

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

AUTORIDADES:

DECANO:

Profesor Dr. JOSE H. FERNANDEZ DE LIGER

DECANO SUSTITUTO:

Dr. NESTOR ANGEL MENENDEZ

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. JORGE EUGENIO IED

SECRETARIO ADMINISTRATIVO:

Sr. OMAR HUGO RAMIREZ

DIRECTORA DE ENSEÑANZA:

Sra. HAYDEE C. R. DE PERETTO

DIRECTORA DE BIBLIOTECA:

Srita. HEBE D. PEDERNERA

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is cursive and appears to be the name of the person who signed the document.

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS Y PROGRAMAS

282 PROFESOR TITULAR " DEDICACION EXCLUSIVA "

<u>APELLIDO Y NOMBRE</u>	<u>CATEDRA</u>	<u>CATEGORIA</u>
AEGULO Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZA Jesús S. W.	Int. a la Biofísica	Titular-1/s/s
ERRECALDE Jorge E.	Microbiología	Interino
ETCHEVERRIGARAY María E. (GALLO)	Virología	Reemplazante
GALLO Guillermo G.	Clín. Grand. Animales	Titular 1/s/s.
MENENDEZ Néstor A.	Anat. y Fisiol. Patol.	Interino
PRACCA Lydia C. (Carroza)	Clín. Pequeñ. Animales	Reemplazante
QUINTEROS Indalecio R.	Genét. y Biometría	Titular
ZACCARDI Eduardo M.	Fisiología	Titular

-PROFESOR ASOCIADO "DEDICACION EXCLUSIVA"-

MARTIN Alcides A.	Anat. Fisiol. Patol.	Interino
-------------------	----------------------	----------

-PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BOCCIA Francisco O. (Etcheverrigaray)	Clín. P. Animales	Reemplazante
ETCHEVERRIGARAY María E.	Virología	Titular 1/s/s
IDIART Julio R.	Anat. y Fisiol. Patol.	Interino
LAGRECA Liliana	Zotec. Gral. y Agrost.	Interino
LASTA Jorge A.	Higiene Epid. y S. Púb.	Interino
MONINA Marta Inés	Clín. Grand. Animales	Interino

-PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"-

AGUIRRE Walter G.	Microb. Especial	Titular
AIBERDI Cecilio	Tec. y Sanid. Aliment.	Interino
ANDREATTA Jorge N.	Somiología y Propedeut.	Interino
ARGERI Nelson J. (Tesori ero)	Análisis Clín. I y II	Reemplazante
BERTOLINI José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPATO Ismael O.	Anat. Descript. y Top.	EMERITO
GIMENO Emilio J.	Higiene Epid. y S. Púb.	Titular-Art. 41
JENSEN Alicia D.	Bioestadística	Interino
LED Jorge E.	Parasit. y Enf. Parasit	Interino
MANZULIO Alfredo (Gimeno)	Inmunología I y II	EMERITO-Reemp.
MAROTTA Eduardo G.	Zotec. Espec. I Pte.	Interino
OCHOA Mario E.	Director Inst. Sta. Cat.	Interino
OTTINO Julio F.	Histología y Embriol	Interino
PRACCA Lydia C.	Clín. Pequeños Animal.	Titular-1/s/s

///



RODRIGUEZ Benjamín R.	Zootec. Espec. II Pte.	Interino
TESORIERO Catalina (Pracca)	Física y Quím. Aplic.	Reem.-l/s/s.
TORRES Jorge F.	Int.a la Bioquímica	Interino

-PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"-

BRANDETTI Eugenio	Anat. y Fisiol. Pat.	Interino
BOCCIA Francisco O.	Clínc. Pequeños Animal.	Titular l/s/s.
CHAMPREDONDE Hugo N.	Patología General	Interino
DURANTE Eduardo J.	Palog. Quirúrg. y Pod.	Interino l/c/s.
ERRECALDE Jorge O. (h.)	Farmacol.Farm. y Terap.	Interino l/c/s.
FELDMAN Raquel E.	Parasitol. Comparada	Interino
FERNANDEZ de LIGER José H.	Clín. Grandes Animales	Titular l/s/s.
FERNANDEZ ENRIQUE J.	Enfermedades Infecciosas	Interino
GOMEZ Carlos M.	Inmunología II	Interino
MAGGI Nilda B. (Boccia)	Serv.Central de Cirug.	Reemplazante
MARTINO Juan J.	Microbiología	Titular
MERLINI José C.	Patol. Reprod. y Obst.	Interino
NOIA Miguel A.	Introd. a la Biofísica	Interino
ORTEGA Cesar F.	Semiología y Propedeut.	Interino
PIOVANO Nicolas M.	Introd. a la Bioquímica	Interino
REINOSO Enso M. (Fernández de Liger)	Micol. Méd.eIndust.	Reemplazante
RUAGER Jorge	Anat. y Fisiol. Patológ.	Interino

-JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION EXCLUSIVA"-

BASCHAR Hector O.	Clín. Grandes Animales	Interino
FONROUGE Reinalde D.	Higiene Epid. y S.Púb.	Interino
RONCINO Roberto O.	Sección Radioisótopos	Interino
TEJEDOR Eugenio D.	Genét. y Biometría	Interino

-JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"-

ALIVERTI Héctor M.	Zootec. Espec. II Pte.	Interino
ALLEVATO Hugo L.	Higiene Epid y S.Pública	Interino
AMASINO Carlos F.	Enfermedad. Infecciosas	Interino
AULICIEO Oscar O.	Tecnología y S.Aliment.	Interino
BABUSCI Máximo	Fisiología	Interino
BAMBILL Emilia C.	Zootec. Especial I Pte.	Interino
BARRENA Javier E.	Anatomía Descrip. Y Top.	Interino
BERNAGOZZI Jorge A.	Inmunolog.Gral. y Aplic.	Interino
BISCHOFF Jorge R.	Genét. y Biometría	Interino
BUGALLO Antonio	Patología General	Interino
BUGALLO Antonio	Famac.Farm. y Terap.	Interino
BUSTOS Enrique F.	Inmunolog.Gral. y Aplic.	Interino

///



CARBONE Cecilia	Animales de Laborat.	Interino
CASTUMA María E.	Introd. a la Bioquímica	Interino
COLL CARDENAS	Introd. a la Biofísica	Interino
DE ANTONI Graciela L.	Genética Microbiana	l/c/s.
Del CASTILLO Federico C.	Histología y Embriol.	Interino
DOMINGUEZ María T. (Poli)	Genét. y Biometría	Reemplazante
DRAGONETTI Ana María	Clín. Pequeños Animal.	Interino
FORNER Jesús J.A.	Tecnología y S.Aliment.	Interino
FREGOSI Mario O.	Anatomía Descrip. y Top.	Interino
FRICOLI Alicia E.	Introd. a la Biofísica	Interino
FUENTES Leticia F.	Introd. a la Biofísica	Interino
GARCIA VALENTI Horacio N.	Zotec.Espec. II Pte.	Interino
GIANOTTI Ricardo S.	Tecnología y S.Aliment.	Interino
GIMENO Eduardo J.	Anatomía y Fisiol. Pat.	Interino
GIMENO Eduardo J.	Patología General	Reemplazante
GOITIA Oscar F. (Maggi)	Patología Rep. y Obst.	Reemplazante
GRIGERA Fernando	Fisiología	Interino
CUAJARDO Margarita II.	Introd. a la Biofísica	Interino
GUGLIELMETTI Elda II.C.	Introd. a la Biofísica	Interino
HERRERAS CANALES Félix E.	Anatomía Comparada	Interino
IACCHINI Raúl A.	Zotec.Gral. y Agrost.	Interino
LESTCHISKI Eva	Análisis Clín. I Pte.	Interino
LIENZITTO Oscar R.	Histología y Embriolog.	Interino
MARCANTONI Hugo	Histología y Embriología	Interino
MASSONE Raúl A. (Nosetto)	Clín.Grand.Animales	Reemplazante
MILLAN Margarita D.	Anatomía Descrip. y Top.	Interino
MONTESINO RAMOS Ignacio G.	Clín.Grandes Animales	Interino
MUNARD Carlos J.	Patolog.Rep. y Obst.	Interino
MURO Alicia M.	Clín.Pequeños Animales	Interino
NOSETTO Edgardo M.	Clín.Grandes Animales	Interino
ORELLANA Jorge	Histología y Embriol	Interino
PASSIUCO Mabel N.	Introd. a la Bioquímica	Interino
PELLON Horacio S.	Tecnoloc. y S.Aliment.	Interino
PEREZ CASTILLO Nelly E.	Física y Quim. Aplic.	Interino
PERFUMO Carlos J.	Anatom. y Fisiol. Pat.	Interino
POLI Mario A.	Genét. y Biometría	Interino
PONS Eduardo E.	Clín. y Enf.Parasit.	Interino
RADNAN Nilda E.	Parasit. y Enf.Parasit.	Interino

///



CARBONE Cecilia	Animales de Laborat.	Interino
CASTUMA María E.	Introd. a la Bioquímica	Interino
COLL CARDENAS	Introd. a la Biofísica	Interino
DE ANTONI Graciela L.	Genética Microbiana	l/c/s.
Del CASTILLO Federico C.	Histología y Embriol.	Interino
DOMINGUEZ María T. (Poli)	Genét. y Biometría	Reemplazante
DRAGONETTI Ana María	Clín. Pequeños Animal.	Interino
FORNER Jesús J.A.	Tecnología y S.Aliment.	Interino
FREGOSSI Mario O.	Anatomía Descrip. y Top.	Interino
FRICOLI Alicia E.	Introd. a la Biofísica	Interino
FUENTES Leticia F.	Introd. a la Biofísica	Interino
GARCIA VALENTI Horacio N.	Zotec.Espec. II Pte.	Interino
GIANOTTI Ricardo S.	Tecnología y S.Aliment.	Interino
GIMENO Eduardo J.	Anatomía y Fisiol. Pat.	Interino
GIMENO Eduardo J.	Patología General	Reemplazante
GOITIA Oscar F. (Maggi)	Patología Rep. y Obst.	Reemplazante
GRIGERA Fernando	Fisiología	Interino
CUAJARDO Margarita II.	Introd. a la Biofísica	Interino
GUGLIELMETTI Elda II.C.	Introd. a la Biofísica	Interino
HERRERAS CANALES Félix E.	Anatomía Comparada	Interino
IACCHINI Raúl A.	Zotec.Gral. y Agrost.	Interino
LESTCHISKI Eva	Análisis Clín. I Pte.	Interino
LIENZITTO Oscar R.	Histología y Embriolog.	Interino
MARCANTONI Hugo	Histología y Embriología	Interino
MASSONE Raúl A. (Nosetto)	Clín.Grand.Animales	Reemplazante
MILLAN Margarita D.	Anatomía Descrip. y Top.	Interino
MONTESINO RAMOS Ignacio G.	Clín.Grandes Animales	Interino
MUNARD Carlos J.	Patolog.Rep. y Obst.	Interino
MURO Alicia M.	Clín.Pequeños Animales	Interino
NOSETTO Edgardo M.	Clín.Grandes Animales	Interino
ORELLANA Jorge	Histología y Embriol	Interino
PASSIUCO Mabel N.	Introd. a la Bioquímica	Interino
PELLON Horacio S.	Tecnoloc. y S.Aliment.	Interino
PEREZ CASTILLO Nelly E.	Física y Quim. Aplic.	Interino
PERFUMO Carlos J.	Anatom. y Fisiol. Pat.	Interino
POLI Mario A.	Genét. y Biometría	Interino
PONS Eduardo E.	Clín. y Enf.Parasit.	Interino
RADNAN Nilda E.	Parasit. y Enf.Parasit.	Interino

///

////

RAMIREZ Luis E.(Reinoso)	Anatomía Descript.y Top.	Reemplazante
REINOSO Enso	Micología Méd. e Indust.	Interino
REPETTO SANCHEZ Olindo	Medicina Operatoria	Interino
RODRIGUEZ TOLEDO Jorge A.	Medicina Operatoria	Interino
SARA Raúl Carlos	Patolog.Reprod.y Obst.	Interino
SCAVIA Ricardo César	Anatomía Comparada	Interino
TABORCIA Juan A.	Patología General	Interino
TARABUSO Ricardo	Semiología y Propedeútica	Interino
TREBUCCO Rubén A.	Inmunología Gral. y Aplic.	Interino
VENTURINI María C. (Bustos)	Inmunología Gral. y Aplic.	Reemplazante
VOCOS GIMENEZ Sara T.	Zotec.Especial II Pte.	Interino

-AYUDANTE DIPLOMADO "DEDICACION EXCLUSIVA"-

AVILA Silvia M.	Histología y Embriol.	Interino
CASTELLANO María C.	Clín. Pequeños Animales	Interino
CATALANO Vicente A.	Histolog. y Embriolog.	Interino
CERRUTI Augusto S.	Sección Radioisotopos	Interino

-AYUDANTE DIPLOMADO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"-

BERISSO Marcela M.	Enfermed. Infecciosas	Interino
CABRAL Marta S.	Tecnolog.y S.Aliment.	Interino
CAMINO A Ricardo A.	Microbiolog.Especial	Interino
CORREA Oscar M.	Introd. a la Bioquímica	Interino
GONZALEZ ESTHER T:	Virología.	Interino
GONZALEZ Silvia M.	Farmac.Farm. y Terap.	Interino
GUADARRAMA María del C.	Histología y Embriol	Interino
Huerta Alicia N.	Introd. a la Bioquímica	Interino
MASSONE Raúl A.	Clín.Grandes Animales	Interino
MILLAN Roberto G.	Histología y Embriol.	Interino
MARENCO Alejandro G.	Higiene Epid y S.Púb.	Interino
PETRUCCELLI Miguel A.	Anat. y Fisiol.Patolog.	Interino
RAMIREZ Luis E.	Clín.Grandes Anumales	Interino
RENARD Jorge L.	Tecnolog. yS.Aliment.	Interino
RIVADENEIRA Elisabeth A.(Massone)	Clin.G.Animales	Reemplazante
SALESSI Enrique	Fisiología	Interino
TABORCIA Juan A.	Enfermed. Infecciosas	Interino
ZOHUAR Edith E.	Clín.Pequeños Animales	Interino

////

-NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS Y

PROGRAMAS 280-

-PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE Walter G.	Microbiol. Aplicada	Titular
ALBERDI Cecilio	Tecnol. y Sanid. Aliment.	Interino
ARGERI Nelson J.	Análisis Clin. I Pte.	Interino/1/s/s
CARROZA Jesus S.	Introd. a la Biofísica	Titular
ERRECALDE Jorge	Enf. infecciosas	Interino
GIMENO E.J.	Higiene Epid. S. Pública	Titular
ISEAS, Fortunato	Patología Médica	Interino
MANZULLO, Alfredo	Inmunología I	Emérito 1/S/s
MANZULLO, Alfredo	Inmunología II	Emérito 1/s/s
MARTINO, Olindo	Salud Pública	Interino
MORELLI, Héctor	Zootec. Especial	Interino
OSTROWSKI, Jorge	Patolog. Reprod. Obs.	Interino
PANZONI, Erico	Econ. Agraria	Titular
PENNIMPEDE, Enrique	Inmunología Gral.	Interino
RUAJER, Jorge	Pat. Gral.	Interino
SARACHU, Alberto	Génética Microbiana	Interino
SCIAMMARELLA, Alfredo	Med. Operatoria	Interino
TORRES, Jorge (Argeri)	Física y Química Aplic.	Reemp.
TOUSEDI, Guillermo A.	Patología Quirur. y Pod.	Titular

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BACIGALUPO, Néstor	Tecnol y Slit.	Interino
BAIGUM, Roberto	Patolog. Reprod. Obstet.	Interino
BRANDETTI, Eugenio	Parasit. y Enf. Paras.	Interino
DIBBER, R.N. Alberto	Zootec. Especial	Interino
FERNANDEZ de LIGER, José	Clin. grandes Anin.	Titular
FINOCHIETTO, Héctor	Patología Médica	Interino
GOMEZ, Carlos	Inmunol. Gral y Aplic.	Interino
GRILLO, Virginia	Zootec. Esp. III	Interino
LASTA, Jorge	Microb. Aplicada	Interino
MAGGI, Nilda	Patol. Quir. y Pod.	Interino
MALIANDI, Florestan	Hig., Epid. y S. Púb.	Interino

MOISO, Alejandro	Microbiología	Titular
MORELLI, Héctor	Zootes. Espec. III	Titular
MOVARINI, Miguel	Parmacol., Farm. y Terap.	Interino
OLIVA, Graciela	Virología	Interino
PENNIMPEDE, Enrique	Inmunología I	Interino
ROJAS, Edmundo	Fisiología	Interino
RUTTER, Bruno	Patol. Reprod. Obst.	Interino
TARCIA, Elba	Int. a la Biofísica	Interino
VENTURINE, Lucila	Parasit. y Enf. Parasit.	Interino
VILLAR, Martha	Análisis Clin. I	Interino
VILLAR, Martha	Análisis Clin. II	Interino
YANNARELLA, Francisco	Parasit. y Enf. Parasit.	Interino

- JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION SIMPLE".

ARMENAULT, Roberto	Semiología y Proped.	Interino
AVILA, Silvia	Microbiol. Expec.	Interino
BARDON, Juan	Patol. Médica	Interino
BRAVO, BARDALE, Tomás	Econ. Agraria	Interino
BUTLER, Eduardo	Patol. Quir. y Pod.	Interino
CALONGE, Carlos	Clin. Gdes. Anima.	Interino
CASTAÑEDA, Alberto	Clin. Peq. Anim.	Interino
CESAR, Norberto	Patolog. Médica	Reemplas.
CATALA, Gustavo(Ramirez)	Patol. Reprod. y Obst.	Reemplaz!
CHARAVALLI, Juan	Zootec. Gral. y Agrost.	Interino
CHILLON, Diana	Microb. Aplicada	Interino
DELGADO-CAFFE, Osvaldo	Hig., Epid. y S. Pub.	Interino
FERNANDEZ, de LIGER, José	Patol. Médica	Interino
GALAN, Jorge	Enf. Infec.	Interino
GALLO, Guillermo	Fisiología	Interino
GRAMIGNA, Tomás	Taller de Ed.	Interino
GIMENEZ, Mabel	Zoot. Esp. I	Interino
HERNANDEZ, Zulma	Salud Pública	Interina

LACCHINI, Raúl	Zootec. Espec. I Pte.	Interino
LOJO, María B.	Génética Microbiana	Interino
MARILUNGO, Aníbal	Medicina Operatoria	Interino
MORRIS, Marta Rita	Micol. Méd. e Indust.	Interino
MICODEMO, María de C.	Zootec. Espec. III Pte.	Interino
MOSETTO, Edgardo	Patol. Médica	Interino
OCAMPO, Jesús	Introd. a la Biofis.	Interino
PALACIO, Laura	Zootec. Espec. I	Interino
PRIO DOFEUDO, Graciela	Zootec. Espec. III	Interino
RAMIREZ, Luis	Anatomía Descrip. y Top.	Interino
REGGLOSO, Ana	Introd. a la Biof.	Reemplaz.
RONSINO, Roberto	Fisiología	Interino
SALAS, Laura	Semiología y Prop.	Reemplaz.
SANCHO, José	Medicina Operat.	Interino
SIMPSON, María	Introd. a la Biof.	Interino
TOBIA, Marta	Microbiol. Aplic.	Interino
TREBUCK, Rubén	Inmunolog. I	Interino
TUNES, María	Microbiol.	Interina
VARELA, Juan	Microbiol.	Interino
WARD, Miguel	Farmac. Farm. y Terap.	Interino
YANNARELLA, Francisco	Parasit. y Enf. Paras.	Interino

-AYUDANTES DIPLOMADOS DE DEDICACION SIMPLE:-

ALONSO, Juan	Genética Microb.	Interino
ALT, Celia	Microbiol. Exp.	Interino
BEDOTTI, Daniel	Clin. de Gdes, Anin.	Interino
BUSCAGLIA, Celina	Zootec. Esp. III	Interino
CALVO, Carlos	Anat. y Fisiol. Pat.	Interino
CAMINO, Ricardo A.	Animales de Lab.	Interino
CARDOSO, Luisa del R.	Zootec. Gral. y Agrost.	Interino
CATALANO, Vicente	Sección Audiovisual	Interino
CERRUTTI, Augusto S.	Fisiología	Interino
COLOCCIA, PAYBA, Liliana	Anat. y Fisiol. Patol.	Interino
CORTEZ, Guillermo F.	Higiene Epid. y S. Pub.	Interino

COUREGES, Marta	Anat. y Fisiol. Patol.	Interino
CREVARO, Cristina	Análisis Clin. II	Interino
DIAMESTINO, Liliana	Introd. a la Bioq.	Interino
DRUADO, CAFFE, Osvaldo	Bioest.	Interino
DI LEO, Julio	Zootec. Espec. I	Interino
DOMINELLI, Eraldo	Patol. Quirur. y Pod.	Interino
ELSO, Liliana	Enfer. Infec.	Interino
FARINA, Carlos	Enfer. Infec.	Intwrino
FORMENTI, Liliana	Microbiol.	Interino
FRIGOLI, Alicia	Introd. a la Biofis.	Interino
GARCIA FRONTINI, María	Paras. y Enf. Paras.	Reemplaz.
GONZALEZ, Ester	Microb. Aplic.	Interino
GORDILLO, Carlos	Farmac., Farm. y Terap.	Interino
GUILLEN, Griselda	Análisis Clin.	Interino
HIRIGOYEN, Isabel	Introd. a la Bioq.	Interino
KRAVRHASE, Federico	Patol., Rep. y Obst.	Interino
LASTA, Gregorio	Semiol. y Proped.	Reemplaz.
MEZZERA, Ana Maria	Clin. Peq. Animales	Interino
PENSA, Daniel	Micol. Med. e Indus.	Interino
ROMERO, Jorge	Parasit. y Enf. Parasit.	Interino
SALAS, Laura	Semiol. y Proped.	Interino
SANGUINETE, Héctor	Anat. y Fisiol. Patol.	Interino
SEILLAN, Carlos	Patol. Médica	Reemplaz.

DIRECCION DE ENSEÑANZA - 15 de mayo de 1981 -

ARTICULO 11). La Facultad no se hace solidaria de las opiniones
vertidas en una tesis.

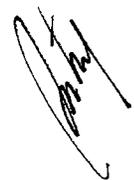
A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is stylized and appears to be a name, possibly starting with 'C' and 'M'.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

LA EDAD Y LA CASTRACION COMO FACTORES MODIFICADORES
DE LAS RESPUESTAS FISIOFARMACOLOGICAS DEL
CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA.

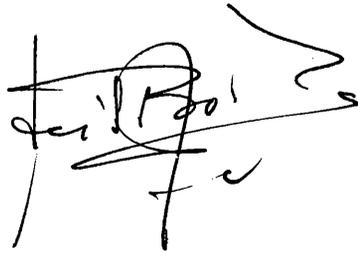
TESIS DE DOCTORADO
MARIA DEL CARMEN AGOSTINI

BUENOS AIRES
(Argentina)
1981

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is stylized and appears to be the name of the author or a related official.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Enri Santiago Borda

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Enri Borda', with a stylized flourish extending to the right.A small, stylized handwritten mark or signature in the bottom right corner of the page.

a Leo y Enri
a mi familia
a mis amigos

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is stylized and appears to be a name, possibly 'Enri' or 'Leo', written in a cursive or semi-cursive style.

CERTIFICO: en mi carácter de Profesor Titular de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, haber asesorado el trabajo de tesis de doctorado titulado "La edad y la castración como factores modificadores de las respuestas fisiofarmacológicas del conducto deferente aislado de rata", llevado a cabo por la médica veterinaria María del Carmen Agostini.



Prof. Eduardo M. Zaccardi



AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi gratitud hacia todas las personas e instituciones que de una u otra manera me brindaron apoyo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Enri S. Borda, quien con sus consejos y constante ejemplo de voluntad y optimismo me estimuló para realizar esta tarea.

A la Dra. Martha F. Gimeno, por su apoyo personal y científico.

A la Dra. Leonor Sterin-Borda, compañera y amiga incondicional.

Al Dr. Carlos Catalano, Prof. y consejero, quién me incentivó para el estudio de la investigación biomédica.

Al Dr. Eduardo M. Zaccardi, por su atenta asesoría en la supervisión de esta tesis.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN) (CONICET), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires (CIC) y a la Universidad Nacional del Centro de la Prov. de Buenos Aires; por haber hecho posible materialmente este trabajo de investigación.



INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	1
1. GENERALIDADES	1
1.1. Aspectos anatomo-histológicos	1
1.2. Aspectos funcionales	5
2. ACETILCOLINA Y LA TRANSMISIÓN NEUROHUMORAL	9
3. MODULACION ADRENERGICA	18
3.1. Antecedentes de la transmisión del impulso nervioso simpá- tico.	18
3.2. Neuronas adrenérgicas y contenido de catecolaminas en el conducto deferente.	20
3.2.1. Síntesis	23
3.2.2. Acumulación.	26
3.2.3. Liberación	28
3.2.4. Recaptación.	31
3.2.5. Catabolismo enzimático	37
3.3. Factores farmacológicos que modifican los mecanismos de inactivación del neurotransmisor adrenérgico.	40
3.3.1. Inhibición de la síntesis.	40
3.3.2. Modificación de la liberación.	41
3.3.3. Bloqueo de los procesos de recaptación	43
3.4. Clasificación de los agonistas adrenérgicos.	45
3.5. Clasificación y propiedades de los adrenorreceptores peri- féricos	46
4. REGULACION HORMONAL	50
4.1. Eventos que ocurren en la maduración del animal macho ..	51
4.2. Esteroidogénesis	53
4.3. Espermatogénesis	56
MATERIAL Y METODOS.	58
1. ANIMALES UTILIZADOS	58



	<u>Pág.</u>
1.1. Grupos experimentales58
1.1.1. De acuerdo a la edad58
1.1.2. De acuerdo a la condición hormonal.58
1.2. Técnica de castración58
1.3. Terapia de sustitución59
2. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS EMPLEADOS.59
2.1. Instrumental y equipo básico.59
2.2. Instrumental y equipo complementario61
3. PREPARACION TISULAR63
3.1. Obtención del conducto deferente63
3.2. Disposición y montaje de los preparados66
4. COMPOSICION DE LA SOLUCION DE PEREUSION TISULAR66
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL67
6. COMPUESTOS QUIMICOS UTILIZADOS69
RESULTADOS70
1. ACTIVIDAD ESPONTANEA DE LA REGION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA70
1.1. Variaciones de la tensión contráctil y frecuencia de las contracciones de acuerdo a la edad de maduración sexual. .70	.70
1.1.1. Animales normales70
1.1.2. Animales castrados.72
2. EFECTO DE ACETILCOLINA SOBRE LA PORCION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA75
2.1. Animales normales75
2.2. Animales castrados77
2.3. Influencia de bloqueantes colinérgicos sobre los efectos de acetilcolina en animales normales y castrados77
3. EFECTO DE NOREPINEFRINA SOBRE LA PORCION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA77

	<u>Pág.</u>
3.1. Animal normal de 90 días79
3.1.1. Influencia de los bloqueantes adrenérgicos79
3.1.2. Influencia de la edad82
3.1.3. Influencia de la castración82
3.1.4. Influencia del tratamiento con testosterona.85
3.2. Influencia de la inhibición de los mecanismos de inactivación de norepinefrina en las distintas edades.87
3.2.1. Animales de 20 días normales y castrados87
3.2.2. Animales de 50 días normales y castrados90
3.2.3. Animales de 90 días normales y castrados95
DISCUSION	107
CONCLUSIONES.	122
RESUMEN	125
SUMMARY	126
BIBLIOGRAFIA	127

INTRODUCCION

1. GENERALIDADES

1.1. Aspectos anatomo-histológicos

El conducto deferente de rata es un tubo de aproximadamente 6 cm de longitud, revestido por un abundante músculo liso, que se origina en la porción caudal del epidídimo, en el escroto, y se extiende hasta el conducto eyaculatorio, cerca de la uretra, en un conducto común con las vesículas seminales, glándulas coagulantes y glándulas anexas del conducto deferente (1, 2).

Está suspendido en un mesenterio que se continúa con su análogo del epidídimo.

El lumen está limitado por células epiteliales en columnas con abundantes y largas vellosidades que se proyectan hacia la luz del órgano.

Presenta una lámina propia vascular, la cual se encuentra entre el epitelio y las capas musculares.

Una característica anatómica importante del conducto deferente es que cada fibra muscular lisa tiene una terminal nerviosa autónoma sobre su superficie (3).

El conducto deferente recibe inervación simpática, la cual, llega desde el plexo hipogástrico vía del nervio espermático inferior (4, 5). La mayoría de las fibras de este nervio, que se distribuyen por cada una de las fibras musculares lisas, son sólo ocasionalmente identificables a lo largo del curso del órgano. Estas fibras nerviosas son en su mayoría mielinizadas, tanto en su raíz como en su terminal intraorgánica.

La irrigación proviene de la arteria vesicular inferior, la cual, al igual que la inervación se dirige hacia la cola del epidídimo donde se anastomosa con la rama epididimaria de la arteria

testicular.

La arteria y el nervio del conducto deferente están encerrados en una adventicia que lo envuelve a manera de dedo de guante, la cual, puede separarse fácilmente del órgano.

En el conducto deferente de rata existe una verdadera especialización regional a lo largo de su extensión.

La porción proximal tiene células con grandes cantidades de vesículas, vacuolas y lisosomas (6, 7) y se extiende desde el epidídimo hasta donde la capa muscular se engrosa. Debido a su capa muscular relativamente delgada es más angosta y fina que la porción distal, siendo su contenido luminal blancuzco, el cual, se trasluce a través de la capa muscular (1).

Las células de la porción distal presentan un abundante retículo endoplásmico de tipo liso (6) y comienza donde el contenido luminal se ve con menor facilidad, esto es, justo antes de su entrada a la región inguinal; esta porción en el animal intacto, es rosada presumiblemente debido a su mayor vascularización comparada con la porción proximal (1).

Una característica importante de destacar es que los túbulos del sistema retículo endoplásmico llegan hasta la vecindad de las mitocondrias pertiendo sus ribosomas y envolviendo a la mitocondria. Este hecho fue observado por Shelton y Jones en la corteza adrenal (8).

Las regiones proximal y distal también pueden ser diferenciadas sobre la base de las características del epitelio, la lámina propia, la oferta vascular y la cubierta muscular que circunda el conducto. Así, la región proximal, en un corte transversal, es aplanada a nivel de su fijación en el mesenterio.

El aplanamiento involucra sólo la capa muscular y resulta en una distribución asimétrica de los husos musculares alrededor del conducto. Los haces musculares están primariamente orienta-

dos longitudinalmente alrededor del conducto proximal, aunque, hay una capa circular profunda justo a la altura de la lámina propia.

Los principales vasos sanguíneos que irrigan el conducto deferente corren lateralmente a lo largo del eje mayor, cerca del músculo y dentro del mesenterio. Sus pequeñas ramas llegan al músculo y lámina propia.

Los nervios forman densos plexos que corren sobre la superficie de la capa muscular y alrededor de toda la circunferencia del órgano. Estos plexos dan brazos que se dirigen hacia la profundidad del músculo.

La topografía del lumen, en el vaso deferente proximal, es relativamente simple. Tiene la forma de un típico cilindro, el diámetro luminal va decreciendo desde un rango de 340-350 μm desde el extremo proximal a 150-190 μm en el punto medio aproximado del órgano; esto se debe a que la altura de las células epiteliales se incrementa a lo largo del conducto y porque el diámetro del epitelio más la lámina propia disminuye.

Es también notorio que la densidad de los plexos capilares subepiteliales se incrementan distalmente.

La región distal, en una sección transversal del conducto deferente, es más o menos circular debido a la adquisición de capas musculares longitudinales gruesas.

La distribución de los nervios y vasos sanguíneos es igual a la porción proximal excepto que tiene un mayor número de nervios mielinizados.

En la unión entre la región proximal y distal el epitelio comienza a ser festoneado. El comienzo de este signo, que representa una extensiva evaginación del epitelio, es característico del segmento distal.

En varias secciones transversales a lo largo del conducto dig

tal o visto lateralmente con el microscopio electrónico de barrido siempre están presentes 2 a 6 evaginaciones del epitelio. A veces parece como si los pliegues estuvieran dispuestos en espiral a lo largo del tubo; dentro de los pliegues hay tejido conectivo y capilares.

Las células epiteliales también presentan un cambio considerable caracterizado por un aumento en la altura de las células debido a un incremento del citoplasma infranuclear, un alejamiento del núcleo respecto de la zona basal y un incremento en longitud de las microvellosidades.

Hacia su terminación, el epitelio del conducto deferente distal, se modifica; las células cilíndricas altas que son características se pierden en algunas áreas y son reemplazadas por grupos de pequeñas células que fagocitan activamente espermatozoides. A continuación de esta zona, el conducto deferente confluye con los conductos de la vesícula seminal, glándula coagulante y glándulas del conducto deferente formando el conducto eyaculador.

Por fuera de la lámina propia, y desde el principio del conducto deferente distal hasta su final, hay un rico y complejo plexo venoso que rodea completamente la mucosa y que se continúa con los canales vasculares del cuerpo esponjoso.

La sangre fluye dentro del plexo a través de vasos centrípetos que corren a través de la capa muscular y que se originan en la arteria deferencial. A su vez la sangre se vuelca en los grandes canales venosos y eventualmente en la gran vena deferencial.

Observando la preparación durante la fijación por perfusión se advierte que las dos porciones reciben sangre arterial de distintas fuentes.

El conducto deferente proximal, testículo y epidídimo reciben por perfusión retrógrada, sangre de las arterias espermáticas, mientras que el conducto deferente distal y las glándulas acceso



rias reciben de la anastomosis de la arteria epididimaria (9).

Estos dramáticos cambios en las estructuras de una a otra región del conducto deferente hablan de un alto grado de organización funcional. Así, la porción proximal está en el escroto, mientras que la porción distal se encuentra en la región inguinal terminando en la pelvis.

En el conducto deferente de rata no se observa una ampolla o zona ampular, como se encuentra en los rumiantes, que tienen la porción terminal muy expandida (10). Se ha sugerido que una de las funciones de la porción terminal es la remoción de espermatozoides presentes en esa zona que no hubieran sido eliminados por eyaculación o por el flujo de orina.

Waldschmidt y Karg (11) demostraron que en la zona ampular de los bovinos hay digestión enzimática de espermatozoides y sería posible que en las porciones distal y terminal de las ratas ocurriera algo semejante.

La función del extenso plexo venoso de la porción distal se desconoce. Podría actuar como una gran bolsa para la difusión de materiales fuera del conducto, pero su relación directa con el tejido eréctil del cuerpo esponjoso sugiere una función de erección, en este caso podría actuar endureciendo el conducto deferente durante la fase de emisión de la eyaculación con el fin de favorecer el movimiento del fluido seminal.

1.2. Aspectos funcionales

Hay una tendencia a ver el conducto deferente como un simple tubo que conduce el esperma, pero poco se sabe acerca de su función durante los intervalos entre una eyaculación y otra. Tampoco hay razones para sospechar que el conducto deferente pueda jugar un rol en la maduración espermática como ocurre con el epidí

dimo, o que contribuya significativamente en la composición del semen como lo hacen las glándulas accesorias.

La función adaptada a su anatomía es el transporte del semen durante la eyaculación y probablemente la conducción del exceso del mismo hacia la uretra durante los períodos de inactividad sexual. Es aceptada también la función de absorción y secreción a nivel del epitelio y por otro lado la capacidad del órgano para almacenar el esperma.

Analizaremos separadamente las diferentes funciones del conducto deferente tales como: transporte espermático, absorción, secreción y almacenamiento.

Transporte espermático: la abundante cubierta muscular del conducto deferente hace que este órgano presente una vigorosa peristalsis para llevar el esperma desde la región caudal del epidídimo hacia el conducto eyaculatorio.

La motilidad más intensa se observa en los momentos previos a la eyaculación, momento en el cual el flujo espermático es capaz de incrementarse unas 200 veces (12).

Existen contracciones muy poderosas durante el período eyaculatorio previo, las cuales son mediadas por la liberación de norepinefrina desde las fibras nerviosas simpáticas (13).

Como resultado de la motilidad espontánea existe una constante expulsión del esperma hacia el conducto deferente en los animales maduros.

La actividad contráctil espontánea normal del conducto deferente humano es anulada por los anestésicos locales (14), los cuales deprimen tanto la actividad nerviosa como la muscular.

Absorción: las células epiteliales de la porción proximal al contener numerosas vesículas, vacuolas y lisosomas sugieren que este epitelio absorbe material desde el lumen (6).

Utilizando métodos de ultraestructura, con peroxidasa como

trazadores intracelulares se determinó que las vesículas de las células epiteliales del conducto deferente de rata llevan proteínas desde el lumen a los cuerpos lisosomales (7). Con estos experimentos se concluyó que el conducto deferente puede modificar el contenido del semen a través de un selectivo mecanismo de absorción.

El 99 % de la producción del fluido testicular en el cãrnero es absorbida en la porción proximal del conducto deferente (15).

Simeone y Young en 1931 (16), propusieron que la porción distal del conducto deferente es responsable de la eliminación del sobreflujo del esperma en especies tales como el cobayo. De acuerdo con este concepto, el esperma no eyaculado refluye a la porción terminal sufriendo una licuefacción y disolución dentro del conducto deferente.

No existe aún evidencia científica de que las células epiteliales cumplan funciones de fagocitosis sino que posiblemente su función se limite a la absorción de los productos del esperma.

Estudios morfológicos sugieren que la porción proximal del conducto deferente de rata es capaz de absorber proteínas (6, 7).

Secreción: Existe una especialización a nivel del conducto deferente para cumplir esta función la que se lleva a cabo, en la porción terminal.

Esta función varía de acuerdo con la especie animal, pero en el hombre, en el toro y en la rata es igual, en cuanto a su contenido de fructosa, a la secreción de las vesículas seminales (17).

La porción proximal está implicada en la secreción de lípidos, proteínas, polisacáridos y ácido siálico.

Un hecho importante de destacar es la reducción de la concentración del ácido siálico en el conducto deferente de ratas castradas y su restauración a niveles próximos al normal después de la administración de propionato de testosterona; lo cual lleva a

decir que el nivel de secreción del ácido siálico por el conducto deferente es hormona-dependiente (18).

Hamilton y colaboradores (19) demostraron que el conducto deferente de conejo es capaz de sintetizar testosterona y dihidroepiandrosterona a partir del acetato en un rango inferior a la capacidad de síntesis que posee el epidídimo. De cualquier manera los esteroides sintetizados son secretados hacia el lumen del conducto deferente y aún se desconoce el papel que juegan los mismos en el proceso reproductivo y tampoco existen evidencias de que ellos actúen en el metabolismo del esperma.

La detección de RNA en el lumen del conducto deferente sugiere que las células epiteliales presentan un mecanismo alócrino de secreción de dicho nucleótido pero no se conoce la función del mismo (20).

Las células principales del conducto deferente, por su estructura sugieren tener una actividad secretoria (19). El desarrollo del sistema retículo endoplásmico rugoso de estas células es consistente con la síntesis y secreción de proteínas incluyendo los antígenos espermáticos. También es razonable pensar que tengan las bases estructurales para la secreción de esteroide y el hecho de poseer un aparato de Golgi muy complejo hace extensivo, junto con la función de absorción, la de conjugación y secreción de proteínas y esteroides.

Almacenamiento espermático: la literatura muestra datos concernientes a la capacidad del conducto deferente para almacenar el esperma, sugiriendo que normalmente este órgano contiene una fracción del número total del mismo presente en un eyaculado. En el carnero, Tischner (12), mostró que en reposo el macho tiene menos de 200 millones de espermatozoides en el conducto deferente y en la ampolla, siendo el promedio del eyaculado de 3 billones de espermatozoides, lo que hace suponer que el conducto defe

rente y su ampolla constituyen un reservorio espermático relativamente importante en esta especie.

