

## Influencia de las gónadas femeninas y el benzoato de estradiol sobre la sensibilidad de la preparación intestino aislado de rata

por

**Bardisa, L., Olmos, A. y Acuña, J.**

(Recibido por la Redacción el 19-VI-1950)

### INTRODUCCION

En los últimos años diferentes autores han comunicado estudios sobre la influencia de los factores metabólicos en la musculatura lisa, tanto en lo que se refiere al tonus (1-2-3-4-5-6-7-8), como a la velocidad de recuperación después de un estímulo acetilcolínico (9-10).

Conociendo los trabajos de **Thales Martin** y colaboradores (11-12-13-14-15), que han demostrado la influencia de las gónadas en la sensibilidad de la preparación de algunos órganos lisos como vesículas seminales y conductos deferentes, nos ha interesado estudiar estas influencias gonadales en la musculatura lisa intestinal, que no ha sido objeto de estos estudios.

Los trabajos de **Thales Martin** concluyen que las sustancias andrógenas inhiben la sensibilidad de la musculatura lisa de algunos órganos como los conductos deferentes y vesículas seminales; y que, por el contrario, las sustancias estrógenas aumentan la sensibilidad de estos órganos a estímulos fisiológicos, especialmente parasimpático-mimético; efecto, este último, también comprobado por otros autores (16-17-18-19-20).

Posteriormente en el Laboratorio de Farmacología Experimental de la Universidad de Chile, se realizaron estudios semejantes; utilizando como efector el intestino aislado de cobayo, en relación a la respuesta cuantitativa ante un estímulo acetilcolínico, no encontrando entre machos normales y castrados diferencias significativas (21).

Nosotros hemos pensado que para dilucidar esta influencia de las gónadas, sería mejor utilizar en la preparación de intestino aislado de rata las variaciones de la dosis umbral de acetilcolina y adrenalina en diferentes condiciones hormonales.

En ratas machos hemos comprobado que las gónadas masculinas inhiben la sensibilidad de la preparación de intestino a la acetilcolina y la aumentan para la adrenalina, y que las sustancias andrógenas inyectadas producen este mismo efecto en el animal castrado (22).

En el presente trabajo hemos abordado el problema en ratas hembras, estudiando las variaciones de la dosis umbral de acetilcolina y de adrenalina en ratas castradas, castradas inyectadas con estrógenos y en ratas normales.

Los resultados del presente trabajo se refieren a nuestras experiencias en estas condiciones.

## M E T O D I C A

### A.—TECNICA DE CASTRACION

Se usaron ratas de sexo femenino, de peso comprendido entre 160 y 220 gramos, mantenidos en igualdad de condiciones de alimentación.

Se sometía previamente el animal a un ayuno de 24 horas y luego, bajo anestesia etérea, se operaba por vía abdominal, utilizando material quirúrgico esterilizado. Se pincelaba la zona con tintura de yodo; mediante una incisión longitudinal de 3 a 4 centímetros se disecaba los cuernos uterinos y los ovarios, se hacía una ligadura de estos últimos y se extraían por sección; se suturaba y pincelaba con tintura de yodo. Se inyectaba 50,000 U. I. de penicilina en dosis fraccionadas durante 48 horas.

Como control del efecto de las gónadas, la mitad de los animales castrados se inyectaron con 40 U. B. I. de estradiol, día por medio, por vía intramuscular (23-24), contralándose el estro periódicamente.

Para controlar el efecto de las manipulaciones quirúrgicas, cierto número de animales fué sometido a una intervención semejante a la anterior, con la salvedad que no se ligaron ni se extirparon los ovarios.

Todos los animales operados se utilizaron entre los 28 y los 32 días después de la intervención.

### B.—TECNICA DE INTESTINO AISLADO

Previo ayuno de 24 horas, se sacrificaba el animal por traumatismo craneano, seguido de sección de las carótidas. Se disecaba la porción terminal del intestino delgado y se extraían trozos de 3 a 4 centímetros de longitud; previo lavado, se con-

servaban en un depósito con solución Tyrode termorregulado 38° y con aireación permanente.

