

Este exemplar é
devidamente corrigido
conforme resolução c.c.
036/83.
Piracicaba, 17 de junho de 1987.
Samir Tufic Arbex.

WILSON FRANCO

ESTUDO DO EFEITO DE AGENTES ADRENÉRGICOS
SOBRE A ATUAÇÃO DA VASOPRESSINA (*Ditressin*)
NA ESTIMULAÇÃO DO FLUXO DE ÁGUA ATRAVÉS
DA BEXIGA DE SAPO "IN VITRO"

Orientador: Prof. Dr. SAMIR TUFIC ARBEX

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do grau de Mestre,
em Odontologia, área de Farmacologia.

PIRACICABA - SP.

1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico

aos meus filhos

RENATA, JULIANA e FÁBIO

e à minha esposa NEIDE.

Ao amigo Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO N.
SILVEIRA, Professor do Departamento
de Fisiologia do Instituto Básico de
Biologia Médica e Agrícola, UNESP,
Botucatu, pela sua insubstituível
ajuda, não só na parte científica
deste trabalho como também pelo exemp
plo de atuação universitária, tão imp
portante à minha formação.

Ao Prof. Dr. SAMIR TUFIC ARBEX, Pro
fessor Titular do Departamento de
Ciências Fisiológicas e coordenador
dos cursos da Pós-Graduação, FOP,
UNICAMP, pela valiosa orientação,
apoio, amizade e elevado senso científ
ico que sempre procurou transmitir.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PAULO RENATO COSTA SOUZA, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo apoio ao ensino e à pesquisa em nosso meio universitário.

Ao Prof. Dr. SIMONIDES CONSANI, Diretor da FOP-UNICAMP, pela ênfase que dedica às atividades didáticas e de pesquisa nesta Faculdade.

Ao Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Farmacologia, da FOP, UNICAMP, pela amizade e incentivo.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, em particular do Departamento de Ciências Fisiológicas, que ajudaram a cumprir essa etapa do mestrado.

Aos funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação, FOP, UNICAMP, pela amizade e colaboração.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia do DCS, UFSCar, por todas as facilidades oferecidas para realização da parte experimental deste trabalho.

A SUELI DUARTE DE O. SOLIANI, secretária da Pós-Graduação, FOP, UNICAMP, pela amizade e dedicação profissional que sempre demonstrou pela nossa pessoa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Su
perior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio fi
nanceiro.

Enfim, a todos aqueles que, diretamente ou indiretamente,
contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

INTRODUÇÃO	1
REVISTA DA LITERATURA	15
PROPOSIÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	68
SINOPSE	70
SUMMARY	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INTRODUÇÃO

A manutenção de um ambiente com características constantes de uma série de parâmetros físicos e químicos, tais como temperatura; pH; concentração de solutos; volume, é essencial para o bom funcionamento das células. Especificamente, a manutenção da constância - dentro de certos limites - do volume e da composição dos fluídos do organismo, é uma tarefa muito mais complexa porque não só ocorrem trocas substanciais de soluto e solvente entre os diversos compartimentos hídricos do organismo, mas principalmente entre o organismo e o ambiente que o cerca. Uma vez que tais trocas são realizadas e reguladas por mecanismos de transporte através das membranas que limitam os referidos compartimentos ou que constituem uma interface com o meio ambiente, o estudo dos processos de transporte de água e solutos através de membranas biológicas representa uma peça fundamental para o entendimento da biologia celular e do organismo como um todo.

A padronização e a modificação de situações experimentais nem sempre são possíveis quando se estuda um organismo vivo como um todo. No caso do estudo da função renal, especificamente, dado o papel do órgão na homeostase, as variáveis envolvidas são muitas, o que dificulta bastante a padronização de condições experimentais. De um modo geral, essas dificuldades tornam-se maiores em função do pequeno tamanho do rim nas espécies animais.

Em vertebrados inferiores, dada a incapacidade do rim de assegurar aos animais (a exemplo dos mamíferos) a homeostasia hidro-mineral, outras estruturas colaboram nessa tarefa. Assim, nos anfíbios, a bexiga urinária é uma exten

são funcional do túbulo renal (PEACHEY & RASMUSSEN, 1961) (41); seu epitélio reabsorve água, sódio e uréia, da urina e secreta prótons para a mesma (STEINMETZ & colab., 1967) (48); (STEINMETZ, 1974) (49). Do ponto de vista do balanço hídrico, essa estrutura funciona como um reservatório do qual a água pode ser reabsorvida em períodos de privação hídrica, ou em resposta a presença de hormônio antidiurético na corrente sanguínea (HAYS & LEAF, 1962) (19); (CIRNE & colab., 1981) (9).