Freund y Davis (21) sugirieron que estos mismos datos pueden extenderse al humano. Estos hallazgos indican que el tracto reproductor distal humano, que es el sitio de la vasectomía, puede almacenar menos de la mitad del número de espermatozoides contenidos en un eyaculado normal.

2. ACETILCOLINA Y LA TRANSMISION NEUROHUMORAL

La primera mención sobre la posible existencia de sustancias químicas que tuvieran relación con la transmisión nerviosa, fue dada por Du-Bois Reymond (22), quien en 1877, afirmó que la transmisión del impulso nervioso se podría producir no sólo eléctricamente por corrientes de acción, sino también químicamente por sustancias excitantes que se forman en la superficie de las terminaciones nerviosas, tales como el amoníaco o el ácido láctico.

Mas tarde Dixon (23) en 1907, describió la similitud entre los efectos de los alcaloides muscarínicos y la respuesta de la estimulación vagal, postulando que la misma produce la liberación de una sustancia muscarínica símil, que actúa como un transmisor químico de estos impulsos. Así, los estudios experimentales de Dixon llegan a la conclusión de que la excitación del nervio induce la liberación local de una hormona, la cual al combinarse con algunos constituyentes del músculo o de la glándula, causa una actividad específica (23).

Un año antes del descubrimiento de Dixon, Hunt y Traveau (24) descubrieron la acetilcolina, la cual fue estudiada minuciosamente aún antes de conocerse su participación en los procesos de transmisión nerviosa.

Por el año 1914, Dale (25) y Ewins (26), estudiaron las propiedades farmacológicas de la acetilcolina; postulando que los

efectos de este agente reproducía con gran fidelidad las respuestas de la estimulación nerviosa parasimpática, caracterizando estos efectos con el término de " parasimpáticos ". Estos autores demostraron que los derivados de colina en general, presentaban dos tipos de acciones farmacológicas: la denominada acción muscarínica, que reproducía los efectos de este alcaloide sobre el músculo liso, músculo cardíaco y glándulas y era anulable por la atropina; y la acción nicotínica ejercida sobre los ganglios y músculo esquelético, que era bloqueable por el hexametonio y la d-tubocurarina.

Dale también hizo notar la breve duración de los efectos de este compuesto y propuso que podría existir una esterasa en los tejidos que rápidamente desdoblaría la acetilcolina en ácido acético y colina (25).

Los brillantes estudios de Loewi (27) en 1921, establecieron la primera demostración real de la mediación química en la transmisión del impulso nervioso, por la liberación periférica de agentes específicos. Estimulando el nervio vago del corazón de rana perfundido, describió la liberación de una sustancia capaz de disminuir la frecuencia cardíaca del corazón de otro animal. Loewi denominó a esta sustancia " vagusstoff " (sustancia vagal parasimpática); identificada por último como acetilcolina.

Muchos otros investigadores establecieron más tarde que la acetilcolina no sólo era el mediador de la transmisión química parasimpática del corazón, sino también de otras estructuras inervadas por el parasimpático, incluyendo el músculo liso que integra las paredes de diferentes vísceras (28, 29).

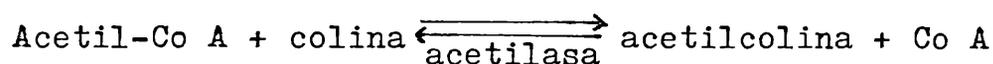
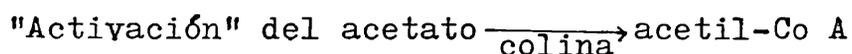
Brown y Feldberg (30) fueron los primeros en dar evidencias de que la acetilcolina era sintetizada y acumulada en las terminaciones nerviosas, dando con precisión detalles sobre la síntesis y acumulación y la localización en las vesículas sinápticas de la colinacetilasa.

Existieron innumerables problemas técnicos en el estudio de la síntesis y acumulación de acetilcolina en las diversas estructuras inervadas por el parasimpático. Sin embargo, el ganglio cervical superior ofreció un buen modelo para el análisis directo de este fenómeno y fue usado por Birks y MacIntosh (31) para este propósito. De sus cuidadosos estudios se pudo obtener un modelo bastante aproximado de los procesos de síntesis, acumulación y liberación de acetilcolina, contenida en el ganglio como fuera del mismo, en diversas condiciones de reposo y activación. Sus estudios se sumarizan en la Figura 1.

Los procesos químicos asociados a la síntesis de acetilcolina son complicados y requieren, por lo menos, dos reacciones enzimáticas que los controlan, sin embargo la etapa de mayor importancia es la acetilación de la colina por transferencia de un grupo acetilo de la acetilcoenzima A a la colina, reacción que es catalizada por la colinacetilasa (32).

Esta reacción requiere fundamentalmente la presencia de glucosa y colina, como así también, de coenzima A y de la activación previa del acetato, el que es luego usado para formar la acetilcoenzima A.

La secuencia de reacciones que intervienen en la formación de acetilcolina es la siguiente :



La acetilcolina así formada es acumulada en estructuras subcelulares, las cuales, pueden ser identificadas como vesículas sinápticas (33, 34) o como sistemas microtubulares conectados a la membrana (35).

Una pequeña fracción de acetilcolina es denominada "acetilcolina estacionaria", no es fácilmente liberable y se encuentra localizada en porciones extrasinápticas de los axones presinápticos (31). La otra fracción denominada "acetilcolina de depósito" puede ser liberada por el impulso nervioso; esta desaparece después de la estimulación nerviosa prolongada y su resíntesis es prevenida por el hemicolinium (31).

La cinética de intercambio de acetilcolina sugiere que la misma se encuentra acumulada en depósitos que están organizados en varios sistemas (Figura 1).

1. La "acetilcolina de reserva", que no es inmediatamente deplecionada por los mecanismos comunes de liberación. En condiciones de reposo, el monto de acetilcolina formada por el proceso de síntesis excede su capacidad de ser acumulada en este depósito y pasa a integrar el depósito "supletorio de acetilcolina", en donde es hidrolizada por la acetilcolinesterasa del axoplasma. Cuando la sinapsis es activada la síntesis se incrementa marcadamente y mantiene este depósito.
2. La "acetilcolina lábil" constituye un pequeño compartimiento que se forma a partir de la "acetilcolina de reserva" y representa aquélla que puede ser liberada por impulso nervioso.
3. Representa la fracción de acetilcolina que es más "fácilmente liberable" y es la que ocupa sitios estratégicos de la membrana presináptica, desde donde se libera.

Este modelo de síntesis, acumulación y liberación de acetilcolina fue propuesto por Birks y Mac Intosh (31).

El potencial de acción nervioso, produce la liberación de 100 cuantas de acetilcolina en 1 milisegundo (33, 34, 36, 37); y se libera solamente la fracción más próxima a la membrana presináptica (35).

Se ha encontrado que durante la estimulación repetitiva y rá-

FIBRA
PRESINAPTICA

Acetilcolina
estacionaria
(40 μg)

TERMINAL PRESINAPTICO
(VESICULA)

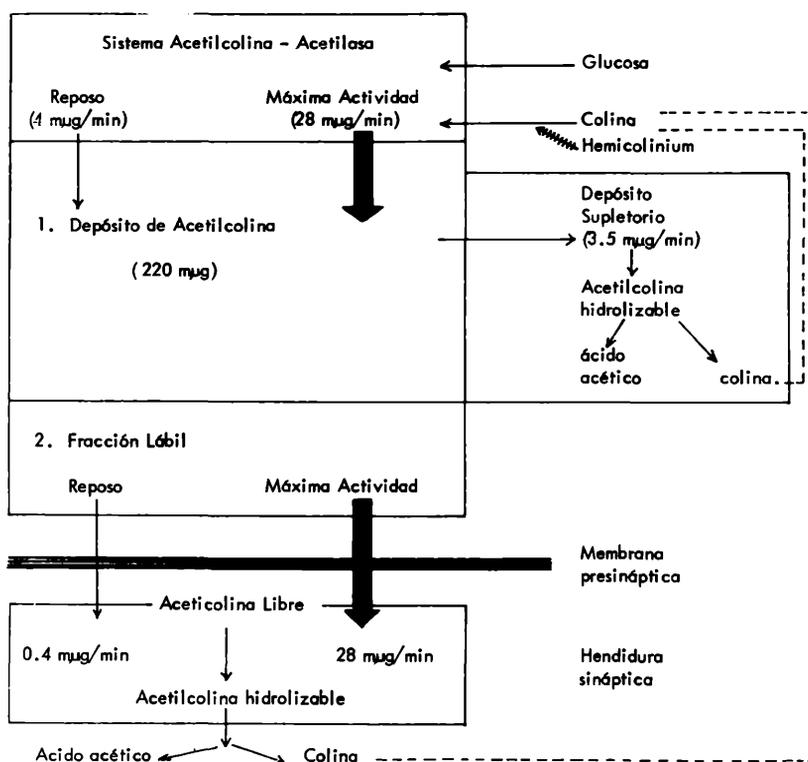


Figura 1: DIAGRAMA QUE REPRESENTA SINTESIS, ACUMULACION Y LIBERACION DE ACETILCOLINA.

Según Birks y MacIntosh (31).

pida de las fibras preganglionares, el monto en el ganglio cae y la transmisión se bloquea; considerándose que en estas condiciones, se libera acetilcolina del total de los sitios lábiles de acumulación, por otro lado, durante el reposo estos sitios lábiles pueden ser replecionados desde otros sitios menos accesibles para su liberación (31).

La activación nerviosa no sólo incrementa la liberación, sino que también incrementa la velocidad de síntesis de acetilcolina. Así la acetilcolina contenida en la terminal nerviosa puede ser incrementada hasta alcanzar los mismos niveles que durante el reposo (38).

Una sugerencia dada por Birks (31), es considerar que los tres subsistemas de acumulación se deplecionan en serie, lo que haría suponer que la máxima cantidad de acetilcolina que puede ser liberada no sólo depende de la velocidad de síntesis, sino también de la velocidad de transformación de la acetilcolina de reserva en acetilcolina lábil.

Existen claras evidencias que el nervio hipogástrico de la rata contiene abundantes células ganglionares situadas cercanas a la cubierta serosa del conducto deferente y en presencia de un estímulo apropiado descarga una contracción que es reducida pero no abolida por el hexametonio (39).

Estudios de microscopía electrónica demostraron que el conducto deferente de cobayo presenta fibras colinérgicas, las cuales se encuentran únicamente en la terminación de las fibras simpáticas post-ganglionares. Similares hallazgos se observaron en el conducto deferente de rata (40).

Es un concepto general que la acetilcolina estimula la musculatura lisa, incrementando la fuerza de contracción (41). Sus efectos están caracterizados por un incremento en la excitabilidad del músculo, asociado con la despolarización de la membrana celu

lar, con iniciación del potencial de acción, el cual en última instancia desencadena mecanismos que determinan la contracción muscular (42, 43).

Si el músculo presenta actividad espontánea, la acetilcolina incrementa la frecuencia y la duración de los potenciales de acción (43, 44). La iniciación o el incremento de las descargas en espigas, siempre ocurre después de pocos segundos de haberse producido la despolarización acetilcolínica, la cual varía de acuerdo con el nivel que inicialmente presentaba el potencial de reposo (44, 45).

Burnstock (46) usando el método del " gap " de sucrosa relacionó la acción de acetilcolina con los movimientos del Na^+ y el K^+ a través de la membrana, comparando su acción sobre el músculo liso con los ejercidos sobre la placa neural del músculo esquelético. Puntualizó que la acción despolarizante de acetilcolina, se produciría mediante un incremento no específico de la permeabilidad de la membrana celular.

A favor de esta teoría, los trabajos de Durbin y col. (47) demostraron el efecto despolarizante del carbacol sobre el músculo intestinal, observando que dicho agente incrementa no sólo la permeabilidad iónica hacia el K^+ , sino también hacia el Na^+ , Ca^{++} , Cl^- y Br^- . Estos estudios se realizaron despolarizando previamente con un exceso de K^+ .

Según Bulbring y Kuriyama (45) la acetilcolina no produce despolarización en un medio libre de K^+ , e incluso cuando el potencial de membrana es muy reducido la acetilcolina resulta inefectiva (45).

Por otro lado, en preparaciones normales, la acetilcolina no tiene efecto en un medio libre de Ca^{++} ; pero el exceso del mismo potencia sus efectos (45).

Recientes estudios permiten construir un esquema de los even-

tos concernientes a la acción estimulante de acetilcolina sobre el músculo liso (Figura 2).

El primer paso en esta secuencia es la unión del neurotransmisor colinérgico a su receptor muscarínico (1.), luego de una latencia muy corta se produciría la apertura de los canales iónicos de Na^+ y Ca^{++} de la membrana celular (2.), los cuales comienzan a operar específicamente por acción de la acetilcolina, manifestándose por la descarga de un potencial de acción (3.).

Durante el corto período que media entre la unión de acetilcolina a su receptor muscarínico, y la apertura de los canales iónicos, ocurriría una liberación del Ca^{++} unido a la membrana, el cual, ha su debido tiempo produciría la liberación del Ca^{++} del retículo sarcoplásmico, produciéndose el conocido fenómeno Ca^{++} libera Ca^{++} del retículo, siendo siempre menor la cantidad que entra que la que sale de dicho retículo para ser aprovechada para la contracción. Este fenómeno se produciría solamente con altas concentraciones del agonista en el receptor muscarínico (48).

Existen evidencias que en el músculo liso altas concentraciones de acetilcolina pueden liberar el Ca^{++} de las membranas celulares y éste a su debido tiempo ser el activador de la proteína contráctil del receptor muscarínico. Por el contrario, bajas concentraciones de acetilcolina movilizan el Ca^{++} incrementando su concentración intracelular, el cual, al activar la proteína quinasa sería el responsable del incremento de la tensión contráctil producida por el agonista colinérgico (48).

La activación del receptor muscarínico por parte del neurotransmisor colinérgico desencadena dos efectos bioquímicos intracelulares que se manifiestan por un incremento en los niveles de GMP (guanosin monofosfato) cíclico (49) y una movilización y recambio del ácido fosfatidilinositol asociado a los lípidos de

la membrana (50), de la misma manera que se ha postulado para la noradrenalina en el conducto deferente (51).

3. MODULACION ADRENERGICA

3.1. Antecedentes de la transmisión del impulso nervioso simpático

Langley (52) en 1901, fue el primero en describir la similitud entre los efectos de la inyección del extracto de la glándula adrenal y la estimulación nerviosa simpática. En 1899, Abel (53) separó el principio activo del extracto adrenal y lo denominó "epinefrina".

Elliott (54) en 1905, postuló que el impulso nervioso simpático libera una sustancia semejante a la epinefrina que entra en inmediato contacto con la célula efectora y consideró a la misma como indispensable para la transmisión nerviosa. En este mismo año, Stölz realizó un importante hallazgo al sintetizar una nueva sustancia, la "norepinefrina" (55).

Por un largo período se prestó poca importancia a estos hallazgos y los primeros en relacionar la norepinefrina con el sistema nervioso simpático fueron Barger y col. (56) quienes en 1910, al estudiar los efectos biológicos de varias drogas simpaticomiméticas, hicieron la interesante observación de que la epinefrina no imita todos los efectos de la estimulación nerviosa simpática, como se debe esperar de un verdadero trasmisor; mientras que la inyección de aminas simpáticas secundarias reproducen más fielmente dichos aspectos.

Cannon y Uridil (57) postularon en el año 1921, que al estimular los nervios hepáticos simpáticos se liberaba una sustancia semejante a la epinefrina, que aumentaba la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, pero no dilataba la pupila.

Experimentos posteriores realizados por Cannon (58) confirma-

ron la presencia de un mediador químico liberado en la unión neuroefectora por el impulso nervioso, al que, para evitar toda interferencia prematura acerca de su estructura química denominó "simpatina".

Bacq (59) en 1934, insinuó la posibilidad de que la epinefrina no metilada o norepinefrina podría ser el mediador químico simpático, relacionando a la "simpatina E" con la norepinefrina y a la "simpatina I" con la epinefrina.

Raab (60) en 1943, fue el primero que mediante métodos químicos, encontró en extractos de bazo, catecolaminas con propiedades diferentes a la epinefrina, restándole valor a ésta como neurotransmisor simpático.

Las pruebas concluyentes del papel de la norepinefrina como uno de los mediadores simpáticos, sólo se obtuvieron cuando surgieron métodos químicos y biológicos para la determinación cuantitativa de las aminas simpáticas en líquidos orgánicos y macerados de tejidos. Euler (61) en 1946, encontró, con todos los métodos empleados, que la sustancia simpaticomimética obtenida de macerados de nervios y órganos, tenía una gran semejanza a la norepinefrina, manifestando que esta era el verdadero transmisor simpático y que sólo ocasionalmente, la estimulación nerviosa puede liberar pequeñas cantidades de epinefrina.

Carlsson (62) por su parte, mediante métodos de histofluorescencia, identificó a la norepinefrina como el compuesto más activo en el proceso de transmisión nerviosa.

Sin embargo, la proporción en que se encuentra la norepinefrina por gramo de órgano es variable y tiene un valor característico que es particular en cada órgano. Estas diferencias se deben a la densidad de la inervación adrenérgica ya que desaparecen luego de la denervación (63).

En 1953, Blaschko y Welch (64), demostraron por primera vez

la presencia de catecolaminas en estructuras submicroscópicas en homogenatos de médula adrenal que luego fueron identificadas como gránulos cromafines. Más tarde Euler (65) usando técnicas especiales de homogeinización y centrifugación, obtuvo en relativo estado de pureza, gránulos que contenían norepinefrina en el nervio esplácnico de bovino y en el bazo de rata. Potter y Axelrod (66) utilizando técnicas radioactivas, los identificaron en homogenatos de corazones de rata. Con estas mismas técnicas se los obtuvo también en la glándula salival, conducto deferente y glándula pineal de rata (67).

Estudios realizados por Stjarne (67) demuestran el importante papel que juegan los gránulos citados en la síntesis, acumulación y liberación de las catecolaminas, así como la importancia fisiológica de estos procesos en diversos tejidos.

3.2. Neuronas adrenérgicas y contenido de catecolaminas en el conducto deferente.

Durante muchos años la inervación simpática de los órganos genitales accesorios del macho despertó gran interés, debido en parte al uso frecuente de estos órganos como sistemas modelos para los estudios sobre la transmisión adrenérgica.

Aunque en su extensiva investigación, Langley y Anderson (68) sugirieron que por lo menos, parte de las fibras preganglionares pasan el ganglio meséntérico inferior y corren hacia los nervios hipogástricos para hacer sinapsis con células nerviosas más periféricas, la opinión general ha sido que en la mayoría de los animales estos órganos son provistos por neuronas simpáticas postganglionares que tienen sus cuerpos celulares localizados en el ganglio mesentérico inferior.

Estas afirmaciones se basaron principalmente en hallazgos morfológicos (69) así como electrofisiológicos (70) comprobándose

que el 90 % de las fibras en el nervio hipogástrico son fibras no mielinizadas de tipo C.

Sin embargo, Sjöstrand (71) encontró que los bloqueantes ganglionares tales como el hexametonio y la nicotina, inhibieron la respuesta motora del conducto deferente del cobayo a la estimulación del nervio. Además se demostró que el conducto deferente y la vesícula seminal del cobayo contenían un gran depósito de norepinefrina que podía ser deplecionado con reserpina, pero no se reducía en forma evidente por la denervación hipogástrica (72).

Estos hallazgos, junto con la demostración simultánea por Falck (73) de una distribución abundante de terminales nerviosas conteniendo catecolaminas en el conducto deferente de cobayo, llevaron a la conclusión de que el alto contenido de norepinefrina en el conducto deferente y la vesícula seminal se almacena en nervios que derivan de cuerpos celulares localizados cerca o dentro del órgano.

Estos estudios encontraron un fuerte apoyo en investigaciones morfológicas, electrofisiológicas y farmacológicas. Así, Falck (74) y Sjöstrand (75) demostraron neuronas adrenérgicas en la parte terminal del nervio hipogástrico de cobayo, y Merriless, Holman y Burnstock (76) encontraron células ganglionares en la vecindad del conducto deferente. Ferry (77) mostró que las fibras hipogástricas que producen respuesta a partir de las células del músculo liso del conducto deferente de cobayo eran fibras de tipo B. Por otro lado, Kuriyama (78) usando microelectrodos intracelulares y Birmingham y Wilson (79) trabajando con estimulación hipogástrica y transluminal dieron evidencias farmacológicas de una estación sináptica localizada cerca del conducto deferente.

Por su parte Sjöstrand (75) encontró grandes cantidades de noreadrenalina que quedaban luego de la denervación hipogástrica en

las glándulas genitales accesorias y en el conducto deferente de distintas especies, además se encontró que en algunas de ellas, y en ciertos órganos existían considerables cantidades de adrenalina.

A continuación, pasaremos a analizar detalladamente las principales etapas en los mecanismos de síntesis, acumulación, liberación, recaptación y catabolismo de las catecolaminas.

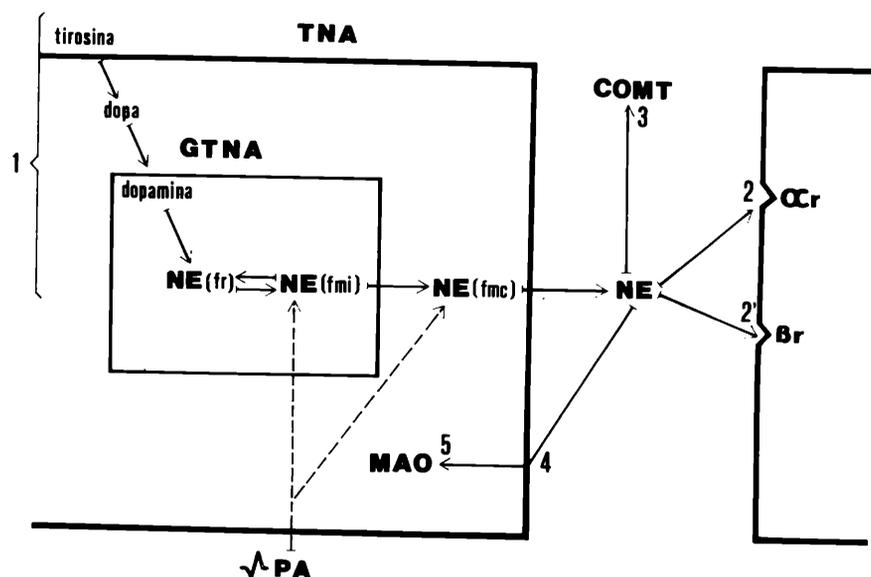


Figura 3: TNA: terminal nervioso adrenérgico; $\alpha_r - \beta_r$: adrenorreceptores alfa y beta; GTNA: gránulo del terminal nervioso adrenérgico; NE (FR): fracción de reserva intragranular de norepinefrina; NE (FMI): fracción móvil intragranular de NE; NE (FMO) fracción móvil intracitoplasmática de NE; PA: potencial de acción nervioso que produce la liberación de NE de las fracciones móviles; 1: síntesis de NE a partir de tirosina; 2 y 2': NE liberada que actúa sobre los receptores alfa y beta; 3: NE inactivada por la catecol-O-metiltransferasa (COMT); 4: NE recaptada por la terminación nerviosa simpática; 5: NE inactivada por la monoaminooxidasa (MAO).

La Figura 3 muestra en forma esquemática estos procesos y su desarrollo desde el terminal nervioso hasta la membrana postsináptica del receptor.

3.2.1. Síntesis

Las diferentes etapas en los procesos biológicos que sufren las catecolaminas fue motivo de extensos estudios por un gran número de investigadores, tales como, Blaschko (80), Eränkö (81), Euler (82, 83) ; Axelrod (85) y Stjärne (84).

La síntesis de epinefrina a partir de la fenilalanina fue propuesta por Blaschko (86), pero recién cuando Gurin y Delluva (87) suministrando fenilalanina radiactiva a ratas, recogieron epinefrina marcada en las glándulas adrenales, se pudieron confirmar las diferentes etapas de síntesis de catecolaminas; así como también, la mayoría de las enzimas que intervienen en dicho proceso. Es importante destacar, que no existe una alta especificidad enzimática, por lo tanto, pueden implicarse a las mismas enzimas tanto en la formación de epinefrina como de norepinefrina.

La biosíntesis de norepinefrina comienza con la fenilalanina proveniente de la dieta, la que por hidroxilación se transforma en tirosina. Sin embargo, esta síntesis puede considerarse a partir de la tirosina, la cual representa el punto de partida más importante en este proceso biológico (Figura 4).

Tres enzimas están involucradas en este proceso, las cuales, son sintetizadas en el cuerpo neuronal y por un mecanismo de transporte denominado axoplasmático migran a lo largo del axón hasta llegar a las terminales nerviosas (88, 89).

1) **Tirosina hidroxilasa:** esta enzima, aislada por Nagatsu (90) cataliza la metahidroxilación de tirosina a DOPA y aparentemente se encuentra en alta concentración en el sistema nervioso adre-

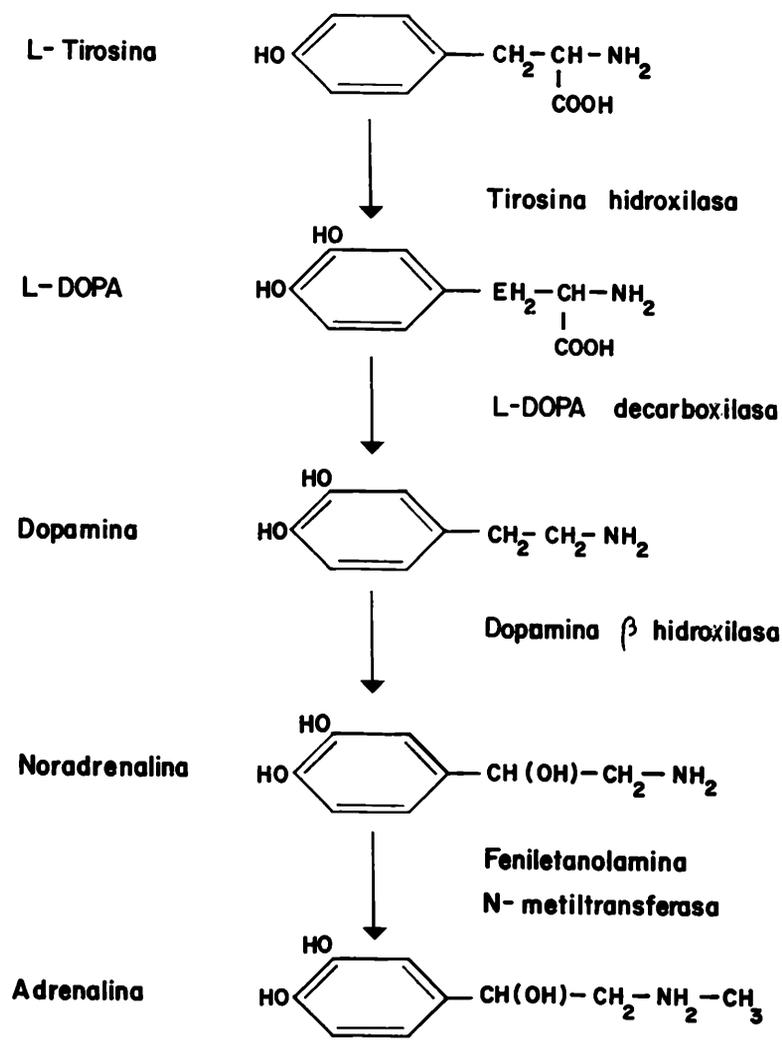


Figura 4: ETAPAS SECUENCIALES QUE PARTICIPAN EN LA BIOSINTESIS DE LAS CATECOLAMINAS TISULARES.

nérgico, pero es de localización extragranular (91).

Esta enzima es específica para l-tirosina, se halla bajo el control regulatorio inhibitorio por el producto final, norepinefrina y cataliza el paso limitante (rate-limiting step) (91), tanto en la síntesis central como periférica de norepinefrina (92, 93), requiriendo como cofactores para su actividad O₂, Fe y tetrahidropteridina, siendo inhibida competitivamente por varios análogos de tirosina, alfa-metil-tirosina, alfa-metil-fenilalanina

na y una variedad de agentes quelantes (93).

Cuando esta enzima es inhibida, los niveles de norepinefrina caen y la proporción de disminución varía de un órgano a otro y entre especies y es influenciada por el trayecto en el nervio simpático.

2) decarboxilasa de aminoácidos aromáticos: esta enzima convierte la DOPA en dopamina, se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos y presenta una localización intragranular (94). Presenta poca especificidad de sustrato y es capaz de decarboxilar también a otros aminoácidos levógiros (93).

3) Dopamina beta oxidasa: esta enzima, también llamada dopamina beta hidroxilasa, cataliza la hidroxilación del carbono beta de la dopamina, resultando en la formación de norepinefrina y su localización es intragranular (94). Su especificidad por el sustrato es baja y puede oxidar cualquier feniletilamina a su correspondiente feniletanolamina (95, 96).

Una vez que la tirosina es captada de la circulación, es hidroxilada en las neuronas adrenérgicas por acción de la enzima tirosina hidroxilasa para formar dihidroxifenilalanina (DOPA).

En el citoplasma, la DOPA es decarboxilada por la enzima dopa decarboxilasa a la forma de dopamina que es captada por el gránulo y convertida en norepinefrina por acción de la enzima dopamina beta oxidasa.

Cabe destacar, que la primera etapa en la síntesis de norepinefrina hasta la formación de dopamina se realiza en el citoplasma neuronal, y las sucesivas transformaciones hasta la formación de norepinefrina es un proceso intragranular. Si bien se desconoce si la entrada de tirosina al citoplasma neuronal se realiza por transporte activo o por simple difusión; se sabe, en cambio, que la dopamina penetra en el gránulo sólo cuando la concentra-

ción de norepinefrina disminuye, es decir, lo hace a expensas de un gradiente de difusión favorable.

Los factores que regulan la velocidad de síntesis de norepinefrina en las neuronas adrenérgicas son bastante complejos. Sin embargo, los niveles endógenos de norepinefrina son mantenidos a un nivel fijo, característico de cada órgano a menos que la síntesis sea inhibida; ello demuestra que hay un balance dinámico entre su síntesis y su desaparición.

3.2.2. Acumulación

Mediante técnicas histoquímicas de fluorescencia se ha podido detectar y visualizar el sitio de acumulación y los niveles que alcanzan las catecolaminas tisulares.

La mayor parte de las catecolaminas acumuladas en las células y las acumuladas por los nervios simpáticos para la transmisión nerviosa, parecen estar contenidas, como ya se dijo, en partículas específicas, Sin embargo, mediante el fraccionamiento por centrifugación de tejidos homogeinizados, se ha podido obtener un porcentaje relativamente alto de neurotransmisores en el sobrenadante (83) lo que sugiere que también existe presencia de norepinefrina libre en el citoplasma celular. Como quiera que fuere, datos de esta naturaleza no permiten emitir una conclusión definitiva sobre la dimensión de esta fracción que se encuentra libre en el citoplasma, ya que la preparación del tejido inevitablemente causa liberación de las amins contenidas en las vesículas.

Las catecolaminas libres se mantienen con mucha dificultad en el citoplasma, debido a la monoaminoxidasa (MAO) dentro de las células (97, 98, 99, 100). Se cree por ello, que probablemente gran parte de la acumulación extravesicular se encuentra en forma insoluble, ya que la norepinefrina que se encuentra en esta forma está protegida de la acción de la MAO.

Existen considerables evidencias farmacológicas y bioquímicas indicadoras de que el reservorio de catecolaminas no es único y homogéneo. Trendelenburg (101) cita que la depleción inicial provocada por reserpina no es reproducible por tiramina. Por su parte, Axelrod (102) y Kopin (103) demostraron, utilizando norepinefrina marcada, tanto "in vivo" como en corazones aislados de rata, cobayo y ratón, que la misma, luego de ser captada por el corazón, es liberada en diversas fases o etapas, lo que indicaría la presencia de, por lo menos, 2 "pools" o reservorios de norepinefrina que se renuevan en forma diferente.

Stjärne (67) e Iversen (104) también demostraron trabajando "in vitro" que, por lo menos, una porción de la norepinefrina en los gránulos de las terminaciones nerviosas no es cambiante.

Pasaremos a analizar la distribución de neuronas adrenérgicas y la acumulación de catecolaminas en el conducto deferente y glándulas genitales accesorias de la rata.

Estudios de fluorescencia han demostrado que el conducto deferente y las glándulas accesorias reproductivas de la rata y de distintos animales, tales como, cobayo, conejo, gato, mono y perro poseen una inervación adrenérgica generalmente de densidad muy alta que es resistente a la denervación hipogástrica como así también a la simpatectomía lumbosacra (75).

Los cuerpos nerviosos celulares desde los cuales surge el plexo adrenérgico de los órganos genitales accesorios internos del macho se localizan principalmente, en las cercanías de los órganos, dentro de sus paredes o en las ramificaciones periféricas de los nervios hipogástricos (74). Las terminales varicosas adrenérgicas se presentan en gran cantidad en estos órganos y se distribuyen en las capas de músculo liso, en los septos y alrededor de los vasos sanguíneos. No se han obtenido datos que indiquen inervación adrenérgica de las células secretorias de estos órga-

nos.

En el perro se encontró una diferencia remarcable. La capa muscular circular del conducto deferente sólo contiene un número poco denso de fibras nerviosas adrenérgicas y una rica red de fibras no adrenérgicas (74).

La densa distribución de terminales adrenérgicos, en la mayoría de los órganos genitales accesorios del macho, se corresponden bien con el contenido elevado de norepinefrina que se encuentra en estos órganos (75). Con su rica inervación parecen adaptarse bien para ejercer su función: en un tiempo bastante corto (el período de emisión) entregan parte de su contenido. Tal eyección breve, apenas podría obtenerse si el órgano efector poseyera solo una inervación débil.

3.2.3. Liberación

Se asume generalmente que la norepinefrina que es liberada por el terminal nervioso proviene de las vesículas sinápticas.

Existen dos principales mecanismos, por los cuales, la norepinefrina acumulada en las vesículas puede ser liberada hacia el espacio extracelular o hendidura sináptica. Estos se pueden clasificar en:

Tipo 1. La norepinefrina podría pasar primero desde la vesícula sináptica al citosol (parte soluble del citoplasma) y desde allí pasar a través de la membrana celular al espacio postsináptico.

Tipo 2. La vesícula podría liberar directamente su contenido hacia el espacio extracelular.

Trataremos cada uno de estos mecanismos por separado.

1. Liberación de norepinefrina desde el citoplasma

Este mecanismo, tipo 1, puede producirse por: a) una disociación o una alteración en el complejo de unión entre la norepine

frina y el adenosin-trifosfato (ATP) de la vesícula, mecanismo que ha sido propuesto para tiramina (105); b) una alteración en la bomba energía-dependiente, que mantiene una alta concentración de norepinefrina dentro de la vesícula con respecto a la alta concentración en el citosol, modo de acción propuesto para reserpina (106); o bien que las vesículas sean disueltas dejando escapar su contenido, modelo de acción que explica los efectos de altas dosis de prenilamina (107).

Todos estos mecanismos involucran el pasaje de norepinefrina desde el citosol al espacio postsináptico. Esto puede objetivarse tratando primero al animal con reserpina para deplecionar las vesículas y luego con inhibidores de la MAO, para evitar su inactivación en el citoplasma. También los inhibidores de la MAO potencian el efecto liberador de tiramina posiblemente porque protegen a la misma de su destrucción por la enzima (108).

Estudios en el vaso deferente (109), han mostrado la existencia de este mecanismo para la liberación espontánea de norepinefrina; o luego de la administración de drogas que actúan sobre las vesículas. Por el contrario la liberación de norepinefrina por estímulo nervioso respondería a otro mecanismo de liberación en el cual la vesícula es la fuente directa de dicha liberación.

2. Liberación de norepinefrina directamente desde la vesícula hacia el espacio extracelular

Este mecanismo, tipo 2, también denominado exocitótico, ha sido propuesto en el conducto deferente por Fillenz en 1971 (110) y consiste en que las membranas de las vesículas y la membrana citoplasmática se fusionan, modifican su forma y se abren al espacio sináptico volcando su contenido. Este proceso descrito en el conducto deferente, implica la liberación de otros elementos contenidos en la vesícula, tales como, la dopamina β -hidroxilasa,

enzima que cataliza la conversión de dopamina a norepinefrina.

Thoa y col. (108) han estudiado los mecanismos por los cuales la norepinefrina es liberada desde el terminal nervioso en el vaso deferente de cobayo. Mediante diversas intervenciones, han puesto de manifiesto los dos tipos de mecanismos liberadores del neurotransmisor distinguiendo uno del otro de acuerdo a que tengan la capacidad de provocar la liberación de dopamina β hidroxilasa junto con norepinefrina; como así también, sea o no dependiente de la concentración de Ca^{++} extracelular. Estos autores sugieren que todos los fenómenos que despolarizan la membrana de la célula nerviosa adrenérgica, tales como, soluciones hipertónicas de Cl K, la veratridina y la estimulación del nervio hipogástrico inducen a una liberación proporcional de norepinefrina y dopamina β -hidroxilasa, correspondiente al radio molar de la fracción soluble que se encuentra en la vesícula sináptica de los nervios, dando así, evidencia que el mecanismo de liberación por despolarización corresponde al tipo 2 o exocitótico.

Por el contrario, la reserpina, y las aminas simpáticas tales como, tiramina, d-anfetamina o el metaraminol, inducen una liberación de norepinefrina en forma dosis-dependiente; pero no la propia de dopamina β -hidroxilasa, confirmando de este modo la existencia, en el conducto deferente, de una liberación de norepinefrina desde el citoplasma o mecanismo tipo 1.

Otro elemento a tener en cuenta para definir ambos mecanismos es su requerimiento o no de la presencia de Ca^{++} extracelular.

En el conducto deferente de cobayo (108) la liberación de norepinefrina por tiramina, reserpina, d-anfetamina o metaraminol resultó ser Ca^{++} independiente. Por el contrario, las intervenciones que indujeron la liberación del neurotransmisor por el mecanismo exocitótico, tales como, la estimulación del nervio hipogástrico,

gástrico o la veratridina, se mostraron Ca^{++} dependiente ya que disminuyeron en forma proporcional con el descenso de la concentración del Ca^{++} extracelular y a la vez los ionóforos de Ca^{++} tales como, el A-23187 incrementaron dicha liberación.

Por último, el uso de ciertos bloqueantes permiten diferenciar ambos tipos de mecanismos. Así, la tetrodotoxina, que al inhibir la entrada de Na^+ impide la despolarización de la membrana del terminal nervioso o la colchicina que destruye los microtúbulos Ca^{++} dependientes, producen una abolición de la liberación excitotóxica de norepinefrina en el conducto deferente sin modificar aquella inducida por reserpina u otras aminas simpaticomiméticas.

3.2.4. Recaptación

La idea de que las catecolaminas puedan ser aceptadas en los sitios de unión de los tejidos fue sugerida por Burn (111) pero solamente en la década pasada se apreciaron las propiedades y la significancia fisiológica y farmacológica de cada tejido en la captación de catecolaminas.

Los estudios de Whitby, Axelrod y Weil-Malherbe (112) demostraron que la captación y la unión a los tejidos de la norepinefrina circulante representan un mecanismo importante para la inactivación de esta sustancia.

Se ha demostrado claramente que no solamente, uno sino varios procesos diferentes de captación, existen, para las catecolaminas en tejidos animales.

Es un hecho conocido que la norepinefrina y aminas relacionadas son transportadas desde el espacio extracelular y atraviesan la membrana axónica de los nervios adrenérgicos por un proceso llamado "captación 1" (uptake 1). Además existe un mecanismo pro



piciador de la transferencia de catecolaminas libres desde el axoplasma a las vesículas en los nervios adrenérgicos. Finalmente las catecolaminas son transportadas y cruzan las membranas de varias células postsinápticas por otro proceso conocido como "captación 2" (uptake 2). (Figura 5).