Utilizando la técnica de **Magnus** (25), ligeramente modificada por nosotros (26-27-28), se procedía a determinar la dosis umbral del estímulo fisiológico utilizado.

Se emplea 4 trozos de intestino por animal.

### C.—SOLUCIONES UTILIZADAS

**SOLUCION TYRODE.**—Preparado con reactivos purísimos y glucosa (29-30); su pH se controlaba periódicamente.

**SOLUCION DE ACETILCOLINA.**—Se utilizó Presicolina Petrizio. Se pesaba 100 miligramos y se enteraba a 100 ml. con solución Tyrode; esta solución se diluía al 1:10 y 1:100. Con estas diluciones se determinaba la dosis umbral, buscando la menor dosis de acetilcolina capaz de producir una contracción.

Se utilizaba siempre Presicolina de la misma partida, ampollitas recién abiertas y soluciones preparadas en el momento de usarse.

**SOLUCION DE ADRENALINA.**—Se utilizó Adrenalina "Clin" (clorhidrato) diluída al 1: 100; 1:500 y 1:1000; tomando las mismas precauciones que con la Presocolina y buscando la menor dosis de adrenalina capaz de producir una relación.

**SOLUCION DE BENZOATO DE ESTRADIOL.**—Se utilizó Foliculina Massone de 1 mg. de benzoato de estradiol por ml., diluída en aceite de oliva al 1:50 en el momento de usarse; se inyectaba 0.2 ml. de esta dilución que equivale a 40 U. B. I.

### D.—CALCULOS ESTADISTICOS

Para nuestros cálculos estadísticos seguimos las indicaciones de **Günther, B.** y **Pizzi, M.** (31-32).

## R E S U L T A D O S

### 1.—DETERMINACION DE LA DOSIS

#### UMBRAL DE ACETILCOLINA

- a) Ratas hembras normales.
- b) Ratas hembras castradas.
- c) Ratas hembras controles de las manipulaciones quirúrgicas.
- d) Ratas hembras castradas e inyectadas con benzoato de estradiol.

## 2.—DETERMINACION DE LA DOSIS UMBRAL DE ADRENALINA

- a) Ratas hembras normales.
- b) Ratas hembras castradas.
- c) Ratas hembras controles de las manipulaciones quirúrgicas.
- d) Ratas hembras castradas e inyectadas con benzoato de estradiol.

## RESULTADOS

### A.—DETERMINACION DE LA DOSIS UMBRAL MEDIA DE ACETILCOLINA

Los resultados obtenidos fueron agrupados en forma de cuadros; en los cuales, cada determinación corresponde a un protocolo semejante al número 90 que aparece en la Fig. N° 1.

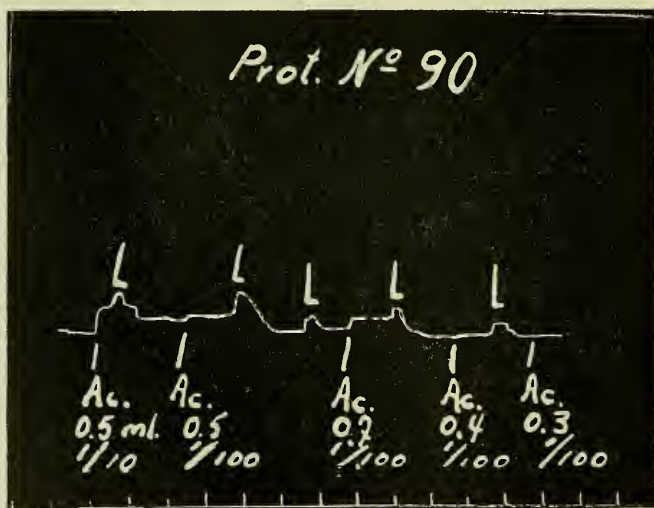


FIGURA N.º 1

Preparación de intestino aislado de rata.