Dada a facilidade de montagem de preparações de bexiga urinária de sapo, dada a possibilidade de controle de uma série de variáveis nos experimentos "in vitro" e dada a analogia morfológica, filogenética e funcional dessa estrutura com o duto coletor do rim de mamíferos, a preparação isolada desse epitélio tornou-se uma importante ferramenta para o estudo dos fenômenos de transporte de água e solutos através de membranas e dos mecanismos de ação de hormônios e outros agentes sobre o transporte (CIRNE & colab., 1981) (9); (STEINMETZ & colab., 1967) (48); (STEINMETZ, 1974) (49).

MORFOLOGIA DA BEXIGA DE SAPO

A bexiga de sapo é uma estrutura bilobada que fica solta na cavidade abdominal e, no animal bem hidratado, ocupa porção considerável dessa cavidade com um conteúdo de 15-30 (ou até mais) mL de urina hipotônica em relação ao plasma.

A membrana é fina e transparente, consistindo de uma simples camada de células epiteliais forrando a sua su per f i c i e m u c o s a; de uma porção intermediária formada por te ci do f r o u x o de fibras colágenas, musculatura lisa e vasos e, internamente, de uma membrana serosa voltada para a cavidade abdominal e que também recobre a superfície das vísceras (PEACHEY & RASMUSSEN, 1961) (41); (HERRERA, 1971) (27).

Em condições normais a membrana apresenta uma bai xa permeabilidade a água, de forma que o fluxo é pequeno, a despeito do enorme gradiente osmótico (da ordem de 4 atm.) normalmente existente entre o meio interno (face serosa) e o meio externo (face mucosa) (HAYS & LEAF, 1962) (19).

O epitélio é considerado "tight" já que apresenta alta resistência a passagem de solutos (e água) pelas vias paracelulares (DIAMOND, 1978) (14).

HORMÔNIOS E O BALANÇO HÍDRICO

A vasopressina (Hormônio Antidiurético - ADH) de se m p e n h a papel fundamental na manutenção da homeostasia hí dr i c a nos vertebrados (HAYS & LEAF, 1962) (19). Esse hormô nio de natureza protéica, produzido pelo sistema nervoso cen tral (núcleos supra-ópticos e para-ventriculares do hipotálamo) e armazenado na hipófise posterior, promove um aumento extraordinário da permeabilidade a água, sódio e uréia no du to co le t o r e n a l de m a m í f e r o s e da pele e bexiga urinária de anfíbios (BENTLEY, 1964) (4); (CIRNE & colab., 1981) (9).

As aminas biogênicas e seus derivados participam do controle da homeostasia hídrica em anfíbios através da modificação do fluxo plasmático renal, em função da variação do tônus muscular das arteríolas do glomêrulo (DEYRUP, 1964) (13); (WATLINGTON & HUF, 1971) (53); ou do fluxo sangüíneo na região cutânea (CHRISTENSEN, 1974) (10); ou por intermêdio de efeitos exercidos diretamente sobre a permeabilidade das membranas (BENTLEY, 1971) (5), ou, ainda, por meio de uma modulação do efeito hemodinâmico e da resposta da vasopressina ao nível de membranas (CIRNE & colab., 1981) (9); (HAYS, 1976) (20); (SMYTHE & colab., 1952) (47).

Os hormônios esteróides, principalmente os mineralocorticóides atuam no sentido de reter líquido no organismo em função de um reaproveitamento maior do sal que seria perdido na urina. Além dessa ação sobejamente conhecida, esses agentes também interferem com o mecanismo celular de ação do hormônio antidiurético (BENTLEY, 1971) (5).

MECANISMO DE AÇÃO DO ADH EM BEXIGA DE SAPO

Como já foi mencionado anteriormente, o hormônio antidiurético promove aumento notável do transporte de água através dessa membrana.

Na análise do mecanismo de ação do ADH sobre a bexiga de sapo, podemos considerar essa membrana como sendo constituída por duas barreiras em série: a primeira - "barreira densa" - é formada pela membrana celular luminal da cé

lula epitelial e a segunda - "barreira porosa" - e representada em conjunto pelas camadas estacionárias da solução adjacente à membrana luminal; pelo citoplasma e organelas celulares; pelos espaços intercelulares e pela camada de colágeno e fibras musculares que apoiam as células epiteliais.