Captación neuronal de norepinefrina (captación 1)

A) Propiedades y ubicación celular: la existencia de sitios de captación de catecolaminas en neuronas noradrenérgicas en el sistema nervioso autónomo periférico y en el sistema nervioso central están muy bien estudiados.

Whitby y col. (112) observaron que la norepinefrina tritiada circulante es captada principalmente por tejidos que tienen una rica inervación simpática siendo ampliamente reducida después de la denervación.

Las propiedades del proceso de captación neuronal se han estudiado en varios órganos aislados o preparaciones tisulares encontrándose que la captación 1 parece tener propiedades idénticas en las neuronas del sistema nervioso central y periférico, y parece resultar de la actividad de un sistema "carrier" o transportador de membrana requiriendo energía metabólica (112).

El proceso de captación es saturable y tiene una alta especificidad por la norepinefrina, el transporte constante o " K_m " aparente está entre los 0.2 μM y 1 μM en la mayoría de los tejidos en la rata. En estos tejidos la captación es estereoquímicamente selectiva, teniendo una afinidad por la norepinefrina natural 5 veces mayor que para sus enantiómeros (113), aunque en cobayos y conejos parece faltar tal especificidad (114).

En tejidos de mamíferos, muchos derivados fenólicos de alfa-feniletilamina son acumulados en nervios simpáticos por captación 1, incluyendo el metaraminol, alfa-metilnoradrenalina ,

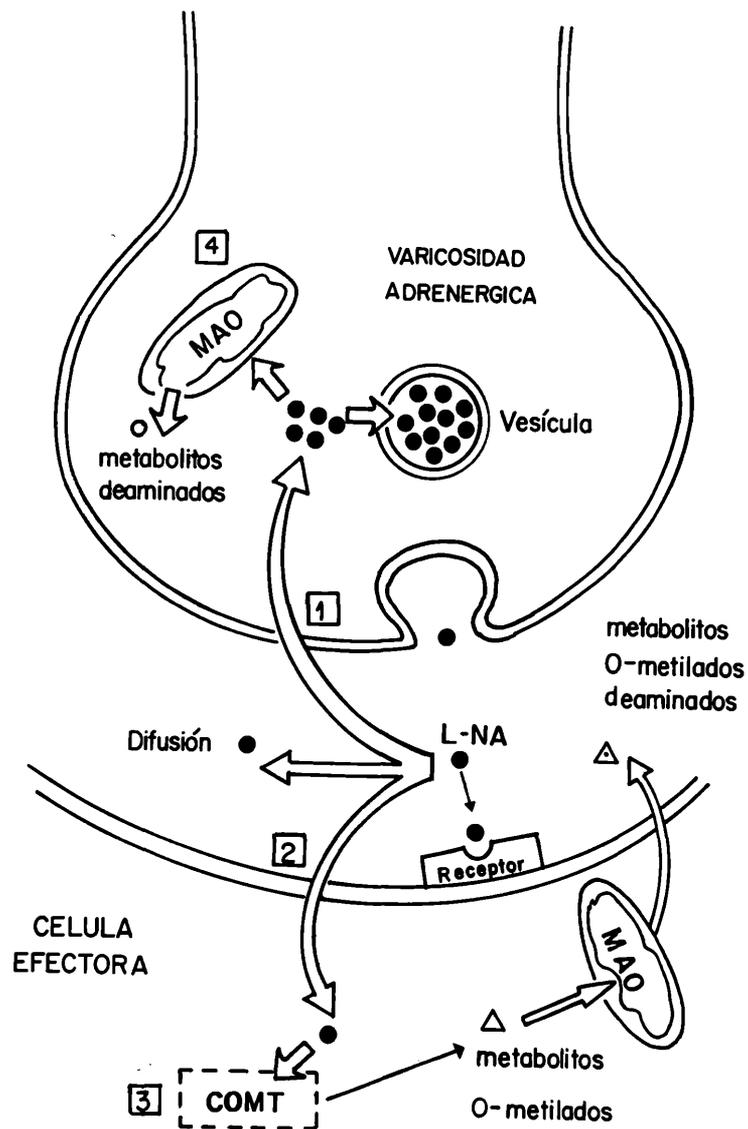


Figura 5: RUTAS DE INACTIVACION DE NOREPINEFRINA (NA) EN EL ESPACIO POSTSINAPTICO..

- 1- Captación neuronal
- 2- Captación extraneuronal
- 3- Degradación enzimática por la catecol-O- metiltransferasa (COMT).
- 4- Degradación enzimática por la monoaminooxidasa (MAO).

tiramina, octopamina y alfa metiltiramina. Parece que los reque
rimientos estructurales necesarios para la captación 1 son: a)
ausencia de grupos N-sustituyentes voluminosos (el isoprotere-
nol no es sustrato), b) ausencia de grupos metoxil sobre el ani
llo aromático (la normetanefrina no es sustrato) y c) presencia
de, al menos, un grupo hidroxil fenólico (anfetamina, fenileta-
nolamina y norefedrina no son sustratos) (115).

En tejidos periféricos y en preparaciones de sinaptosomas de
sistema nervioso central, la captación de norepinefrina está mar
cadamente reducida en un medio libre de Na^+ (116)

La captación 1 también requiere la presencia de una baja con
centración de K^+ (aproximadamente 5 mM) pero es inhibida por al
tas concentraciones de K^+ (encima de 50 mM).

Los inhibidores de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa, tales como, la ouabaina
también conducen a la inhibición de la captación de norepinefri-
na (116).

b) Inhibidores: Burgen e Iversen (117) y Horns(118) estudiaron
la inhibición de la captación de norepinefrina tritiada en co-
razones de rata y en preparaciones de sinaptosomas por varios de
rivados de feniletilamina, y observaron que la anfetamina, la
cual carece de grupos hidroxifenólicos no parece ser sustrato
para la captación 1 pero es un potente inhibidor competitivo de
la misma. Eso sugiere que tales compuestos, inhibidores enzimá-
ticos competitivos son capaces de unirse a los sitios de capta
ción con mayor afinidad, pero carecen de las partes estructura-
les necesarias para el transporte hacia el interior.

Muchas drogas inhiben la captación 1, las más potentes se en
cuentran entre los derivados de imipramina, amitriptilina y o-
tros antidepresivos tricíclicos.

El desmetil derivado de imipramina, desipramina, causa el
50% de la inhibición de la captación de norepinefrina tritiada

en corazón de rata y cerebro a una concentración de 10^{-8} a 10^{-7} M (119) y es el más potente de todos los inhibidores de la captación 1.

La captación 1 es también inhibida ampliamente por drogas conocidas predominantemente por otras actividades farmacológicas; incluyéndose la cocaína, droga anestésica local; drogas bloqueantes de adrenorreceptores, tales como, fenoxibenzamina, clorpromazina y dicloroisoprenalina; los inhibidores de la MAO como la tranilcipromina; y bloqueantes de neuronas adrenérgicas como el bretilio y la guanetidina (120).

c) Rol fisiológico de la captación 1: no existen equivalentes de la enzima acetilcolinesterasa en las uniones adrenérgicas simpáticas. Los inhibidores de la MAO y de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) no prolongan o potencian marcadamente los efectos de norepinefrina después de su liberación en los terminales simpáticos (121). La terminación de sus acciones no parece ser mediada por cualquier conversión enzimática, sino más bien por el transporte de la amina desde el espacio extracelular hacia el terminal nervioso. Este proceso de recaptura es mediado por la captación 1 y representa el mecanismo más importante de inactivación del neurotransmisor.

Desde el punto de vista farmacológico la existencia de un proceso de captación para catecolaminas es de importancia considerable en el entendimiento de mecanismos de acción de muchas drogas que interactúan con mecanismos adrenérgicos. Así, las aminas simpaticomiméticas no solo liberan norepinefrina sino que potencian su acción al inhibir la captación neuronal, es el caso de tiramina (122).

La potenciación de los efectos de los agonistas adrenérgicos por la inhibición de la captación neuronal se produce en mayor o menor medida de acuerdo a la afinidad que estos tengan por di-

chos sitios de captación. Así, por ejemplo, la cocaína no potencia el efecto del isoproterenol y la fenilefrina, mientras que, sí lo hace sobre adrenalina y noradrenalina. Esto es debido a que las dos primeras aminas no son sustratos para la captación neuronal.

Hay drogas que combinan sus propiedades farmacológicas específicas con sus efectos sobre la captación neuronal. Un ejemplo típico es la 6-OH-dopamina, que al producir selectivamente una denervación química potencia los efectos de la noradrenalina exógena al anular el proceso de captación 1 (122).

Captación extraneuronal de norepinefrina (captación 2).

a) Localización celular y propiedades: las aminas simpáticas pueden ser transportadas hacia el interior de los tejidos periféricos extraneuronales, proceso que se denomina recaptación 2 (123, 124). Este proceso se diferencia de la recaptación neuronal por que se pone de manifiesto cuando el neurotransmisor se encuentra en alta concentración en la biofase. Este sistema es saturable, pero tiene mucho menos afinidad hacia noradrenalina y adrenalina que la captación neuronal. Por el contrario, el isoproterenol es muy buen sustrato para la captación extraneuronal.

Este proceso no es normalmente detectable, ya que no se consiguen concentraciones de catecolaminas suficientes en el espacio postsináptico, ya que estas son rápidamente metabolizadas por la acción combinada de la MAO y de la COMT (125).

Estudios histoquímicos del conducto deferente han mostrado que tiene sitios de captación 2 cuando es incubado con altas concentraciones de catecolaminas "in vitro" (126).

Esta captación es seguida rápidamente por el catabolismo intracelular; de este modo, este proceso estaría secuenciado por captación seguida de inactivación, en contraposición a la captación neuronal en que la secuencia es captación seguida de re-

tención.

b) Inhibidores: Burgen e Iversen (117) encontraron que de acuerdo a las estructuras de las aminas simpáticas, estas pueden convertirse en inhibidoras del proceso de captación 2. Así, la N-sustitución y la O-metilación transforman las aminas en inhibidoras de este fenómeno; ejemplo típico son: la normetanefrina y la metanefrina.

Por el contrario, el metaraminol, un potente inhibidor de la captación neuronal, no tiene efecto sobre la extraneuronal.

Lightman e Iversen (125) encontraron que la fenoxibenzamina también es un bloqueante de dicho proceso.

Otros compuestos como el SKF-550 y el SKF-625, aunque menos efectivos se comportan como bloqueantes de este fenómeno.

También han sido descriptos varios esteroides como efectivos agentes bloqueantes de la captación 2, como el 17 β estradiol y la corticosterona (127).

c) Rol fisiológico de la captación 2: la posible función de la captación extraneuronal sería intervenir en la terminación de la acción de la noradrenalina liberada por el terminal nervioso, pero dicha función, sin duda alguna, sería de menor valor que la captación neuronal. Sólo cuando esta última estuviese bloqueada la captación extraneuronal podría tener relevancia.

3.2.5. Catabolismo enzimático

Las dos enzimas que tienen mayor importancia en la transformación metabólica de las catecolaminas son: la MAO y la COMT (128, 129), (Figura 6).

Las catecolaminas endógenas provenientes de la médula adrenal, así como las inyectadas o las liberadas por estimulación nerviosa adrenérgica, son primeramente atacadas por la COMT, que al transferirles un grupo metilo las transforman en metanefrina y normetanefrina respectivamente (130, 131).

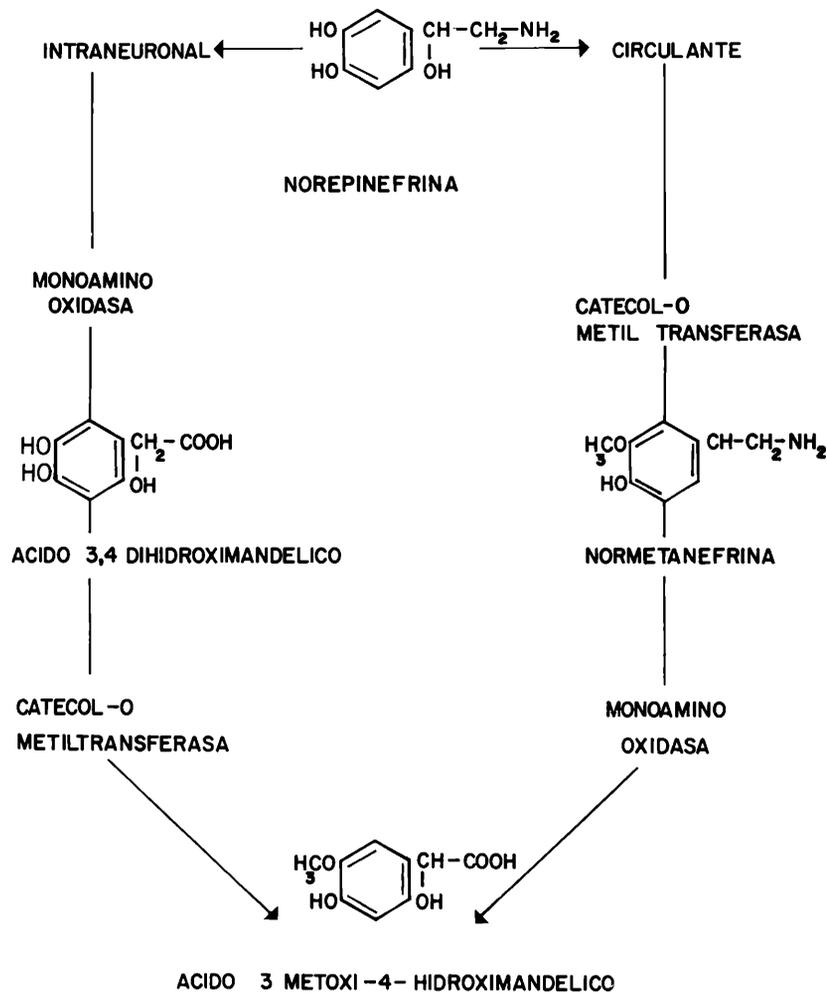


Figura 6: RUTAS DE METABOLIZACION ENZIMATICA DE NOREPINEFRINA INTRANEURONAL Y CIRCULANTE O TISULAR.

La norepinefrina que es liberada más lentamente, ya sea por influencia de ciertas drogas como la reserpina, o por impulsos nerviosos de bajas frecuencias; es probablemente desaminada primero por la MAO a nivel mitocondrial en su correspondiente aldehído y luego convertida extraneuronamente en ácido 3, 4 dihidroximandélico (132).

La COMT está presente en casi todos los tejidos del organismo, incluyendo el hígado (133); la MAO se encuentra en altas concentraciones en el hígado (134). La primera posee actividad predominantemente extraneuronal (135, 136), mientras que, la MAO actúa a nivel de las mitocondrias intra-axonales (99).

Axelrod (137) demostró que la O-metilación es el camino más importante para la inactivación metabólica de la epinefrina marcada.

El hígado puede inactivar la mayor parte de las catecolaminas exógenas y lo hace principalmente por O-metilación (138). Cuando se administra norepinefrina marcada, gran parte es excretada o rápidamente destruída por O-metilación en el hígado o el riñón; y la fracción remanente entra en los tejidos para ser metabolizada más lentamente (112, 99), esta porción es atacada principalmente por la MAO que cataliza su desaminación oxidativa (99).

Examinando los productos metabólicos de la norepinefrina marcada, liberada por los nervios simpáticos, se pueden evidenciar directamente las diferencias entre el metabolismo que sufren las catecolaminas intra y extraneuronales.

Drogas, tales como, la reserpina, que depleciona las catecolaminas intraneuronales (132), incrementan marcadamente la excreción de productos desaminados (98), mientras que otras drogas, tales como, la tiramina, feniletilamina, alfa-metiltiramina y derivados (132), que provocan liberación de la norepinefrina extraneuronal hacia la circulación incrementan de esta forma los

productos O-metilados.

Para resumir estos aspectos podemos decir que la MAO no jugaría el mayor papel en la terminación de la actividad de las catecolaminas liberadas (138), sin embargo, es la enzima responsable directa de la destrucción de la norepinefrina intraneuronal y por ende regula el nivel de ésta en los tejidos.

La COMT, por su parte, al actuar sobre la norepinefrina extraneuronal, tanto tisular como la que pasa a la circulación, regula también la terminación de la actividad de las catecolaminas liberadas (139).

3.3. Factores farmacológicos que modifican los mecanismos de inactivación del neurotransmisor adrenérgico.

3.3.1. Inhibición de la síntesis

Los más importantes inhibidores de la síntesis de catecolaminas, parecen ser aquellos agentes que actúan en el eslabón tirosina-DOPA, pues en el mismo, como ya se dijo, interviene la tirosina hidroxilasa, que es la enzima que regula la síntesis de norepinefrina (91).

Existen dos clases de compuestos capaces de inhibir esta enzima: los ácidos aminados y los catecoles (140). Los ácidos aminados (alfa-metil-p-tirosina y compuestos halogenados) son más potentes que los catecoles y actúan por inhibición competitiva por el sustrato (141); mientras que los catecoles (alfa-metil-dopa, norepinefrina y compuestos afines) no actúan por esta vía sino que compiten con el cofactor pteridina (142).

La depleción causada por estimulación nerviosa seguida por la presencia de un inhibidor de la síntesis, tiene lugar selectivamente en las varicosidades de los nervios terminales (143).

Por otra parte, las catecolaminas acumuladas en el citoplasma, debido al bloqueo de los mecanismos de acumulación en las

vesículas por reserpina, no pueden ser fácilmente liberadas por estimulación nerviosa (143). En base a ello se propone que el transmisor que se encuentra incorporado dentro de las vesículas es aprovechado para ser liberado por impulso nervioso.

3.3.2. Modificación de la liberación

a) Depleción por hiperactividad funcional: la estimulación de nervios simpáticos produce depleción de catecolaminas que por lo general es de grado moderado. La combinación de dos factores deplecionantes pueden actuar sinérgicamente, incrementando la velocidad y grado de depleción. Así, las depleciones inducidas por un bloqueo en la acumulación por acción de reserpina, por inhibición de su transporte por la influencia de desipramina o por interferencia en su síntesis con alfa-metil-tirosina, son incrementadas y aceleradas por la estimulación nerviosa (143). Contrariamente la depleción inducida por reserpina, es retardada por inhibición de la actividad celular.

b) Depleción por deterioro de los sitios de acumulación en los gránulos: este mecanismo aún no ha sido demostrado "in vivo", pero "in vitro", ciertos agentes como la prenilamina a concentraciones elevadas, liberan aminas del reservorio granular, posiblemente por deterioro de los sitios de acumulación (144).

c) Depleción por incremento de la permeabilidad de los gránulos: En realidad la membrana de las vesículas es normalmente permeable a las catecolaminas (67). Sólo el deterioro intenso de las membranas causa liberación masiva de proteínas intragranulares específicas, produciéndose liberación de catecolaminas hacia el citoplasma (145).

La depleción por incremento de la permeabilidad celular tiene lugar durante la degeneración nerviosa (146).

d) Desalojo de catecolaminas de los sitios de reserva: No está

bién establecido si la norepinefrina puede ser desalojada de sus sitios de acumulación en las partículas intraneuronales; pero sus análogos como la alfa-metil-norepinefrina, la alfa-metil dopamina o el metaraminol pueden comportarse como falsos trasmisores (147, 148).

Carlsson y Lindquist (147) sugirieron que los mismos son capaces de reemplazar a la norepinefrina acumulada. Así, después de la inyección de alfa-metil-tirosina en ratas, los productos aminados persisten durante días, en aquellos órganos con alto grado de inervación adrenérgica y su concentración es igual a la cantidad de norepinefrina deplecionada (149). Este mecanismo es de naturaleza competitiva, ya que la administración de norepinefrina disminuye el metaraminol en el corazón de rata (149), indicando ello, que el proceso de desplazamiento es reversible.

Está bien establecido que la norepinefrina liberada por impulso nervioso es capaz de interactuar con receptores específicos (α o β adrenorreceptores) que están localizados en la membrana postsináptica de la célula efectora despertando una respuesta fisiológica del órgano. Hasta no hace mucho tiempo se pensó que el terminal nervioso noradrenérgico era capaz de sintetizar acumular, liberar e inactivar al neurotransmisor.

Sin embargo, en los últimos años se ha sumado una nueva función a los mismos al describirse la presencia de receptores en la superficie externa de la membrana del terminal nervioso que son capaces, al ser activados o inhibidos de autorregular la liberación de norepinefrina (150).

En general, parecerían existir, por lo menos, cuatro formas por las cuales la liberación de norepinefrina puede ser regulada localmente en condiciones apropiadas (151).

a) Mecanismo 1: la liberación del neurotransmisor puede ser regulada por él mismo, estimulando autorreceptores ubicados en la

presinápsis. Estos receptores son los alfa inhibidores y beta estimulantes; de modo tal que la norepinefrina u otras sustancias podrían actuar por un mecanismo de retroalimentación sobre estos receptores localizados sobre las varicosidades nerviosas, incrementando o disminuyendo su propia liberación provocada por impulso nervioso.

Los bloqueantes alfa adrenérgicos, como fentolamina o fenoxibenzamina, estimularían la liberación, mientras que los bloqueantes beta, como el propranolol, inhibirían dicha liberación.

b) Mecanismo 2: la liberación de norepinefrina podría estar regulada por sustancias que se forman localmente como las prostaglandinas. Estas se formarían en la postsinápsis y al actuar sobre receptores presinápticos específicos o sobre el presináptico α disminuirían (prostaglandinas de la serie E) o estimularían (prostaglandinas de la serie F) la liberación. A este tipo de mecanismo se lo denomina "trans-sináptico".

c) Mecanismo 3: este se denomina "control neuronal contralateral". Es producido por una sustancia tal como, acetilcolina que al ser liberada desde el nervio colinérgico que termina próximo a la varicosidad nerviosa adrenérgica, actuaría sobre receptores presinápticos muscarínicos inhibitorios o nicotínicos estimulantes, regulando así, la liberación del neurotransmisor adrenérgico.

d) Mecanismo 4: es el postulado para la angiotensina, que ejercería un efecto modulador facilitador modificando la composición electrolítica del fluido de perfusión; incrementando el Ca^{++} que activando al mecanismo excitótico estimula la liberación de norepinefrina.

3.3.3. Bloqueo de los procesos de recaptación

a) Bloqueo a nivel de las partículas de acumulación: existen amplias evidencias, que la depleción de catecolaminas inducida por

reserpina es debida al bloqueo, de la captación de las mismas por parte de las vesículas (152, 153). Dicho proceso es intracelular y antes que la amina escape de la célula, es destruída en el citoplasma por desaminación oxidativa (148).

La recuperación de la función de acumulación de los nervios adrenérgicos se realiza a las 48 horas después de administrada la droga; y es interesante destacar que el mecanismo funcional de la transmisión adrenérgica, se recupera concomitantemente con la función de acumulación (154). Ello sugiere la existencia de partículas que constituyen un pequeño reservorio esencialmente funcional, el cual se recuperaría de la acción de la reserpina más rápidamente que las restantes.

b) Bloqueo del transporte de aminas a nivel de la membrana celular: el mecanismo de transporte activo por el cual la membrana celular "bombea" las aminas hacia el endoplasma, es bloqueado eficientemente por ciertos agentes del grupo de las imipraminas, fenotiazinas, anti-histamínicos y cocaína (143). Estas drogas necesitan, sin embargo, de ciertas condiciones para causar la depleción del neurotransmisor adrenérgico, ya que las mismas no son capaces de acelerar la liberación de la norepinefrina lábil incorporada en los reservorios del trasmisor (85).

Se interpreta que el bloqueo de la recaptación causa verdaderamente depleción de la norepinefrina cuando el nervio está estimulado a altas frecuencias o cuando la concentración del trasmisor libre en el citoplasma es lo suficientemente alto para causar una pérdida sustancial. Una concentración alta de norepinefrina libre, se puede alcanzar por el bloqueo de los mecanismos de acumulación en las partículas, o sobrecargando el sistema con norepinefrina exógena o con uno de sus precursores (dopamina o l-dopa). En tales condiciones, los agentes que bloquean la recaptación, pueden causar una disminución de norepinefrina en los nervios centrales y periféricos (143).



3.4. Clasificación de los agonistas adrenérgicos

El término de aminas simpaticomiméticas fue introducido por Barger y Dale (56), para caracterizar la actividad farmacológica de una serie de aminas sintéticas, las cuales inducen respuestas fisiológicas similares a las ejercidas por la estimulación nerviosa simpática.

Con posterioridad se efectuaron numerosos estudios que determinaron la estructura básica requerida para esta actividad, revelándose la existencia de diferencias no solo cuantitativas sino cualitativas, en la acción individual de estas aminas. Así, se observó que la denervación postganglionar simpática (155, 156), o la administración de cocaína (156), incrementan los efectos de epinefrina, pero reducen o inhiben los efectos de altas dosis de tiramina o efedrina (155, 156). Por otra parte, drogas tales como, feniletilamina y diversas anfetaminas, se comportan igual que tiramina (156).

Fleckenstein y Burn (157), exploraron una amplia variedad de aminas simpaticomiméticas, comparando sus efectos sobre la membrana nictitante de gato, denervada crónicamente y en condiciones normales, y pudieron así clasificarlas en tres grupos:

- 1) Aminas que no actúan o lo hacen débilmente en los órganos denervados y se caracterizan por carecer del grupo beta-hidroxilo conteniendo o no un grupo hidroxifenólico.
- 2) Aminas que disminuyen sus efectos después de la denervación y se caracterizan por poseer el grupo beta-hidroxilo, pero tienen un solo grupo hidroxifenólico.
- 3) Aminas que incrementan sus efectos luego de la denervación o catecolaminas.

Se realizaron posteriormente estudios con cocaína (156), obteniendo idénticos resultados, sugiriéndose que las catecolaminas actúan directamente sobre las células efectoras, mientras

que las aminas del primer grupo, lo hacen indirectamente, ya que sus efectos dependen de la presencia del trasmisor en las terminaciones nerviosas (157). Los autores concluyeron que esta acción indirecta se realiza a través de la liberación de norepi_nefrina de las terminaciones nerviosas, y por esta razón las denominaron "aminas-neuro-simpaticomiméticas".

Las aminas del segundo grupo, parecen ejercer sus efectos por combinación de acciones directas e indirectas (157) y por esta razón se las identifica con los términos de "grupo intermedio" o de "aminas de acción mixta" (158).

Al primer grupo pertenecen: tiramina, anfetamina, beta-fenil etilamina, n-metil anfetamina y proledina.

Al segundo grupo pertenecen: efedrina, p-hidroxiefedrina y p- hidroxibeta-feniletanolamina.

Al tercer grupo pertenecen: norepinefrina, epinefrina, dopamina, epinina y fenilefrina.

Esta clasificación fue confirmada por varios autores, luego de administrar reserpina y valorar la respuesta de la presión sanguínea; de la membrana nictitante y del corazón aislado, frente a estas aminas (158, 159).

Burn y Rand (160), fueron los primeros en observar que en gatos reserpinizados, disminuye la acción de tiramina, anfetamina y efedrina, lo que se toma como evidencia para deducir que la reserpina depleciona la norepinefrina, pero por otro lado, estas aminas aumentan los efectos de las catecolaminas por lo cual dichas sustancias, actúan normalmente, liberando norepinefrina y epinefrina de sus lugares de acumulación.

3.5. Clasificación y propiedades de los adrenorreceptores periféricos

Concepto: El receptor adrenérgico, es definido, como aquella parte especializada de la célula efectora a través de la cual

los neurotransmisores adrenérgicos y sus compuestos relacionados actúan determinando una respuesta característica y propia en la célula efectora. En 1905, Langley (161) propuso que existen dos tipos de receptores tisulares, excitatorios e inhibitorios, y que la respuesta a la epinefrina depende del tipo de receptor sobre el cual actúa.

Aunque el concepto de receptor es muy útil para describir la acción de las drogas y las respuestas tisulares y relacionar la estructura de un tejido con su actividad, es necesario tener en cuenta que la actividad de un receptor no explica la real naturaleza de la interrelación entre un tejido y una droga. Son innumerables los estudios farmacológicos realizados con el objeto de poner en evidencia la existencia de los receptores adrenérgicos y para diferenciar los tipos de tales receptores.

En general se emplean dos procedimientos para la caracterización de los receptores adrenérgicos; el primero se basa en la relación estructura-actividad de los llamados agentes agonistas, especialmente con referencia en orden de potencia de las drogas simpaticomiméticas sobre varios tejidos. El segundo procedimiento, consiste en valorar la habilidad de varias drogas para antagonizar o bloquear específicamente las respuestas del sistema efector hacia los agonistas.

Ahlquist (162), fue el primero en combinar los dos procedimientos y clasificó a los receptores adrenérgicos en dos tipos fundamentales, a los que denominó convencionalmente alfa y beta.

Las respuestas obtenidas a través de los receptores alfa, pueden ser antagonizadas por una serie de drogas naturales y sintéticas, incluyendo los alcaloides del ergot, imidazolina, fentolaminas y beta-alcoalkilamidas; mientras que, la respuesta de los receptores beta son bloqueadas selectivamente por el dicloroisoproterenol, pronetalol, propranolol, MJ-1999, etc.

Los receptores alfa y beta parecieran diferir en sus propiedades físicas y químicas, del mismo modo como difieren en su reactividad frente a la acción de las aminas simpaticomiméticas y de drogas bloqueantes adrenérgicas.

En general, el efecto de los agonistas sobre los receptores alfa produce influencias funcionales excitatorias y sobre los beta inhibitorias. Existen, sin embargo, dos excepciones notables que demoraron la aceptación irrevocable del concepto de alfa y beta adrenergicos por cerca de una década. La primera excepción, es que la epinefrina es el más potente inhibidor del músculo liso intestinal (163), lo cual hecharía por tierra el concepto de que los alfa son siempre excitadores. Además ningún tipo de bloqueante adrenérgico antagoniza la acción relajante sobre la musculatura lisa intestinal. Esta dificultad fue resuelta cuando se encontró que en el intestino, tanto la "activación alfa como beta producen relajación (163, 164).

La segunda excepción evidente la constituye el músculo cardíaco, el cual muestra, que la interacción del agonista con receptores beta provoca efectos excitatorios (165, 166).

Lands y col. (167) fueron los primeros que evidenciaron dos subpoblaciones de receptores beta en diferentes tejidos. Las respuestas beta que mediaban la lipólisis y la estimulación cardíaca se incluyeron en el grupo denominado β_1 , mientras que aquellos que mediaban las respuestas de broncodilatación y vaso-depresión fueron clasificados como receptores β_2 .

Investigaciones posteriores revelaron que los adrenergicos beta del tejido uterino (168), del conducto deferente de rata y la musculatura lisa en general, así como, aquellos que median los efectos glucogenolíticos en hígado (169) conforman el subtipo β_2 .

Estas diferentes clases de receptores beta existentes han si

do confirmadas mediante el uso de nuevos antagonistas de los adrenorreceptores beta. Así, la butoxamina, es un antagonista específico beta₂ (170), mientras que, el practolol es más efectivo para los sitios beta₁ (171).

Por otro lado Farmer y col. (172) han sintetizado agonistas que selectivamente estimulan al receptor beta₂, tales como, soteranol y salbutamol.

Estas diferencias farmacológicas frente a los adrenorreceptores beta implica la existencia de diferencias moleculares específicas a nivel del sitio receptor.

Los eventos bioquímicos que ocurren con el uso de los agonistas de los adrenorreceptores beta sobre su sistema enzimático específico (adenil ciclase) producen el incremento del AMP cíclico (segundo mensajero), el cual, se correlaciona muy estrechamente con los efectos de estas drogas sobre el órgano efector. (173, 174).

Aún hoy no es claro que la subclasificación de beta₁ y beta₂ pueda ser igualmente correspondida con una compartimentalización del sistema adenil ciclase (175).

La situación con los adrenorreceptores alfa es menos clara aún. Recientemente se ha postulado que el incremento de los niveles de guanosin monofosfato (GMP) cíclico del tejido sería el evento bioquímico responsable de la unión del agonista con el adrenorreceptor alfa (176). Esta proposición es puramente especulativa puesto que, la mayoría de los laboratorios que trataron directamente de demostrar este hecho han fracasado (177).

En los últimos años se han postulado mecanismos regulatorios de liberación de norepinefrina, que serían mediados por receptores presinápticos alfa y beta que al ser activados promoverían una disminución o aumento de la liberación del neurotransmisor respectivamente (178, 179, 180).



4. REGULACION HORMONAL

Una de las perspectivas del sistema reproductivo, es la ocurrencia de una serie de eventos en secuencia, que dan las señales de interacción entre el receptor y el efector hormonal.

En este rol, por ejemplo, el testículo es el receptor que responde a los péptidos adenohipofisarios, tales como, la hormona luteinizante (LH), la cual, controla la producción de esteroides por las células de Leydig, y la folículo estimulante (FSH), la cual, modula las células de Sertoli.

Por otro lado, las hormonas testiculares en su turno, actúan como un efector intragonadal a través de sus acciones sobre el epitelio de los túbulos seminíferos. Como efector extragonadal los andrógenos, regulan una serie de caminos específicos incluyendo la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias y la actividad de los órganos sexuales secundarios, y el comportamiento sexual de los animales.

Los aspectos fisiológicos de este sistema regulatorio que controla la reproducción masculina es conocida en un amplio espectro primario por el desarrollo de los procedimientos de medida de los péptidos y esteroides en sangre y en tejido glandular (181, 182).

Estos estudios permitieron analizar los cambios secuenciales en los niveles de hormonas circulantes, tanto hipofisarias como gonadales, en períodos prolongados de tiempo en un mismo individuo. Pudo comprobarse así, que no existe en el macho un estado de reposo en la secreción hormonal; por el contrario, es una secreción de tipo irregular, intermitente y pulsátil, que a su vez, está modificada por el medio ambiente del animal.

Aún más se ha avanzado en este aspecto, ya que se llegó a indagar los eventos moleculares que provocan las hormonas sobre sus órganos blanco.

4.1. Eventos que ocurren en la maduración del macho

El período que va desde el nacimiento hasta la aparición de la fertilidad en la rata, puede ser dividido en varios estadios funcionales. Estos períodos son comparables tanto para el macho como para la hembra, en su desarrollo gonadal como en el control de las gonadotropinas hipofisarias (GTH), las cuales difieren según el sexo. Para el caso de la rata macho se muestra en el diagrama de la Figura 7; extraído de los trabajos de Dohler 1975, (183), Payne 1977, (184), y Negro-Vilar 1973, (185).

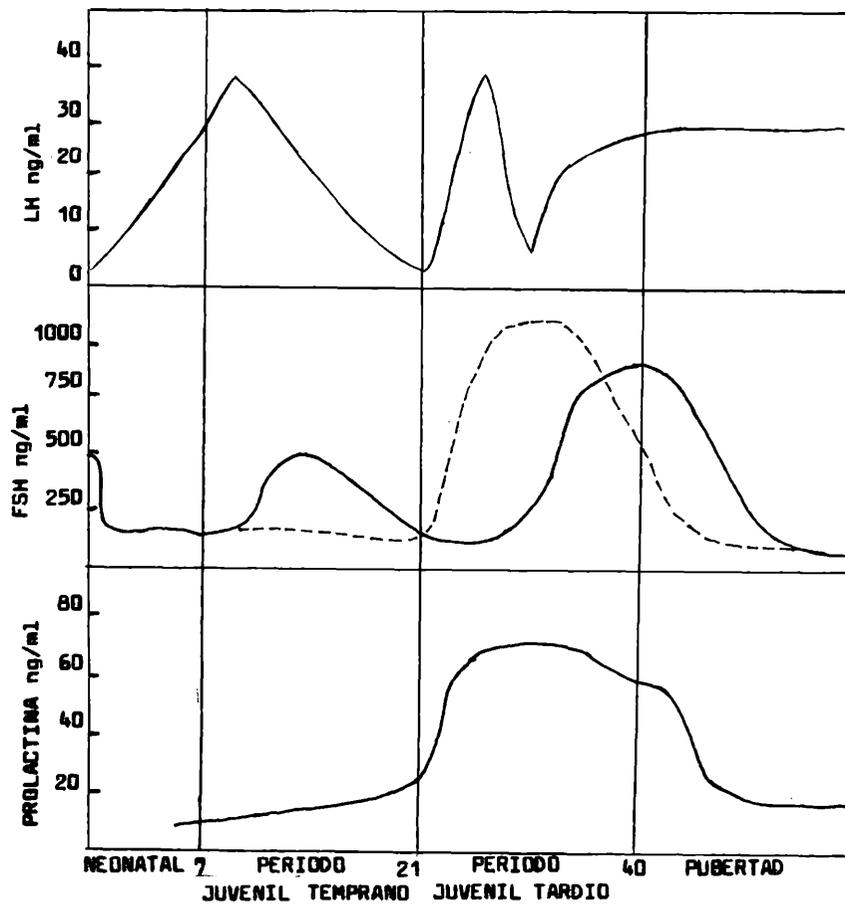


Figura 7: PERFILES DE GONADOTROFINAS DURANTE LA MADURACION SEXUAL DE LA RATA MACHO (183, 184, 185).

En la rata macho, existen cuatro períodos bien definidos en su desarrollo temprano, los cuales, pueden ser clasificados de la siguiente manera, siguiendo el criterio de Ramaley de 1979 :

a) Período neonatal: que se extiende desde el nacimiento hasta la primera semana de vida. Durante esta primera semana, la testosterona, es el andrógeno por excelencia secretado por los testículos y el primer eslabón de la célula de Leydig, la cual, se desarrolla prenatalmente y luego entra en degeneración o en un período de quiescencia.

b) Período juvenil temprano: es aquel donde el andrógeno principal es el androstenediol, producto de la actividad de la enzima 5 alfa reductasa testicular y ocurren los estadios tempranos de la espermatogénesis.

c) Período juvenil tardío: comienza alrededor del día 21 post-nacimiento. Aparece el primer espermatozocito (leptotene) el cual, se mueve dentro de los compartimientos internos del epitelio germinal y la proliferación de las células de Sertoli cesa.

d) Período peripuberal: Comienza en el día 30 con la maduración y función de las células de Leydig, con la testosterona como principal andrógeno.

e) Período puberal: la pubertad empieza cuando el primer espermatozoide es liberado desde el epitelio germinal, alrededor de los 45 a los 50 días de edad de la rata macho.(186).

Este período se manifiesta externamente con la separación del prepucio (187), signo físico que se correlaciona con un incremento de los niveles plasmáticos de testosterona.

Antes del nacimiento hay elevados montos de FSH y LH en circulación. Después del nacimiento la FSH disminuye a niveles muy bajos y un segundo pico de FSH se observa alrededor del día 30 de edad. Luego del incremento puberal la FSH retorna a los valores del adulto (188).

Se ha sugerido que la caída de la FSH es un efecto de un material no esteroideo denominado inhibina, la cual, deriva de las células del epitelio germinal y es secretada en montos muy aumentados en la rata macho adulto, cuando la esteroideogénesis es completa (189).

Los niveles de LH son elevados neonatalmente, caen en los días 25 a 30 y aumentan otra vez alcanzando los niveles del animal adulto (188).

El rol que juegan las GTH en la iniciación de la esteroideogénesis y espermatogénesis es pobremente conocido.

4.2. Esteroidogénesis

Los testículos contienen receptores a las GTH prenatalmente (190, 191), de modo que tienen la capacidad de responder a las GTH exógenas (192).

Los testículos parecen estar bajo el control del axis hipotálamo-hipofisario aproximadamente a partir de día 18 de gestación (193), a su vez incrementa el volumen de la célula de Leydig, incrementa los niveles de testosterona llegando a un pico máximo alrededor de los veinte días de gestación (194, 195).