"Ac": indica las dosis variables de acetilcolina agregadas al baño.

"L": lavado.

Tiempo, cada 30 segundos.

CUADRO Nº 1

Dosis umbral de acetilcolina en ratas hembras normales

Protocolos Nº (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	0.572	0.095	0.009025
2	0.430	0.763	0.582169
3	1.430	0.763	0.582169
4	1.144	0.477	0.227529
5	0.858	0.191	0.036481
6	0.572	0.095	0.009025
7	1.144	0.477	0.227529
8	0.858	0.191	0.036481
9	0.572	0.095	0.009025
10	0.286	0.381	0.145161
11	0.572	0.095	0.009025
12	0.572	0.095	0.009025
13	0.858	0.191	0.036481
14	0.572	0.095	0.009025
15	0.572	0.095	0.009025
16	1.144	0.477	0.227529
17	0.572	0.095	0.009025
18	1.144	0.477	0.227529
19	0.572	0.095	0.009025
20	0.286	0.381	0.145161
21	0.572	0.095	0.009025
22	0.143	0.524	0.274576
23	0.572	0.095	0.009025
24	0.286	0.381	0.145161
25	0.143	0.524	0.274576
26	0.286	0.381	0.145161
27	0.286	0.381	0.145161

Dosis umbral media : 0.667

D. Standard del T. M. ± 0.0713

CUADRO N° 2

Dosis umbral de acetilcolina en ratas hembras castradas

Protocolos N° (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	1.716	0.316	0.099856
2	2.574	1.174	1.378276
3	1.430	0.030	0.000900
4	2.002	0.602	0.362404
5	1.430	0.030	0.000900
6	2.288	0.888	0.788544
7	0.572	0.828	0.685584
8	2.288	0.888	0.788544
9	0.858	0.542	0.293764
10	0.572	0.828	0.685584
11	1.716	0.316	0.099856
12	1.144	0.256	0.065536
13	1.716	0.316	0.099856
14	0.858	0.542	0.293764
15	1.716	0.316	0.099856
16	1.716	0.316	0.099856
17	1.716	0.316	0.099856
18	1.144	0.256	0.065536
19	1.430	0.030	0.000900
20	0.572	0.828	0.685584
21	1.716	0.316	0.099856
22	1.144	0.256	0.065536
23	0.858	0.542	0.293764
24	1.716	0.316	0.099856
25	0.572	0.828	0.685584
26	0.858	0.542	0.293764
27	0.572	0.828	0.685584
28	1.716	0.316	0.099856
29	2.002	0.602	0.362404

Dosis umbral media : 1.400  
D. Standard del T. M. ± 0.107

CUADRO Nº 3

Dosis umbral de acetilcolina en ratas hembras controles  
de las manippuplapppciones quirúrgicas

Protocolos Nº (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	0.286	0.398	0.158404
2	0.572	0.112	0.012544
3	0.572	0.112	0.012544
4	0.285	0.398	0.158404
5	0.572	0.112	0.012544
6	1.114	0.460	0.021160
7	0.572	0.112	0.012544
8	0.286	0.398	0.158404
9	0.858	0.174	0.030276
10	0.286	0.398	0.158404
11	0.858	0.174	0.030276
12	0.572	0.112	0.012544
13	0.858	0.174	0.030276
14	0.572	0.112	0.012544
15	0.858	0.174	0.030276
16	0.858	0.174	0.030276
17	1.144	0.460	0.021160
18	0.858	0.174	0.030276
19	0.572	0.112	0.012544
20	0.858	0.174	0.030276
21	0.572	0.112	0.012544
22	1.144	0.460	0.021160
23	0.858	0.174	0.030276
24	0.572	0.112	0.012544
25	0.572	0.112	0.012544
26	0.858	0.174	0.030276
27	0.572	0.112	0.012544
28	0.572	0.112	0.012544

