tejidos, estimule o potencialice sus respuestas a través de inactivar los sistemas de recaptura y degradación sináptica de aminas biogénicas tales como la MAO, COMT, etc .

Así mismo, se puede sugerir que el tejido experimental empleado en este estudio puede ser de gran utilidad para valorar efectos cardiovasculares dependientes de la población de receptores del subtipo α_1 , de tal forma, que al emplear al conducto deferente, permite analizar de manera aislada los efectos de ciertos fármacos, neurotransmisores, etc., eliminando el enmascaramiento con otras sustancias producidas a nivel cardiovascular, como ejemplo, las del endotelio, etc (Miyawak y col., 1995).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio, con el objeto de identificar los posibles mecanismos que la ketamina ejerce para realizar sus acciones, así como otras investigaciones del efecto de la ketamina sobre otros tipos de músculo liso de tipo vascular y no vascular (Altura y col., 1980; Fukuda y col., 1986; Kanmura y col., 1993; Peters y col., 1991; Yamazaki, 1992) permiten sugerir que la potenciación de la respuesta de las aminas biogénicas genera el efecto vasoconstrictor que presenta este fármaco después de su administración en la rata y en otras especies de mamíferos, incluyendo al hombre.

De tal manera, que el efecto estimulador del sistema cardiovascular, así como los efectos secundarios, como la susceptibilidad y / o inducción de hipertensión en algunos pacientes a los que se les administra este anestésico, se debe a que la ketamina induce un incremento en los niveles séricos de las aminas biogénicas después de ser administrada, debido a su acción inhibitoria sobre los mecanismos de recaptura neuronal y extraneuronal de las catecolaminas, es decir provoca una inactivación de los tejidos para tomar a las aminas biogénicas y liberarlas en sitios de inactivación.

Finalmente, el clorhidrato de ketamina utilizado primeramente con propósitos veterinarios, ha sido ampliamente recomendado como un excelente anestésico general, ya que bloquea las vías nerviosas sin deprimir las funciones respiratorias y circulatorias, además sus propiedades farmacológicas han permitido utilizar a este anestésico en una infinidad de situaciones clínicas, a nivel dental, pediátrico, cardiovascular, etc. Recientemente, se le ha catalogado como el anestésico de la década, sin embargo, su empleo en cierto tipo de pacientes puede inducir efectos colaterales.

Por lo antes expresado, es importante seguir realizando estudios que permitan caracterizar de manera clara los posibles mecanismos con los que actúa en diferentes tejidos, con el objeto de minimizar los efectos indeseables al administrarlo de manera conjunta con otros fármacos que regulen su actividad. Es importante mencionar que la ketamina se administra en forma racémica por lo que es conveniente realizar estudios enfocados a los enantiómeros de la ketamina y caracterizar su actividad y determinar que tipo de molécula es la que induce los efectos colaterales, así como la posibilidad de mejorar las propiedades de este anestésico.

VII. BIBLIOGRAFIA.

Aboud, R., Shafii, M. & Docherty, J. R. (1993): Investigation of the subtypes of alpha₁-adrenoceptor mediating contractions of rat aorta, vas deferens and spleen. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 80-87.

Ahlquist, R. P. (1948): A Study of the adenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153: 586-600

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, T. (1994). *Molecular Cell Biology*. Ed. Omega, Barcelona.

Altura, B. T. & Altura, B. M. (1975). Barbiturates and aortic and venous smooth muscle function. *Anesthesiol.*, 43: 432-444.

Altura, B. M., Altura, B. T. & Carella, A. (1980): Effects of ketamine on vascular smooth muscle function. *Br. J. Pharmacol.*, 70: 257-260.

Andersen, T. N. & Gravenstein, J. S. (1966): Cardiovascular effects of sedative doses of pentobarbital and hidroxizine. *Anesthesiol.*, 27: 272-278.

Anstey, M. D. & Birmingham, A. T. (1980): The isolated circular muscle layer of the vas deferens of the guinea pig. *Br. J. Pharmacol.*, 69: 233-239.

Ashouri, T. N. & Tomita, T. (1983). Mechanical response to noradrenaline in calcium free solution in the rat vas deferens. *J. Physiol.* 388: 165-178.

Black, J. L., French, R.J. & Mylechoreane, E. J. (1981): Receptor mechanisms for 5-hydroxytryptamine in rabbit arteries. *Br. J. Pharmacol.* 74: 619-622

Berridge, M. (1987). *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159-193

Bolton, T. B. (1979): Mechanisms of action of transmitters and substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 59: 606-718

Bremel, R., Sobieszek, A. & Small, J. (1977). Regulation of actin-myosin in vertebrate smooth muscle. En: *Biochemistry of smooth muscle*. Stephens, N. (ed). University Park Press. Baltimore, E. U. A. pp. 533-549

Bremer, A. & Aebi, U. (1992): The structure of the F-actin filament and the actin molecule. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 4. 20-26.