La secreción de andrógenos no es uniforme durante el período prepuberal. Parecería que en estos momentos hay dos tipos de células de Leydig, uno que emerge durante el período prenatal y está en vías de degeneración y otro que aparece justo antes que la testosterona incremente en la pubertad (196, 197). Además los trabajos de Gondos en 1977 (198), también hablan a favor de un estado de inactividad de las células de Leydig durante el período temprano y juvenil del macho.

Sea un caso o el otro, estos dos tipos de células de Leydig son las responsables de los diferentes niveles en la secreción de testosterona por los testículos.

Los homogenatos de testículos provenientes de ratas en período neonatal, peripuberal y adulto, tienen la capacidad de convertir progesterona a testosterona. Entre los días 15 y 30 de edad el androstenediol es el producto androgénico predominante (199).

El cambio en la cantidad de testosterona durante el período juvenil no está dado por una disminución en el metabolismo del esteroide, sino por un relativo dominio de la reducción del esteroide por hidroxilación (200).

Alrededor del día 30, hay un aumento en los niveles de testosterona tanto en el testículo como en el suero (201, 202).

En la pubertad el nivel androgénico incrementa, tal vez debido a la actividad biológica de la 5 alfa reductasa o por una lógica transición hacia la adultez.

Todos los andrógenos incluyendo testosterona, dihidrotestosterona y androstenediol pueden estimular el acoplamiento de los andrógenos en sus receptores a nivel de las células de Sertoli (203) y podrían ser los responsables en el mantenimiento de la función de estas células.

Se necesitan menos dosis de androstenediol que de testosterona para mantener la maduración espermática en el epidídimo de hamster castrado (204). Es posible por analogía argumentar que la rápida velocidad de la formación del esperma (205) en el período infantil estaría en relación con la presencia de altos niveles de andrógenos 5 alfa-reducidos en los túbulos; lo cual también sugiere que los andrógenos reducidos representan un mecanismo de inactivación.

Rivarola (206) sugirió que el androstenediol puede jugar un papel en la iniciación de la espermatogénesis. También el androstenediol afecta la secreción de las GTH y la respuesta a la liberación del factor hipotalámico.

En los animales adultos, hay argumentos acerca de la capacidad de los túbulos para producir andrógenos, ya que se encontraron niveles de producción de androstenediol (206).

El escalón final de la síntesis de testosterona son los 17-cetosteroides que ocurre en el túbulo y en las células de Leydig del macho adulto (207).

Dorrington y Fritz en 1975 (208), sugirieron que los túbulos del adulto no sintetizan mucho andrógeno, porque la testosterona es secuestrada de la maquinaria esteroidea por la "proteína fijadora de andrógeno" (PFA) y por lo tanto, no estaría disponible para su reducción o hidroxilación. La testosterona que se necesita en el macho adulto para la espermatogénesis pasa libremente al túbulo (209) y no es necesario que se produzca allí. Si los túbulos de las ratas infantiles producen andrógenos, ellos, a nivel de las células de Sertoli producirían la PFA alrededor del día 15 posterior al nacimiento (210).

La pregunta que surge, es cual sería la causa que aumenta los niveles de testosterona en los días 25 a 30 de edad. Habría dos corrientes que dan su interpretación: una, sostiene que los testículos tienen receptores a LH y que son capaces de activarse con un incremento en el adenosín monofosfato (AMP) cíclico (211), y la otra sostiene que la producción de testosterona se aumenta por acción de FSH (212) o por acción de prolactina (213). Sea una hormona o la otra, estimularán a las células de Leydig para que inicie la esteroidogénesis y se producirá un nuevo grupo de células de Leydig con gran capacidad para sintetizar andrógenos (214).

Kinson y Robinson (215) en 1970, comunicaron que la melatonina es capaz de interferir con la síntesis de testosterona en la rata adulta.

Por otro lado, el exceso de corticoides suprime la secreción

androgénica por impedir la liberación de LH (216).

4.3. Espermatogénesis

Alrededor de los veinte días de edad, las células de Sertoli dejan de dividirse y comienzan a perder su sensibilidad a FSH (217).

El desarrollo de la barrera vascular testicular y el lecho vascular (218) son dos hechos coincidentes con la aparición del espermatozoides leptotene, lo cual, señala el comienzo de la espermatogénesis (205) y la aparición de la división meiótica (219).

Aproximadamente a los 30 días de vida, los testículos tienen su ubicación escrotal definitiva y la cápsula y el músculo liso se encuentran ya desarrollados rodeando así al tejido testicular adulto (220).

El rol de las gonadotropinas y los esteroides en iniciar y mantener la barrera sanguínea testicular no se conoce aún con claridad. El número de células de Sertoli y las espermatogonias ya responden al estímulo de FSH alrededor del día 35 de edad (221).

FSH parece jugar solamente un rol transitorio a nivel del testículo, siendo su acción fundamental la canalización y la elongación de los túbulos seminíferos (222) y el comienzo de la espermatogénesis (223).

El efecto de FSH desaparece generalmente llegada la pubertad, debido a la pérdida de los receptores a FSH sobre la célula de Leydig (224) y debido a la disminución en la respuesta a la FSH por parte de la célula de Sertoli (225) y finalmente por el desarrollo de un factor FSH inhibitorio (226).

En todo este desarrollo, los estrógenos también juegan su papel. La iniciación de la formación del lumen tubular, que comienza alrededor del día 20, coincide con el momento en el cual la

célula de Sertoli en su producción estrogénica declina (227). El tratamiento con estrógenos retarda el desarrollo tubular (228) y la formación de la barrera sanguínea testicular (229).

La testosterona no parece jugar un rol importante en la iniciación de la espermatogénesis. Los niveles séricos de testosterona comienzan a aumentar alrededor del día 10 después que los niveles de LH han comenzado a incrementarse. En este lapso de tiempo, la espermatogénesis ha progresado al estado de 16 espermátides (221). La maduración histológica de las células de Leydig precede a la elevación de testosterona en varios días (230).

En contraste con estos hechos, la testosterona estimula la actividad secretoria y crecimiento de las glándulas reproductivas accesorias del macho que ocurren durante el período juvenil tardío (231). Estos efectos son facilitados por la prolactina (232).

El epidídimo tiene su etapa de crecimiento rápido, alrededor del día 20 y su desarrollo posterior coincide con los niveles de testosterona sérica.

La primera maduración ocurre muchos días antes de la primera entrada del esperma a los sistemas ductales (233).



MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se estudió la actividad espontánea y la respuesta a acetilcolina (Ach) y norepinefrina (NE) en dos porciones anatomo-histologicamente diferenciables del conducto deferente aislado de rata en distintos períodos de desarrollo sexual y en presencia de drogas que modifican las vías de inactivación del neurotransmisor adrenérgico,

1. ANIMALES UTILIZADOS

Se emplearon ratas macho de la cepa Winstar, Los animales fueron divididos en dos grupos. El número total de animales empleados fue 587.

1.1. Grupos experimentales

1.1.1. De acuerdo a la edad

- ratas macho prepúberes de 20 días de edad (35 a 45 gr de peso).
- ratas macho púberes de 50 días de edad (170 a 190 gr de peso)
- ratas macho adultos de 90 días de edad (250 a 280 gr de peso)

1.1.2. De acuerdo a la condición hormonal

- ratas macho normales
- ratas macho gonadectomizados estudiados a los 30 días post-castración.
- ratas macho gonadectomizados tratados con propionato de testosterona durante los últimos 10 días del período post-castración.

1.2 Técnica de la castración

La castración se llevó a cabo según la técnica siguiente: en

ratas, previamente anestesiadas con éter sulfúrico, se realizó una incisión de la piel a nivel del escroto de aproximadamente 2 cm. Cumplido el paso anterior se procedió a incidir la bolsa escrotal para exponer el testículo; posteriormente, se efectuó una ligadura con catgut fino a nivel de la cola del epidídimo, y otra en el plexo arterio-venoso testicular, de esta manera, se retiró el testículo, epidídimo y tejido adyacente quedando intacto el conducto deferente.

El cierre de la herida se realizó con hilo de lino. En el lado opuesto se procedió de manera similar.

1.3 Terapia de sustitución

La restitución hormonal se realizó en los animales gonadectomizados, los cuales fueron procesados a los 30 días post-castración. La terapia de sustitución hormonal se realizó mediante el empleo de propionato de testosterona (Sigma Lab.) por vía subcutánea, en la dosis de 0.5 mg/rata/día, durante los últimos 10 días post-castración. (234).

2. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS EMPLEADOS

2.1. Instrumental y equipo básico

El registro de la tensión contráctil isométrica de las preparaciones provenientes del conducto deferente aislado de rata se llevó a cabo mediante el empleo de un transductor de tensión conectado a un sistema de registro directo, luego de una etapa de amplificación electrónica. De esta manera la actividad mecánica del tejido, pudo inscribirse y registrarse en la forma necesaria para su ulterior evaluación cuantitativa.

La tensión contráctil desarrollada por el tejido se registró mediante el empleo de un transductor capaz de transformar la ac



tividad mecánica en una señal eléctrica. El circuito del transductor es factible de ser calibrado con pesos de valor conocido, los que siendo capaces de defleccionar la pluma inscriptora del registrador, permiten por comparación evaluar cuantitativamente la magnitud de la tensión contráctil desarrollada por el músculo y expresarla en mg.

Con el objeto de obtener el registro gráfico directo de la actividad contráctil tisular, la salida del transductor se conectó con un sistema amplificador-inscriptor donde se registraron en forma inmediata y continua las curvas producidas por la actividad mecánica del tejido.

La Figura 8 representa un esquema de los componentes y la distribución del instrumental básico empleado para el registro de la actividad contráctil del conducto deferente aislado de rata.

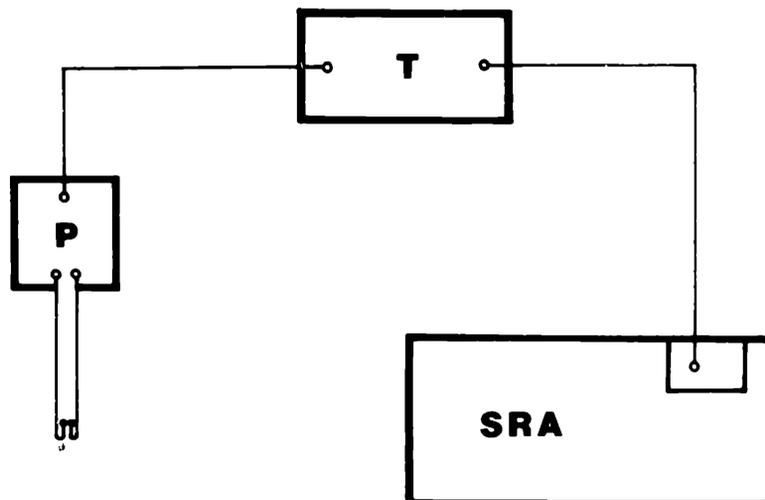


Figura 8: ESQUEMA DEL EQUIPO UTILIZADO PARA REGISTRAR LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA.

T: transductor, SRA: sistema de amplificación y registro, P: preparado muscular.

2.2. Instrumental y equipo complementario

Los preparados obtenidos del conducto deferente se sumergieron en cámaras de vidrio de doble pared y de 20 cc de volumen (Figura 9), capaz de contener la solución tisular nutriente a una temperatura constante.



Figura 9: CAMARA TISULAR

Para el control térmico de la cámara tisular se utilizó agua proveniente de una bomba termostaticada, que llevándola hasta la cámara tisular, la hacía circular por el espacio comprendido entre sus dos paredes.

La temperatura de la bomba se controló en forma constante mediante su termostato correspondiente, manteniendo la temperatura de la solución que baña y nutre el tejido a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.02$ (Figura 10).



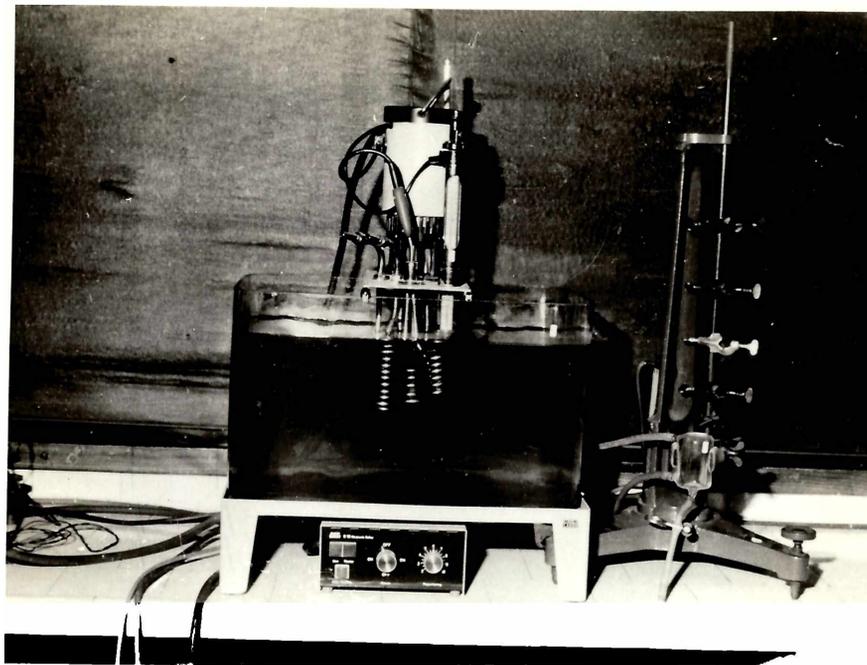


Figura 10: BOMBA EXTERIOR

La preparación tisular se colocó dentro de su cámara, dispuesta de tal manera que por un lado hacía contacto con su soporte de vidrio y por otro lado, se conectaba por medio de un hilo con el transductor.

El soporte tisular está constituido por un tubo de vidrio en forma de "J", cuyo extremo inferior ensanchado, presenta un orificio que permitía la introducción de un hilo, que cosido al extremo inferior del tejido lo mantenía fijo, mientras que el extremo superior, también cosido, se conectaba con la terminal sensible del transductor.

El soporte de vidrio junto con el preparado tisular se introduce dentro de la cámara tisular en la cual se coloca un cilindro poroso (burbujeador) que conectado a una fuente de carbógeno permite la oxigenación del tejido durante el experimento.

Adjunto a la misma se encuentra un dispositivo micrométrico unido al transductor, que se emplea para ajustar la tensión.



Figura 11: SOPORTE TISULAR, DISPOSITIVO MICROMETRICO Y BURBUJEADOR MONTADOS EN LA CAMARA TISULAR.

1: cámara tisular, 2: soporte tisular, 3: dispositivo micrométrico, 4: burbujeador.

Las Figuras 11 y 12 permiten observar el soporte tisular, el dispositivo micrométrico y el burbujeador, como así también el transductor, tal como aparecen una vez montados en el baño o cámara tisular.

3. PREPARACION TISULAR

3.1. Obtención del conducto deferente

Los presentes estudios se realizaron sobre el conducto deferente aislado de ratas de 20, 50 y 90 días de edad en las condiciones antes descriptas.

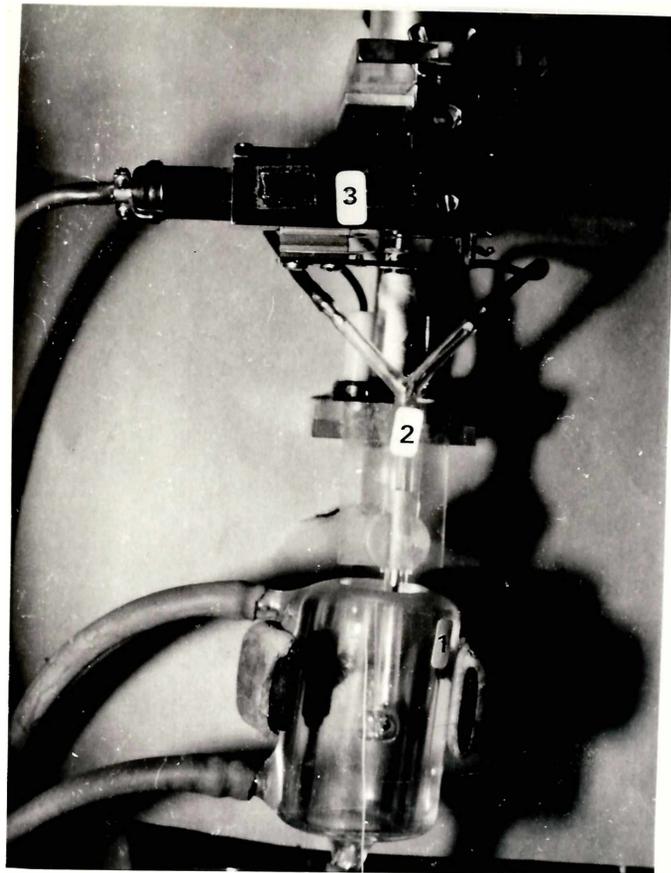


Figura 12: SOPORTE TISULAR Y TRANSDUCTOR EN LA DISPOSICION DE OPERAR.

1: cámara tisular, 2: soporte tisular, 3: transductor.

En todos los casos los animales se sacrificaron mediante decapitación con guillotina, A continuación se practicó una laparatomía medial, se visualizaron ambos conductos deferentes y se seccionaron con tijera el extremo proximal y distal al testículo.

Luego de su extracción, la preparación se colocó de inmediato en una cápsula de Petri conteniendo una solución de Krebs-Ringer Bicarbonato-Glucosa convenientemente oxigenada y conservada a temperatura ambiente, donde se procedió a disecar el conducto deferente "in toto" eliminando todo resto de tejido extraño.

Cada conducto deferente fue lavado intraluminalmente 3 veces

con solución de Krebs a temperatura ambiente con el fin de eliminar totalmente el líquido seminal evitando así interferencias en la interpretación de los resultados.

Finalmente ambos conductos deferentes se dividieron en 2 porciones:

- a) una porción próxima al testículo llamada Porción Epididimaria (PE).
- b) una porción distal al testículo llamada Porción Prostática (PP).

En todos los casos la porción medial fue descartada.

En la Figura 13 se muestra el aparato reproductor de la rata macho y el conducto deferente donde se observa la localización de ambas zonas.



Figura 13: LOCALIZACION DEL CONDUCTO DEFERENTE EN EL APARATO REPRODUCTOR DE LA RATA MACHO.

3.2. Disposición y montaje de los preparados

Una vez aislado y disecado el conducto deferente fue dividido en las dos porciones antes mencionadas, las cuales, cada una por separado, fueron cosidas mediante hilo de seda en ambos extremos, de tal manera, que el extremo inferior y el extremo superior libre se sumergieron junto con el soporte tisular dentro de la solución que ocupa la cámara tisular, conectándose el hilo fijado a este último extremo del preparado con la terminal sensible del transductor.

Una vez montados los preparados, se aplicó una tensión basal de 250 mg, mediante el dispositivo micrométrico. Dado que el movimiento del tejido se encuentra limitado por el desplazamiento del cabezal sensible del transductor, que es mínimo, en estas condiciones de estudio descritas, las contracciones del conducto deferente aislado de rata fueron esencialmente isométricas.

La Figura 14, muestra la disposición del tejido suspendido entre la extremidad inferior del soporte tisular y el transductor.

4. COMPOSICION DE LA SOLUCION DE PERFUSION TISULAR

El tejido fue suspendido en una solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato, cuya composición es la siguiente:

Na ⁺	145.00 mM
K ⁺	5.90 mM
Ca ⁺⁺	2.20 mM
Mg ⁺⁺	1.20 mM
Cl ⁻	127.00 mM
HCO ₃ ⁻	1.20 mM
PO ₄ ⁼	1.20 mM
SO ₄ ⁼	1.33 mM
Dextrosa	11.00 mM

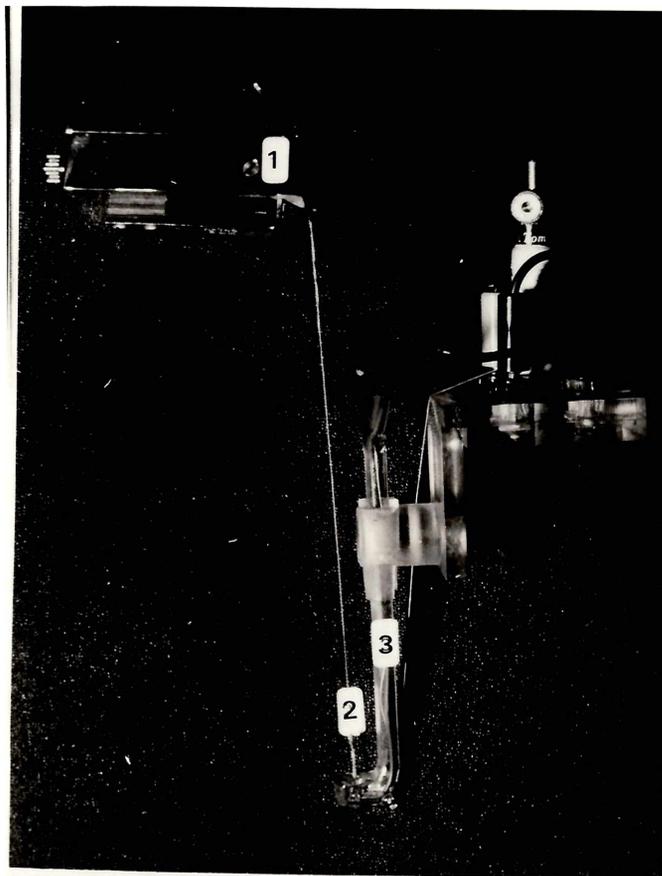


Figura 14: DISPOSICION DEL TEJIDO MONTADO ENTRE SU SOPORTE Y EL TRANSDUCTOR.

1: transductor, 2: preparado tisular, 3: soporte tisular.

El pH de esta solución fue ajustada a un valor de 7.4 mediante el burbujeo con una mezcla gaseosa de 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 .

La temperatura del medio nutriente se conservó en $37^\circ C$ y la gasificación, que se realizó a través del cilindro poroso ya descrito, tuvo un flujo constante de carbógeno de 200cc por minuto.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Una vez que el tejido se encontró montado en su cámara y sometido a una tensión basal de 250 mg se lo dejó estabilizar por

espacio de 60 minutos, a partir del cual se comenzó con el período experimental.

La tensión contráctil desarrollada por el músculo liso del conducto deferente se midió, como lo indica la Figura 15, desde el nivel de reposo hasta el punto de mayor tensión alcanzado en actividad isométrica y su valor fue expresado en mg/mg de peso húmedo de tejido.

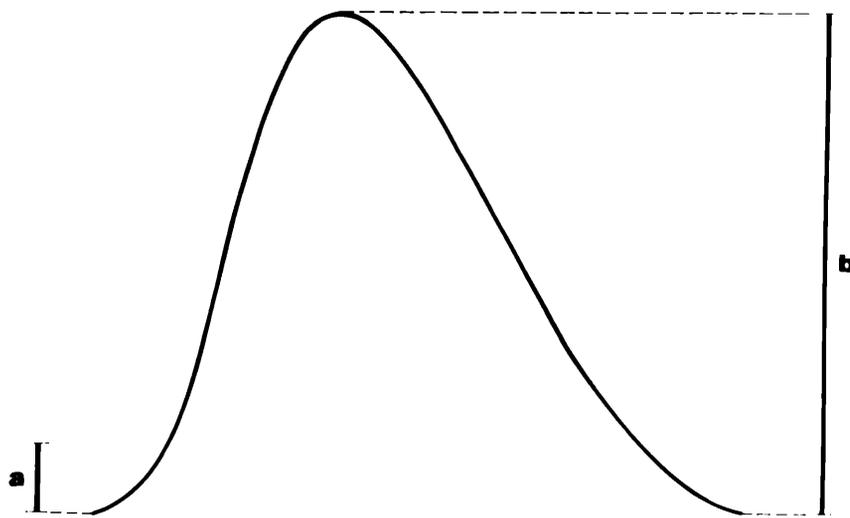


Figura 15: PARAMETROS PARA MEDIR LA TENSION CONTRACTIL ISOMETRICA DEL TEJIDO.

a) trazado de calibración en mg, b) medida de la tensión contráctil isométrica en mg.

Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

a) Tensión contráctil isométrica inicial (TCII), esto es la tensión contráctil desarrollada por el músculo luego de los 10 primeros minutos de montaje (actividad espontánea).

b) Frecuencia inicial (FI), número de contracciones en 10 minutos; valorándose ella de la misma manera que la TCII.

En todos los casos los resultados se compararon por medio del test "t" de Student de acuerdo con las tablas de Fisher y Yates

(235) y las diferencias se consideraron significativas si $p=0.05$ o menos.

6. COMPUESTOS QUIMICOS UTILIZADOS

- Norepinefrina (Lab. Sigma).
- Acetilcolina (Lab. Sigma).
- Regitina 10^{-6} M (Lab. Ciba).
- Fenoxibenzamina 10^{-6} M (Lab. Smith and Kline).
- Atropina 10^{-6} M (Lab. Sigma).
- Desipramina 10^{-7} M (Lab. Sigma).
- U-0521 10^{-6} M (Lab. Mead Johnson).
- Normetanefrina 10^{-6} M (Lab. Sigma).
- Propranolol 10^{-6} M (Lab. Ayerst).
- Practolol 10^{-6} M (Lab. Ayerst).
- Indometacina 10^{-6} M (Lab. Merck, Sharp y Dohme).
- Acido acetil salicílico 1.8×10^{-4} M (Lab. Sigma).

Las drogas citadas fueron utilizadas "in vitro" y las concentraciones que se expresan previamente corresponden a la concentración final por ml de la solución nutriente en la que se suspende el tejido.

Para el caso de norepinefrina y acetilcolina se realizaron curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo siguiendo el criterio propuesto por van Rossun (236).

En todos los casos se emplearon drogas en forma pura, y las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su empleo.

Las drogas que se adicionaron al baño tisular fueron disueltas en volúmenes que en ningún caso excedieron de 1 ml.

RESULTADOS

En el presente trabajo se analizan los resultados obtenidos en el estudio fisiológico y farmacológico comparativo de la región epididimaria y prostática del conducto deferente de ratas en distintas edades de maduración sexual.

Se analizó sucesivamente la actividad espontánea y su reactividad farmacológica hacia los agonistas colinérgicos y adrenérgicos, relacionando estos últimos con la operabilidad de los mecanismos endógenos de inactivación de catecolaminas. Así mismo, se valoró el efecto de las hormonas sexuales y la castración sobre los fenómenos ya mencionados,

1. ACTIVIDAD ESPONTANEA DE LA REGION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA

1.1. Variaciones de la tensión contráctil y la frecuencia de las contracciones de acuerdo a la edad de maduración sexual

1.1.1. Animales normales

En este grupo experimental se realizó un análisis comparativo de la actividad espontánea de preparaciones provenientes de la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de ratas normales de 20, 50 y 90 días de edad.

En los mismos se valoró la tensión contráctil inicial y la frecuencia inicial de las contracciones.

En la Figura 16, panel A, puede observarse que el promedio de los valores absolutos de la tensión inicial (Media en $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ del peso húmedo del tejido \pm Error Típico de la Media (ETM)), fueron mayores a los 20 días, tanto en la porción epididimaria como en la porción prostática. A la vez dichos valores tensionales fueron estadísticamente similares en ambas porciones.

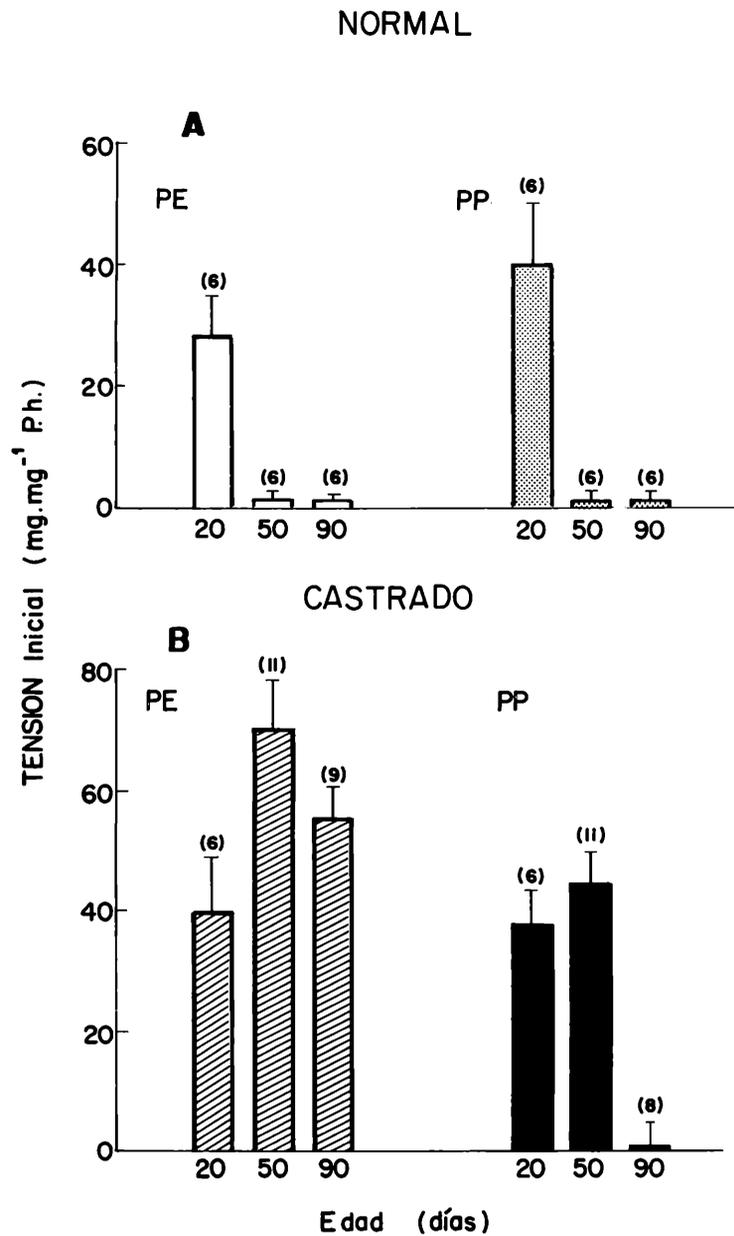


Figura 16: TENSION CONTRACTIL INICIAL DE LA PORCION EPIDIDIMARIA (PE) Y PROSTATICA (PP) DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS

Ordenada: tensión inicial (expresada en mg.mg^{-1} de peso húmedo de tejido (P.h.)). Absisa: edad en días. Panel A y B: representan los resultados en animales normales y castrados respectivamente. Las barras verticales representan el error típico de la media y los números entre paréntesis indican el número de casos.

La frecuencia inicial, valorada por el número de contracciones durante los 10 primeros minutos de actividad espontánea (figura 17, panel A), sufrió modificaciones idénticas a las observadas con la tensión inicial (Figura 16, panel A).

1.1.2. Animales castrados

En esta serie de experimentos se analizó el efecto que la castración produjo sobre la tensión contráctil inicial (Figura 16, panel B) y la frecuencia inicial (Figura 17, panel B) de la porción epididimaria y la porción prostática de animales de 20, 50 y 90 días de edad.

Se pudo observar que la castración desencadenó actividad espontánea en ambas regiones; pero sus efectos variaron de acuerdo con la etapa madurativa del animal.

Así, a los 20 días, la castración no modificó la actividad mecánica tanto en la tensión inicial (Figura 16, panel B) como en la frecuencia inicial (Figura 17, panel B), en comparación con los animales normales.

Por el contrario, a los 50 días la tensión inicial y la frecuencia inicial, de ambas regiones, resultaron ser significativamente mayores en los animales castrados con respecto a los normales (Figuras 16 y 17, panel B).

Por último, a los 90 días la castración incrementó la tensión inicial y la frecuencia inicial de la porción epididimaria sin modificar la falta de actividad de la porción prostática (Figuras 16 y 17, panel B).

Cabe destacar, que las diferencias observadas en la actividad espontánea de animales normales y castrados, no estarían en relación directa con el crecimiento y desarrollo del tejido, ya que si analizamos la Figura 18, se puede deducir que en los animales normales (panel A) el peso húmedo del tejido se incrementó con

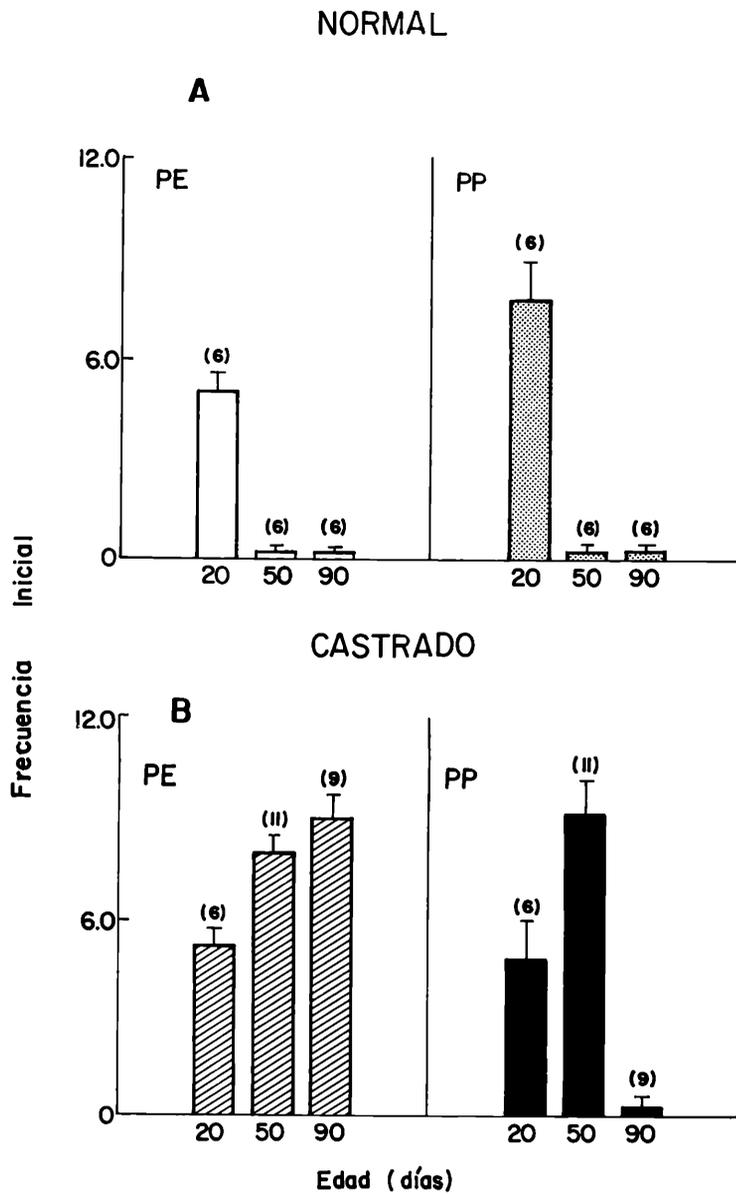


Figura 17: FRECUENCIA CONTRACTIL INICIAL DE LA PORCION EPIDIDIMARIA (PE) Y PROSTATICA (PP) DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS

Ordenada: frecuencia inicial: representa el número de contracciones en los primeros 10 minutos del período experimental. Abscisa: edad en días. Detalles y condiciones como los descritos en la Figura 16.

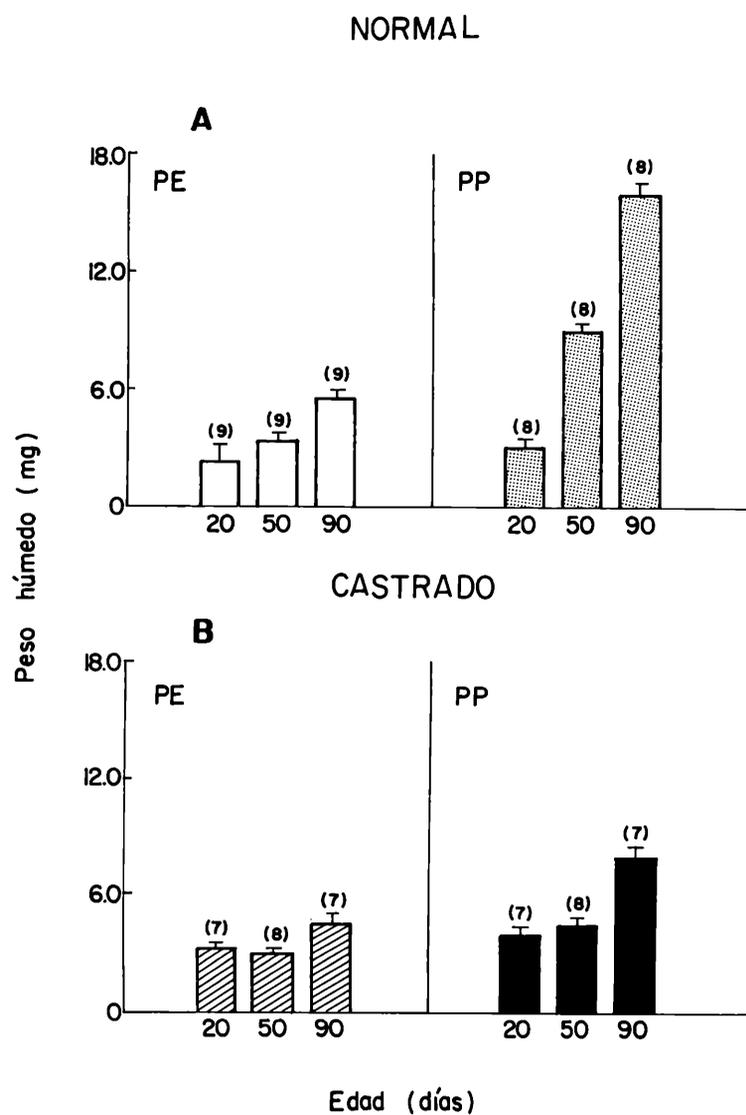


Figura 18: PESO HUMEDO DE LA PORCION EPIDIDIMARIA (PE) Y PROSTATICA (PP) DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS EN DISTINTAS EDADES DE MADURACION SEXUAL.

Ordenada: peso húmedo del tejido expresado en mg. Abscisa: edad en días. Otras condiciones y detalles como las descriptas en la Figura 16.

la edad coincidiendo con una disminución de la actividad espontánea (Figuras 16 y 17, panel A).

En los animales castrados (panel B), la porción epididimaria no sufrió modificaciones en su peso mientras que, en la porción prostática, dicho parámetro disminuyó, coincidiendo con una reducción de la actividad mecánica.

Finalmente, en todos los casos, la preincubación de los tejidos durante 40 minutos con bloqueantes de síntesis de prostaglandinas como indometacina 10^{-6} M o ácido acetil salicílico $1,8 \cdot 10^{-4}$ M; o con bloqueantes adrenérgicos, tales como, regitina 10^{-5} M o fenoxibenzamina 10^{-6} M no fueron capaces de modificar los parámetros antes mencionados.

2. EFFECTO DE ACETILCOLINA SOBRE LA PORCION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA

Mediante curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo, se estudió el efecto del mediador colinérgico sobre la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado proveniente de ratas normales y castradas en los diferentes estadios de maduración sexual.

2.1. Animales normales

En la Figura 19, panel A, se grafica el efecto de Ach a los 20, 50 y 90 días de edad sobre la porción epididimaria de animales normales.

Se puede observar que el agonista colinérgico produjo efectos similares, tanto en afinidad (dosis umbral de respuesta) como en eficacia (potencia máxima de respuesta) en los tres grupos experimentales.