A Vasopressina só é ativa quando adicionadas do lado da irrigação sangüínea, isto é, do lado seroso (meio interno) da bexiga, e que a ligação do hormônio a receptores (dois, pelo menos) provoca a ativação da enzima adenil-ciclasase, a qual está incluída em forma inativa na membrana basolateral da célula epitelial (ORLOFF & HANDLER, 1962) (38); (VIEIRA & MALNIC, 1981) (31). Essa enzima, uma vez ativada pela vasopressina, cataliza a conversão de ATP em AMP_c no interior da célula. O nível intracelular desse nucleotídeo é regulado pela enzima fosfodiesterase, a qual transforma o AMP cíclico em uma forma inativa (HAYS, 1976) (20); cada molécula do hormônio anti-diurético leva à formação de cerca de 100 moléculas de AMP cíclico (MALNIC & MARCONDES, 1983) (35).

Após a produção de AMP_c, os eventos não estão ainda totalmente esclarecidos (GOLDEBERG, 1975) (17). Sabe-se que o AMP_c ao ligar-se a sub-unidade de uma proteína-quinase, torna-a ativa e esta, por sua vez, ativa uma fosforilase-quinase, a qual atua sobre proteínas de microtúbulos e microfilamentos induzindo a uma agregação de partículas na membrana luminal. A hipótese mais aceita atualmente é a de que a fosforilação ou a desfosforilação de proteínas de microtúbulos e microfilamentos é traduzida em ordens para a síntese

se, transporte e incorporação de matrizes proteicas (poros) na estrutura lipídica da membrana (exocitose) (CHEVALIER & HUGON, 1974) (8); (HARMANCI & colab., 1980) (25); (MULLER & colab., 1980) (37); (WADE & colab., 1981) (52); (De SOUZA & GROSSO, 1981) (12).

Para a resposta do tecido à vasopressina, sabe-se que tanto os microfilamentos como os microtúbulos são independentemente necessários para a iniciação da agregação de partículas e do concomitante aumento da permeabilidade a água. Entretanto, somente os microfilamentos são necessários para a manutenção da resposta do tecido à vasopressina (TAYLOR & colab., 1973) (50); (TAYLOR & colab., 1975) (51); (HAYS, 1983) (21).

KOEFOED-JOHNSEN & USSING, 1953 (30) propuseram que o efeito do hormônio antidiurético era no sentido de aumentar o diâmetro dos poros da membrana, de forma que o fluxo de massa de água a favor de um gradiente de pressão (osmótica ou hidrostática) seria enormemente aumentado pela ação do hormônio (o fluxo de massa de água segue a equação de Poiseuille e, portanto, é proporcional a 4ª potência do raio), enquanto o fluxo difusional de água não seria tão aumentado (o fluxo difusional de moléculas de água é proporcional a área disponível e, portanto, a 2ª potência do raio) (MALNIC & MARCONDES, 1983) (35). Essa interpretação foi questionada por HAYS & LEAF, 1962 (19), que trabalharam com bexiga de sapo e por SCHAFER & ANDREOLI, 1972 (44) em epitélio tubular renal, que demonstraram que a agitação das soluções adjacentes à membrana (e a conseqüente redução das camadas estacio

nárias) permitia a observação de valores próximos a 1 (um) para a razão entre a permeabilidade obtida em fluxo de massa e a permeabilidade difusional da água. Esses dados invalidam, portanto, a hipótese de que o hormônio antidiurético atuaria no sentido de aumentar o diâmetro dos poros.

Posteriormente, os estudos de AL-ZAHID & colab., 1977 (1) e de HEBERT & ANDREOLI, 1980 (26) baseados em cálculos da energia de ativação, a partir das variações da permeabilidade a água em várias temperaturas, apontaram para a conclusão de que o hormônio antidiurético aumenta a permeabilidade a água por aumentar o número de poros (e não por aumentar o diâmetro dos poros) envolvidos no transporte de água através da membrana.

Considerando-se que o ADH eleva, em vários epitélios, a permeabilidade a água e também eleva a permeabilidadade de a solutos hidrofílicos de baixo peso molecular (ex.: uréia) levantou-se a hipótese de que esses solutos atravessariam a membrana servindo-se do mesmo poro de permeação a água. Entretanto, a verificação de que a estimulação pelo ADH podia ser bloqueada especificamente (por ex.: a floretina inibe a estimulação pelo ADH do transporte de uréia mas não o de água), indica a existência de vias de permeação diferentes para a água e para esses solutos (LEVINE & colab., 1973) (32).