Dosis umbral media : 0.684  
S. Standard del T. M. ± 0.038

CUADRO N° 4

Dosis umbral de acetilcolina en ratas hembras castradas  
e inyectadas con benzoato de estradiol

Protocolos N° (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	0.572	0.125	0.015625
2	0.858	0.161	0.025921
3	0.572	0.125	0.015625
4	0.572	0.125	0.015625
5	0.858	0.161	0.025921
6	0.572	0.125	0.015625
7	0.858	0.161	0.025921
8	0.572	0.125	0.015625
9	1.144	0.447	0.199809
10	0.858	0.161	0.025921
11	0.572	0.125	0.015625
12	0.858	0.161	0.025921
13	0.858	0.161	0.025921
14	0.572	0.125	0.015625
15	0.858	0.161	0.025921
16	0.572	0.125	0.015625
17	0.858	0.161	0.025921
18	0.085	0.612	0.374544
19	0.572	0.125	0.015625
20	0.858	0.161	0.025921
21	0.572	0.125	0.015625
22	0.858	0.161	0.025921
23	0.572	0.125	0.015625
24	0.858	0.161	0.025921
25	0.286	0.409	0.167281
26	0.858	0.161	0.025921
27	0.572	0.125	0.015625
28	0.858	0.161	0.025921

Dosis umbral media : 0.697  
D. Standard del T. M. ± 0.0407



CUADRO Nº 5

Resumen de las dosis umbrales medias de acetilcolina obtenidos con los distintos grupos de ratas

Tipo de Ratas (1)	Número de protocolos (2)	Dosis U. medias (3)	D. Standard del T. M. (4)
Normales	27	0.667	0.0713
Castradas	29	1.400	0.107
Contr. Manip. Quirúrg.	28	0.684	0.038
Castr. Inyect. B. Estr.	28	0.697	0.040

CUADRO Nº 6

Valores significativos entre las dosis umbrales de acetilcolina para los distintos grupos de ratas

Grupos comparados	Valores significativos
Normales-Castradas	<b>5.72</b>
Contr. M. Quirúrg.-Castradas	<b>6.30</b>
Castr. Inyect. B. Estr.-Castradas	<b>6.15</b>
Normales-Contr. Manip. Quirúrg.	0.21
Normales-Castr. Inyect. B. Estradiol	0.36
Contr. Manip. Quir.-Castr. Inyect. B. Estr.	0.23

B.—DETERMINACION DE LA DOSIS  
UMBRAL DE ADRENALINA

Los resultados obtenidos fueron agrupados en forma de cuadros, en los cuales, cada determinación corresponde a un protocolo semejante al número 161 que aparece en la Fig. N° 2.

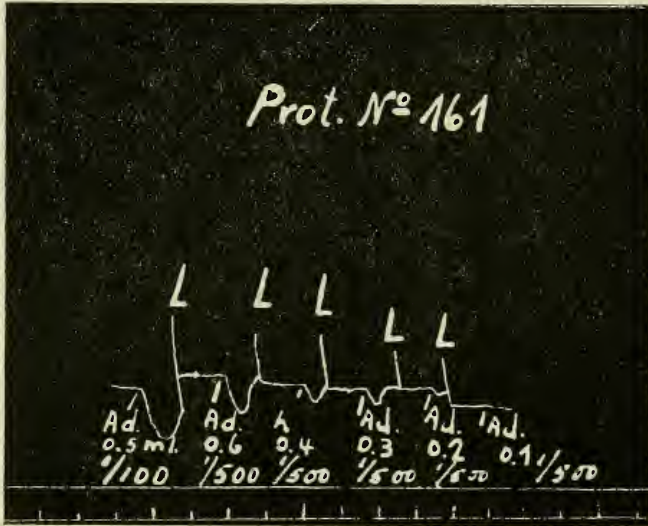


FIGURA N.º 2

Preparación de intestino aislado de rata.