La porción prostática del conducto deferente de los animales



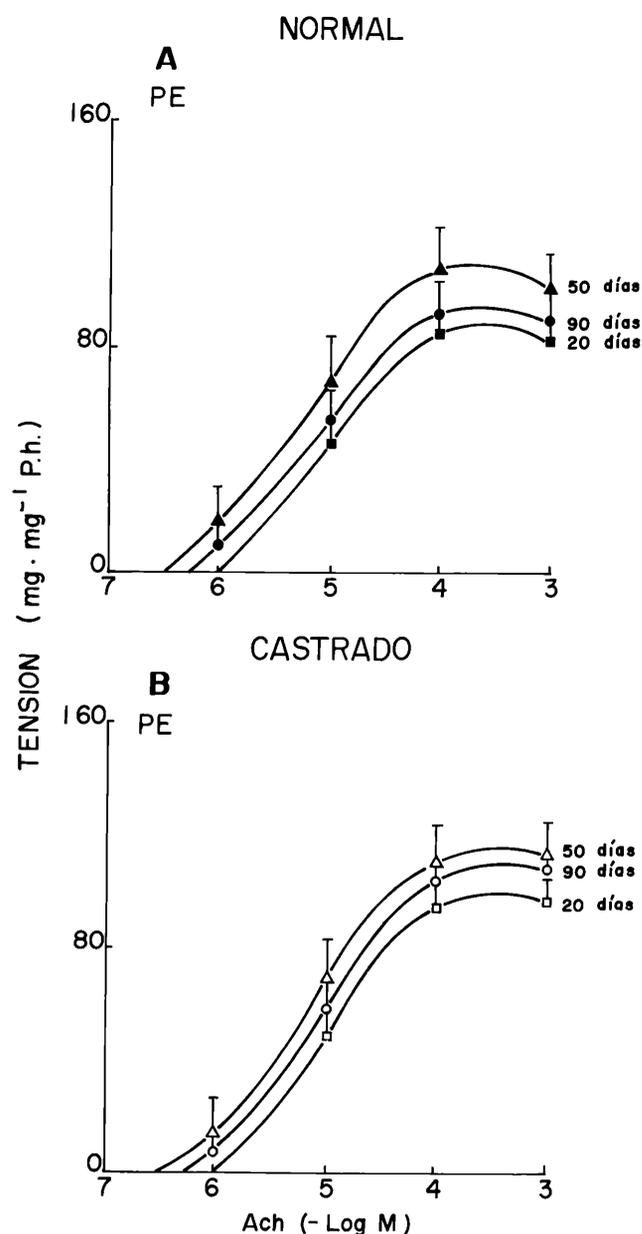


Figura 19: CURVA DOSIS-RESPUESTA TIPO ACUMULATIVO DE ACETILCOLINA SOBRE LA PORCION EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS EN DISTINTAS EDADES DE MADURACION SEXUAL.

Ordenada: tensión en $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso húmedo (P.h.) del tejido.
 Abscisa: logaritmo negativo de la concentración molar de acetilcolina (ACh). Panel A y B resultados obtenidos en la porción epididimaria (PE) de animales normales y castrados respectivamente. Cada uno de los puntos de la curva representan el promedio de la serie experimental en cada una de las concentraciones probadas. Las barras verticales indican el error típico de la media. Se realizaron 9 experimentos para cada uno de los grupos estudiados.

normales en todos los estadios, no mostró reactividad hacia la Ach en ninguna de las concentraciones probadas.

2.2. Animales castrados

La Figura 19, panel B, muestra comparativamente el efecto de Ach en animales castrados de 20, 50 y 90 días de edad en la porción epididimaria.

Se puede observar que en estas condiciones, el efecto de Ach fue similar en todos los grupos experimentales y comparables a los del animal normal.

Al igual que en condiciones normales, la castración no fue capaz de despertar reactividad hacia el agregado del agente colinérgico en la porción prostática.

2.3. Influencia de bloqueantes colinérgicos sobre los efectos de acetilcolina en animales normales y castrados

Con el objeto de determinar el tipo de receptor involucrado en el efecto estimulante de Ach en la porción epididimaria del conducto deferente aislado de rata, se realizó un grupo experimental en presencia de un bloqueante muscarínico (atropina 10^{-6} M) y nicotínico (hexametonio 10^{-6} M).

La tabla I muestra la influencia de atropina y hexametonio sobre los efectos de Ach en animales normales y castrados de 90 días. Se puede observar que la atropina bloqueó casi totalmente el efecto de la dosis máxima de Ach; mientras que el hexametonio no la modificó.

Cabe destacar, que en los animales de 20 y 50 días, se observó el mismo fenómeno (datos que no se muestran en la tabla I).

3. EFEECTO DE NOREPINEFRINA SOBRE LA PORCION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA

Tabla I:

INFLUENCIA DE ATROPINA Y HEXAMETONIO SOBRE LOS EFECTOS DE ACETILCOLINA EN LA PORCION EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 90 DIAS DE EDAD.

<u>DROGAS</u>	<u>NORMAL</u> *	<u>CASTRADO</u> *
Ach (10^{-4} M)	89 ± 7.1 (n= 7)	95 ± 8.3 (n= 6)
Atrop. (10^{-5} M) + Ach (10^{-4} M)	5 ± 0.4 (n= 5)	87 ± 1.1 (n= 5)
Hex. (10^{-6} M) + Ach (10^{-4} M)	86 ± 5.3 (n= 6)	92 ± 6.1 (n= 6)

* Valores expresados en $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso húmedo del tejido y representan el valor medio \pm ETM.

Ach: acetilcolina. Atrop.: atropina. Hex.: hexametonio.

n= número de casos.

En esta serie experimental, mediante curvas dosis-respuesta se analizó el efecto de NE sobre la porción epididimaria y prostática del conducto deferente proveniente de animales de 20, 50 y 90 días de edad normales y castrados. Se estudió además la influencia de factores capaces de modificar la concentración de NE en la biofase a través de la inhibición de los mecanismos de su inactivación.

3.1. Animal normal de 90 días

En este grupo experimental se estudió el efecto de NE sobre la porción epididimaria y porción prostática del conducto deferente aislado de ratas de 90 días de edad.

Las Figuras 20 y 21 muestran el efecto estimulante de NE sobre la porción epididimaria (panel A) y porción prostática (panel B).

Se puede observar que la reactividad de la porción epididimaria resultó ser mayor que en la porción prostática tanto en afinidad como en eficacia.

3.1.1. Influencia de los bloqueantes adrenérgicos

Con el objeto de determinar la naturaleza del receptor involucrado en dicho efecto estimulante, se preincubaron los preparados con bloqueantes de los adrenorreceptores alfa y beta.

La Figura 20, muestra que el bloqueo del receptor beta con propranolol (10^{-6} M) o practolol (10^{-6} M) no modificó el efecto estimulante dosis-dependiente de NE en todas las concentraciones probadas y en ambas regiones.

Por el contrario, la Figura 21, muestra el efecto del bloqueo del adrenorreceptor alfa con regitina (10^{-5} M) y con fenoxibenzamina (10^{-6} M) sobre la acción de NE; en la porción epididimaria (panel A) y en la porción prostática (panel B).

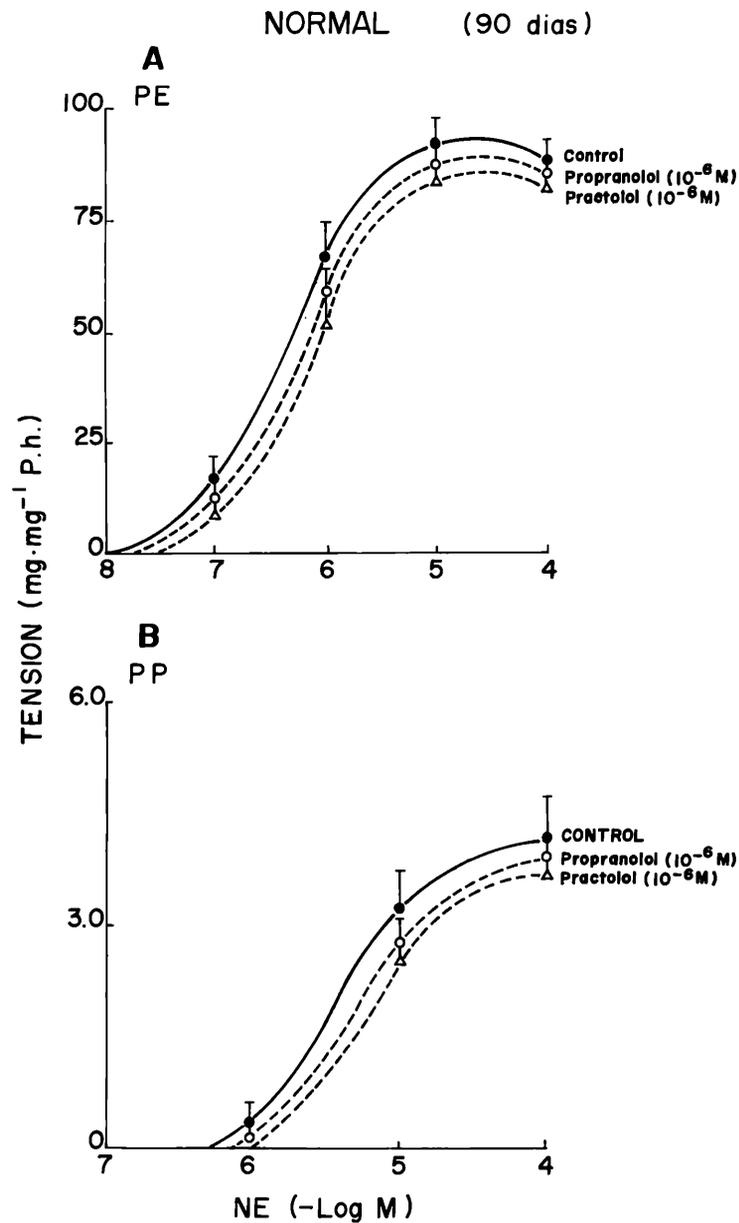


Figura 20: CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA SOBRE LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA Y PROSTÁTICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS DE 90 DÍAS DE EDAD. INFLUENCIA DEL BLOQUEO DE ADRENORRECEPTORES BETA.

Panel A y B: porción epididimaria (PE) y prostática (PP) respectivamente. Ordenada: tensión en $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ de P.h. del tejido. Abscisa: logaritmo negativo de la concentración molar de norepinefrina (NE). Otros detalles como en la Figura 19.

Los preparados se preincubaron 30 minutos con propranolol o practolol (10^{-6} M para ambos). Se realizaron 8 experimentos por cada grupo.

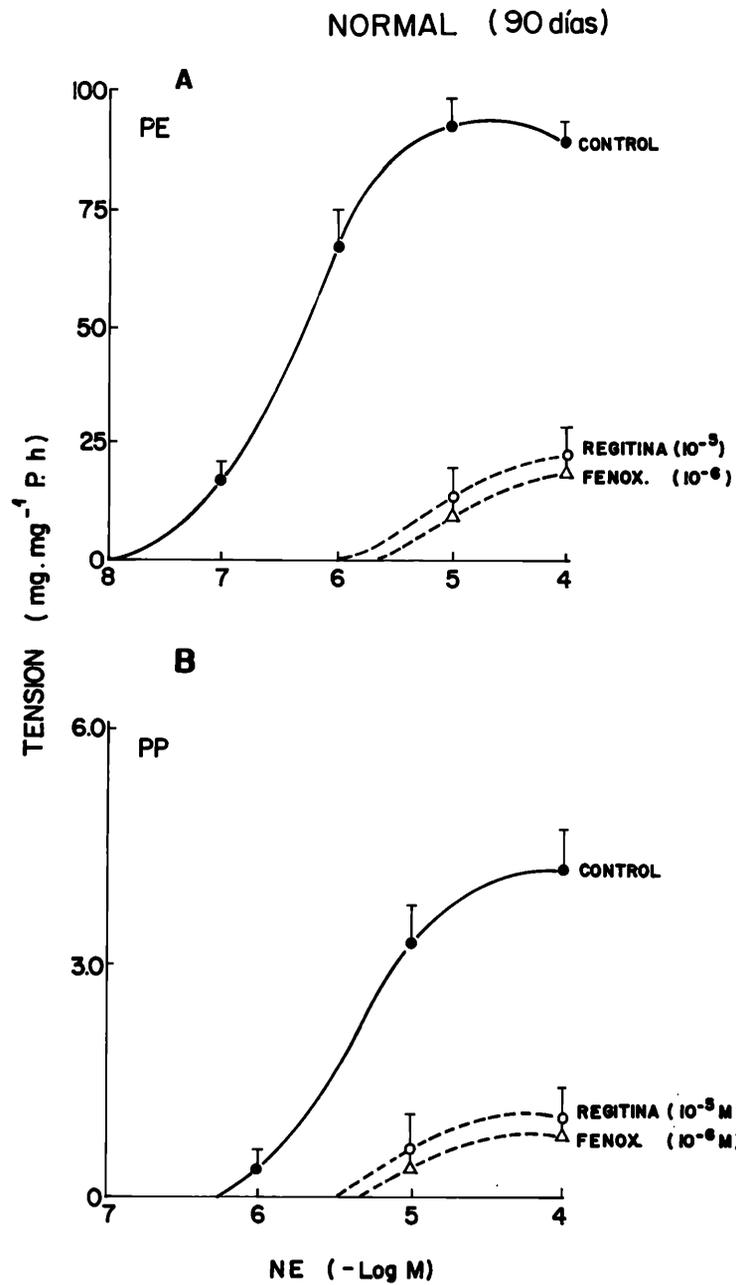


Figura 21: INFLUENCIA DEL BLOQUEO DE LOS ADRENORRECEPTORES ALFA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN EL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS NORMALES DE 90 DIAS.

Panel A: porción epididimaria (PE). Panel B: porción prostática (PP). Otros detalles y condiciones como las Figuras 19 y 20.

Las preparaciones fueron incubadas previo a la adición de norepinefrina durante 30 min, con regitina ($10^{-5}M$) o fenoxibenzamina (Fenox.) ($10^{-6}M$). Corresponden 7 experimentos para cada una de las curvas.

Puede apreciarse que ambos bloqueantes inhibieron significativamente y desviaron la curva dosis-respuesta hacia la derecha de los efectos excitatorios de NE en ambas porciones.

3.1.2. Influencia de la edad

En esta serie experimental se estudió el efecto de NE sobre la porción epididimaria y prostática del conducto deferente de animales de 20, 50 y 90 días.

Si analizamos en forma comparativa la Figura 22, puede observarse que la porción epididimaria (panel A) de los animales de 50 días presentó una respuesta contráctil significativamente mayor hacia el neurotransmisor exógeno, que aquella de 20 y 90 días. Por su parte, la curva de NE a los 20 y 90 días no mostró diferencias significativas.

La Figura 22, muestra también, la acción de NE sobre la porción prostática (panel B) en animales de diferentes edades. Si analizamos dicha figura, vemos que la reactividad hacia el agonista adrenérgico fue disminuyendo significativamente a medida que se incrementa la edad del animal.

Así, el efecto del neurotransmisor fue máximo a los 20 días, intermedio a los 50 y mínimo a los 90 días.

3.1.3. Influencia de la castración

La Figura 23, muestra la influencia de la castración sobre los efectos de NE en la porción epididimaria (panel A) y la porción prostática (panel B) de animales de 20, 50 y 90 días de edad.

Se puede observar, que la porción epididimaria de animales de distintas edades, presenta una reactividad hacia NE similar en los tres grupos experimentales.

Por el contrario, en la porción prostática, las diferencias

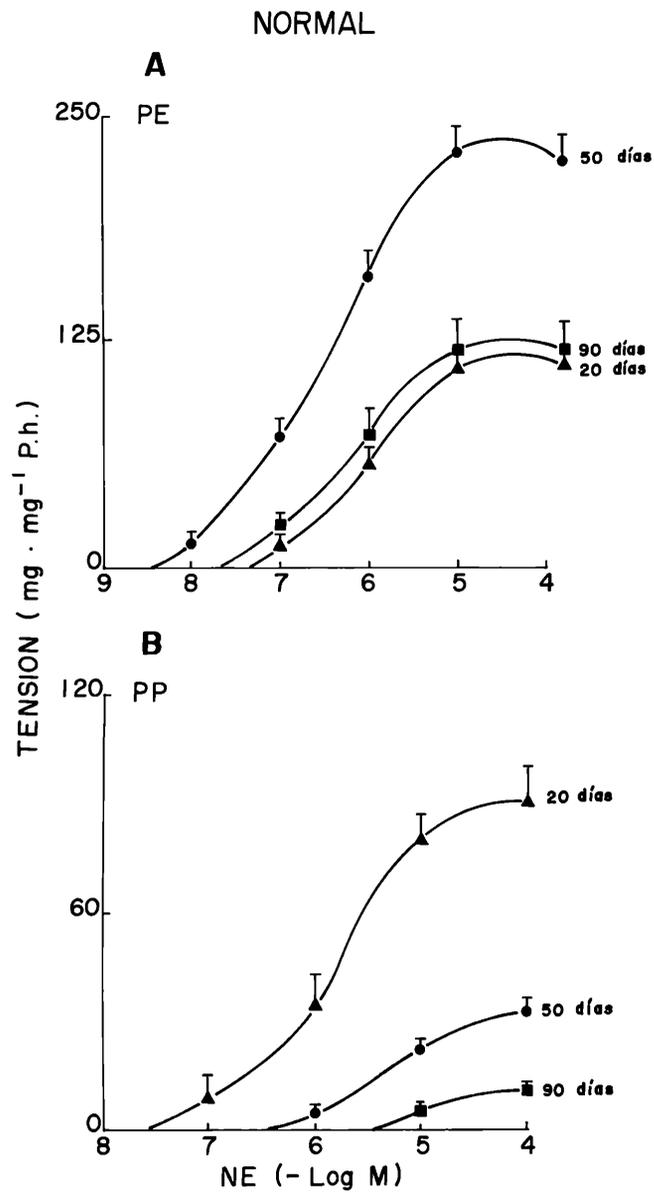


Figura 22: CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA SOBRE EL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE ANIMALES NORMALES DE 20, 50 Y 90 DIAS.

Panel A: porción epididimaria (PE). Panel B: porción prostática (PP). Otros detalles como los descriptos para las Figuras 19 y 20. Para cada curva corresponden 9 experimentos.

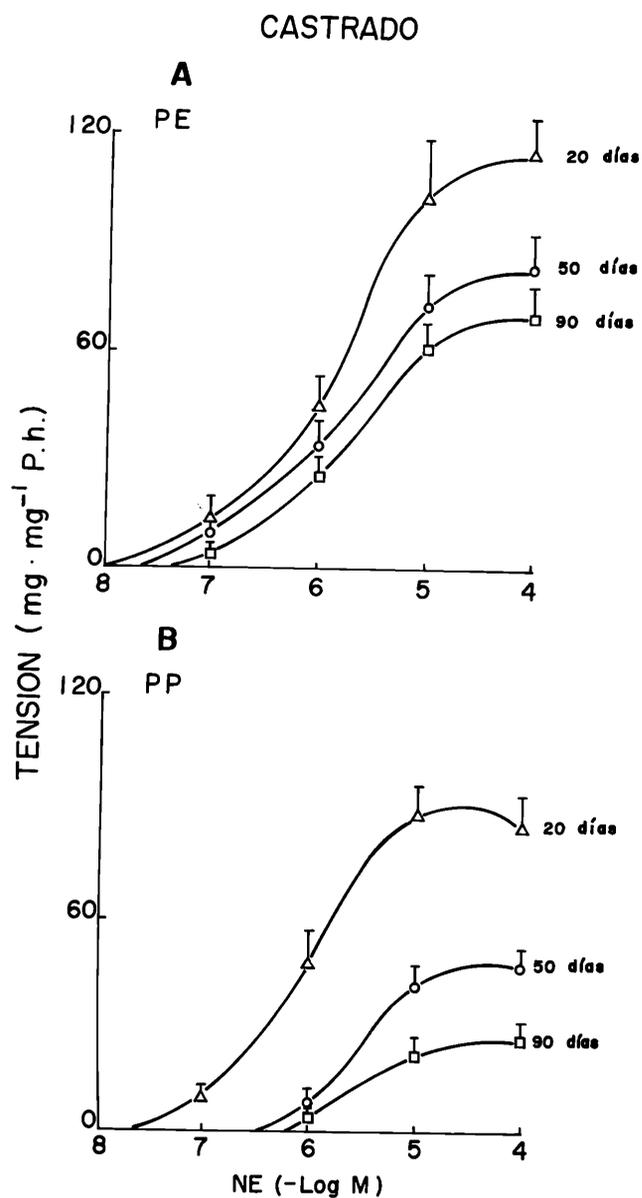


Figura 23: CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA SOBRE LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE ANIMALES CASTRADOS EN DISTINTOS PERIODOS DE MADURACION SEXUAL.

Panel A: porción epididimaria (PE). Panel B: porción prostática (PP). Otros detalles y condiciones como los indicados en las Figuras 19 y 20. A cada curva corresponden 7 experimentos.

en la respuesta observada a los 20, 50 y 90 días se siguieron manteniendo en los animales castrados.

3.1.4. Influencia del tratamiento con testosterona

En esta serie de experimentos se analizó en forma comparativa el efecto de NE sobre la porción epididimaria y porción prostática de animales de distintas edades en condiciones normales, castrados y castrados con terapia de sustitución con propionato de testosterona.

En la tabla II puede apreciarse que en la porción epididimaria (panel A) el efecto de la dosis máxima de NE fue, en los animales normales, de mayor magnitud en los de 50 días con respecto a los de 20 y 90 días; siendo en estos dos últimos comparables.

La castración atenuó el efecto del agonista adrenérgico a los 50 y 90 días y no lo modificó a los 20 días.

El tratamiento de sustitución hormonal con propionato de testosterona (ver material y métodos) impidió el efecto inhibitorio producido por la castración a los 50 y 90 días, llevándolos a valores similares a aquéllos de los animales normales. A los 20 días, este tratamiento no modificó la acción del neurotransmisor adrenérgico, obteniéndose valores idénticos en los tres grupos estudiados.

La misma tabla, muestra además, lo que aconteció en la porción prostática (panel B).

Puede observarse que la acción de NE fue disminuyendo de acuerdo a la edad. La castración potenció el efecto estimulante de NE a los 50 y 90 días y la inyección de testosterona, en el animal castrado, abolió el efecto potenciador de la castración sobre la acción de NE a los 50 y 90 días, llevándolos a valores semejantes a los del animal normal.



Tabla II:

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON TESTOSTERONA SOBRE LOS EFECTOS DE NOREPINEFRINA EN EL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS CASTRADAS.

A (porción epididimaria)

CONDICION	NE (10^{-5} M) *			n
	DIAS			
	20	50	90	
NORMAL	120 \pm 7.9	244 \pm 12.3	122 \pm 9.3	5
CASTRADO	110 \pm 6.8	80 \pm 7.1	70 \pm 5.9	5
CASTRADO + TESTOSTERONA	117 \pm 9.2	237 \pm 9.8	125 \pm 3.7	5

B (porción prostática)

CONDICION	NE (10^{-5} M) *			n
	DIAS			
	20	50	90	
NORMAL	98 \pm 5.4	26 \pm 1.4	8 \pm 0.5	5
CASTRADO	110 \pm 7.2	50 \pm 2.6	20 \pm 1.3	5
CASTRADO + TESTOSTERONA	100 \pm 9.8	23 \pm 1.9	7 \pm 0.2	5

* Valores expresados en $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso húmedo del tejido, representan el valor medio \pm ETM.
n= número de casos.

En el animal de 20 días castrado e inyectado con testosterona, la acción de NE no se modificó con respecto al control.

3.2. Influencia de la inhibición de los mecanismos de inactivación de norepinefrina en las distintas edades.

A este punto corresponden varios grupos experimentales, en los que se estudió la influencia de la inhibición de los mecanismos de inactivación de NE, sea por captación neuronal, captación extraneuronal o vía de inactivación enzimática a través de la COMT.

Estos fenómenos fueron estudiados en la porción epididimaria y en la porción prostática de animales de 20, 50 y 90 días de edad en condiciones normales y castrados.

Pasaremos a analizar cada uno de estos grupos por separado.

3.2.1. Animales de 20 días normales y castrados

En este grupo experimental se estudió, mediante curvas dosisrespuesta, el efecto de NE en animales normales y castrados, como así también, la influencia de la inhibición de los mecanismos de inactivación de NE en ambos grupos.

La Figura 24, muestra que la curva dosis-respuesta de NE es similar en la porción epididimaria (panel A) de animales normales y castrados. Sucede lo propio con la porción prostática (panel B).

A su vez, no existen diferencias significativas en la acción de NE en los cuatro grupos estudiados.

La Figura 25, muestra la influencia del bloqueo de la captación neuronal por la desipramina (Desip) (10^{-7} M), sobre la porción epididimaria de animales de 20 días normales (panel A) y castrados (panel B).

Puede observarse que la inhibición de la captación neuronal

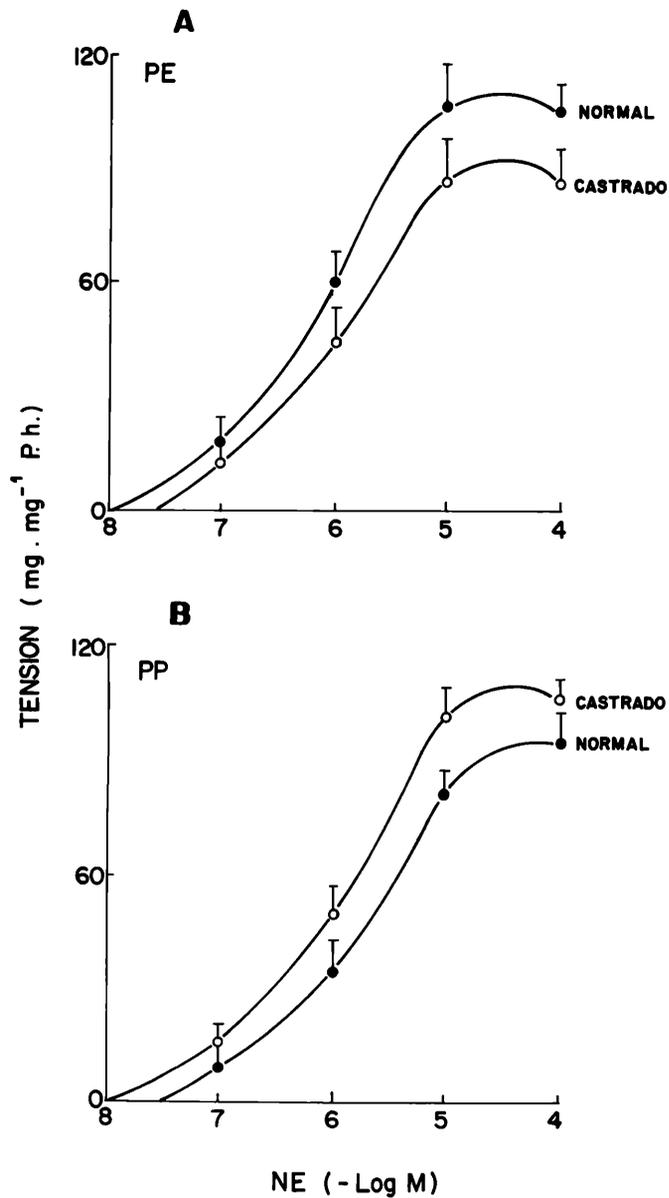


Figura 24: INFLUENCIA DE LA CASTRACION SOBRE LOS EFECTOS DE NO-REPINEFRINA EN LA PORCION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS DE 20 DIAS.

Panel A: porción epididimaria (PE). Panel B: porción prostática (PP). Otros detalles y condiciones como los de las Figuras 19 y 20. Se realizaron 10 experimentos en cada grupo.

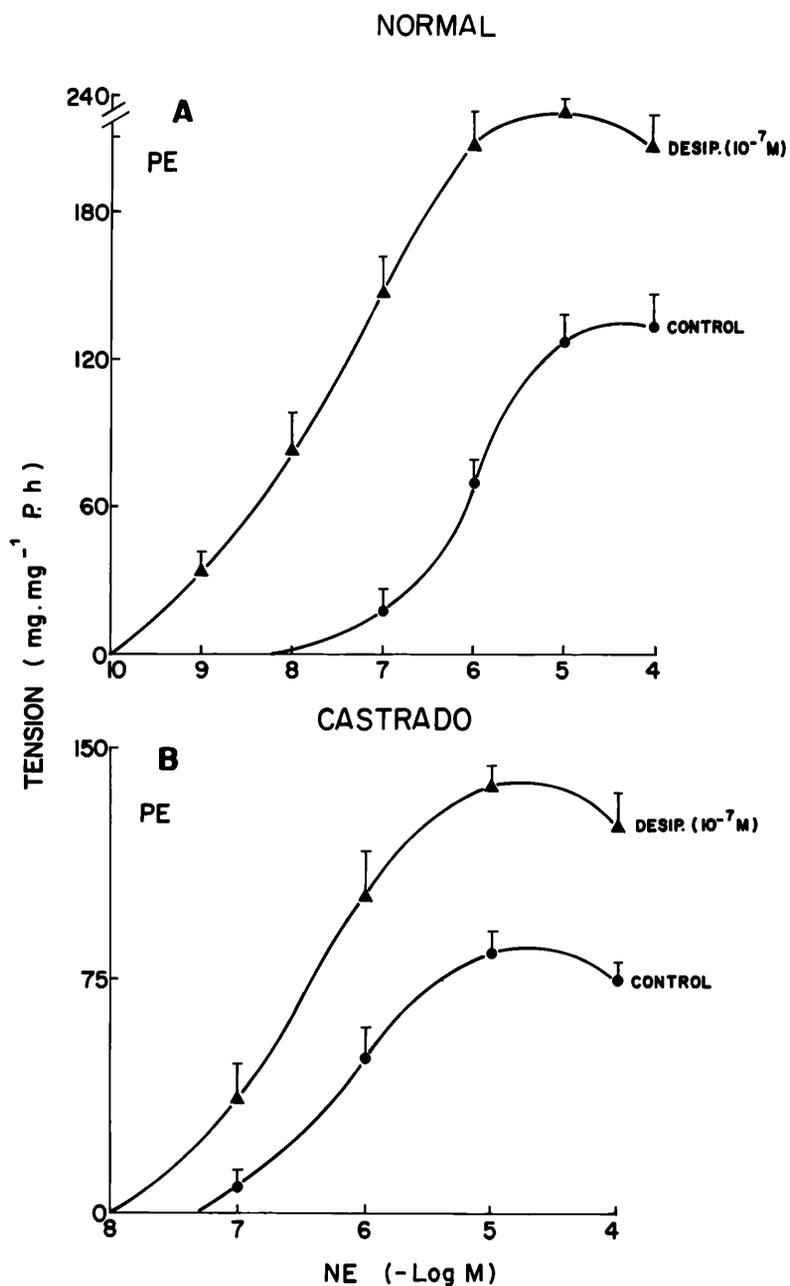


Figura 25: INFLUENCIA DE DESIPRAMINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 20 DIAS. Panel A y B: porción epididimaria (PE) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones y detalles como los descritos en las Figuras 19 y 20. La desipramina fue adicionada 30 min. antes de realizar la curva dosis-respuesta a una concentración de 10^{-7} M. Corresponden 7 experimentos a cada curva.

desplazó la curva de NE hacia la izquierda, potenciándola en todos los puntos. Esta potenciación se observó tanto en el animal normal como en el castrado.

La Figura 26, ilustra el mismo fenómeno, pero acontecido en la porción prostática. Se puede observar que la desipramina potenció los efectos del neurotransmisor tanto en el animal normal (panel A) como en el castrado (panel B).

La potenciación ejercida por el bloqueo de la captación neuronal hacia los efectos de NE exógena, resultó ser mayor en la porción epididimaria (Figura 25) que en la porción prostática (Figura 26); tanto en el animal normal como en el castrado.

En las Figuras 27 y 28, se analizó la influencia de la inhibición de la captación extraneuronal por la normetanefrina (NMN) (10^{-6} M) y de la degradación enzimática, vía COMT, por el U-0521 (10^{-6} M), sobre los efectos de NE exógena en la porción epididimaria (Figura 27) y en la porción prostática (Figura 28) de animales normales (panel A) y castrados (panel B).

Puede observarse que, ni la inhibición de la captación extraneuronal, ni la inhibición de la COMT modificaron la curva dosis-respuesta de NE en ambas porciones y en ambas condiciones experimentales.

3.2.2. Animales de 50 días normales y castrados

En este grupo experimental, se estudió el efecto de NE exógena sobre la porción epididimaria y porción prostática de animales normales y castrados; como así también, la influencia de la inhibición de los procesos de inactivación.

Si analizamos la Figura 29, podremos observar, como se señalara con anterioridad, que la castración atenuó las respuestas excitatorias de NE sobre la porción epididimaria (panel A) y las potenció sobre la porción prostática (panel B).

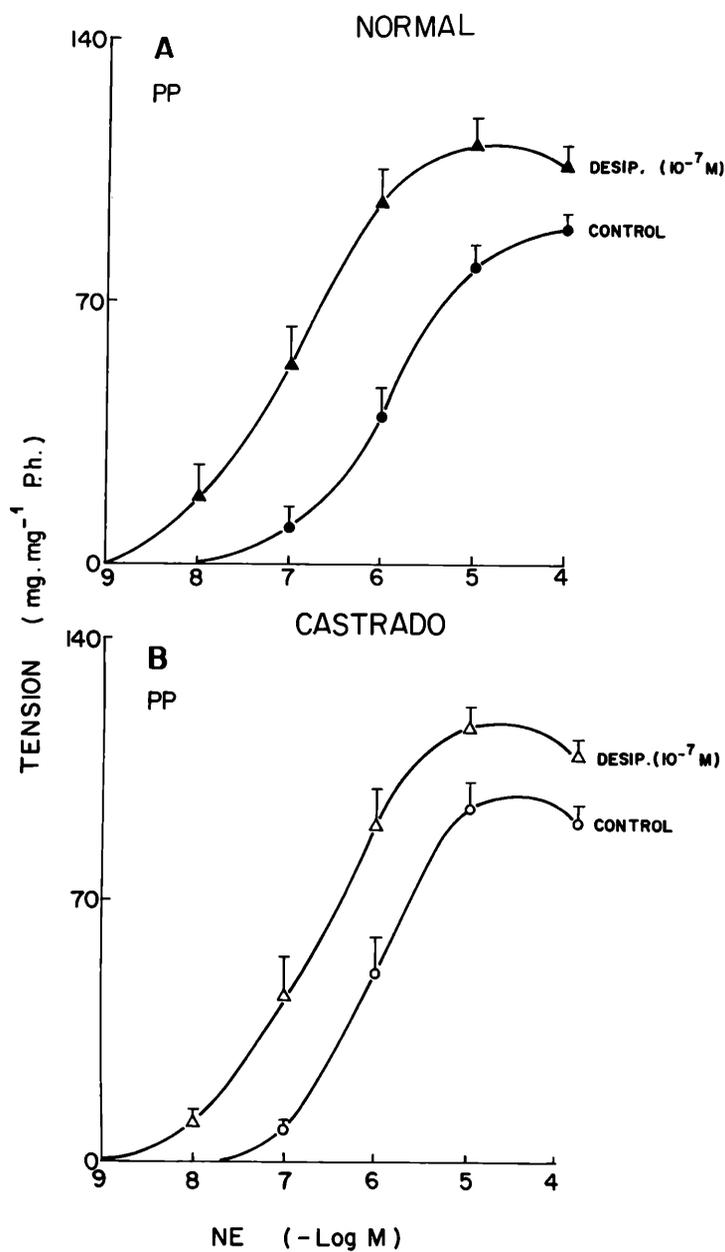


Figura 26: INFLUENCIA DE DESIPRAMINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCION PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 20 DIAS. Panel A y B: porción prostática (PP) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones y detalles como los ya descritos para las Figuras 19, 20 y 25. Corresponden 7 experimentos a cada curva.

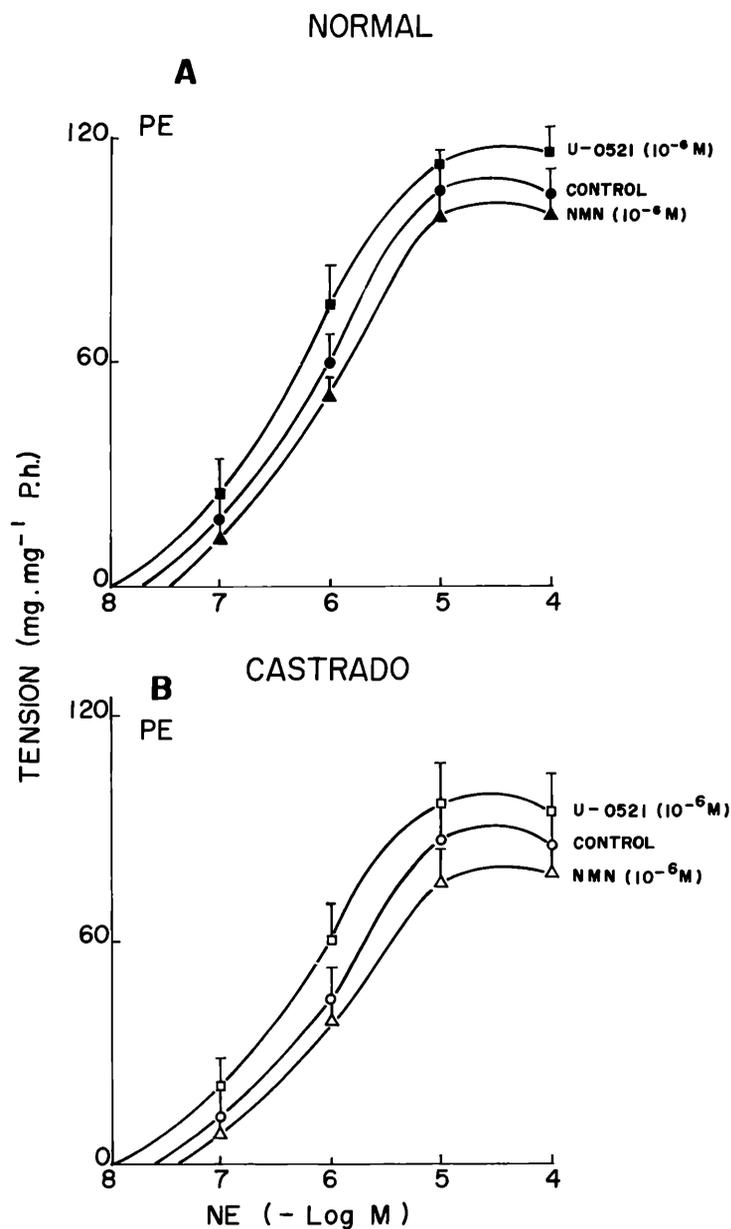


Figura 27: INFLUENCIA DEL U-0521 Y NORMETANEFRINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 20 DIAS.

Panel A y B: porción epididimaria de animales normales y castrados (PE) respectivamente. Para más detalles ver descripción de las Figuras 19 y 20. Los tejidos fueron preincubados durante 30 minutos con U-0521 o normetanefrina (NMN) a una concentración final de 10^{-6} M. Se realizaron 8 experimentos en cada grupo.