AGENTES FARMACOLÓGICOS QUE INTERFEREM NO ESTABELECIMENTO DA AÇÃO HIDROSMÓTICA DA VASOPRESSINA

- CÁLCIO

Esse íon é extremamente importante para manter a permeabilidade normal da bexiga de sapo a água. Nos epitélios em geral e na bexiga de sapo, uma diminuição da concentração de íons cálcio do Ringer leva a um aumento da permeabilidade a água (HARDY & DiBONA, 1982) (24). Tal modificação de permeabilidade é irreversível, pelo menos quando a concentração de íons Ca^{+2} é drasticamente reduzida (cerca de 100 vezes), não sendo retomada a condição normal quando esse íon é adicionado novamente a preparação. Por outro lado, para que se processe o efeito da vasopressina de aumentar o fluxo de água, é necessária a presença de concentração ótima de cálcio.

Entretanto, o aumento da concentração desse íon inibe a ação da vasopressina, alterando de uma maneira significativa a permeabilidade osmótica da água (PETERSON & EDELMAN, 1964) (42).

Na bexiga urinária de sapo está bem estabelecido que o íon cálcio atua em duas etapas diferentes do processo de aumento da permeabilidade a água induzida pela vasopressina (HAYS, 1976) (20):

1ª) Ao nível de receptor para a vasopressina inibindo a ligação desta ao receptor;

2a) Ao nível do sítio da enzima adenilciclase, bloqueando a ação dessa enzima e, portanto, impedindo a transformação de ATP em 3'5' AMP_C.

- METIL-XANTINAS

As observações indicam que esse tipo de agente farmacológico atua numa etapa posterior à síntese do 3'5' AMP_C, bloqueando a atividade da enzima fosfodiesterase, a qual regula o nível intra-celular do 3'5' AMP_C, por promover a transformação desse nucleotídeo em sua forma inativa (5' AMP). Portanto, pela atuação das Metil-Xantinas vai ocorrer um aumento da permeabilidade osmótica exercida pela vasopressina, o que foi comprovado por meio de uma série de dados experimentais obtidos principalmente, através de preparações "in vitro" de bexiga urinária de sapo (ORLOFF & HANDLER, 1962) (38); (HANDLER & colab., 1969) (23).

- ANESTÉSICOS GERAIS (Metoxifluorano, Halotane)

A atuação característica de certos anestésicos gerais (voláteis) é no sentido de bloquear a estimulação do fluxo de água pela vasopressina, sem interferir com a estimulação dos transportes de uréia e sódio em bexiga de sapo (LE VINE & colab., 1975) (33).

A inibição provocada por esses agentes não se verifica quando se usa 3'5' AMP_C ao invés de vasopressina. Por tanto, esses agentes atuam numa etapa anterior à da síntese

de 3'5' AMP_c; ou ao nível do sítio da enzima adenilciclase (bloqueando a ação catalítica dessa enzima), ou ao nível do receptor hormonal (LEVINE & colab., 1975) (33); (FAHRENHOLZ & colab., 1984) (15).

- PROSTAGLANDINAS (PgE₁, PgE₂)

Em bexiga urinária de sapo, as prostaglandinas antagonizam a ação hidrosmótica da vasopressina (ORLOFF & colab., 1965) (39).

A utilização de drogas do tipo (Indometacina, AAS), inibidoras da enzima ciclo-oxigenase - que participa da síntese de prostaglandinas - potencia a ação hidrosmótica da vasopressina (SATO & DUNN MICHAEL, 1984) (43).

Os mecanismos específicos de interação entre Prostaglandinas e vasopressina não estão totalmente esclarecidos ao nível bioquímico; a hipótese mais favorável é a de que as Prostaglandinas, de um modo geral, produza um bloqueio da interação da vasopressina com a enzima adenilciclase (FORREST & GOODMAN, 1981) (16).

Entretanto, a vasopressina, além do seu efeito de aumentar a permeabilidade a água sódio e uréia na bexiga de sapo, também provoca um aumento da liberação de ácido araquidônico de seus sítios de armazenamento, tendo como resultado um aumento da síntese de Prostaglandinas nessa estrutura (ZUSMAN & HANDLER, 1977) (54); (BURCH & HALUSHKA, 1981) (6).

- DROGAS ANTIMITÓTICAS (Colchicina, Vimblastina, Citochalasina)

Na bexiga urinária de sapo estes agentes farmacológicos atuam em vários locais e por mecanismos diferentes, interferindo direta ou indiretamente sobre a ação hidrosmótica gerada pela vasopressina sobre essa estrutura, resultando, como consequência, uma diminuição sensível da estimulação da permeabilidade a água induzida pela vasopressina.