"A": indica las dosis variables de adrenalina.

"L": lavado.

Tiempo, cada 30 segundos.

CUADRO N° 7

Dosis umbral de adrenalina en ratas hembras normales

Protocolos N° (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	1.713	0.429	0.184041
2	1.142	0.142	0.020164
3	1.713	0.429	0.184041
4	1.142	0.142	0.020164
5	0.571	0.713	0.508369
6	0.571	0.713	0.508369
7	1.713	0.429	0.184041
8	1.142	0.142	0.020164
9	0.571	0.713	0.508369
10	1.142	0.142	0.020164
11	1.142	0.142	0.020164
12	1.713	0.429	0.184041
13	0.571	0.713	0.508369
14	1.713	0.429	0.184041
15	1.142	0.142	0.020164
16	0.571	0.713	0.508369
17	1.142	0.142	0.020164
18	1.142	0.142	0.020164
19	1.713	0.429	0.184041
20	2.855	1.571	2.468041
21	1.142	0.142	0.020164
22	0.571	0.713	0.508369
23	1.142	0.142	0.020164
24	1.713	0.429	0.184041
25	1.142	0.142	0.020164
26	2.855	1.571	2.468041
27	1.142	0.142	0.020164
28	1.142	0.142	0.020164

Dosis umbral media : 1.284  
 D. Standard del T. M. ± 0.112

CUADRO Nº 8

Dosis umbral de adrenalina en ratas hembras castradas

Protocolos Nº (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	2.855	1.530	2.340900
2	0.571	0.754	0.568516
3	1.142	0.183	0.033489
4	1.142	0.183	0.033489
5	1.713	0.388	0.150544
6	1.142	0.183	0.033489
7	0.571	0.754	0.568516
8	1.142	0.183	0.033489
9	1.713	0.388	0.150544
10	1.142	0.183	0.033489
11	0.571	0.754	0.568516
12	1.142	0.183	0.033489
13	0.571	0.754	0.568516
14	0.571	0.754	0.568516
15	2.284	0.959	0.919681
16	0.571	0.754	0.568516
17	1.713	0.388	0.150544
18	2.855	1.530	2.340900
19	1.142	0.183	0.033489
20	1.142	0.183	0.033489
21	1.713	0.388	0.150544
22	1.713	0.388	0.150544
23	2.855	1.530	2.340900
24	1.142	0.183	0.033489
25	1.142	0.183	0.033489
26	0.571	0.754	0.568516
27	1.142	0.183	0.033489
28	1.142	0.183	0.033489

Dosis umbral media : 1.325  
D. Standard del T. M. ± 0.131

CUADRO N° 9

Dosis umbral de adrenalina en ratas hembras controles de las manipulaciones quirúrgicas

Protocolos N° (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	1.713	0.530	0.280900
2	0.571	0.612	0.374544
3	1.142	0.041	0.001681
4	1.142	0.041	0.001681
5	2.855	1.672	2.795584
6	0.571	0.612	0.374544
7	1.713	0.530	0.280900
8	1.142	0.041	0.001681
9	0.571	0.612	0.374544
10	0.571	0.612	0.374544
11	2.284	1.101	1.212201
12	1.713	0.530	0.280900
13	1.142	0.041	0.001681
14	0.571	0.612	0.374544
15	0.571	0.612	0.374544
16	1.142	0.041	0.001681
17	2.855	1.672	2.795584
18	0.571	0.612	0.374544
19	0.571	0.612	0.374544
20	1.713	0.530	0.280900
21	0.571	0.612	0.374544
22	0.571	0.612	0.374544
23	1.142	0.041	0.001681
24	0.571	0.612	0.374544
25	1.142	0.041	0.001681
26	1.142	0.041	0.001681
27	1.713	0.530	0.280900

Dosis umbral media : 1.183  
D. Standard del T. M. ± 0.132

CUADRO N° 10

Dosis umbral de acetilcolina en ratas castradas e inyectadas con benzoato de estradiol