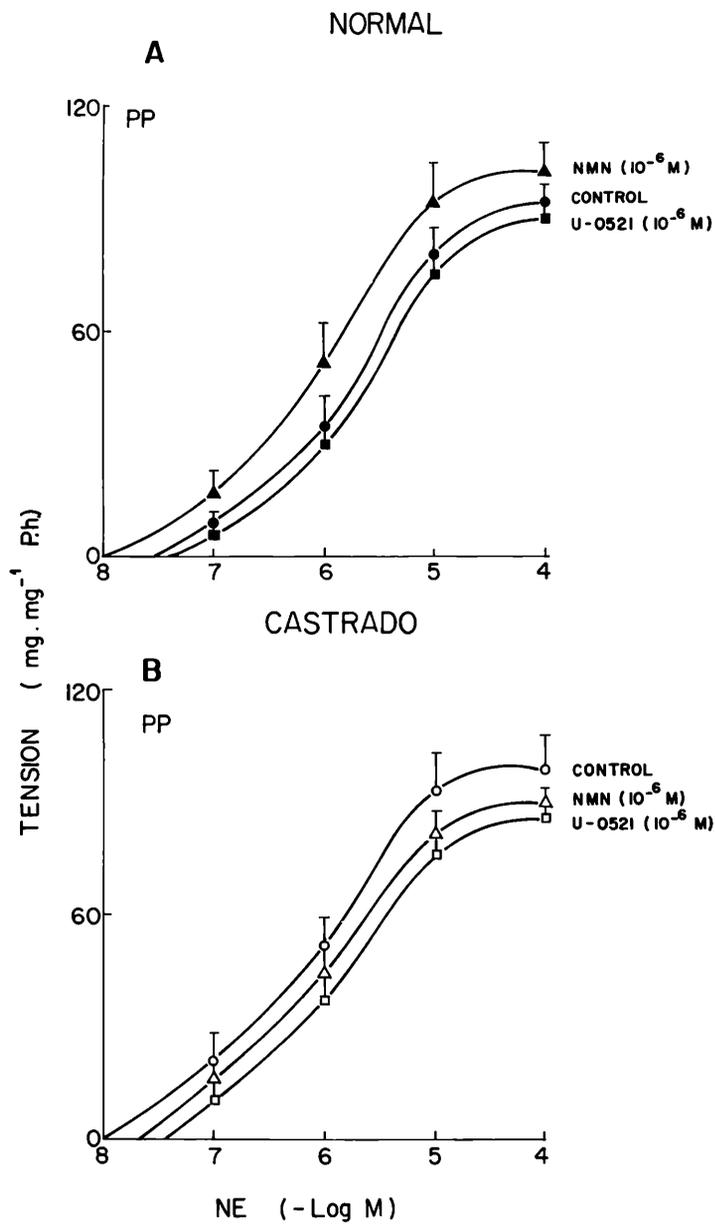


Figura 28: INFLUENCIA DEL U-0521 Y NORMETANEFRINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINAFRINA EN LA PORCIÓN PROSTÁTICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 20 DIAS.

Panel A y B: porción prostática (PP) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones y detalles como los de la Figuras 19, 20 y 27. Corresponde un número de 9 experimentos para cada curva.

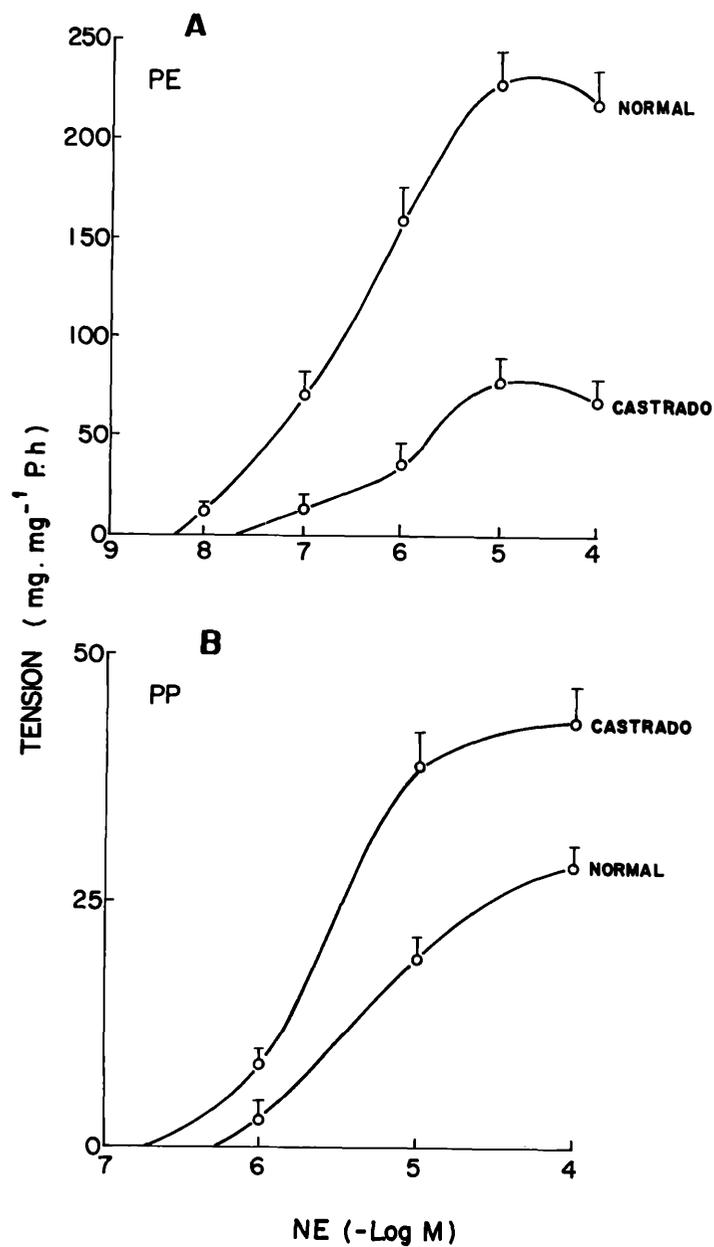


Figura 29: INFLUENCIA DE LA CASTRACION SOBRE LOS EFECTOS DE NO-REPINEFRINA EN LA PORCION EPIDIDIMARIA Y PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS DE 50 DIAS.

Panel A: porción epididimaria (PE). Panel B: porción prostática (PP). Otros detalles como las Figuras 19 y 20. Se realizaron 8 experimentos en cada uno de los grupos.

Con el objeto de determinar si las diferencias observadas en la influencia de la castración sobre la porción epididimaria y prostática del animal de 50 días, podría estar relacionada con los mecanismos de inactivación del agonista adrenérgico, se estudió la acción de desipramina, NMN y U-0521, sobre ambas porciones y en condiciones normales y castrados.

La Figura 30, ilustra la influencia de la desipramina sobre la porción epididimaria de animales normales (panel A) y castrados (panel B).

Puede observarse, que la inhibición de la captación neuronal potenció los efectos de la NE exógena en ambos grupos.

Por otra parte, esta potenciación también se observó en la porción prostática (Figura 31) de los animales normales (panel A) y castrados (panel B). Cabe destacar, que en estos últimos, la desipramina potenció los efectos de las dosis bajas de NE (10^{-8} a 10^{-6} M) pero no modificó a las más altas (10^{-5} , 10^{-4} M).

Las Figuras 32 y 33 grafican la influencia de la inhibición de la captación extraneuronal y de la actividad de COMT en ambas porciones.

Se puede apreciar que ni la NMN ni el U-0521 fueron capaces de modificar la curva dosis-respuesta de NE exógena sobre la porción epididimaria (Figura 32) de animales normales (panel A) y castrados (panel B).

Tampoco modificó la propia, en la porción prostática (Figura 33) de animales normales (panel A) y castrados (panel B).

3.2.3. Animales de 90 días normales y castrados

A esta serie de experimentos corresponde el análisis de los efectos de NE sobre la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de ratas de 90 días de edad, norma-

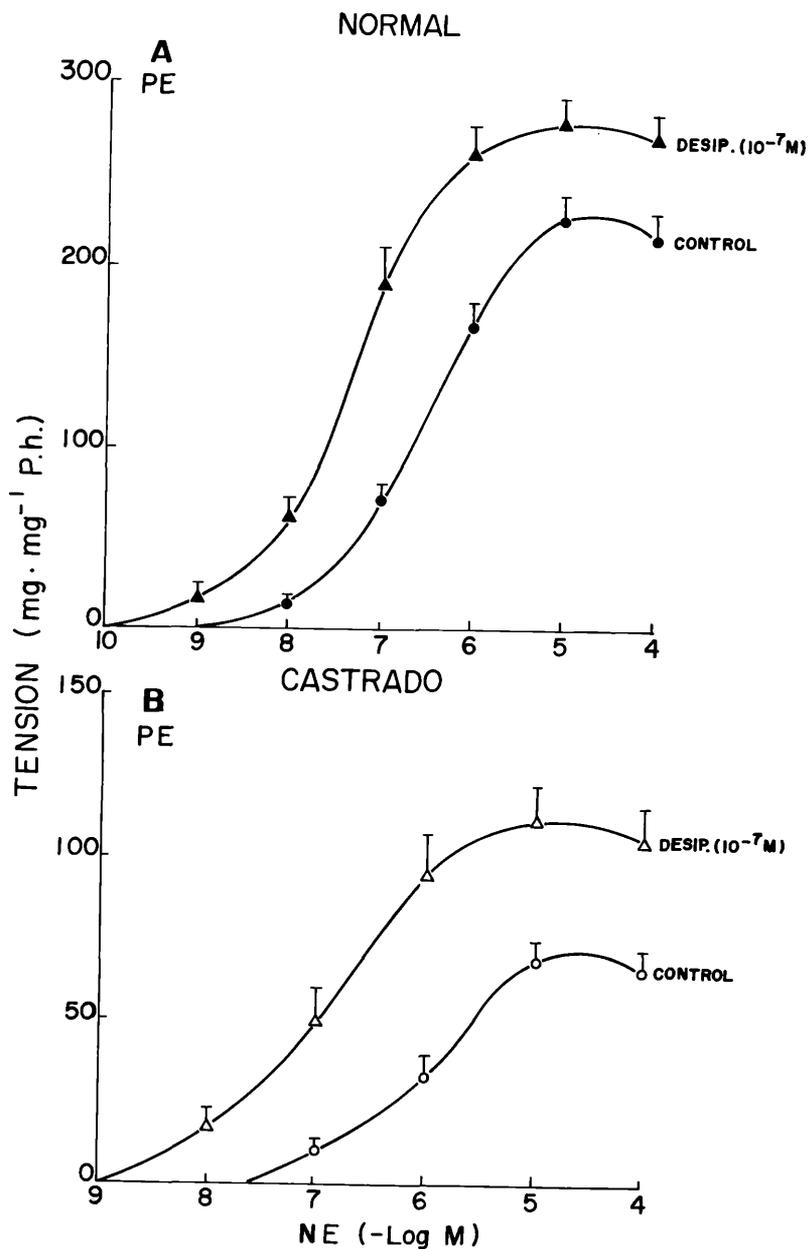


Figura 30: INFLUENCIA DE DESIPRAMINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS DE 50 DIAS.

Panel A y B: porción epididimaria (PE) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones y detalles como los ya descritos para las Figuras 19, 20 y 25. Corresponden 8 experimentos a cada una de las curvas.

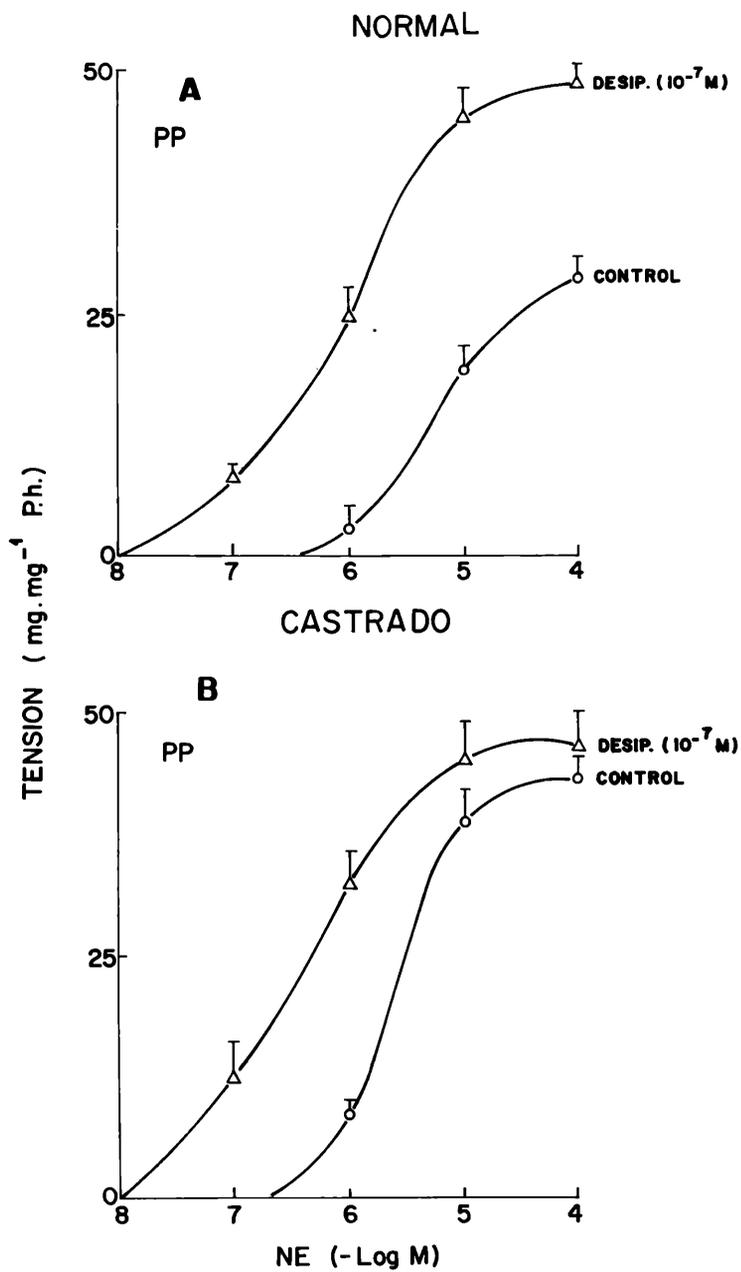


Figura 31: INFLUENCIA DE DESIPRAMINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCION PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 50 DIAS. Panel A y B: porción prostática (PP) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones y detalles como los ya mencionados para las Figuras 19, 20 y 25. Se realizaron 8 experimentos para cada una de las curvas.

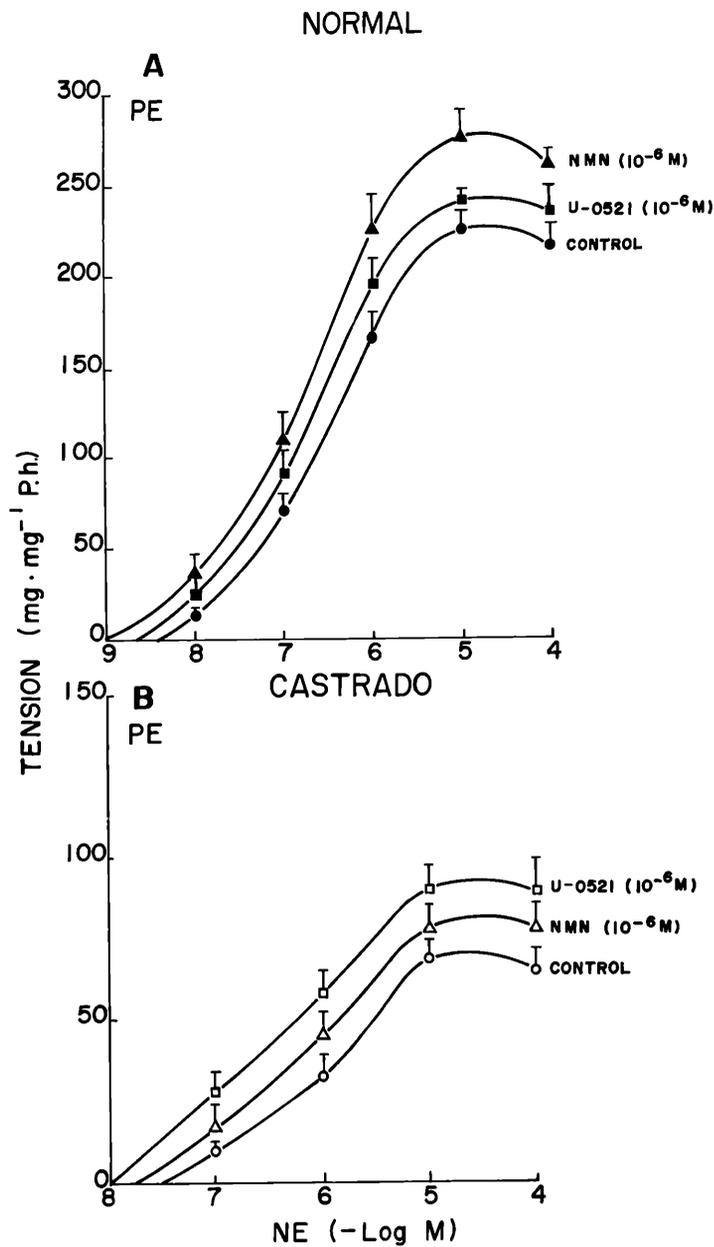


Figura 32: INFLUENCIA DEL U-0521 Y NORMETANEFRINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCION EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 50 DIAS.

Panel A y B: porción epididimaria (PE) de animales normales y castrados respectivamente. Otros detalles como los descriptos en las Figuras 19, 20 y 27. Corresponden 9 casos para cada curva.

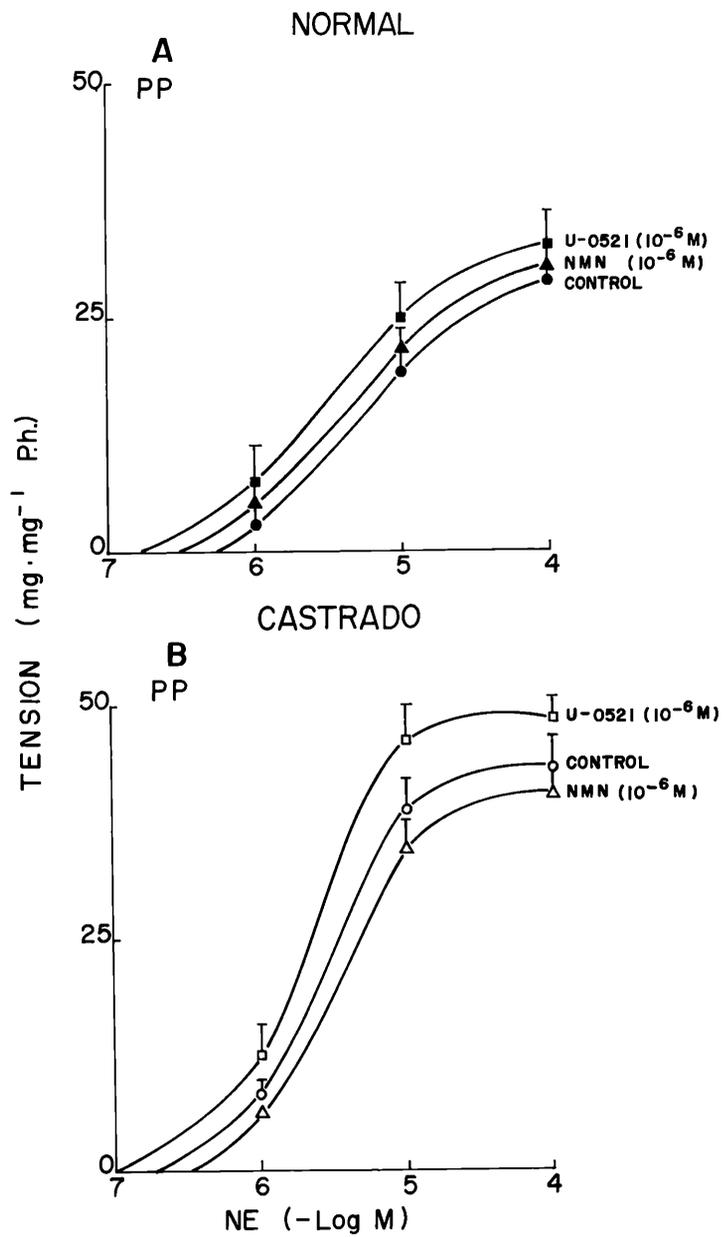


Figura 33: INFLUENCIA DEL U-0521 Y NORMETANEFRINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCIÓN PROSTÁTICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 50 DIAS.

Panel A y B: porción prostática (PP) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones como en las Figuras 19, 20 y 27. Corresponden 9 experimentos para cada curva.

les y castrados.

En la Figura 34, se ilustra el efecto de la castración sobre la acción del neurotransmisor adrenérgico en la porción epididimaria (panel A) y porción prostática (panel B).

Se puede observar, que mientras en la primera, la castración inhibió en todos los puntos de la curva el efecto de la NE exógena, en la segunda los potenció de manera significativa.

Siguiendo la misma secuencia que en los casos anteriores para el análisis de la influencia de la inhibición de los procesos de inactivación de la NE exógena a los 90 días de edad, se estudió el efecto de la desipramina, la NMN y el U-0521.

Las Figuras 35 y 36, muestran respectivamente el efecto de la desipramina sobre la porción epididimaria y porción prostática del conducto deferente de animales normales (panel A) y castrados (panel B).

Puede observarse, que el bloqueo de la captación neuronal, potenció significativamente el efecto de la NE en todos los grupos; pero dicha potenciación fue más marcada en ambas porciones del animal castrado (Figuras 35 y 36, panel B).

Las Figuras 37 y 38, grafican en forma comparativa el efecto del U-0521 y de la NMN sobre la porción epididimaria y porción prostática de animales normales (panel A) y castrados (panel B).

La inhibición de la captación extraneuronal y de la actividad de COMT no modificó la curva dosis-respuesta del agente adrenérgico del animal normal, tanto en la porción epididimaria (Figura 37, panel A) como en la porción prostática (Figura 38, panel A).

Por el contrario, en el animal castrado, las preincubaciones con NMN y con U-0521 incrementaron significativamente la acción estimulante de la NE exógena, tanto en la porción epididimaria como en la prostática (Figuras 37 y 38, panel B, respectivamente).

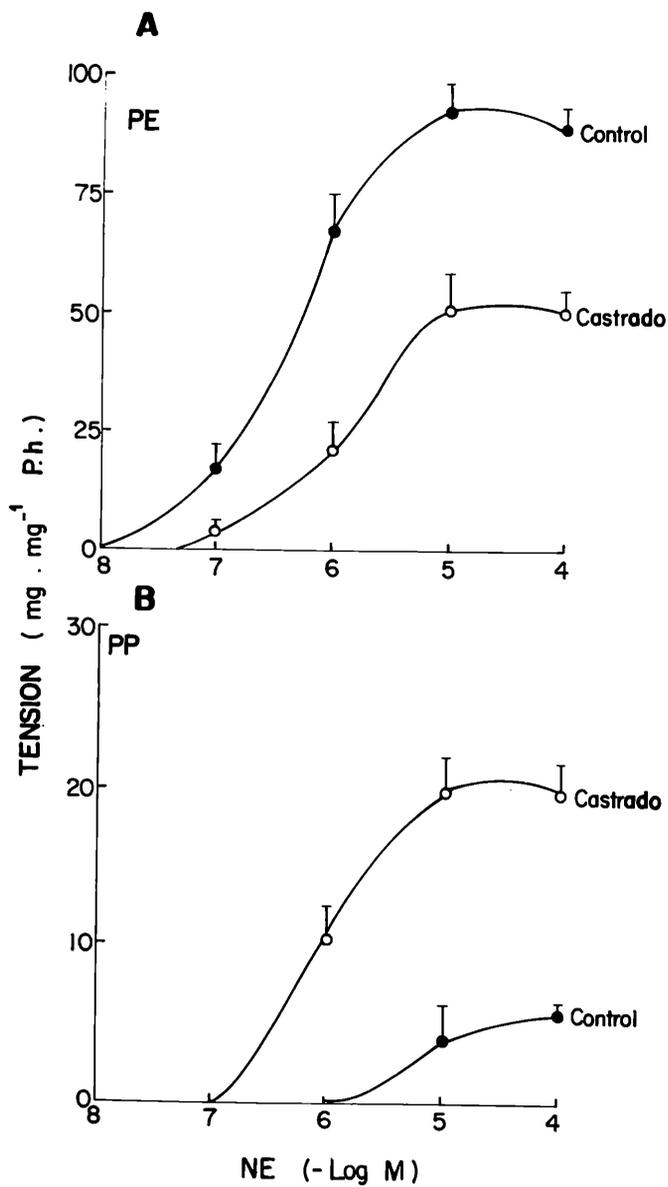


Figura 34: INFLUENCIA DE LA CASTRACION SOBRE LOS EFECTOS DE NO-REPINEFRINA EN LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA Y PROSTÁTICA DEL CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATAS DE 90 DIAS.

Panel A: porción epididimaria (PE). Panel B: porción prostática (PP). Otros detalles y condiciones como los descritos en las Figuras 19 y 20. Corresponden 10 experimentos en cada grupo.

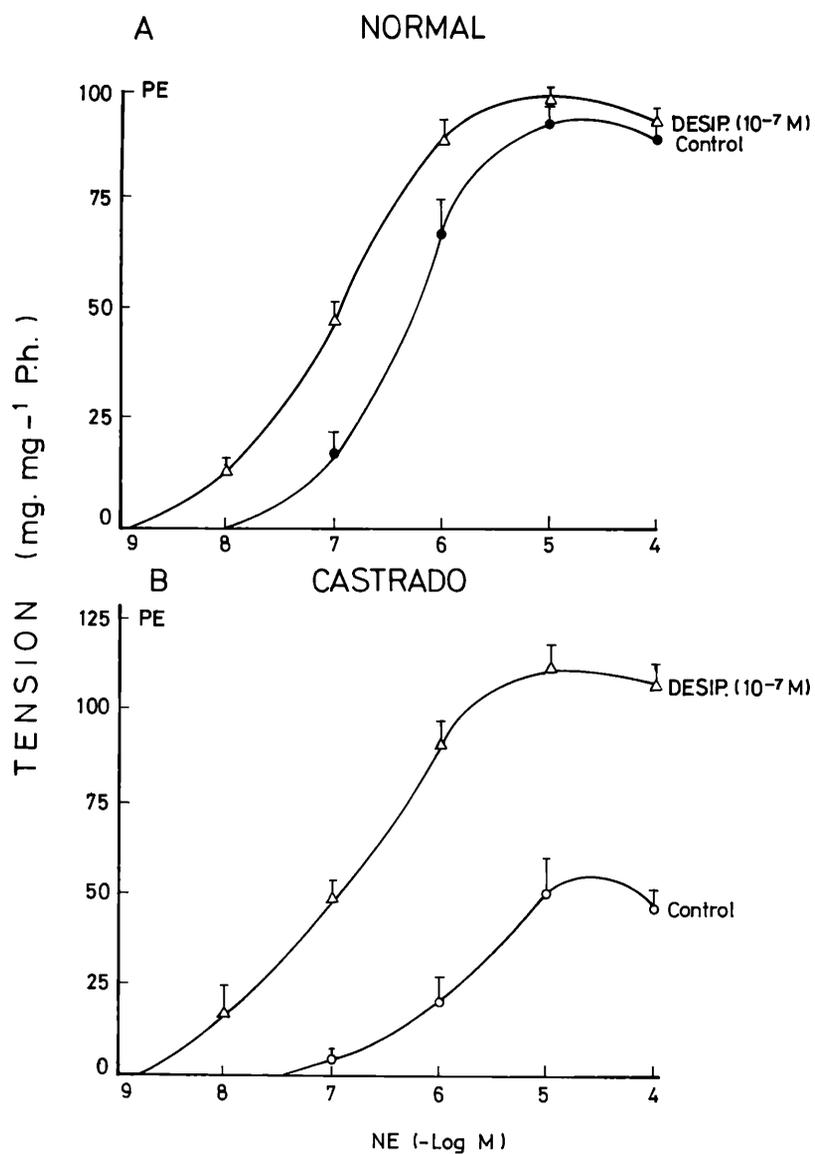


Figura 35: INFLUENCIA DE DESIPRAMINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCIÓN EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 90 DIAS. Panel A y B: porción epididimaria (PE) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones y detalles como los descritos para las Figuras 19, 20 y 25. Corresponden 10 experimentos para cada curva.

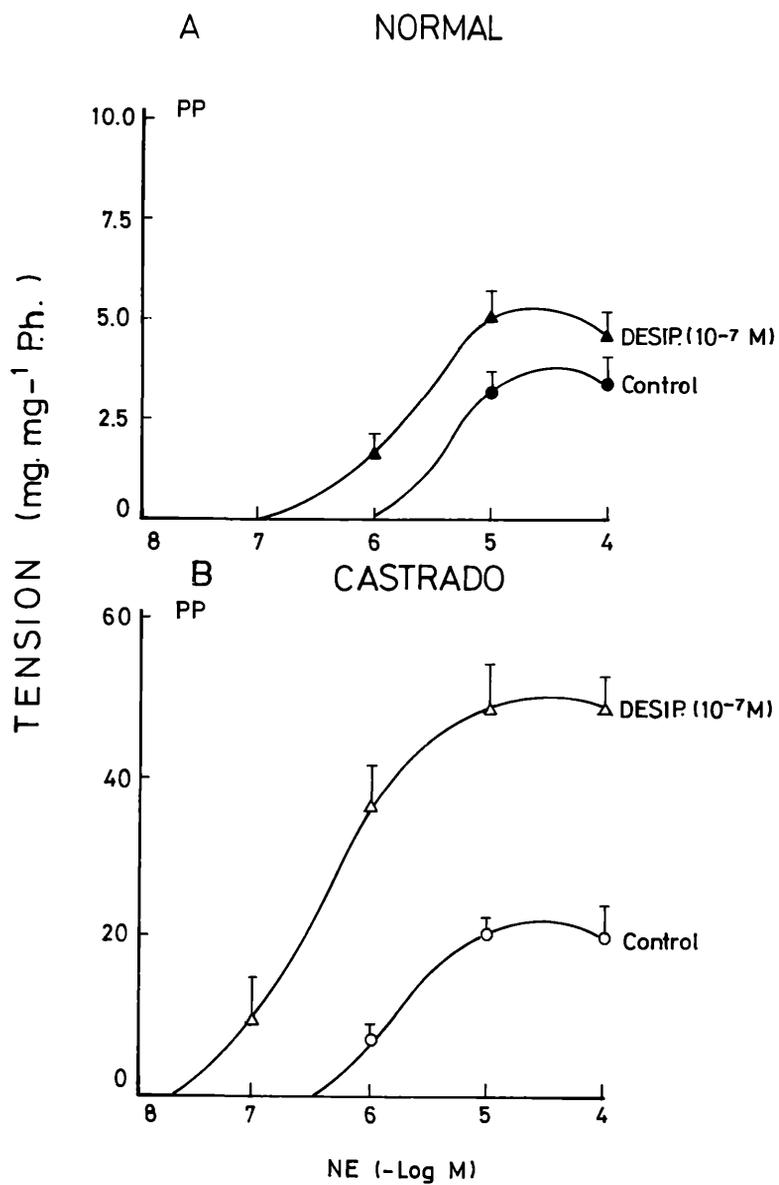


Figura 36: INFLUENCIA DE DESIPRAMINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS-RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCION PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 90 DIAS. Panel A y B: porción prostática (PP) de animales normales y castrados respectivamente. Otros detalles como los ya mencionados en las Figuras 19, 20 y 25. Se realizaron 8 experimentos en cada curva.

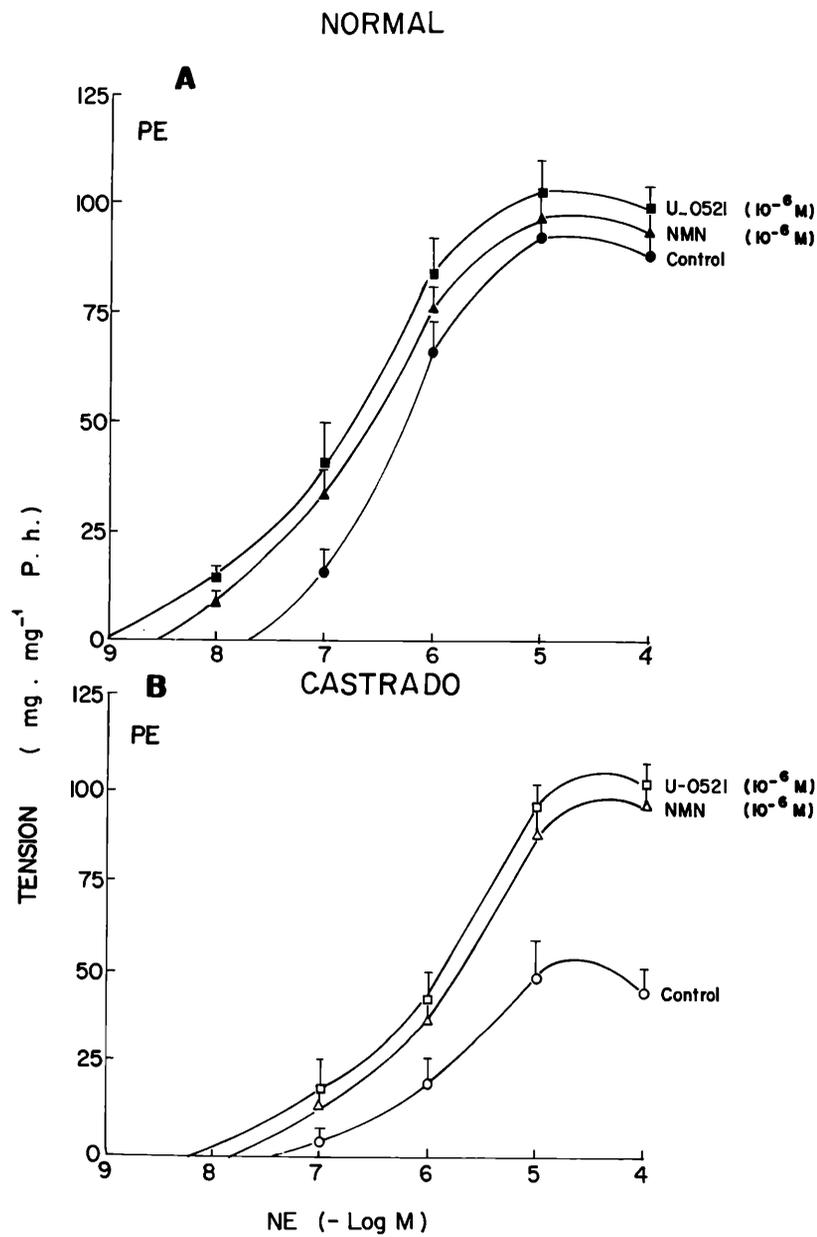


Figura 37: INFLUENCIA DEL U-0521 Y NORMETANEFRINA SOBRE LA CURVA-DOSIS RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCION EPIDIDIMARIA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 90 DIAS. Panel A y B: porción epididimaria (PE) de animales normales y castrados respectivamente. Otros detalles y condiciones ver las Figuras 19, 20 y 27. Corresponde un número de 9 experimentos para cada curva.

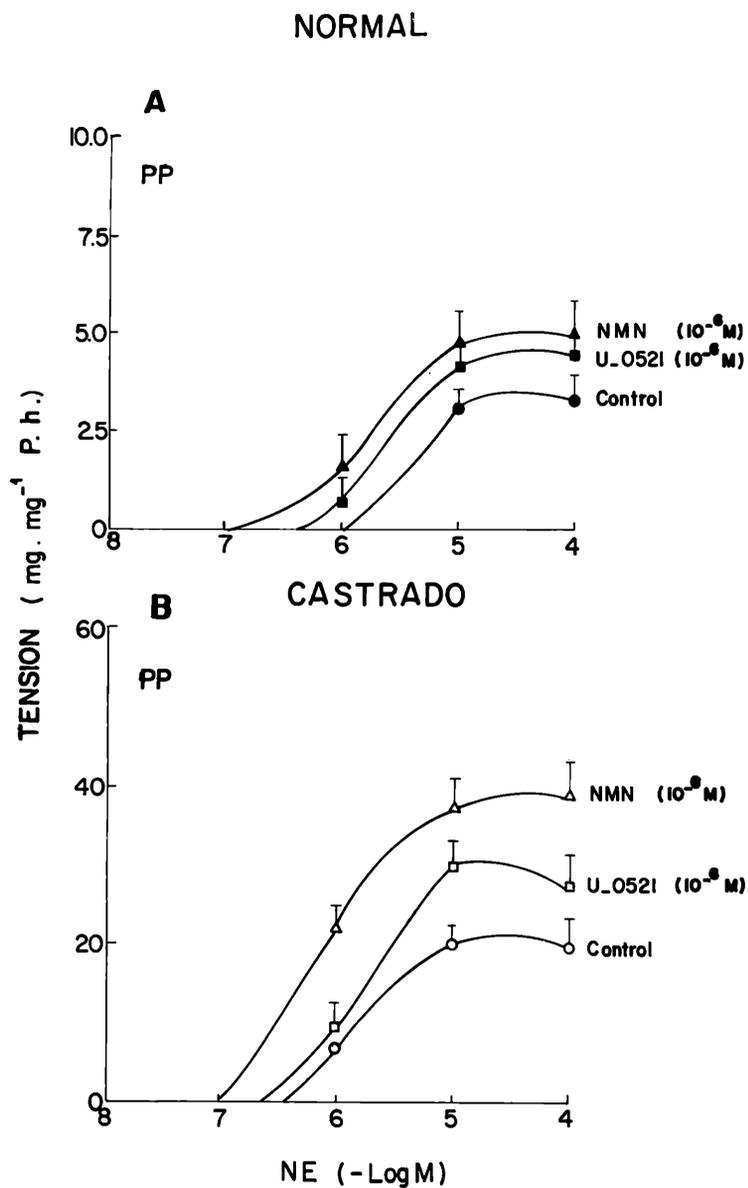


Figura 38: INFLUENCIA DEL U-0521 Y NORMETANEFRINA SOBRE LA CURVA ACUMULATIVA DOSIS RESPUESTA DE NOREPINEFRINA EN LA PORCIÓN PROSTATICA DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATAS NORMALES Y CASTRADAS DE 90 DIAS.

Panel A y B: porción prostática (PP) de animales normales y castrados respectivamente. Otras condiciones como los de las Figuras 19, 20 y 27. Corresponden 9 experimentos para cada curva.

Los efectos potenciadores de NE observados por la inhibición de la captación extraneuronal y enzimática vía COMT, fueron mayores en la porción epididimaria que en la porción prostática.

A handwritten signature in black ink, located in the bottom right corner of the page. The signature is stylized and appears to consist of several overlapping loops and lines.

DISCUSION

El objetivo principal de este estudio fue el de analizar la influencia de las diferentes edades de maduración sexual sobre la actividad mecánica de la región epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de rata. Se tuvo en cuenta no sólo la actividad espontánea desarrollada por el músculo liso, sino también su reactividad farmacológica hacia los dos neurotransmisores más importantes como moduladores de las respuestas mecánicas, tales como Ach y NE.

Por otra parte, con el objeto de dilucidar si la diferencia en la reactividad de ambas porciones hacia el neurotransmisor adrenérgico se hallaba vinculada con la magnitud de los procesos de inactivación de catecolaminas, se estudió el bloqueo de dichos mecanismos en las diferentes edades de maduración sexual.

Por último, para determinar si las diferencias observadas en los fenómenos estudiados en las distintas edades estarían relacionadas con factores hormonales, se exploró la actividad mecánica y la reactividad farmacológica de ambas regiones del conducto deferente, en animales castrados comparándolos con animales enteros y en aquéllos castrados tratados con terapia de sustitución hormonal con testosterona.

Actividad espontánea

Si analizamos los resultados obtenidos sobre la actividad espontánea se puede concluir que tanto la porción epididimaria como la porción prostática presentan actividad espontánea cuando provienen de animales normales de 20 días de edad; mientras que aquéllos provenientes de 50 y 90 días, pierden dicha actividad. Cabe destacar, que a los 20 días la tensión inicial y la frecuencia inicial son similares para ambas regiones.

La castración despierta actividad espontánea en la porción epididimaria de animales de 50 y 90 días y en la porción prostática de animales de 50 días; sin existir modificaciones en la falta de actividad mecánica a los 90 días.



El hecho que, la maduración sexual del animal produzca una inhibición de la actividad espontánea del conducto deferente y que la castración revierta ese efecto inhibitorio, hace suponer que factores locales provenientes del testículo sean los responsables de la falta de actividad observada en los conductos deferentes de los animales de 50 y 90 días.