Brown, D. A., Docherty, J., French, A., McDonald, A. & Scott, N. C. (1983): Separation of adrenergic and non-adrenergic contractions to field stimulation in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 79: 379-393.

Calixto, J. B., Aucelio, J. G. & Duarte, D. F. (1983): Inhibitory effects of ketamine on the isolated uteri of the rat: evidence for the mechanism of action. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61: 1305-1311.

Calixto, J. B. & Loch, S (1985): Ketamine-inhibition of calcium-induced contractions in despolarized rat uterus: a comparison with other calcium antagonists. *Br. J. Pharmac.*, 85: 189-195.

Campos, G., Caracheo, F., Valencia, A. & Ponce, H (1990): The sensitivity of rat uterus to serotonin in vitro is a late estrogenic response. *Arch. Inv. Med. Mex.*, 21: 27-

Campos, H. A. (1987): A Possible crossed histamine-containing pathway adjacent to the sympathetic system of the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244: 1121-1127.

Chang, D., Chun, K. E. & Ganendran, A (1969): Cardiovascular effects of 2-(*o*-chlorophenyl) 2-methyl-amino cyclohexanone (Cl581). *Br. J. Anaesth.*, 41: 391-395.

Chen, G., Ensor, C. R. & Bohner, B. (1966): The neuropharmacology of 2-(*o*-chlorofenil)-2- metilaminociclohexanone hydrochloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 152: 332-339.

Cook, D. J., Carlon, E. Y., Housemans, P. R. (1991): Mechanism of the positive inotropic effect of ketamine in ferret ventricular papillary muscle. *Anesthesiol.* 74: 880-888).

Corsen, G. & Domino, E. F. (1966): Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with phencyclidine derivative Cl.581. *Anesth. Analg.* 45: 29-39.

Cohen, M. L., Cham, S. L. Way, W. L. & Trevor, G. (1973): Distribution in the brain and metabolism of ketamine in the rat after intravenous administration. *Anesthesiol.* 39: 370-376.

Cohen, M., Schenck, K., Colbert, W. & Wittenauer, L. (1985): Role of 5-HT₂ receptors in serotonin induced contractions of non vascular smooth muscle. *J. Pharmac. Exp Ther.*, 232:770-774.

Creed, K. E. (1979): Functional diversity of smooth muscle. *British Medical Bulletin*, 35: 243-247.

Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1986): *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. New York. pp. 667-693.

Docherty, J. R. (1984). An investigation of presynaptic alpha-adrenoreceptor subtypes in the pithed rat heart and in the rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmac.*, 84. 15-23

Dodd, J & Role, L. W. (1991). *The Autonomic Nervous System*. En Principles of neural science. Kandel, E. R. (de.). Elsevier, New York. pp. 761-777.

Domino, E. F., Chodoff, P. & Corsson, G. (1965): Pharmacologic effects of Cl-581 a new dissociative anesthetic in man. *Clin Pharmac. Ther.* 6: 279-290.

Dowdy, E. G., Kaya, K. (1968): Studies of the mechanism of cardiovascular responses to C1-581. *Anaesthesiol.* 29: 931-943.

Dundee, J. W. & Wyant, G. M. (1974): Intravenous anesthesia. *Anesthesiol.* 44: 311-317.

Ebashi, S. (1977): Role of subcellular structures in calcium homeostasis. En: *Excitation-contraction coupling in smooth muscle* Casttels, R., Godfrain, T. & Ruegg, J. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 239-240.

Fain, J. N. & García-Sainz, J. A. (1980): A role of phosphatids inositol turnover in α_1 and adenylyl cyclase inhibition in α -effects of catecholamines. *Life Sci.* 26: 1183-1191.

Falck, B., Hillarp, N., Thiene, B. & Torp, A. (1962): Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 348-354.

Fernández-Pardal, J., Borda, E., Gimeno, M. & Gimeno, A. (1981): ^3H -noradrenaline metabolism in the isolated epididymal and prostatic portions of the rat vas deferens. *Life. Sci.*, 29: 1583-1589.

Ford, L. E., Seow, C. Y. & Pratusевич, V. R. (1994): Plasticity in smooth muscle, a hypothesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 1320-1324.