Protocolos N° (1)	Dosis umbral microgramos % (2)	Diferencias (3)	(diferencias) <sup>2</sup> (4)
1	0.571	0.693	0.480249
2	1.142	0.122	0.014884
3	1.142	0.122	0.014884
4	1.713	0.449	0.201601
5	1.142	0.122	0.014884
6	1.713	0.449	0.201601
7	1.142	0.122	0.014884
8	1.713	0.449	0.201601
9	0.285	0.979	0.951371
10	1.142	0.122	0.014884
11	1.713	0.449	0.201601
12	1.142	0.122	0.014884
13	0.571	0.693	0.480249
14	1.713	0.449	0.201601
15	1.713	0.449	0.201601
16	1.142	0.122	0.014884
17	1.713	0.449	0.201601
18	0.285	0.979	0.951371
19	0.571	0.693	0.480249
20	0.571	0.693	0.480249
21	1.142	0.122	0.014884
22	1.713	0.449	0.201601
23	1.142	0.122	0.014884
24	1.713	0.449	0.201601
25	1.142	0.122	0.014884
26	2.284	1.020	1.040400
27	1.142	0.122	0.014884
28	2.284	1.020	1.040400

Dosis umbral media : 1.264

D. Standard del T. M. ± 0.101

## CUADRO Nº 11

Resumen de las dosis umbrales medias de adrenalina obtenidas con los distintos grupos de ratas

Tipo de Ratas (1)	Número de protocolos (2)	Dosis U. medias (3)	D. Standard del T. M. (4)
Normales	28	1.284	0.112
Castradas	28	1.325	0.131
Contr. Manip. Quirúrg.	27	1.183	0.132
Castr. Inyect. B. Estr.	28	1.264	0.101

## CUADRO Nº 12

Valores significativos entre las dosis umbrales de adrenalina para los distintos grupos de ratas

Grupos comparados	Valores significativos
Normales-Castradas	0.234
Contr. Manip. Quirúrg.-Castradas	0.763
Castr. Inyect. B. Estr.-Castradas	0.375
Normales-Contr. Manip. Quirúrg.	0.589
Normales-Castr. Inyect. B. Estr.	0.133
Contr. Manip. Quirúrg.-Castr. Inyect. B. Estr.	0.488

## DISCUSION DE RESULTADOS

En los resultados expuestos se observa que existen variaciones significativas de la dosis umbral de acetilcolina por acción de las gónadas, en el sentido que la castración produce una disminución de la sensibilidad a dicho estímulo, que no se debe a la manipulación quirúrgica y que es corregido por la inyección de benzoato de estradiol a estas ratas castradas.

Están de acuerdo estos resultados con lo observado por **Thales Martín** y colaboradores, en el sentido que las gónadas femeninas aumentan la sensibilidad de las formaciones musculares lisas a estímulos para-simpático-mimético.

Nuestros resultados, en lo que se refiere a las variaciones de las dosis umbral de adrenalina en las distintas condiciones hormonales estudiadas, no son estadísticamente significativos.

Por otra parte, las dosis umbrales de acetilcolina y adrenalina encontrada por nosotros en ratas hembras, son diferentes a las encontradas para ratas de sexo masculino.

Otro hecho especialmente notorio es que nuestras experiencia, así como las de **Capponi** (22), indican trastornos en la sensibilidad de la musculatura de órganos extragenitales, como la preparación de intestino aislado, y no sólo a los de la esfera genital a que hacen referencia los trabajos de **Thales Martin** y colaboradores.

Así también, es interesante destacar que las alteraciones de la sensibilidad al estímulo acetilcolínico se realiza en forma significativa en un período relativamente corto, como es el utilizado por nosotros, 28 a 32 días.

Respecto al mecanismo de producción de este fenómeno, no estamos en condiciones de aclararlo y él puede deberse a trastornos de la fibra muscular misma o bien de las formaciones nerviosas, que la preparación de intestino aislado posee.