Os vários mecanismos propostos para a atuação destes agentes farmacológicos (BURCH & HALUSHKA, 1981) (7); (PALMER & LORENZEN, 1983) (40), são os seguintes:

- Bloqueio da formação e indução de efeito desorganizador sobre os microtúbulos. Esse efeito é característico da Colchicina e da Vimblastina.

- Indução de efeito desorganizador funcional e estrutural sobre microfilamentos. Este efeito é característico da Citochalasina B.

- Interferência com a ação do 3'5' AMP_c, de modo a não permitir que o nucleotídeo estimule uma proteína-quinase, a qual, por sua vez, estaria atuando indiretamente através de microtúbulos e microfilamentos ao nível da membrana luminal, induzindo ao aumento da permeabilidade a água.

- Estimulação da síntese de Prostaglandinas. As drogas antimitóticas induzem a um aumento da liberação de ácido araquidônico celular, que, por sua vez, irá produzir um bloqueio na formação do complexo vasopressina e adenilci

clase.

A Figura 1 esquematiza os possíveis locais de ação das drogas citadas nesta revisão, ao nível celular da bexiga de sapo.

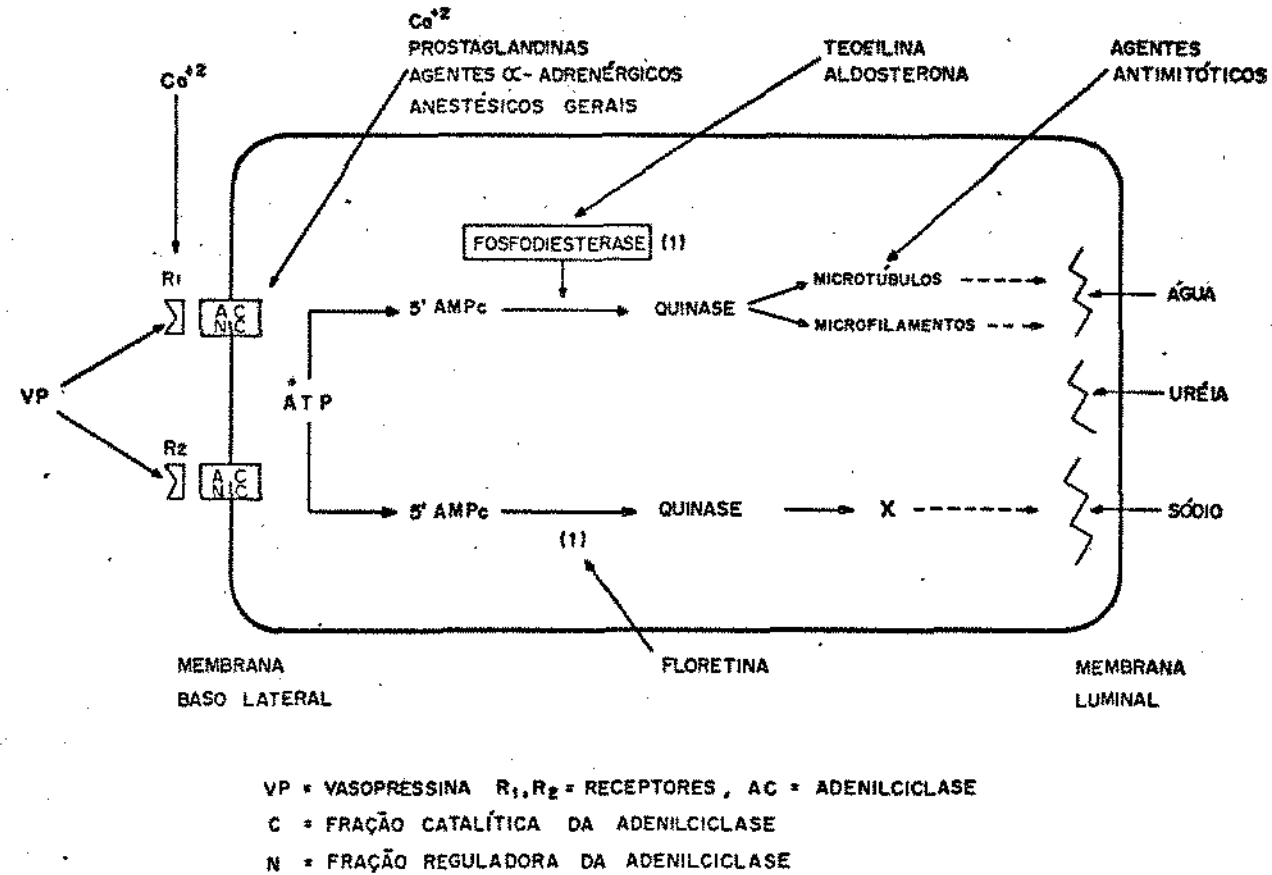


FIGURA 1 - Esquema dos locais em que as drogas atuam ao nível celular de bexiga de sapo, interferindo sobre o efeito hidrosmótico da Vasopressina (adaptado de Hays, R.M., The New England Journal of Medicine, 295: 661-665, 1976)