Fukuda, S., Murakawa, T., Takeshita, H. & Toda, N. (1983): Direct effects of ketamine on isolated canine cerebral and mesenteric arteries. *Anesth. Analg.* 62: 553-558.

Fukuda, S., Su, C. & Lee, T. (1986): Potentiation of pressor responses to serotonin by ketamine in isolated perfused rat mesentery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 8: 765-770.

Gaddum, J. H. & Picarelli, Z. P. (1957): Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 12: 323.

Ganong, W. F. (1994). *Fisiología Médica*. Editorial Manual Moderno.

García-Sainz, J. A. (1987): *Hormonas: Mensajes químicos y comunicación celular*. Col. La ciencia desde México. De. Fondo de Cultura Económica, México, pp.77-82

Greene, N. M. (1971): A consideration of factors in the discovery of anesthesia and their effects on its development. *Anesthesiol* 35: 515-522.

Haeblerle, J. R. & Hemric, M. E. (1993): A model for coregulation of smooth muscle actomyosin by caldesmon, calponin, tropomyosin, and the myosin regulatory light chain. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 1400- 1409.

Hay, D. W. P. & Wadsworth, R. M. (1982): The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 77: 605-613.

Hass, D. A. & Harper, D. G. (1992): Ketamine: a review of its pharmacologic properties and use in ambulatory anesthesia. *Anesth. Prog.*, 39: 61-68.

Hathaway, D. R., March, K. L., Lash, J. A., Adam, L. P. & Wilensky, R. L. (1989): Vascular smooth muscle: A review of the molecular basis of contractility. *Circulation*, 80: 219-233.

Hirota, K., Zsigmond, A., Matsuki, S. F. & Rabito, S. F. (1996). Ketamine inhibits contractile responses of intestinal smooth muscle by decreasing the influx of calcium through the L-type calcium channel. *Acta Anaesthesiol. Scand* 39: 759-767.

Hirshman, C. A., McCullough, R. E., Cohen, P. J. & Weil, J. V. (1975). Hypoxic ventilatory drive in dogs during theopental, ketamine or pentobarbital anesthesia. *Anesthesiol.* 43: 628-634.

Hug, C.J. (1979) Pharmacology anesthetic drug. In: *Cardiac anesthesia*. Kaplon, J. A. (ed.). New York. pp 3-37

Humphrey, P. A., Hartig, P. and Hoyer, D. A. (1993): A proposed new nomenclature for 5HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14: 233- 239.

Jaim-Etcheverry, G. & Zieher, L. M. (1969): Ultrastructural cytochemistry and pharmacology of 5-hydroxytryptamine in adrenergic nerve endings. I. Localization of exogenous 5-hydroxytryptamine in the autonomic nerves of the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 166: 264-271.

Katz, R. I., Lagasse, R. S. Levy, A. & Alexander, G. (1993): Hemodynamic stability and patient satisfaction after anaesthetic induction with thiopental sodium, ketamine, thiopental-fentanyl and ketamine-fentanyl. *J. Clin. Anaesth.*, 5: 134-40.

Kanmura, Y. Kajikury, J. Itoh, T & Yoshitake, J. (1993): Effects of ketamine on contraction and synthesis of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Anesthesiol.*, 79: 571-579.

Karaki, H. & Weiss, G B (1988): Minireview of calcium release in smooth muscle. *Life Sci.* 42: 111-122.

Koga, K., Ogaza, M., Takenaka, Y. Matsumoto, J. & Shigematsu, A. (1994): Ketamine supresses tumor necrosis factor α activity and mortality in carrageenan sensitived endotoxin shock model. *Circulatory Sock.* 44:160-165.

Knobil, E., Neill, J., (1993). The physiology of reproduction. Edit. Raven Press, New York. Vol.1-2.

Kunos, G. & Gao, B. (1993) *Gene*. 131: 243-247.

Lee, T. S., X. H. Hou. (1996): Vasoactive effects of ketamine on isolated rabbit pulmonary arteries. *Chest.*, 107: 1152-1154.

Leedham, J. L. & Pennefather, J. N. (1982): Dopamine acts at the same receptors as noradrenaline in the rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmac.*, 77: 293-299.

Lesson, C. R. & Lesson, T. S. (1993). *Histologia*. Editorial Interamericana, México.

Little, H. J., Alexander, K. L. Gargan, M. F. & Widdison, A. L. (1983): Ketamine and the guinea pig ileum: Possible opiate-agonist and effects of peptidaseinhibition *J Pharmac. Exp Ther* 225: 206-212.

Lundy, J. S (1935). Intravenous anesthesia: preliminary report of the use of two new thiobarbiturates. *Proc. Staff. Meet Mayo Clin.*, 10: 536-543.