Está bien establecido que la falta de testosterona va acompañada en el conducto deferente aislado de rata, por una importante actividad espontánea (237) y la castración en el animal de 90 días también despierta actividad mecánica funcional (238). Por otro lado, se ha demostrado que la inyección de propionato de testosterona en el animal castrado, produce la desaparición de la actividad mecánica espontánea en dicho órgano (237).

Esta acción inhibitoria de la hormona testicular podría ser atribuida a su conocido efecto como estabilizador de membrana, especialmente relacionado al bloqueo del influjo de calcio, elemento éste, indispensable para que se inicie la actividad contráctil del músculo liso (239). Llama la atención el hecho de que la motilidad espontánea esté presente en el conducto deferente de animales de 20 días de edad; puesto que en estos animales los niveles de testosterona plasmática son similares a los observados en los animales de 90 días (240). Pero el hecho, que la castración no haya sido capaz de potenciar la actividad espontánea observada en el animal normal, hace sospechar que la misma no responde en forma directa a la concentración de testosterona plasmática o que en estos animales no se hayan aún desarrollado los receptores sensibles a los efectos de la hormona.

Otro elemento a tener en cuenta, surge del hecho que la porción prostática del conducto deferente aislado proveniente de animales castrados de 90 días, no presente actividad espontánea como hubiera sido de esperar. Este fenómeno podría ser explicado debido a su proximidad anatómica con la glándula prostática, la que podría ejercer un efecto inhibitorio en dicha actividad mecánica.

Es sabido, que la glándula prostática segrega prostaglandinas (241) y estas parecerían ser inhibitoras de la actividad del conducto deferente ya que el mismo, es totalmente refractario a los efectos de dichas sustancias agregadas exógenamente (observación personal).

Cabe destacar, que la contractilidad desarrollada por el conducto deferente aislado de rata no es inhibida por el bloqueo de los adrenoreceptores alfa y beta, ni tampoco modificada por el bloqueo del receptor muscarínico; pero sí por drogas que inhiben el influjo de calcio. Esto sugiere una activación puramente miógena del tejido e independiente del factor neuronal (242).

Estas diferencias en la actividad miógena observadas en las dos regiones estudiadas del conducto deferente de rata y en las diferentes condiciones experimentales, no pueden ser atribuídas meramente a las modificaciones que sufre el tejido en las etapas madurativas o por la castración; ya que en los animales normales el peso del tejido fue incrementando con la edad mientras que la actividad espontánea fue disminuyendo.

Por su parte, en el animal castrado, la porción epididimaria no sufre modificaciones en su peso, mientras que la porción prostática disminuye su peso con respecto a la propia del animal normal, con lo cual podemos concluir que el incremento en la actividad mecánica inducida por la castración no guardaría una relación directa con el crecimiento del tejido.

Sistema nervioso colinérgico

Siendo el conducto deferente un tejido ricamente innervado por el sistema nervioso simpático y parasimpático, nos pareció de interés explorar la acción del neurotransmisor adrenérgico y colinérgico, como así también el efecto de sus bloqueantes específicos en la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de ratas en los diferentes estadios de maduración sexual en condiciones normales y castrados.

Según Sjöstrand y Klinge (243) la probable función de los nervios colinérgicos sería la secretomotora a nivel de las células secretorias. Esta función estaría en relación con su distribución anatómica en la muscular de la mucosa y en el epitelio secretor.

También sería un importante modulador de la actividad mecánica del músculo liso y del tono adrenérgico de este órgano por sus verdaderas sinapsis neuromusculares, sobre todo a nivel de la capa muscular circular, donde toma íntimo contacto con el sistema nervioso simpático (244, 245).

Mediante curvas acumulativas dosis-respuesta de Ach exógena, se pudo observar que la porción epididimaria del conducto deferente presenta una amplia reactividad hacia el agonista colinérgico, el cual, resultó ser dosis dependiente; dicho efecto estimulante fue comparable para los animales de 20, 50 y 90 días. A su vez, la deprivación hormonal de testosterona por la castración, no afectó la respuesta a dicho agonista en ninguna de las edades estudiadas.

El hecho de que la atropina haya bloqueado casi totalmente el efecto estimulante de Ach, habla a favor de la presencia de receptores muscarínicos postsinápticos en este tejido capaces de ser activados por el agonista específico.

Que la Ach estimula, "in vitro", a la porción epididimaria del conducto deferente aislado de rata, ha sido documentado por Kasuya y Suzuki (246); por otra parte estudios "in vivo" han demostrado que la estimulación del nervio hipogástrico y la Ach por si misma despierta actividad mecánica en el conducto deferente (247), pero mientras el efecto de la estimulación nerviosa fue inhibido por agentes bloqueantes ganglionares, el efecto del agregado exógeno de Ach fue suprimido por atropina; demostrándose así que el agonista colinérgico adicionado exógenamente actúa sobre el receptor muscarínico postsináptico.

Se pudo observar que las etapas madurativas del animal no tuvieron implicancia sobre la reactividad de la porción epididimaria del condu-

to deferente hacia Ach. Esto guarda una cierta relación con los estudios de Mohan y Radha (248) sobre el ritmo circadiano de la actividad de acetilcolinesterasa en el sistema nervioso central a diferentes edades del animal. Los mismos afirman que la actividad de la enzima, capaz de desdoblar e inactivar a la Ach. es de tipo unimodal entre los 20 y 90 días de edad del macho.

Si la acción de Ach. exógena depende de la velocidad en el ritmo de inactivación, podríamos explicar la falta de diferencias en sus efectos a los 20, 50 y 90 días, debido a que la actividad de la acetilcolinesterasa presenta un ritmo uniforme en las tres condiciones experimentales. La castración tampoco modificó las respuestas a Ach, hecho que era de esperar, ya que no fue sensible a las modificaciones de los niveles plasmáticos de testosterona en las distintas edades.

A diferencia de la porción epididimaria que respondió en forma constante y regular a los efectos de Ach, sea cual fuere la condición experimental, la porción prostática no fue capaz de responder al agonista colinérgico con ninguna de las concentraciones empleadas. Este hallazgo no guarda relación con lo documentado por Kasuya y Suzuki (246) en el conducto deferente aislado de rata.

Esta discrepancia puede ser atribuída a diferencias en las preparaciones utilizadas, ya que nosotros desechamos la región de transición o de unión entre la región epididimaria y prostática. Mientras, que dichos autores incluyen esta porción intermedia en sus modelos experimentales.

Sistema nervioso adrenérgico

El vaso deferente es ampliamente usado como modelo para el estudio de diferentes aspectos de los mecanismos adrenérgicos, debido a la rica inervación simpática de sus paredes musculares lisas (249).

Por su parte, el hecho que la densidad adrenérgica varíe en la porción prostática y epididimaria lo hace aún más interesante, porque en

un mismo órgano la función de una u otra porción podría estar supeditada a la mayor o menor cantidad de monoaminas simpáticas (72).

En el conducto deferente de rata la densidad adrenérgica y su contenido de NE sería mayor en la porción prostática (72, 249).

Estas marcadas diferencias observadas en la distribución noradrenérgica podrían ser útiles para analizar los efectos de la NE exógena en ambas porciones del conducto deferente.

En el presente trabajo, nosotros hemos analizado los efectos de NE exógena en la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de ratas de 20, 50 y 90 días normales y castrados.

Si analizamos los resultados obtenidos, mediante curvas acumulativas dosis-respuesta de NE exógena en animales normales de 90 días, podemos observar, que el agonista adrenérgico produjo un incremento de la tensión contráctil que fue dosis dependiente; este efecto no fue modificado por el previo bloqueo de los adrenorreceptores beta con un antagonista específico beta₁ como el practolol (250) ni tampoco en presencia de un antagonista beta₁ y beta₂ como el propranolol (168).

Por el contrario, el bloqueo de los adrenorreceptores alfa con regitina y fenoxibenzamina (251) inhibió dicho efecto estimulante de la NE.

De estos datos se desprende que la NE ejerce su acción estimulante sobre el conducto deferente aislado de rata al actuar sobre los adrenorreceptores alfa postsinápticos.

Estos resultados están avalados por recientes estudios realizados con radioligandos de alta actividad específica que señalan la existencia de una gran densidad de adrenorreceptores alfa en el conducto deferente (252), como así también los estudios realizados por Shoji en 1981 (253) quien comparando la afinidad de los receptores postsinápticos alfa a los diferentes bloqueantes específicos concluye que el agonista noradrenérgico tiene una alta afinidad selectiva por dichos receptores postsinápticos.

La respuesta del conducto deferente hacia el agregado del neurotransmisor adrenérgico fue variable, dependiendo de:

- La región en estudio
- La edad madurativa del animal
- El estado hormonal

En cuanto a la región en estudio, la porción epididimaria respondió con mayor afinidad y eficacia al agregado de NE exógena que la porción prostática; este fenómeno fue observado con tiramina por Vardolov y Pennenfater en 1976 (254).

Estas discrepancias en la respuesta de ambas porciones, podrían ser explicadas debido a las diferencias en la distribución de los terminales noradrenérgicos (72, 249). Como se señalara en su oportunidad, al tener la porción prostática mayor número de terminales adrenérgicos hace suponer que la velocidad de inactivación de la NE exógena a través de la captación neuronal debería ser mayor, lo que condicionaría el menor efecto del agonista en esta región.

Por el contrario, el hecho que en la porción epididimaria exista una menor inervación adrenérgica, la inactivación del neurotransmisor agregado exógenamente, vía captación neuronal sería menos relevante, acondicionando así, una mayor concentración de NE en la biofase y por ende en el receptor postsináptico.

La respuesta del conducto deferente a la NE exógena fue variable de acuerdo a la etapa madurativa del animal y dentro de este grupo, la reactividad de la porción epididimaria y prostática también fue heterogénea.

Analizando las curvas acumulativas dosis-respuesta de NE en la porción epididimaria proveniente de animales de 20, 50 y 90 días observamos que la reactividad hacia el agonista fue significativamente mayor a los 50 días de edad que a los 20 y 90. Adicionalmente los efectos estudiados a los 20 y 90 días fueron comparables.

Estas diferencias observadas en la acción estimulante de NE en las tres edades podrían estar relacionadas con cambios en la afinidad de los adrenorreceptores durante el proceso de maduración sexual de la rata, como se observó en la cápsula testicular del mismo animal (255),

en donde se observó incremento a NE, coincidiendo con el inicio de la espermatogénesis acaecida a los 50 días de edad.

Adicionalmente, el proceso de maduración sexual se halla en íntima relación con los niveles plasmáticos de testosterona, los que según Piacsek y Goodspeed (240), desde el día 20 en adelante, se incrementan llegando a su pico máximo en el comienzo de la pubertad (45-50 días) (256). Los niveles de dihidrotestosterona, por el contrario, comienzan a disminuir en esta etapa (201).

De este modo, el incremento en la sensibilidad a NE de la porción epididimaria del conducto deferente observada a los 50 días, estaría relacionada con un nivel alto de testosterona plasmática, la cual, aumentaría la afinidad de la NE hacia el adrenergico receptor alfa.

Este incremento en la respuesta contráctil a NE observada en las ratas a los 50 días de edad parecería no estar relacionado con un mayor desarrollo en el número de fibras musculares lisas, ya que la respuesta a Ach permaneció constante entre animales de 20, 50 y 90 días, a la vez que, la respuesta al agonista adrenergico fue similar a los 90 y a los 20 días.

Si bien la respuesta de la región epididimaria a la NE puede ser atribuida a factores hormonales, es difícil aplicar la misma correlación para la porción prostática.

Si analizamos dicho fenómeno, vemos que la reactividad hacia la NE en esta porción es inversamente proporcional a la edad del animal. Así, el efecto del neurotransmisor fue máximo a los 20 días, intermedio a los 50 y mínimo a los 90 días. Este tipo de hallazgo experimental se halla más en relación con la respuesta del conducto deferente de cobayo (239) en donde se muestra una mayor respuesta a la NE en animales maduros que en los inmaduros sexualmente y el tratamiento con testosterona en estos últimos, disminuye significativamente la sensibilidad y/o afinidad hacia el agonista.

Estos autores (239) sugieren, que en este efecto de testosterona estarían involucrados mecanismos que alteran la distribución y acumula-

ción de calcio. Este fenómeno coincide con nuestra hipótesis formulada en el presente estudio para la acción inhibitoria que ejerce testosterona sobre la actividad espontánea del conducto deferente aislado de rata.

Debido a las diferencias observadas entre la posible acción de testosterona sobre las respuestas a NE en las dos porciones estudiadas, quisimos explorar el efecto de la castración y la terapia de sustitución hormonal con testosterona en ambas porciones.

El análisis de los resultados experimentales demuestra que en la porción epididimaria la castración atenuó las respuestas al agonista adrenérgico a los 50 y 90 días y el tratamiento sustitutivo con propionato de testosterona impidió dicho efecto inhibitorio.

La reactividad de esta porción proveniente de animales de 20 días no se modificó en ninguna de las condiciones experimentales antes mencionadas.

Estos datos señalan que en esta región la testosterona produciría un efecto facilitador de las respuestas alfa adrenérgicas como lo demuestra el hecho que a los 50 días (cuando los valores plasmáticos de la hormona son altos), la reactividad a NE está aumentada. A su vez esta hiperactividad es inhibida por la castración y restaurada por el tratamiento de sustitución hormonal.

El hecho de que a los 20 días la sensibilidad de la porción epididimaria sea indiferente a la castración y a la sustitución hormonal, hace sospechar que en la etapa prepuberal los efectos de NE sean independientes de los niveles séricos del esteroide sexual. Esto se podría explicar, como ya se señalara para la actividad espontánea, por una falta en el desarrollo de receptores sensibles a la hormona en esta edad.

Por el contrario, en la región prostática la castración potenció el efecto de NE a los 50 y 90 días y la inyección de propionato de testosterona en el animal castrado abolió la acción potenciadora de la castración.

Estos resultados confirman aún mas el hecho, de que la testosterona se comportaría como un elemento inhibitorio de las respuestas alfa adrenérgicas en esta porción del conducto deferente aislado de rata.

Si este efecto es directo (239) o indirecto (inhibiendo la captación neuronal), en nuestras condiciones experimentales es muy difícil de dilucidar. Cualquiera sea la causa, farmacológicamente es lícito enunciar que en la porción prostática del conducto deferente de animales de 50 y 90 días, la castración lleva a un estado de hipersensibilidad postsináptica, posiblemente relacionada con un incremento en el número y/o distribución de los adrenorreceptores alfa postsinápticos o a una disminución del proceso de captación neuronal por un "estado de denervación" postcastración.

En vista de estos hallazgos, tratamos de determinar si las diferencias en la reactividad de ambas porciones hacia el neurotransmisor adrenérgico observadas en las diferentes edades de maduración sexual, se hallaba vinculada directa o indirectamente a la magnitud de los procesos de inactivación de catecolaminas, tales como, captación neuronal, captación extraneuronal y degradación enzimática vía COMT.

Para el estudio de la captación neuronal se escogió desipramina, su elección fue decidida debido a su conocida eficacia como bloqueante de este mecanismo (257), hecho avalado por muchos investigadores. Así, Trendelenburg (258) afirmó que la ruta más importante para la inactivación de las catecolaminas endógenas y exógenas es el mecanismo de captación por el terminal nervioso simpático, y que aquellas drogas que bloquean dicho mecanismo, producen hipersensibilidad a la NE, por interferir precisamente con su metabolización, y de esta manera, permitir una mayor concentración de la amina para que se acumule en la vecindad del receptor.

El efecto presináptico específico de desipramina es similar al producido por cocaína (258).

La inhibición de la captación neuronal de aminas por la desipramina ha sido demostrada en muchos tejidos, tales como; corazón perfundido de

rata y cobayo (259, 119); cerebro de rata (261, 260) y conducto deferente de rata (262); y ciertamente en todos ellos produjo una hipersensibilidad a NE exógena, desviando la curva dosis-respuesta del agonista adrenérgico hacia la izquierda.

Cabe destacar, que la desipramina fue utilizada a una concentración que bloquea específicamente la captación neuronal (10^{-7} M), ya que la droga a concentraciones más altas (10^{-5} M) puede comportarse como un bloqueante de los adrenorreceptores alfa (257, 262).

Evidentemente a la luz de los resultados obtenidos en este estudio, la droga se comportó como un bloqueante de la captación y no como un antagonista alfa adrenérgico, ya que potenció los efectos de la NE exógena.

Para estudiar la degradación enzimática, vía COMT, de la NE exógena se utilizó el U-0521, droga capaz de inhibir dicha enzima (264, 263).

La influencia de la inhibición de la COMT, ha sido motivo de varios estudios. Potter (263) demostró en corazones autotransplantados con terminaciones nerviosas degeneradas, que la inactivación de la NE dependía de su degradación extraneuronal a cargo de la COMT.

Por su parte Giles y Miller (264) han presentado evidencias de que el U-0521 potencia la acción inotrópica positiva de NE y que este efecto se debe a la inhibición competitiva que ejerce la droga sobre la COMT. Evarts (266) observó que los derivados 3-metoxilados de NE, como la NMN, que es el producto de biotransformación de la misma por acción de la COMT, pueden incrementar la concentración de epinefrina en la vecindad del receptor por impedir su biotransformación en metanefrina, la cual, es un producto relativamente inactivo.

Kaumann (267), estudió la sensibilidad producida por el U-0521 sobre la respuesta del músculo papilar del gato hacia NE, isoproterenol, tiramina y estimulación eléctrica; observando en general que las curvas dosis-respuesta se desviaban hacia la izquierda. Esta potenciación fue también observada por Giles y Miller (263) y por otros investigadores

con el pirogalol (268).

Otro camino metabólico de la NE exógena que se exploró fue la captación extraneuronal.

Como ya se señalara con anterioridad (ver Introducción), este es un proceso activo diferente, por el cual el tejido es capaz de captar a la NE, la cual, a su vez será atacada por COMT transformándola en NMN y metanefrina (117, 123).

A su vez, tanto la NMN como la metanefrina mostraron una gran efectividad para inhibir el proceso de captación extraneuronal o captación de la NE exógena y endógena. Cabe destacar que este proceso no es abolido por la denervación, demostrando que es un proceso postsináptico (123); se pone en evidencia cuando las concentraciones de NE son altas (más de 1µg/ml), proceso que acontece cuando ya está saturada la captación neuronal.

Pasaremos a analizar la influencia del bloqueo de los distintos procesos involucrados en la inactivación de la NE exógena, en las distintas edades de maduración sexual, tanto en condiciones normales como durante la castración, de la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de rata.

Si analizamos los datos obtenidos de los conductos deferentes de ratas de 20 días de edad, podemos concluir que el bloqueo de la captación neuronal por desipramina potenció la curva dosis-respuesta de NE en todos sus puntos. Esta potenciación se observó tanto en animales normales como en castrados y en la porción epididimaria y prostática del conducto deferente de ambos grupos experimentales.

Por el contrario, tanto la inhibición de la captación extraneuronal por la NMN, como el bloqueo de la actividad de COMT con el U-0521, no fueron capaces de modificar la acción de la NE exógena, cualquiera haya sido el modelo experimental utilizado. Así, la preincubación con los bloqueantes antes mencionados no alteraron la curva dosis-respuesta de NE en ambas porciones del conducto deferente de animales normales y castrados de 20 días de edad,

Estos resultados permiten afirmar que en los animales de 20 días, la presencia de actividad espontánea, la reactividad a Ach y a NE serían independientes de los niveles plasmáticos de testosterona, como lo demuestra la ineficiencia de la castración en estos animales. Por otra parte, existiría un importante proceso de captación neuronal de NE exógena que no se modifica con la castración.

La degradación enzimática, vía COMT, y la captación extraneuronal no serían relevantes para la inactivación del neurotransmisor en esta etapa de maduración sexual.

Estas diferencias en la eficacia de las vías metabólicas de la NE a favor de la captación 1 fueron señaladas ya por Trendelenburg (258), pero en el caso del animal prepúber podría estar relacionada con una falta de desarrollo de la masa muscular en relación a la densidad de las terminales nerviosas.

Llama la atención que la potenciación ejercida por la inhibición de la captación neuronal resultara ser mayor en la porción epididimaria que en la porción prostática, lo que hace suponer que la distribución de los terminales adrenérgicos a favor de esta última, en los animales adultos (249), no sería aplicable en los animales inmaduros de 20 días.

Si analizamos los resultados obtenidos en los animales de 50 días, se puede observar que la desipramina potenció la acción excitatoria de la NE exógena en ambas porciones del conducto deferente de animales normales y castrados.

La hipersensibilidad obtenida en el animal normal fue significativamente mayor en la región prostática con respecto a la epididimaria, resultado que coincide con el concepto de que la distribución adrenérgica es mayor en la primera porción (249).

Además el bloqueo de la captación 2 y la inactivación de la COMT, no modificaron la reactividad hacia la NE exógena en ninguna de las porciones estudiadas ni en los dos grupos experimentales considerados.

Estos resultados nos permiten postular que la porción epididimaria

y la porción prostática del conducto deferente de animales de 50 días de edad, responden en forma distinta a la NE exógena, siendo la primera mucho más sensible al neurotransmisor que la segunda.

La castración, produce hiposensibilidad al agonista adrenérgico en la porción epididimaria e hipersensibilidad en la porción prostática. La hiposensibilidad podría estar relacionada con una exaltación en la captación neuronal, por el contrario, la hipersensibilidad no podría relacionarse con modificaciones en los mecanismos de inactivación de NE ya que el bloqueo de la captación neuronal potencia los efectos del neurotransmisor en el animal castrado, sino a una hipersensibilidad del receptor postsináptico.

De los resultados obtenidos con el bloqueo de la inactivación de NE exógena en los animales de 90 días de edad, se puede deducir que en la porción epididimaria del animal normal se encuentran presentes los tres mecanismos de inactivación estudiados. En la porción prostática el único mecanismo puesto en evidencia es la captación neuronal.

Estos resultados están avalados por el hecho que en la porción epididimaria, la desipramina, la NMN y el U-0521, potenciaron los efectos de la NE exógena. En la región prostática sólo la desipramina tuvo efecto potenciador.

En lo que a la castración se refiere, observamos una exaltación de todos los procesos de inactivación de NE exógena en las dos porciones consideradas. Estos datos están confirmados por el hecho que la porción epididimaria y la porción prostática respondieron con hipersensibilidad hacia el agregado de NE en presencia de desipramina, NMN y U-0521.

Cabe destacar, que el mecanismo que adquiere mayor magnitud en el animal castrado de 90 días es la captación 1 para ambas porciones. La captación 2 y la actividad de COMT son menos relevantes.

A su vez, en la región prostática, donde normalmente el bloqueo de la captación extraneuronal y de la COMT no tiene efecto, la castración

los pone en evidencia.

De estos datos podemos concluir que la porción epididimaria del conducto deferente proveniente de un animal de 90 días es más reactiva a la influencia de la NE exógena que la porción prostática. La castración despierta hiposensibilidad en la porción epididimaria relacionada posiblemente con la deprivación de testosterona, que exalta todos los mecanismos de inactivación explorados. Por el contrario, en la porción prostática, la castración produce hipersensibilidad del tejido a la NE exógena. Este fenómeno no puede ser relacionado con alteraciones en los mecanismos de inactivación del neurotransmisor, ya que estos se encuentran exaltados por la castración. Farmacológicamente es lícito atribuirlo a la postsinapsis, designándolos como "hipersensibilidad alfa postsináptica", como fue observado con el isoproterenol en iguales circunstancias (242).

Si relacionamos los resultados obtenidos en los animales de 20, 50 y 90 días de edad, podemos sintetizar infiriendo que:

- a) en el animal prepúber tanto la actividad espontánea como el efecto de los agonistas adrenérgicos y colinérgicos son idénticos en condiciones normales y castrados e independientes de la región estudiada.
- b) los animales púberes y adultos se caracterizan por ausencia de actividad espontánea que la castración pone de manifiesto. En ellos, la testosterona se comporta como un inhibidor de dicha actividad. La respuesta a Ach es independiente de la condición hormonal y de la región en estudio. Los efectos de NE varían con la región y la condición hormonal. El agonista adrenérgico tiene mayor efecto en la porción epididimaria que en la porción prostática. La castración produce hiposensibilidad hacia la NE exógena en la porción epididimaria por exaltar los mecanismos de su inactivación. Por el contrario, en la porción prostática, la castración lleva a una hipersensibilidad postsináptica, independiente de la magnitud de los procesos de inactivación del neurotransmisor adrenérgico.

CONCLUSIONES

En el presente estudio hemos analizado varios aspectos funcionales básicos de la actividad mecánica del conducto deferente aislado de rata, tales como, la actividad espontánea, la influencia de agonistas adrenérgicos y colinérgicos y de sus respectivos bloqueantes y cómo estas funciones están comprometidas con el estado hormonal, ya sea a través de la correlación con las diferentes etapas de crecimiento del animal, con el efecto de la castración y con el tratamiento sustitutivo con propionato de testosterona.

Por último, con el objeto de ofrecer una hipótesis tentativa de los mecanismos regulatorios, por el cual la actividad adrenérgica puede ser modulada por el estado hormonal del animal, se estudió el efecto del bloqueo de los distintos procesos involucrados en la inactivación del neurotransmisor adrenérgico en los diferentes estadios de desarrollo de la rata en condiciones normales y post-castración.

Todos estos estudios se llevaron a cabo en dos porciones bien diferenciadas del conducto deferente de rata, tales como, la región epididimaria y prostática respectivamente.

Se pudo verificar que la actividad espontánea del conducto deferente aislado de rata está supeditada no sólo a la región en estudio sino también a la edad del animal y a la deprivación de testosterona.

El análisis de dicha actividad contráctil nos permitió comprobar que:

- a) es de tipo miógena e independiente de mecanismos adrenérgicos y colinérgicos.
- b) en la etapa prepuberal está presente tanto en el animal normal como en el castrado, es similar en ambas porciones y no guarda relación con los niveles de testosterona.
- c) en la etapa puberal y en el animal adulto no se observa actividad espontánea de la porción epididimaria y prostática proveniente de animales normales, pero la castración despierta actividad espontánea en



ambas preparaciones. Concluimos que, la testosterona actúa como un inhibidor de dicha actividad miógena del tejido.

El análisis de las respuestas del conducto deferente aislado de rata hacia Ach actuando sobre el receptor muscarínico nos permite postular:

- a) que la porción prostática no responde a Ach.
- b) que la porción epididimaria fue sensible a los efectos del agonista colinérgico.

Estas respuestas resultaron ser independientes de la etapa madurativa del animal, y no fueron modificadas por la castración.

Por último los efectos de NE exógena, guardaron una íntima relación con la edad del animal, la castración y los procesos involucrados en su inactivación, como así también, variaron con la región del conducto deferente considerada.

Respecto a la edad, la porción epididimaria de los deferentes de ratas prepúberes fueron igualmente sensibles a la acción de NE exógena que la de los animales adultos. Los animales púberes mostraron una mayor reactividad al agonista adrenérgico que la de los dos grupos antes mencionados.

El incremento de la afinidad hacia la NE de estos animales puede ser atribuido a un pico de testosterona plasmática que ocurre durante la pubertad.

La respuesta hacia la NE exógena de la región prostática, va disminuyendo con la edad existiendo un tipo de correlación negativa entre los niveles de testosterona plasmática y la respuesta alfa adrenérgica de NE.

La castración no modifica los efectos de NE en los animales prepúberes. Durante la pubertad y el animal adulto, el efecto de la castración varía de acuerdo con la porción del conducto deferente en estudio.

En la porción epididimaria, la castración, produce una hiposensibilidad a la adición de NE, mecanismo posiblemente relacionado con una

exaltación de los procesos involucrados en la inactivación de la NE exógena.

Por el contrario, en la porción prostática la castración llevaría a un estado de hipersensibilidad alfa postsináptica, que es independiente de los fenómenos de metabolización de NE; Esto en última instancia conduciría a un incremento en la concentración del neurotransmisor a nivel del adrenergico receptor alfa.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen la implicancia de servir como base y modelo experimental, para el estudio "in vitro" de los órganos reproductores masculinos de mamíferos domésticos.

Es bien conocido que en la patología reproductiva de los animales domésticos las alteraciones hormonales tienen gran relevancia. En este estudio se postula como factor principal o adicional, la disfunción nerviosa local o periférica, que actuaría no solo modificando las respuestas musculares, sino también las secreciones de sustancias locales y hormonas relacionadas con el sistema simpático y parasimpático.



RESUMEN

Se estudió la motilidad y la influencia de agonistas adrenérgicos y colinérgicos en la porción epididimaria y prostática del conducto deferente aislado de ratas prepúberes, púberes y adultas, normales y castradas.

En prepúberes, la motilidad y las respuestas farmacológicas no se modificaron con la castración. En púberes y adultas la motilidad ausente, aparece con la castración.

La acción de NE fue mayor en la porción epididimaria que en la prostática. La castración disminuye la acción de NE en la primera por exaltar su inactivación, opuestamente, en la prostática, produce hipersensibilidad postsináptica independiente de su inactivación.



SUMMARY

The spontaneous activity and the influence of adrenergic and cholinergic agonists on the epididymal and prostatic portions of the vas deferens from prepuber, puber and adults male rats were studied.

The spontaneous activity and the pharmacological responses were not modified by castration in prepuber rats.

Vasa deferentia from puber and adult rats did not have any spontaneous activity, but it was elicited by castration.

The effect of norepinephrine was higher in the epididymal portion than in the prostatic ones.

Castration induced an hyposensitivity to norepinephrine on the epididymal portion, probably associated with an exaltation of the mechanisms involving norepinephrine inactivation,

On the prostatic portion, castration, induced postsynaptic hypersensitivity that was independent of norepinephrine inactivation.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. W.', located in the bottom right corner of the page.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - HAMILTON, D.W. y COOPER, T.G., Gross and histological variations along the length of the rat vas deferens., Anat. Rec. 190:795-810 (1978).
- 2 - NEAVES, W.B., Biological aspect of vasectomy., Endocrinology 5:383-404 (1975).
- 3 - RICHARDSON, K.C., The fine structure of autonomic nerve endings in smooth muscle of the rat vas deferens., J. Anat. 96:427-442 (1962).
- 4 - HARRINSON, R.G. The urogenital system., Edited by ROMANES, G.J. London, Oxford, Univ. Press. 503-556 (1972).
- 5 - HODSON, N. The nerves of the testis, epididymis and scrotum. en: The testis., Edited by JOHNSON, A.D. New York, Acad. Press., pp. 47-100 (1970).
- 6 - FLICKINGER, C.J., Regional variation in endoplasmic reticulum in the vas deferens of normal and vasectomized rats., Anat. Rec. 176:205-224 (1973).
- 7 - FRIEND, D.S. y FARQUHAR, M.G., Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens., J. Cell. Biol. 35:357-376 (1967).
- 8 - SHELTON, J. y JONES, A.L. Ultrastructural changes in mouse adrenal cortex associated with low and high sodium diets., Anat. Rec. 163:252-258 (1969).
- 9 - KORMANO, M. Microvascular structure of the rat epididymis., Ann. Med. Exp. Fenn. 46:118- (1968).
- 10 - SJÖSTRAND, N.D., The adrenergic innervation of the vas deferens and the accesory male genital glands., Acta Physiol. Scand. 65: (suppl. 257) 1-82 (1965).
- 11 - WALDSCHMIDT, M. y KARG, H. Review of metabolic and enzymic studies of spermatozoa from the ampullae ductus deferentiae of bulls Adv. Biosci. 10:169-180 (1973).

- 12 - TISCHNER, M. The role of the vasa deferentia and the urethra in the transport of semen in rams., Acta Agrar. Silvestria Series Zootechnica 12:77-113 (1972).
- 13 - VENTURA, W.P., FREUND, M., DAVIS, J. y PANNUTI, C., Influence of norepinephrine on the motility of the human vas deferens a new hypothesis of sperm transport by the vas deferens., Fertility and Sterility., 24:68-77 (1973).
- 14 - WILHELM, S., Observations on emptying of vasa deferentia and seminal vesicles., J. Urol., 34:284-287 (1935).
- 15 - WAITES, G.M.H. y SETCHELL, B.P., Physiology of the testes, epididymis and scrotum., en: Advances in reproductive physiology., Ed. by McLAREN, A., London L. Press., pp. 1-63 (1969).
- 16 - SIMEONE, F.A. y YOUNG, A., Study of the function of the epididymis the fate of non ejaculated spermatozoa in the genital tract of the male guinea pig., J. Exptl. Biol., 8:163-175 (1931).
- 17 - MANN, T., The biochemistry of semen and of the male reproductive tract., London.L. Press. by McLaren, pp 1-63 (1969).
- 18 - RAJALAKSHMI, M. y PRASAD, M.N.R., Changes in the sialic acid content of the accessory glands of the male rat., J. Endocrinol., 41:471-476 (1968).
- 19 - HAMILTON, D.W., The mammalian epididymis., en: Reproductive Biology., Ed. by BALIN, H. y GLASSER, S., Amsterdam: Exc. Med. Found, pp. 268-337 (1972).
- 20 - MOUTSCHEN, I., Nature of some components of epididymis and ductus deferens secretion in mouse., Experientia, 28:893-894 (1972).
- 21 - FREUND, M. y DAVIS, J., Disappearance rate of spermatozoa from the ejaculate following vasectomy., Fertility and Sterility., 20:163-170 (1969).
- 22 - DUBOIS-REYMOND, E., Gesammelte abhagen zur allgemeinen muskel und nervenphysik., Vol. II Veit. Leipzig., Cita: NACHMANSOHN, D. Structure and function of muscle., Acad. Press: pp. 2-199 (1960).

- 23 - DIXON, W.E., Med. Mag. 16: 454 (1907). Cita: GOODMAN L.S. Y GILMAN, A., The pharmacological basis of therapeutcics. 4^{ta} ed. Ed: MacMillan. pp. 409 (1970).
- 24 - HUNT, R. y TRAVEAU, R., Cita: DALE, H., The effects of a number of derivates of choline and analogous compouds on the blood pressure. U.S. Hyg. Lab. Bull. N°73, Washington D.C. (1911).
- 25 - DALE, H.H., The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine., J. Pharmacol. Exp. Ther., 6:147-190 (1914).
- 26 - EWINS, A.J., Bioch. J., 8:44-52 (1914). Cita: NACHMANSOHN, D., The structure and function of muscle. Academic. Press. 2:199-302 (1960).
- 27 - LOEWI, O., Pflugers Arch. Ges. Physiol. 189:239 (1921). Cita: NACHMANSOHN. D., The structure and function of muscle. Academic. Press., 2:199-302 (1960).
- 28 - DALE, H.H. y FELDBERG, W., Release of acetylcholine at voluntary motor nerve ending., J. Physiol. (Lond)., 86:353-389 (1934).
- 29 - FELDBERG, W. y GACCUM, J.H., The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion., J., Physiol. (Lond)., 81:309-319 (1934).
- 30 - BROWN, G.L. y FELDBERG, W., J. Physiol. (Lond)., 87:394-405 (1936). Cita: NACHMANSOHN, D., The structure and function of muscle., Academic. Press., 22:199-302 (1960).
- 31 - BIRKS, R.I. y MacINTOSH, F.C., Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion., Can. J. Biochem. Physiol., 39:787-827 (1961).
- 32 - NACHMANSOHN, D., Chemical and molecular basic of nerve activity. Academic. Press, Inc. New York, (1959).
- 33 - AUGUSTINSSON, K.B., Classification and comparative enzymology of the cholinesterases and methods for their determination in cholinesterases and anticholinesterases agent., 15:Springer-Verlag . Berlin, Ed: KOELLE, G.B., pp. 89-120 (1963).
- 34 - KATZ, B., Nerve, muscle and synapse. Mac. Graw-Hill Boock. Co. New York (1966).

- 35 - BIRKS, R.I., HUXLEY, H.E. y KATZ, B., The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. J. Physiol. (Lond) 150: 134-144 (1960)
- 36 - WASER, P.G. Cholinergic mechanism. Ed: Waser, P.G., Raven Press (1975)
- 37 - CASTILLO, J. del y KATZ, B. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. J. Physiol. (Lond) 124:574-585 (1954)
- 38 - FATT, P. y KATZ, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve ending. J. Physiol. (Lond) 117:109-128 (1952)
- 39 - GRAHAN, J.D.P., KATIB, A.L. y SPRIGGS, T.L.B. The isolated hypogastric nerve vas deferens preparation of the rat. Br. J. Pharmacol. Chemoter. 32:34-45 (1968)
- 40 - BURN, A.H. y RAND, M.J. Sympathetic postganglionic cholinergic fibers. Br. J. Pharmacol. 15:56-66 (1960)
- 41 - BULBRING, E. The action of humoral transmitter on smooth muscle. Br. Med. Bull. 13:172-175 (1957)
- 42 - BURNSTOCK, G. y PROSSER, C.L. Conduction in smooth muscles: comparative electrical properties. Am. J. Physiol. 199:553-559 (1960)
- 43 - MARSHALL, J.M. Effects of estrogen and progesterone on single uterine muscle fibers in the rat. Am. J. Physiol. 197:935-942 (1959)
- 44 - BURNSTOCK, G. y HOLMAN, M.E. The transmission of excitation from autonomic nerve to smooth muscle. J. Physiol. (Lond) 155:115-133 (1961)
- 45 - BULBRING, E. y KURIYAMA, H. Effects of changes in the external sodium and calcium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of guinea pig taenia coli. J. Physiol. (Lond) 166:29-58 (1963)

- 46 - BURNSTOCK, G., The action of adrenaline on excitability and potential in the taenia coli of the guinea-pig and the effect of DNP on this action and the action of acetylcholine., J. Physiol. (Lond.), 143:183-194 (1958).
- 47 - DURBIN, R.P. y JENKINSON, D.H., The effect of carbachol on the permeability of despolarized smooth muscle to inorganic ions., J. Physiol. (Lond.), 157:74-89 (1961).
- 48 - BOLTON, T.B., Cholinergics mechanisms in smooth muscle. Br. Med. Bull., 35:275-283 (1979).
- 49 - LEE, T.P., KUO, J.F. y GREENGARD, P., Role of muscarinic cholinergic receptors in regulation of guanosine 3':5'-monophosphate content in mammalian brain, heart muscle and intestinal smooth muscle., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69:3287-3291 (1972).
- 50 - JAFFERJI, S.S., MICHEL, R.H. y SHAMSHOD, S., Muscarinic cholinergic stimulation of phosphatidyl-inositol turnover in the longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum., Biochem. J., 154:653-657 (1976).
- 51 - CANESA de SCARNATI, O. y LAPETINA, E., Adrenergic stimulation of phosphatidyl-inositol labelling in rat vas deferens. Biochem. Biophys. Acta, 360:298-305 (1974).
- 52 - LANGLEY, J.N., Observation on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies., J. Physiol. (Lond.), 27:237-256 (1901)
- 53 - ABEL, J.J., Hoppe seyler Z. Physiol Chem., 28:318 (1899). Cita:
 , READER, R. y PHIL, D., Circulat. Res. 21 (suppl.3):1
 (1967).
- 54 - ELLIOT, T.R., The action of adrenalin., J. Physiol. (Lond.), 32:
 401-467 (1905).
- 55 - STÖLZ, F., Ber. d. Tsch. Chem. Ges., 37: 4149 (1966). Cita: GOODMAN
 L.S. y GILMAN, A., The pharmacological basis of therapeutics.
 p. 399 (1965).
- 56 - BARGER, G. y DALE, H.H., Chemical structure and sympathomimetic action of amines., J. Physiol. (Lond.). 41:19-59 (1910).