REVISTA DA LITERATURA

A interação entre agentes adrenérgicos (catecolaminas) e peptídeos neurofisiológicos (vasopressina) foi demonstrada em células glandulares, em epitélios e em fibras musculadas (ORLOFF, 1962) (37); (JARD, 1971) (28); (HAYS, 1983) (21). As catecolaminas, principalmente as alfa adrenérgicas, tem sido referidas como inibidoras do aumento da permeabilidade a água na bexiga urinária de sapo induzida pela vasopressina (ORLOFF, 1962) (37); (HANDLER & colab., 1968) (22).

De uma maneira geral, a ordem de potência das diferentes catecolaminas é variável conforme a estrutura que está sendo estudada, especificamente ao nível da bexiga urinária de sapo, temos que o efeito inibidor da Adrenalina é maior que da Isoprenalina (AMBALAVANAR & colab., 1972) (2).

Uma vez que agentes bloqueadores alfa adrenérgicos (ex.: fenoxibenzamina, fentolamina), atuam promovendo o efeito hidrosmótico da vasopressina, isto é, impedem que as catecolaminas (Adrenalina) exerçam o seu efeito inibidor sobre a ação da vasopressina, fica evidente a participação de receptores alfa adrenérgicos na instalação do efeito hidrosmótico desse hormônio (HANDLER & colab., 1968) (22).

De outra parte o estudo, sobre o efeito das catecolaminas beta adrenérgicas (ex.: Isoprenalina), ainda está em aberto, ou seja, não está bem estabelecido. HANDLER & colab., 1968 (22) utilizando a técnica de BENTLEY, 1958 (3), observaram uma inibição muito discreta ou mesmo uma ausência de inibição sobre o efeito da vasopressina na promoção do aumento da permeabilidade da bexiga a água.

Em algumas situações experimentais foi observado,

paradoxalmente, uma certa potenciação da atividade hidrosmótica da vasopressina pela isoprenalina, essa variabilidade de resultados também foram obtidos por AMBALAVANAR & colab., 1972 (2). Os autores atribuem essa discrepância de observações a variações sazonais da permeabilidade normal da bexiga e da resposta da estrutura a estimulação pela vasopressina, mencionando também, como fator envolvido nessa variabilidade, o fato de os resultados terem sido obtidos com anfíbios de diferentes espécies. Nos períodos nas quais foi observada a tendência ao bloqueio pela Isoprenalina na ação da vasopressina, HANDLER & colab., 1968 (22), utilizando-se de agentes beta bloqueadores (ex.: propranolol), observaram o retorno do efeito hidrosmótico do hormônio aos seus valores máximos.

Torna-se, portanto, necessário um estudo mais aprofundado do efeito das catecolaminas, principalmente das beta adrenérgicas, sobre a ação hidrosmótica da vasopressina para permitir melhor entendimento da interação entre o hormônio e as catecolaminas, tanto no aspecto quantitativo como qualitativo.

PROPOSIÇÃO

Em vista da variabilidade dos resultados observados na literatura com a Isoprenalina sobre a ação hidrosmótica da vasopressina em bexiga de sapo, objetivamos neste trabalho estudar o fluxo de água, por meio da técnica de BENTLEY, 1958 (3), visando caracterizar:

1) O efeito das catecolaminas com atividade sobre receptores beta adrenérgicos: Adrenalina, Dopamina e Isoprenalina sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina.

2) O papel dos receptores alfa e beta adrenérgicos na cadeia de eventos que se segue à interação da Vasopressina com os receptores da membrana celular.

MATERIAL E MÉTODOS

A) MATERIAL

1 - ANIMAL

Utilizou-se 198 (cento e noventa e oito) sapos Bufo marinus, adultos, sadios, de ambos os sexos, pesando em média 180 gramas. Os sapos eram mantidos num sapário, com água em abundância, à temperatura ambiente, de onde eram remetidos para o laboratório para a sua utilização.