Lundy, P. M., Gowdey, C. N. & Colhoun, E. H. (1974): Tracheal smooth muscle relaxant effects of ketamine *Br. J. Anaesth* 46: 333-336

Lundy, P.M., Godwey, C. N. and Colhoun, E. H. (1975): Further experimental evidence for a smooth muscle depressant effect of ketamine *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 216: 57-62.

Lundy, P. M. & Frew, R. (1981): Ketamine potentiates catecholamine responses of vascular smooth muscle by inhibition of extraneuronal uptake. *Can. J. Physiol. Pharmacol* , 59: 520-527.

Maruyama, K., Maruyama, J. Yokochi, A., Numeyuki, M. & Miyasaka, K. (1995): Vasodilatory effects of ketamine on pulmonary arteries in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Anaesth. Analg.* , 80: 786-789.

McCarthy, D. A., Chen, G., Kaump, D. H. & Ensor, C. (1965): General anaesthetic and other pharmacological properties of 2-(*o*-chlorophenyl)-2-methylamine cyclohexanone HCl-581. *J. New. Drugs.* 5: 21-23.

MacDonald, A & McGrath, J. C. (1980): The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 71: 445-458

MacDonald, A. & McGrath, J. C. (1984): Post-natal development of functional neurotransmission in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 82: 25-34.

McIntyre, A. R. (1959): Historical background early use and development of muscle relaxants. *Anaesthesiol.* 20: 409-413.

Marietta, M., Way, W., Castagnoli, I. & Trevor, A. J. (1977): On the pharmacology of the ketamine enantiomorphs in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 202: 157-165.

Michell, R. H. (1985): Inositol phospholipids and cell surface receptor function, *Biochem. Biophys. Acta*, 415: 81

Miyawak, K., Nakamura, K., Terasako, K., Toda, H., Kakuyama, K. & Mon, K. (1995): Modification of endothelium dependent relaxation by propofol, ketamine and midazolam. *Anesth. Analg.*, 85: 474-480.

Minneman, K. F. (1988): α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* 10: 87-119

Mukay, J., Yamaguchy, E., Goto, J. & Takagi, K. (1981). Smooth muscle relaxing drugs and guinea pig ileum. *J. Pharmac.* 31: 147-157.

Oashi, M. & Takayanagi, L. (1983): The actions D-60aspaminol and papaverine on calcium, potassium and histamine-induced contractions of isolated rabbit basilar artery, aorta, taeniocoli and tracheal smooth muscle. *J. Pharmac* 33: 1135-1144

Pagel, P. S., Kampine, J., Schmeling, W. & Warltier, D. C. (1992): Ketamine depresses myocardial contractility as evaluated by the preload recruitable stroke work relationship in chronically instrumented dogs with autonomic nervous system blockade. *Anesthes.*, 76: 564-572

Pérez, M., Fera, A. V. y García, M. M. (1983): Métodos para el estudio de neurotransmisores en el sistema nervioso central. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas*. Pasantes y Aréchiga (eds). U. N. A. M. 2:: 31- 54.

Peroutka, S. J. & Snyder, S. H. (1979): Multiple serotonin receptors: differential binding of [^3H]-5-hydroxytryptamine, [^3H]-lysergic acid diethylamide and [^3H]-spiroperidol. *Mol. Pharmacol.*, 16: 687-692.

Pullents, J. , Wiss, K. & Scharf, M. J. (1996). Ketamine sedation obviates the need for general anaesthesia in children having laser ablation of facial port-wine stains. *Can. J. Anaesth.*, 43: 755.

Qian, J., Brown, S. A. & Carlton, M. (1996). Systemic ketamine attenuate nociceptive behaviors in rat model of peripheral neuropathy. *Brain Res* 715: 51-62.

Ratnasooriya, W. D. & Wadsworth, R. M. (1990): Effect of removal of epithelium on contractions of the rat vas deferens. *Med. Sci. Res.*, 18: 43-44.

Ratz, P., Callahan, P. E. & Lattanzio, F. A. (1993): Ketamine relaxes rabbit femoral arteries by reducing $[Ca^{2+}]_i$ and phospholipase C activity. *Eur. J. Pharmacol.*, 236: 433-441

Retrack, E. M., Max, C. M. & Wright, M. S. (1996): Intramuscular ketamine is superior to mependine, promethazin and chlorpromazine for pediatric emergency department sedation. *Arch. Pediat. Adol. Med.*, 150: 676-680.

Sallés, J. & Badia, A. (1991): Mechanisms underlying the differential sensitivity to α_1 -adrenoreceptors activation in the bisected rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 102: 439-445.