- 57 - CANNON, W.B. y URIDIL, J.E., Studies on the conditions of activity in endocrine glands., Am. J. Physiol., 58:353-354 (1921).
- 58 - CANNON, W.B., Organization for physiological homeostasis. Physiol Rev., 9:399-431 (1929).
- 59 - BACQ, Z.M., Ann Physiol. Physico-Chem. Biol., 10:467 (1934). Cita: STJÄRNE, L., Studies os catecholamine uptake and storage and release mechanisms., Acta Physiol. Scand. 62: (suppl. 228) 1-97 (1964).
- 60 - RAAB, W., Adrenaline an related susbstances in blood and tissues. Biochem. J., 37:470-473 (1943).
- 61 - EULER, V.S. von, A specific sympathomimetic ergone in adrenergic fibers (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline., Acta Physiol. Scand., 12:73-97 (1946).
- 62 - CARLSSON, A.; FALCK, B. y HILLARP, N.A., Cellular localization of brain monoamines., Acta Physiol. Scand., 56:(suppl.196) 6-28 (1962).
- 63 - GOODALL, Mc.C., Studies of adrenaline and noradrenaline in mammalian heart and suprarenals., Acta Physiol. Scand., 24:(suppl 85) 1-51 (1951).
- 64 - BLASCHKO, H. y WELCH, A.D., Arch. Exp. Phat. Pharmak., 219:17-26 (1953). Cita: EULER, V.S. von., 20 years of adrenaline, Sec. Catecholamine Symposium. Milán (Italy), July(1965). Pharmacol. Rev. 18:29-38 (1966).
- 65 - EULER, U.S. von., The distribution of sympathin N and sympathin A in spleen and splenic nerve of cattle., Acta Physiol. Scand. 19: (207-214 (1962).
- 66 - POTTER, L.T. y AXELROD, J., Intracellular localization of catecholamines in tissues of the rat., Nature (Lond.) 194:581-582 (1962).
- 67 - STJÄRNE, L., Studies of catecholamine uptake and storage and release mechanisms. Acta Physiol. Scan. 62:(suppl.228) 1-97 (1964).

- 68 - LANGLEY, J.N. y ANDERSON, H.K., The innervation of the pelvic and adjoining viscera., J. Physiol. (Lond.), 20:372-406 (1896).
- 69 - LANGLEY, J.N. y ANDERSON, H.K., The constituents of the hypogastric nerves., J. Physiol. (Lond.), 17:177-191 (1894).
- 70 - GRUNDFEST, H. y GASSER, H.S., Properties of mammalian nerve fibers of slowest conduction., Amer. J. Physiol., 123:307-318 (1938).
- 71 - SJÖSTRAND, N.O., Inhibition by ganglionic blocking agents of the motor response of the isolated guinea-pig vas deferens to hypogastric nerve stimulation., Acta Physiol. Scand., 56:306-315 (1962).
- 72 - SJÖSTRAND, N.O., Effect of reserpine and hypogastric denervation on the adrenaline content of the vas deferens of the guinea-pig Acta Physiol. Scand., 56:376-380 (1962).
- 73 - FALCK, B., Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method., Acta Physiol. Scand., 56:(suppl. 197)6-25 (1962).
- 74 - FALCK, B., HAGGENDAL, J. y OWMAN, Ch., The localization of adrenaline in the adrenergic nerves in the frog., Quart. J. Exp. Physiol. 48:253-257 (1963).
- 75 - FALCK, B. y SJÖSTRAND, N.O., Peripherally located adrenergic neurons innervating the vas deferens and the seminal vesicle of the guinea-pig., Experientia (Basel) 21:98-100 (1965).
- 76 - MERRILESS, N.C.R., BURNSTOCK, G. y HOLMAN, M.E., Correlation of fine structure and Physiology of the innervation of smooth muscle in the guinea-pig vas deferens., J. Cell.Biol. 19:529-550 (1963).
- 77 - FERRY, C.B., The innervation of the vas deferens of the guinea-pig., J. Physiol. (Lond.), 166:16-23 (1963).
- 78 - KURIYAMA, H., Electrophysiological observations on the motor innervation of the smooth muscle cells in the guinea-pig vas deferens., J. Physiol. (Lond.), 169:213-228 (1963).
- 79 - BIRMINGHAM, A.T. y WILSON, A.B., Preganglionic and postganglionic stimulation of the guinea-pig isolated vas deferens preparation., Br. J. Pharmacol. 21: 569-580 (1963).

- 80 - BLASHKO, H. y HELLE, K., Interaction of soluble protein fractions from bovine adrenal medullary granules with adrenaline and adenosinetriphosphate., *J. Physiol. (Lond.)*., 169:120-142 (1963).
- 81 - ERÄNKÖ, O. y HARKONEN, M., Histochemical demonstration of fluorogenic amines in the cytoplasm of sympathetic ganglion cells of the rat., *Acta Physiol. Scand.*, 58:285-285 (1963).
- 82 - EULER, U.S. von y LISHAJKO, F., Catecholamine release and uptake in isolated adrenergic nerve granules., *Acta Physiol. Scand.*, 57:468-480 (1963).
- 83 - EULER, U.S. von y LISHAJKO, F., Free and bound noradrenaline in the rabbit heart., *Nature (Lond.)*., 205:179-180 (1965).
- 84 - STJARNE, L., Studies of noradrenaline biosynthesis in nerve tissue., *Acta Physiol. Scand.*, 67:441-454 (1966).
- 85 - AXELROD, J., HERTTING, G. y POTTER, L., Effect of drugs on the uptake and release of H^3 norepinephrine in the rat heart., *Nature (Lond.)*., 194:297 (1962).
- 86 - BLASHKO H., The specific action of L-dopa-decarboxylase., *J. Physiol. (Lond.)*., 96:50p-51p (1939).
- 87 - GURIN, S. y DELLUVA, A., The biological synthesis of radioactive adrenalin from phenylalanine., *J. Biol. Chem.*, 170:545-550 (1947).
- 88 - KOPIN, J.J. y SILBERSTEIN, S.D., Axons of sympathetic neurons: transport of enzyme in vivo and properties of axonal sprouts in vitro., *Pharmacol. Rev.* 24:245-251 (1972).
- 89 - OCHS, S. y WORTH, R.M., Axoplasmic transport in normal and pathological systems., En: *Physiology and pathobiology of axons.*, WAXMAN, S.G. (ed)., Raven Press, New York, p. 251 (1978).
- 90 - NAGATSU, T., LEVITT, M. y UDENFRIEND, S., Tyrosine hydroxylase, the initial step in norepinephrine biosynthesis., *J. Biol. Chem.* 239:2910-2917 (1964).
- 91 - LEVITT, M., SPECTOR, S., SJOERSMAN, A. y UDENFRIEND, S., Elucidation of the rate-limiting-step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 148:1-8 (1965).

- 92 - COSTA, E. y NEFF, N.H., Stimulation of turnover rates to study the metabolic regulation of the steady state level of neuronal monoamines. En: Hand boock of Neuchemisthry., LAJTHA, A. (ed).., Plenum Press, New York., p. 45 (1978).
- 93 - MAYER, S., Drugs acting at synaptic and neuroeffector functional sites., En: The Pharmacological Basis of Therapeutics., GOODMAN, L.S. y GILMAN, A. (eds).., 5^{ta} ed. (1980).
- 94 - ANTON, A.H. y SAYRE, D.F., The distribution of dopamine and dopa in various animals and a method for their determination in diverse biological material., J. Pharmacol. Exp. Ther., 145:326-343 (1964).
- 95 - COYLE, J.T. y AXELROD, J., Dopamine β -hidroxylase in the rat brain. developmental characteristic., J. Neuropharmacol., 19:449 (1972).
- 96 - ROSENBERG, R.C. y LOVENBERG, W., Dopamine B-hidroxylase. En: Essays in Neurochemisthry and Pharmacology., YODIN, M.B., LOVENBERG, W., SHARMAN, D. y LAQUADA, J. (eds.). p. 163 (1980).
- 97 - CARLSSON, A. e HILLARP, N.Å., Formation of phenolic acids in brain after administration of 3,4 dihidroxifenilalanine., Acta Physiol. Scand., 55:95-100 (1962).
- 98 - KOPIN, I.J. y GORDON, E.K., Metabolism of norepinephrine ³H released by tyramine and reserpine., J. Pharmacol. Exp. Ther., 138: 359-368 (1962).
- 99 - KOPIN, I.J. y GORDON, E.K., Metabolism of administered and drug released norepinephrine-1 H³ in the rat., J. Pharmacol. Exp. Ther. 140:207-216 (1963).
- 100 - SPECTOR, S., KUNTZMAN, R., SHORE, P.A. y BRODIE, B.B., Evidence for release of brain aminas by reserpine in presence of monoamine oxidase in norepinephrine metabolism in brain., J. Pharmacol. Exp. Ther., 130:8-17 (1960).
- 101 - TRENDELEMBURG, U., Modification of the effect of tyramine by various agents and procedures., J. Pharmacol. Exp. Ther. 134: 8-17 (1961).

- 102 - AXELROD, J., O-methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo., *Science.* , 126:400-401 (1957).
- 103 - KOPIN, I.J., HERTTING, G. y GORDON, E.K., Fate of norepinephrine H^3 in the isolated perfused rat heart., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 138:34-40 (1962).
- 104 - IVERSEN, L.L. y WHEBY, L.G., Retention of injected catecholamines by the mouse., *Br. J. Pharmacol.*, 19:355-364 (1962).
- 105 - SCHUMANN, H.J. y PHILIP, A., Release of catecholamine from isolated medullary granules by sympathomimetic amines., *Nature (Lond.)* 193:890-891 (1962).
- 106 - SMITH, A.D. y PHIL, M.A., Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves., *Br. Med. Bull.*, 29:123-129 (1973).
- 107 - GROBECKER, H., HOLTZ, P., PALM, D., BAK, I. y HASSLER, R., In vitro lysis of erythrocytes and chromaffine granules by prenylamine. *Experientia*, 24: 701-703 (1968).
- 108 - THOA, N., WOOTEN, G.F., AXELROD, J. y KOPIN, J., On the mechanism of release of norepinephrine from sympathetic nerves induced by despolarizing agents and sympathomimetic drugs., *Mol. Pharmacol.* 11:10-18 (1975).
- 109 - BACQ, Z.M. Les contrôles de la libération des médiateurs aux terminaisons des nerf adrénergiques. *J. Physiol. (Paris)* 72:423-451 (1976)
- 110 - FILLENZ, M. y HOWE, P.R.C., The contribution of small and large vesicles to noradrenaline release., *J. Physiol (Lond.)*, 212:42p-43p (1971).
- 111 - BURN, J.H., The action of tyramine and ephedrine., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 46:75-95 (1932).
- 112 - WHITBY, L.G., AXELROD, J. y WEIL-MALHERBE, H., The fare of H^3 norepinephrine in animals., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 132:193-201 (1961).

- 113 - COYLE, J.T. y SNYDER, S.H., Catecholamine uptake by sinaptosomes in homogenates of rat brain: stereospecificity in different areas. J. Pharmacol Exp. Ther. 170: 221-231 (1969).
- 114 - JARROT, B., Uptake and metabolism of catecholamines in the perfused hearts of different species., Br. J. Pharmacol. 38: 810-821 (1970).
- 115 - IVERSEN, L.L., Role of transmitter uptake mechanism in synaptic neurotransmission., Br. J. Pharmacol. 41:571-591 (1971).
- 116 - BOGDANSKI, D.F. y BRODIE, B.B., The effects of inorganic ions on the storage and uptake of H^3 norepinephrine by rat heart slices., J. Pharmacol. Exp. Ther., 165:181-189 (1969).
- 117 - BURGEN, A.S.U. e IVERSEN, L.L., The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart., Br. J. Pharmacol. Chemother, 25:34-49 (1965).
- 118 - HORNS, A.S., structure-activity relations for the inhibition of catecholamine uptake into synaptosomes from noradrenaline and dopaminergic neurons in the rat brain., Br. J. Pharmacol. 47:332-338 (1973).
- 119 - LEITZ, F.H. y STEFANO, F.J.E., Effect of ouabain and desipramine on the uptake and storage of norepinephrine and metaraminol., Eur. J. Pharmacol., 11:278-285 (1970).
- 120 - HERTTING, G., AXELROD, J. y PATRICK, R.W., Action of bretylium and guanethidine on uptake and release of 3H noradrenaline., Br. J. Pharmacol, 18:161-166 (1962).
- 121 - HERTTING, G., AXELROD, J. y WHITBY, L.G., Effect of drugs on the uptake and metabolism of 3H norepinephrine., J. Pharmacol. Exp. Ther. 134:145-153 (1961).
- 122 - STEINBER, M.I. y SMITH, C.B., Uptake, retention and metabolism of H^3 tyramine in rat atria., J. Pharmacol. Exp. Ther., 139:148 (1971).
- 123 - IVERSEN, L.L., The uptake of catecholamines at high perfusion concentration in the rat isolated heart., Br. J. Pharmacol., 25:18-33 (1965).

- 124 - TRENDELEMBURG, V., The extraneuronal uptake of catecholamines: is it experimental addity or physiological mechanisms., Trends in Pharmacol. Sci., 1:4-6 (1979)
- 125 - LIGHTMAN, S.L. y IVERSEN, L.L., The rol of uptake₂ in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. Br. J. Pharmacol., 37:639-649 (1969)
- 126 - GILLESPI, J.S., Uptake of noradrenaline by smooth muscle. Br. Med. Bull., 37:136-141 (1973)
- 127 - IVERSEN, L.L. y SALT, P.J., Inhibition of catecholamine uptake by steroids in the isolated rat heart., Br. J. Pharmacol., 40:528-530 (1970)
- 128 - BLASCHKO, H., y RICHTER, D. y SCHLOSSMAN, H., The oxidation of adrenaline and other amines., Biochem. J., 31:2187=2196 (1937)
- 129 - GULBERG, H. y MARSDEN, M., Catechol-O-methyltransferase: pharmacological aspects and physiological rol., Pharmacol. Rev., 27:135-146 (1975)
- 130 - AXELROD, J., The metabolism of catecholamines in vivo and in vitro., Pharmacol. Rev., 11:402=408 (1959)
- 131 - GOODALL, M.C., Matabolic products of adrenaline and noradrenaline in human urine., Pharmacol. Rev., 11:416-425 (1959)
- 132 - POTTER, L.T. y AXELROD, J., Studies on the storage of norepinephrine and the effect of drugs., J. Pharmacol. Exp. Ther., 140:199-206 (1963)
- 133 - AXELROD, J., O-methilation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo., Science 126:400-401 (1957)
- 134 - ZELLER, E.A., The rol of amine oxidases in the destruction of catecholamines., Pharmacol. Rev., 11:387-393 (1959)
- 135 - IVERSEN, L.L., GLOWINSKI, J. y AXELROD, J., The physiological disposition and metabolism of norepinephrine in immuno sympathetomized animals., J. Pharmacol. Exp. Therap. 151:273-279 (1966)

- 136 - WYLIE, D.W., ARCHER, S. y ARNOLD, A., Augmentation of pharmacological properties of catecholamines by O-methyl transferase inhibitors., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 130:239-244 (1960)
- 137 - AXELROD, J., Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines., *J. Physiol. Rev*, 39:751-776 (1959)
- 138 - KOPIN, I.J., Storage and metabolism of catecholamines: the role of monoamine oxidase., *Pharmacol. Rev.*, 16:179-191 (1964)
- 139 - KOPIN, I.J. y GORDON, E.K., Metabolism of norepinephrine ^3H released by tyramine and reserpine., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 138:359-364 (1962)
- 140 - BACQ, Z.M., Les contrôles de la libération des médiateurs aux terminaisons des nerf adrénergiques., *J. Physiol. (Paris)*, 72:389-397 (1976)
- 141 - SPECTOR, S., SJOERDSMA, A. y UDENFRIEND, S., Blockade of endogenous norepinephrine synthesis by methyl-tyrosine and inhibitors of tyrosine hydroxylase., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 147:86-95 (1965)
- 142 - UDENFRIEND, S., ZALTZMAN-NIRENBERG, P., Norepinephrine and 3,4 dihydroxyphenil-ethyl amine turnover in guinea pig brain in vivo., *Science* 142:394-396 (1963)
- 143 - MALFORS, T., Studies on adrenergic nerves., *Acta physiol. Scand.*, 64:(supp) 1-95 (1965)
- 144 - CARLSSON, A., HILLARP, A. y WALDECK, B., Analysis of the Mg^{++} - ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medules., *Acta physiol. Scand* 59:(supp 215) 5-38 (1963)
- 145 - HILLARP, N.A. y NILSON, B., The structure of the adrenaline and noradrenaline containing granules in the adrenal medullary cells with references to the storage and release of the sympathomimetic amines., *Acta physiol Scand.*, 31:(supp 113) 79-107 (1954)
- 146 - MALMFORD, T. y SACHS, C., Direct studies on the disappearance of the transmitter and changes in the uptake, storage, mechanisms of degenerating adrenergic nerves., *Acta physiol. Scand.*, 64:211-223 (1965)

- 147 - CARLSSON, A. y LINDQUIST, M., In vivo decarboxylation of alpha methyl metatyrosine., Acta physiol. Scand., 54:37-94 (1962)
- 148 - ANDEN, N.C., ROOS, B.E. y WERDINIMS, B., Effects of chlorpromazine, haloperidol and reserpine on the levels of phenolic acids in rabbits corpus striatum., Life Sci., 3:149-158 (1964)
- 149 - SHORE, P.A., BUSFIELD, D. y ALPERS, H.S., Binding and release of metaraminol: mechanism of norepinephrine depletion by a methyl-M-tyrosine and related agents., J. Pharmacol. Exp. Ther., 146:194-199 (1964)
- 150 - LANGER, S.Z., Presynaptic regulation of the release of catecholamines. Pharmacol. Rev., 32:337-362 (1981)
- 151 - WESTFALL, T.C., Local regulation of adrenergic neurotransmission., Physiol. Rev., 57:660-707 (1977)
- 152 - ANDEN, N.E. y HENNING, M., Adrenergic nerve function, noradrenaline level and noradrenaline uptake in cat nictitating membrane after reserpine treatment. Acta physiol. Scand., 67:498-504 (1966)
- 153 - ANDEN, N.E. y LUNDBORG, P., Recovery of noradrenaline uptake, storage mechanism in nerve granules after reserpine treatment. Inhibition by axotomy., J. Pharm. Pharmacol., 22:233-235 (1970)
- 154 - ANDEN, N.E., MAGNUSSON, T. y WALDECK, B., Correlation between noradrenaline uptake and adrenergic nerve function after reserpine treatment., Life Sci., 3:19-25 (1964)
- 155 - BURN, J.H. y TAINTER, M.L., An analysis of the effect of cocaine on the actions of adrenaline and tyramine. J. Physiol. (Lond) 71:169-193 (1931)
- 156 - BULBRING, E. y BURN, J.H., The action of tyramine and adrenaline on the denervated nictitating membrane., J. Physiol. (Lond) 91:459-473 (1938)
- 157 - FLECKENSTEIN, A. y BURN, J.H., The effect of denervation on the action of sympathemimetic amine on the nictitating membrane., Br. J. Pharmacol., 8:69-78 (1953)

- 158 - TRENDELEMBURG, U., Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol. Rev.*, 15:225-276 (1963)
- 159 - MOORE, J.I. y MORGAN, N.C., Cardiac contractile force responses to ephedrine and other sympathomimetic amines in dogs after pre-treatment with reserpine., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 133:192-204 (1961)
- 160 - BURN, J.H. y RAND, M.J., The action of sympathomimetic amines in animal treated with reserpine., *J. Physiol. (Lond)* 144:314-336 (1958)
- 161 - LANGLEY, J.N., On reaction of cells and of nerve endings to certain poisons, chiefly as regards reaction of striated muscle to nicotine and to curarine. *J. Physiol. (Lond)* 33:374-413 (1905)
- 162 - AHLQUIST, R.P., A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153:586-599 (1948)
- 163 - BURNSTOCK, G., Reversible inactivation of nervous activity in a fish gut., *J. Physiol. (Lond)* 141:35-45 (1958)
- 164 - JENKINSON, D.H. and MORTON, I.K.M., Adrenergic blocking drugs as tools in the study of the actions of catecholamines on the smooth muscle membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 139:762-771 (1967)
- 165 - MORAN, N.C., MOORE, J.I., HOLCOMB, A.K. y MUSHET, G., Antagonism of adrenergically-induced cardiac arrhythmias by dichoroisoprotorenol., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 136:327-335 (1962)
- 166 - MORAN, N.C. y PERKINS, M.E., An evaluation od adrenergic blockade of the mammalian heart., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 136:89-96 (1962)
- 167 - LANDS, A.M., ARNOLD, A., McAULIFF, J.P., LUDUEÑA, F.L. y BROWN, T.G., Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines., *Nature* 214:597-598 (1967)
- 168 - LANDS, A.M., LUDUEÑA, F.L. y BUZZO, H., Differentiation of receptors responsive to isoproterenol., *Life Sci.*, 6:2241-2244 (1967)
- 169 - ARNOLD, A.,McAULIFF, J.P., COLELLA, D.F., O 'CONNOR ; W.W. y BROWN, T.G., The beta₂ receptor mediated glycogenolytic responses to

- catecholamines in the dog., Arch. Intern. Pharmacodyn., 170:
451-460 (1968)
- 170 - WASSERMAN, M.A. y LEVY, B., Selective beta adrenergic receptor blockade in the rat., J. Pharmacol. Exp. Ther., 182:256-273 (1973)
- 171 - DUNLOP, D. y SHANKS, R.C., Selective blockade of adrenoceptive beta receptors in the heart., Br. J. Pharmacol., 32:201-208 (1968)
- 172 - FARMER, J.B., LEVY, G.P. y MARSHALL, R.J., A comparison of the beta adrenoceptor properties of salbutamol, oxiprenaline and soterenol with those of isoprenaline. J. Pharmacol. Pharmac., 22: 945-950 (1970)
- 173 - BURGESS, R.A. y BLACKBURN, K.J., Adenylcyclase and the differentiation of beta adrenoceptors., Nature (New Biol.) 235:249-253 (1972)
- 174 - ROBINSON, G.A., BUTCHNER, R.N. y SUTHERLAND, E.W., Cyclic AMP. London, Academic Press, pp 145-231 (1971)
- 175 - MURAD, F., Beta blockade of epinephrine-induced cyclic AMP formation in heart, liver, fat and trachea., Biochem. Biophys Acta 304:181-191 (1973)
- 176 - GOLDBERG, N., O'DEA, F.F. y HUDDOX, M.R., Cyclic GMP. Advances in cyclic nucleotide Research. Ed. by G.I. DRUMMOND, New York, Raven Press, pp 155-224 (1975)
- 177 - LEFKOWITZ, R.J., Beta adrenergic receptors: recognition and regulation. Physiology in Medicine 295:323-328 (1976)
- 178 - DUCOVICH, M.L. y LANGER, S.Z., Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre and post synaptic adrenergic receptors., J. Physiol. (Lond)., 237:505-519 (1974)
- 179 - LANGER, S.Z., Presynaptic regulation of catecholamine release. Biochem Pharmacology 23:1193-1800 (1974)

- 180 - GELUGH, S.M., DUCOVICH, M.L. y LANGER, S.Z., Stimulation of pre-synaptic beta adrenoceptor enhances ³H-noradrenaline release during nerve stimulation in the perfused cat spleen. Br. J. Pharmacol. 63:97-108 (1979)
- 181 - JAMES, V.H.T. y JEFFCOAT, S.L., Steroids. Br. Med. Bull. 30:50-54 (1974)
- 182 - JACOBS, B.S. y LAWTON, N.F., Pituitary and placental glycopeptide hormones. Br. Med. Bull. 30:55-61 (1974)
- 183 - DOHLER, K.D. y WUTTKE, W.; Changes with age in levels of serum gonadotrophins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. Endocrinology 97:899-907 (1975)
- 184 - PAYNE, A.H., KELCHM, R.F., MURONO, E.P. y KALAS, J.T. Hypothalamic pituitary and testicular function during sexual maturation of the male rat. J. Endocrinol. 72:17-26 (1977)
- 185 - NEGRO-VILAR, A., KRULICH, L. y McCANN, S.M. Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. Endocrinology 93:660-664 (1973)
- 186 - RAMALEY, J., Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. Biol. Reprod. 20: 1-31 (1979)
- 187 - KORENBROT, C.C., HUHTANIEMI, I.T. y WEINER, R.I. Preputial reparation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod. 17:298-303 (1977)
- 188 - ODELL, W.O. y SWERDLOFF, R.S. Etiologies of sexual maturation: a model system based on the sexually maturing rat. Recent Prog. Horm. Res. 32:245-288 (1976)
- 189 - RAGER, K., ZARZYCKI, J., EICHNER, M. y GUPTA, D. Effect of experimental bilateral cryptorchidism and castration on the plasma gonadotropins in male rats during sexual maturation. Res. Exp. Med. 165:55-59 (1975)
- 190 - FROWEIN, J. y ENGEL, W. Constitutivity of the HCG-receptor protein in the testis of rat and man. Nature 249:377-379 (1974)

- 191 - FROWEIN, J. y ENGEL, W. Binding human chorionic gonadotrophin by rat testis. Effect of sexual maturation cryptorchidism and hypophysectomy. J. Endocrinol. 64:59-66 (1975)
- 192 - ARAI, Y. y SERISOWA, K. Effects of gonadotropins on neonatal testicular activity and sexual differentiation of the brain in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143:656-660 (1973)
- 193 - EZUCHI, Y., ARISHIMA, K., NASU, T., TODA, M., MORIKAWA, Y. y HASHIMOTO, Y. Development of the fetal pituitary-testicular system based on observation of Leydig cells in encephalectomized hypophysectomized and control fetal rats. Anat. Rec. 190:679-686 (1978)
- 194 - STEINBERG, E. y FICHER, M. Differentiation of steroid biosynthesis pathways in developing testes. Biol. Reprod. 1:119-133 (1969)
- 195 - WARREN, D.W., HALTMEYER, G.C. y EIK-NES, K.B. Synthesis and metabolism of testosterone in the fetal rat testis. Biol. Reprod. 7:94-99 (1972)
- 196 - LORDING, D.W. y de KRETZER, D.M. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testes during fetal and postnatal development. J. Reprod. Fert. 29:261-269 (1972)
- 197 - CLEGG, E.J. Pubertal growth in the Leydig cells and accessory reproductive organs of the rat. J. Anat. 100:369-379 (1966)
- 198 - GONDOS, B. Testicular development. In: The Testis; Johnson, A.D. y GOMES, W.R.. Academic Press, New York, Vol. IV, pp 1-37 (1977)
- 199 - FICHER, M. Y STEINBERG, E. In vitro progesterone metabolism by rat testicular tissue at different stages of development. Acta Endocrinol. 68:285-292 (1971)
- 200 - LACROIX, E., EeCHAUTE, W. y LENSEN, I. Influence of age on the formation of 5 alpha androstenediol and 7 alpha hydroxytestosterone by incubated rat testis. Steroids, 25:649-661 (1975)
- 201 - GUPTA, D., RAZER, K., ZARZYCKI, J. y EICHNER, M. Levels of lutei-

- nizing hormone follicle stimulating , testosterone and dihydro-
testosterone in the circulation of sexually maturing intact male
rat and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchid-
dism. *J. Endocrinol.* 66:183-193 (1975a)
- 202 - GUPTA, D., ZARZYCKY, J. y RAGER, K. Plasma testosterone and
dihydrotestosterone in male rats during sexual maturation and
following orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism.
Steroids 25:33-42 (1975b)
- 203 - LOUIS, B.G. y FRITZ, I.B. Stimulation of androgens of the produc-
tion of androgen binding protein by cultured Sertoli cells. *Mol.*
Cell. Endocrinol. 7:9-16 (1977)
- 204 - LUBICZ-NAWROCKI, C.M. The effects of metabolites of testosterone
on the development of fertilizing ability by spermatozoa in the
epididymis of castrated hamsters. *J. Exp. Zool.* 197:89-96 (1976)
- 205 - HUCKINS, C. Cell cycle and primary spermatocytes in immature
Sprague-Dawley rats. *Anat. Rec.* 175:347-354 (1973)
- 206 - RIVAROLA, M.A., PODESTA, E.J., CHEMES, H.E. y CIRAGOGA, S. Andro-
gen metabolism in the seminiferous . *Cur. Top. Mol. Endocrinol.*
2:25-35 (1975)
- 207 - MURONO, E.P. y PAYNE, A.H. Distinct testicular 17 ketosteroid
reductases, one in interstitial tissue and one in seminiferous
tubules. *Biochem Biophys Acta* 450:89-100 (1976)
- 208 - DORRINGTON, J.H. y FRITZ, I.B. Androgen synthesis and metabolism
by preparations from the seminiferous tubul of the rat testis.
Cur. Top. Mol. Endocrinol. 2:37-52 (1975)
- 209 - PARVINEN, M., HURME, P. y NIEMI, M. Penetration of exogenous
testosterone, pregnenolone, progesterone and cholesterol into
the seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology* 87:1082-1084
(1970)

- 210 - TINADALL, D.J., VITALE, R, y MEANS, A.R. Androgen binding protein as a biochemical marker of formation of the a blood testis barrier *Endocrinology* 97:636-648 (1975)
- 211 - ENGEL, W. y FROWEIN, J. Glucocorticoids and HCG sensitivity of rat testicular Leydig cell. *Nature* 251:146-148 (1974)
- 212 - CHEM, Y.D.I., SHAW, M.J. y PAYNE, A.H. Steroid and FSH action on LH receptors and LH-sensitive maturation of the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 8:291-299 (1976)
- 213 - ARAGONA, C., BOHNET, H.G. y FRIESEN, H.G. Localization of prolactin binding in prostate and testis: the rol of serum prolactin. concentration on the testicular LH receptor. *Acta Endocrinol.* 84:402-409 (1977)
- 214 - CHARREAU, E.H., ATTRAMADAL, A., TORJESEN, P.A., PURVIS, K., CALANDRA, R. y HANSON, V. Prolactin binding in rat testis: specific receptors in interstitial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 6:303-307 (1977)
- 215 - KINSON, G.A. y ROBINSON, S. Gonadal function of inmature male rats subjected to light restriction, melatonin administration and removal of pineal gland. *J. Endocrinol.* 47:391-392 (1970)
- 216 - HAOUR, F. y SAEZ, J.M. HCG-dependent regulation of gonadotropin receptor sites: negative control in testicular Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 7:17-24 (1977)
- 217 - GRISWAOLD, M.D., SOLARI, A., TUNG, P.S. y FRITZ, I.B. Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of inmature rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 7:151-165 (1977)
- 218 - KORMANO, M. An angiographic study of the testicular vasculature in the postnatal rat. *J. Anat. Entwickl. Gesch.* 126:138-153 (1967)
- 219 - CLERMONT, Y. y PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in inmature rats' *Am. J. Anat.* 100:421-267 (1957)

- 220 - LEESON, T.S. Smooth muscle cells in the rat testicular capsule. A development study. J. Morphol. 147:171-186 (1975)
- 221 - DE JONG, F.H. y SHARPE, R.M. The onset and establishment of spermatogenesis in rats in relation to gonadotrophin and testosterone levels. J. Endocrinol. 75:197-207 (1977)
- 222 - MILLS, N.C., MILLS, T.M. y MEANS, A.R. Morphological and biochemical changes which occur during postnatal development and maturation of the rat testis, Biol. Reprod. 17:124-130 (1977)
- 223 - STEINBERG, A. y STEINBERG, E. Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured cells Sertoli. Endocrinology 98:918-921 (1976)
- 224 - LIPSETT, M.B. Regulation of androgen secretion. In: Androgens and Antiandrogens, Martini, L. y Motta, M. (Eds), Raven Press, New York, pp 11-17 (1977)
- 225 - MEANS, A.R. y HALL, P.F. Protein biosynthesis in the testis. Endocrinology 82:597-602 (1968)
- 226 - REICHERT, L.R. y ABOU-ISSA, H. Studies on a low molecular weight testicular factors which inhibits binding of FSH to receptor. Biol. Reprod. 17:614-621 (1977)
- 227 - ARMSTRONG, D.T. y DORRINGTON, J.H. Estrogen biosynthesis in the ovaries and testis. Adv. Sex. Horm. Res. 3:217-258 (1976)
- 228 - STEINBERG, E. y STEINBERG, A. The Testis: growth versus function. In regulation of organ and tissue growth. Academic Press, New York, pp 299-314 (1972)
- 229 - VITALE, R., FAWCETT, D.W. y DYM, M. The normal development of the blood testis barrier and the effects of clomiphene an androgen treatment. Anat. Rec. 176:333-344 (1973)
- 230 - KNORR, D.W. y VANHA-PERTTULA, T. Structure and function of the rat testis through pubescence. Endocrinology 86:1298-1304 (1970)
- 231 - FUJII, T. Roles of age and androgen in the regulation of sex accessory organs. Adv. Sex. Horm. Res. 3:103-137 (1976)

- 232 - HOSTETTER, M.W. y PIACSEK, B.I. The effect of prolactin deficiency during sexual maturation in the male rat. *Biol. Reprod.* 17:574-577 (1977)
- 233 - SETTY, B.S. y JEHAN, Q. Functional maturation of the epididymus in the rat. *J. Reprod. Fert.* 49:317-322 (1977).
- 234 - NAZIAN, S.J. y MAHESCH, V.B. Alterations in the organ responsiveness to testosterone during the sexual maturation of the male rat. *Biol. Reprod.* 21:465-479 (1979)
- 235 - FISHER, R.A. y YATES, F. Statistical tables for biological, agricultural and mechanical research, 5th ed., N.Y., Hafner Pub. Co. Inc., (1957)
- 236 - VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. *Arch. Intern. Pharmacodyn, Therap.* 143:299-230 (1963)
- 237 - DO VALLE, J.R. Condones hormonales e receptores farmacologicos a o nivel de musculatura lisa genital. *Ciencia y Cultura* 21:62-67 (1969)
- 238 - MARTINS, T., VALLE, J.R. y PORTO, A. Pharmacology in vitro of the human vas deferens and epididymus. *J. Urol.* 44:682-697 (1940)
- 239 - GREENBERG, S., KADOWITZ, P.J., SCHEDL, H.P. y LONG, J. Effect of age and testosterone calcium content and reactivity of guinea pig vas deferens. *J. Pharm. Exp. Ther.* 185:505-513 (1973)
- 240 - PIACSEK, B.E. y GOODSPEED, M.P. Maturation of the pituitary-gonadal system in the male rat. *J. Reprod. Fert.* 52:29-35 (1978)
- 241 - CONTE, D., LAGUZZI, G., BONIFORTE, L., CANTAFORA, A., SILVERIO, F., LATINO, C., LALLONI, G., MESOLELLA, V. y ISIDORI, A. Prostaglandins content and metabolic activity of human prostate. *Prostaglandins and Physiology* 91:89-96 (1979)
- 242 - BORDA, E., AGOSTINI, MdelC., GIMENO, M. Y GIMENO, A.L. Alpha and beta sympathetic responses to isoproterenol by the isolated rat vas deferens, *Pharm. Res. Comm.* 13:487-499 (1981)

- 243 - SJOSTRAND, N.O. y KLINGE, E. What function have cholinergic nerves in the smooth muscle of the male genital tract?
Acta physiol Scand. 452:89-95 (1977)
- 244 - NISTAL, M. y PINIAGUA, R. Ultraestructura del conducto deferente de rata a nivel de la sinapsis neuromuscular. An. Anat. 26:483-492 (1977)
- 245 - ROBINSON, P.M. Cholinergic component in the innervation of the longitudinal smooth muscle of the guinea pig vas deferens.
J. Cell. Biol. 41:462-476 (1969)
- 246 - KASUYA, J. y SUZUKI, N. Regional differences in the effects of denervation, cocaine and chronic reserpine administration on the responses of the rat vas deferens to norepinephrine and acetylcholine. Arch. Int. Pharmacodyn. 236:202-213 (1978)
- 247 - GRAHAM, J.D., KATIB, H. y SPRIGGS, T.L. The isolated hypogastric nerve vas deferens preparation of the rat. Br. J. Pharmac. Chem. 32:34-45 (1968)
- 248 - MOHAN, C. y RADHA, E. Circadian rhythm in acetylcholinesterase activity during aging of the central nervous system. Life Sci. 15:231-237 (1975)
- 249 - ZIEHER, M. y ETCHEVERRY, G. Regional distribution and variations of noradrenaline along the rat vas deferens. J. Pharm. Pharmac. 23:61-63 (1971)
- 250 - WASSERMAN, M.A. y LEVY, B. Selective beta adrenergic receptor blockade in the rat. J. Phar. Exp. Ther. 182:256-262 (1972)
- 251 - LANGER, S.Z. The metabolism of ³H.Norepinephrine by electrical stimulation from the isolated nictitating membrane of the cat and from the vas deferens of the rat. J. Physiol. 208:515-522 (1970)

- 252 - HOLCK, M.I., MARKS, B.H. y WILBERDING, C. Characterization of alpha adrenergic receptors in guinea pig vas deferens by ^3H . dihydroergocryptine binding. *Mol. Pharmacol.* 16:77-90 (1979).
- 253 - SHOJI, T. Comparison of pre and postsynaptic alpha adrenoceptor blocking effects of E-643 in the isolated vas deferens of the rat. *Japan J. Pharmacol.* 31:361-368 (1981).
- 254 - VARDOLOV, L. y PENNENFATHER, J.N. Regional variation in the distribution of alpha adrenoceptors in the vas deferens of rat. *Arch. Inter. Pharmacodyn* 221:212-222 (1976).
- 255 - DAVIS, J.R. y HOROWITZ, A.M. Age related differences in the response of the testicular capsule of the rat to norepinephrine, acetylcholine and prostaglandins. *J. Reprod. Fert.* 54:269-274 (1978).
- 256 - OJEDA, S.R., ANDREWS, W.W. y WHITE, S. Recent advances in the endocrinology puberty. *Endocrine Rev.* 1:228-257 (1980).
- 257 - WESTFALL, D.P. Antagonism by desipramine of the response of the vas deferens of the rat to norepinephrine, acetylcholine and potassium. *J. Pharm. Exp. Ther.* 185:540-550 (1973).
- 258 - TRENDELEMBURG, U. Mechanisms of supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol. Rev.* 18:629-640 (1966)
- 259 - IVERSEN, L.L. Inhibition of noradrenaline uptake by drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 17:62-64 (1965).
- 260 - GLOWINSKI, J. y AXELROD, J. Inhibition of uptake of tritiated noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. *Nature* 204:1318-1319 (1964).
- 261 - HAMBERGER, B. Reserpine-resistant uptake of catecholamines in isolated tissues of the rat. *Acta physiol. Scand.* 295:1-56 (1967).
- 262 - BARNETT, A., SYMCHOWICZ, S. y TABER, R.I. The effects of drugs inhibiting catecholamines uptake on tyramine and noradrenaline induced contractions of the isolated rat vas deferens. *Brit. J. Pharmacol.* 34:484-492 (1968).

- 263 - GILES, R.E. y MILLER, J.W. A comparison of certain properties of catechol-O-methyl transferase to those of adrenergic beta receptors. J. Pharm. Exp. Ther. 156:201-206 (1967a).
- 264 - GILES, R.E. y MILLER, J.W. Studies on the potentiation of the inotropic action of certain catecholamines by U-0521. J. Pharm. Exp. Ther. 157:55-61 (1967b).
- 265 - POTTER, L.T., COOPER, T., WILLMAN, V.L. y WOLFE, D.E. Synthesis, binding, release and metabolism of norepinephrine in normal and transplanted dog hearts. Circulation Res. 16:468-481 (1965).
- 266 - EVARTS, E.V., GILLESPIE, L., FLEMING, T.C. y SJOERDSMA, A. Relative lack of pharmacological action of 3-methoxy analogue of norepinephrine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:74-76 (1958).
- 267 - KAUMANN, A.J. Adrenergic receptors in heart muscle: relations among factors influencing the sensitivity of the cat papillary muscle to catecholamines. J. Pharm. Exp. Ther. 173:383-398 (1970).
- 268 - IZQUIERDO, J.A. y KAUMANN, A.J. Effect of pirogalol on the duration of the cardiovascular actions of catecholamines. Arch. Int. Pharmacodyn Therap. 144:437-445 (1963).