Por otra parte, tampoco podemos precisar si las sustancias estrógenas actúan por sí mismas o bien estimulan la producción de otras hormonas que actuarían en este sentido. Ambos puntos constituyen trabajos que se realizan actualmente en este laboratorio.

## CONCLUSIONES

- 1.—Se estudia la influencia de las gónadas femeninas sobre la sensibilidad de la fibra muscular lisa intestinal, a la acetilcolina y adrenalina.
- 2.—Se demuestra que la castración aumenta la dosis umbral de acetilcolina y no modifica la de adrenalina.
- 3.—La inyección de benzoato de estradiol en ratas castradas, vuelve la dosis umbral de acetilcolina a un valor semejante al encontrado en ratas normales.
- 4.—Se discuten estos resultados.

## SUMMARY

Influence of female gonade on intestinal unstriated muscular sensibility with acetylcholine und adrenaline, is studied.

Evidence is given that castration increases the threshold dosage of acetylcholine without modifying that of adrenaline.

The injection of estradiol benzoate in castrated rats makes the threshold dosage of acetylcholine equivalent to the dosage entered for normal rats.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.—FELDBERG, W. y SOLANDT, O. M.—The stimulating  $\alpha$  effects of glucose and pyruvate en the rabbits gut. *J. Physiol.* 98, 22-38 (1940).
- 2.—FELDBERG, W. y SOLANDT, O. M.—Effects of drugs, sugars and allied substances on the isolated small intestine of the rabbit. *J. Physiol.* 101, 137-171 (1942).
- 3.—FALDBERG, W.—Effects of iodoacetic acid, glyceraldehyde and phosphorylated compound on the small intestine of the rabbit. *J. Physiol.* 102, 108-114 (1943).
- 4.—TORRES, R.—Estudio de la influencia de la glucosa, ácido láctico y succínico sobre el tonus del músculo liso. Tesis Univ. de Chile (1943).
- 5.—MARDONES, J., LECANNELIER, S., TORRES, R. y LARRAIN, S.—Estudio de la acción de algunos metabolitos sobre el tonus del músculo liso de intestino aislado de cuy. *Bol. Soc. Biol. Santiago*, 2, 57-61 (1945).
- 6.—LARRAIN, S.—Estudio de la acción de algunos metabolitos sobre el tonus del músculo liso de intestino aislado de cuy. Tesis Univ. de Chile (1946).
- 7.—CASTILLO, A.—Influencia de algunos metabolitos sobre el tonus del músculo liso aislado. Tesis Univ. de Chile (1946).
- 8.—LECANNELIER, S.—Influencia de algunas condiciones metabólicas sobre el tonus y velocidad de recuperación del músculo liso. Tesis Univ. de Chile (1941).
- 9.—MARDONES, J., LECANNELIER, S., TORRES, R. y VALDES, E.—Acción de algunos metabolitos en la velocidad de recuperación del músculo liso. *Bol. Soc. Biol. Santiago*, 2, 78-82 (1945).
- 10.—VALDES, E.—Influencia de algunas condiciones metabólicas en la velocidad de recuperación de la excitabilidad del músculo liso de intestino aislado de cuy. Tesis Univ. de Chile (1944).
- 11.—MARTIN, TH. y VALLE, J.—Influence de la castration sur le motilité des canaux déferents en rats. *Soc. Biol.*, 127, 464-466 (1938).
- 12.—MARTIN, TH. y VALLE, J. R.—Farmacologie comparée des canaux-déferents et des vésicules séminales, in vitro des rats normaux et des rats castrés. *Soc. Biol.*, 127, 1381-1384 (1938).
- 13.—MARTIN, TH., VALLE, J. R. y PORTO ANANIAS.—Contractibilité et reactions pharmacologiques des canaux et des vésicules séminales in vitro, de rats castrés et traités par les hormones sexuales. *Soc. Biol.*, 127, 1385-1388 (1938).
- 14.—MARTIN, TH. y PORTO ANANIAS.—Contractibilité et reactions pharmacologique des canaux déferents et des vésicules séminales après conservations a basse température, des rats normaux castrés et tratés par les hormones sexuales. *Soc. Biol.*, 127, 1389-1392 (1938).
- 15.—MARTIN, TH., VALLE, J. R. y PORTO ANANIAS.—Pharmacology in vitro of the human vasa deferentia and epididymis; the question of the endocrine control of the motility of the male acesyory genitals. *J. of Urology*, 44, 682-697 (1940).
- 16.—VALLE, J. R. y PORTO, A.—Gonadal Hormones and the contractility in vitro of the vas deferents of the dog. *Endocrinology*, 40, 308-315 (1947).
- 17.—VALLE, J. R. and JUNQUEIRA, L. C. U.—Motility and Farmacological Reativity of Genitals of Vitamin E. Deficient Rats. *Endocrinology*, 40, 306-321 (1947).