2 - SOLUÇÕES E DROGAS UTILIZADAS

1* - Solução isotônica de Ringer Fosfato com osmolaridade de 250 mOsm/ℓ, com pH = 7,8.

- NaCl = 110,0 mM
- KCl = 3,5 mM
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ = 0,5 mM
- $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ = 2,0 mM
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ = 1,8 mM
- $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ = 10,0 mM.

2* - Solução de Ringer Fosfato (1*) diluída (1:5) em água destilada, com osmolaridade de 50 mOsm/ℓ.

3* - Vasopressina (Pitressin)^R - Laboratório PARKE-DAVIS - volume utilizado de 1 µℓ/ml de banho.

4* - Dopamina (Revivan)^R - Laboratório Zambom - vo

lume utilizado de 25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho.

5* - Isoprenalina (Isoproterenol)^R - 1:5.000 - Laboratório Santisa - volume utilizado de 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho.

6* - Adrenalina - 1:1.000 - Laboratório Hipolabor - volume utilizado de 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho.

7* - Propranolol - Laboratório Ayerst - volume utilizado de 28 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho.

8* - Fentolamina (Regitina)^R - Ciba Pharmaceutical Co. - volume utilizado de 0,3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho.

B) M É T O D O

MONTAGEM DA PREPARAÇÃO

Foi utilizada basicamente a técnica desenvolvida por BENTLEY, 1958 (3) para a determinação do fluxo de água.

Após a destruição do encéfalo e da medula por meio de um estilete, procedia-se a exposição da bexiga bilobada, através de incisão no abdômem e retirada da mesma para lavagem em solução de Ringer Fosfato (1*). (A manipulação da bexiga requer certos cuidados, tais como: a ponta dos dedos do experimentador e o fio de algodão que vai ser utilizado devem ser umedecidos previamente em solução fisiológica para não lesar a bexiga). A seguir eram separados os dois lobos e

introduzido em cada um deles um tubo de polietileno rígido, com 4 mm de diâmetro externo, amarrando-se firmemente o tecido em volta do tubo, de forma a formar um saquinho na extremidade do tubo.

Esse saquinho, em cujo interior fica a face mucosa do epitélio (correspondente ao compartimento urinário), era separado do resto da bexiga, tendo-se o cuidado de deixar o mínimo possível de tecido remanescente (a fim de facilitar a secagem e, conseqüentemente, a pesagem). O conjunto, tubo de polietileno e hemi-bexiga era, então, submetido a lavagem.

A lavagem da face serosa (exterior do saquinho e que corresponde a face de contato com o meio interno) era feita com solução de Ringer Fosfato (1*), enquanto o interior (face mucosa ou meio externo) era lavado com solução de Ringer Fosfato diluída (2*), introduzindo-se através do tubo uma cânula de polietileno (P.E. - 90) ligada a uma seringa; era injetado em média, 2 ml em cada hemi-bexiga.

A membrana era, então, mergulhada em um béquer que continha 40 ml de solução de Ringer Fosfato (1*), ficando totalmente coberta pelo líquido, de forma a coincidir o nível da solução externa com o menisco da solução interna (Ringer Fosfato diluído (2*)), para que não se criasse um gradiente de pressão hidrostática entre as duas soluções.

As diferenças ocasionais entre o nível da solução externa e o menisco da solução interna no tubo, provocadas pela variação do tônus da musculatura lisa da bexiga, não desempenham qualquer papel significativo sobre o fluxo de água nessa estrutura.

Os experimentos foram conduzidos em banho-maria com temperatura controlada através de um termostato e um termômetro, a fim de que a temperatura do sistema fosse mantida em torno de $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Durante todo o período experimental o compartimento seroso foi mantido sob borbulhamento de ar saturado com vapor de água (bomba de aquário), a fim de oxigenar o meio e proporcionar uma agitação constante das soluções (Fig. 2).

Os resultados obtidos com as variações de peso (mg) da bexiga, foram expressos como variações de volume (μl), o que torna mais fácil a compreensão dos mesmos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados são apresentados em termos de Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM) e a Significância (P) foi verificada a partir da aplicação do Teste T (Student) para amostras pareadas e não pareadas (SNEDECOR & COCHRAN, 1956) (46).