Sallés, J. & Badia, A. (1993): Modulation of α_1 -adrenoceptors and functional consequences in the bisected rat vas deferens following chronic inhibition of neuronal noradrenaline uptake. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 678-683.

Seong, Y. H., Baba, A., Matsuda, T. & Iwata, H. (1990): 5-hydroxytryptamine modulation of electrically induced twitch responses of mouse vas deferens: Involvement of multiple 5-hydroxytryptamine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 254:1012-1016.

- Shapiro, A. M. (1975): Intracranial Hypertension: Therapeutic and anesthetic considerations. *Anaesthesiol.* 43: 445-471.
- Shapiro, Y., Lam, A. M., Eng, C. C., Lacha, V. & Michell, M. (1994): Therapeutic time window and dose response of the beneficial effects of ketamine in experimental head injury. *Stroke*, 25: 1637-1643.
- Sims, S., Vivaudou, M. B., Clapp, L. H., Lassignal, N. L., Walsh, J.V. & Singer, J. J. (1988): Neurotransmitter regulation of ionic channels in freshly dissociated smooth muscle cells. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 527: 346-359.
- Smith, D. J., Bouchal, R. L., Deganetig, C. A., Monroe, P. J., Andrei, J. B., Perroti, J. M. & Grips, T. (1987) Properties of the interactions between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro. *Neuroendocrinol.* 26: 1253-1260
- Sobieszek, A. (1977): Vertebrate smooth muscle myosin: enzymatic and structural properties. In: *Biochemistry of smooth muscle*. Stephens, N. (ed.) University Park Press. Baltimore, E. U. A. pp. 413-443.
- Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 372. 231-236.
- Spat, A., Bradford, P. G., McKinney, J. S., Rubinn, R. P. & Putney, J. W. (1981): A saturable receptor of 32 P-inositol-1, 4, 5, trisphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature*, 319: 514.

Takayanagi, L., Hisayama, T. & Suzuki, S. (1980): Effects of nonspecific smooth muscle relaxants and calcium blockers on Ca-release and Ca-binding in microsomal fractions from rabbit. *J. Pharmacol.* 30: 641-646.

Takekita, H., Okuda, Y. & Sari, A. (1982): The effects of ketamine on cerebral circulation and metabolism in man. *Anesthesiol.* 36: 69-75.

Tallarida, R. J. & Murray, R. (1981): Manual of pharmacologic calculations. Springer-Verlag, New York.

Traber, D. L., Wilson, R. D. & Pranno, L. (1968): Differentiation of the cardiovascular effects of CI-581. *Anaesth. Analg.* 47: 769-778.

Villa, A., Podini, P., Panzeri, M. C., Soling, H., Volpe, P. & Meldolesi, J. (1993): The endoplasmic-sarcoplasmic reticulum of smooth muscle: Immunocytochemistry of vas deferens fibers reveals specialized subcompartments differently equipped for the control of Ca²⁺ homeostasis. *J. Cell. Biol.*, 121: 1041-1051.

Villalon, C. M., Terron, J. A., Hong, E., and Saxena, P. R. (1993): Mecanismos involucrados en los efectos cardíacos de la serotonina. *Arch. Inst. Mex. Cardiol.*, 63: 161- 166

Villalon, C. M., Terron, J. A., Ramirez, E. and Saxena, P. R. (1995): 5-Hydroxytryptamine: Considerations about discovery, receptor classification and relevance to medical research. *Arch. Med. Res.*, 26: 331- 344.

Virtue, R. W., Alanis, J. M. Marl, M. Lafargue, R. J., Vogel, J. H. & Metcalf, D. R. (1967). An Anaesthetic agent: 2- orthochlorophenyl, 2-methylamino cyclohexanone HCl (CI-58). *Anaesthesiol.* 28: 823- 833

Wali, F. A. & Hayter, A. (1987): The effect of ethanol on rat vas deferens. *Act. Physiol. Hun.*, 74 : 201-207.

Wayne, W. D. (1988). Bioestadística Ed. Limusa México.

Wong, D. H. W. & Jenkins, L. C.(1974): An experimental study of the mechanism of ketamine on the central nervous system. *Can. Anaesth. Soc. J.* 21: 57-67.

Yamazaki, M., Momose, Y., Shakunaga, K., Kamitani, K. & Ito, Y. (1995). The vasodilatory effects of ketamine on isolated rabbit portal veins. *Pharmac. Toxicol.* 76: 3-8.

Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni, L. Jr. & Biggers, J. D. (eds.). *Fertilization and embryonic development in vitro* New York, Plenum Press, 1981, pp. 81.