- 18.—HOUSSAY, A. B. y colaboradores.—Fisiología Humana 1004. B. Aires. "El Ateneo" (1946).
- 19.—WICK, J. H. y POWEL, E. C.—Estrone and Stilvestrol on the response of rabbits uterus to ergonovine. *J. A. Pharm. Assoc.* 31 (1942).
- 20.—HUNDLEY, J. M., DHIEL, W. K. y DIGGS, E. S.—Influencias hormonales sobre el uréter. *A. Jour. Of. Obstr. and. Gynec.* 44 (858) (1942). *Abstr. de Rev. Med. de Chile*, 71, 299-300 (1943).
- 21.—JIMENEZ, P. O.—Influencia de las hormonas sexuales sobre la sensibilidad de la fibra lisa intestinal ante los estímulos químicos-fisiológicos. Tesis Med. *Circ. U. de Chile* (1940).
- 22.—CAPPONI, G. E.—Influencia de gónadas masculinas y el propionato de testosterona sobre la sensibilidad de la preparación de intestino aislado de rata. Tesis Q. *Farm. Univ. de Concepción* (1949).
- 23.—WEILAND, H. y GRAS, W.—A propósito de la titulación biológica de la hormona sexual femenina. *Medicina y Química "Bayer"*, 3, 174-183 (1937).
- 24.—CURTIS, JACK, M., ERNEST, J. UNBERGER and LILA F. KNUDSEN.—The Interpretation of Estrogenio Assys. *Endocrinology*, 40, 231-250 (1947).
- 25.—MAGNUS, R.—Versuche am ueberlebenden Duendarm von Saeugetieren. *Pfuegers Archs. ges. Physiol.* 102, 1023-1051 (1904).
- 26.—CHEN, G., ENSOR, R., CH. CLARK.—*J. Pharm and Exp. Ther.*, 92-90 (1948).
- 27.—PARDO, PILAR.—Estudio sobre la propiedad de taquifilaxia de la histamina en intestino aislado de cobayo. Tesis Q. *Farm. Univ. de Concepción* (1949).
- 28.—HEMPEL, H. C.—Influencia de la denervación en el aprovechamiento de metabolitos en el tonus y velocidad de recuperación del intestino aislado de conejo. Tesis Q. *Farm. Universidad de Concepción* (1949).
- 29.—GUERRA, F.—Farmacología experimental. Pág. 474. Méjico. UTEHA (1946).
- 30.—SOLLMANN, T. y HANSLIK, P.—Fundamentals of Experimental pharmacology. Pág. 134, San Francisco. J. W. Stacey Inc. (1940).
- 31.—GÜNTHER, B.—Cálculos de probabilidades en biología y medicina. *Ciencia e investigación*, 1, 407-414 (1945).
- 32.—PIZZI, M.—Los métodos estadísticos. *Imp. Univ. Santiago de Chile*, 137-171 (1947).