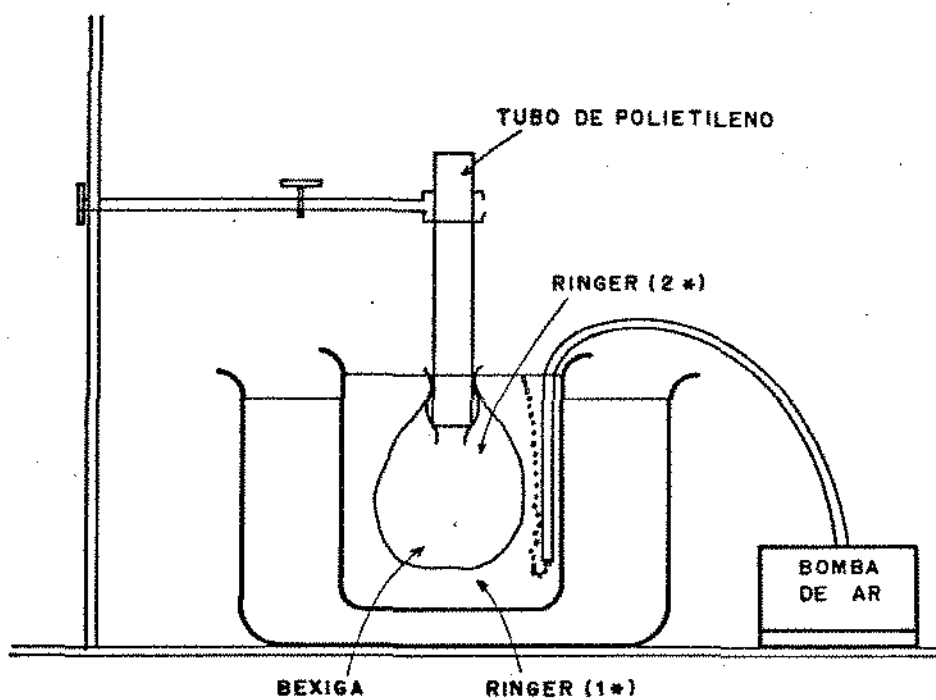


FIGURA 2 - Esquema da montagem para medida do fluxo de água através da bexiga de sapo. (Adaptado de Malnic, G., Marcondes, M., Fisiologia renal, 1983, pág. 217)

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Deve ser ressaltado que na maior parte dos experimentos uma hemi-bexiga (lobo) foi usada para o experimento propriamente dito, enquanto o outro lobo foi usado para o controle.

Os saquinhos, ou seja, as bexigas com solução isotônica de Ringer Fosfato (1*) (250 mOsm/l), Figura 2, na face serosa e a solução de Ringer Fosfato (2*) (50 mOsm/l), Figura 2, na face mucosa, foram deixadas em repouso por 120 minutos (período de incubação), a fim de se adaptarem as condições "in vitro".

PROTOCOLO EXPERIMENTAL A (Quadro 1)

Foi utilizado quando trabalhamos com os agentes farmacológicos (agentes adrenérgicos e hormônio anti-diurético (Vasopressina)).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL B (Quadro 2)

Foi utilizado quando trabalhamos com o agente adrenérgico (Isoprenalina) combinado com Vasopressina e agentes bloqueadores alfa ou beta adrenérgicos, respectivamente (fentolamina e propranolol).

Queremos ressaltar que ambos os protocolos experimentais selecionados permitiram sempre a utilização de experimentos pareados, os quais foram conduzidos em hemi-bexigas

oriundas do mesmo animal, possibilitando, desse modo, a comparação entre os valores obtidos no período inicial (controle) e num período experimental realizado posteriormente na mesma hemi-bexiga, ou então a comparação foi feita entre as hemi-bexigas gêmeas, sendo que uma delas serviu como controle e a outra como experimental. Dessa forma, a comparação pode ser feita no sentido "horizontal" (entre os períodos realizados na mesma hemi-bexiga) e no sentido "vertical" (entre os períodos realizados concomitantemente na hemi-bexiga controle e na hemi-bexiga experimental).

Após o período de incubação das bexigas, iniciava-se o período experimental: a bexiga era esvaziada, lavada e preenchida com solução de Ringer Fosfato (2*). Enxugava-se rapidamente a bexiga com papel de filtro, tomando-se o cuidado especial na parte em que esta era amarrada ao tubo.

O conjunto (bexiga e tubo) era então pesado em uma balança de precisão (Mettler H-35-AR) e colocado no bequer (40 ml), Figura 2, cuja solução não diluída também havia sido trocada (pesagem inicial).

Após 30 minutos, retirava-se o conjunto (tubo e bexiga) do banho e procedia-se a secagem e pesagem (final). A diferença entre as duas pesagens é devido ao fluxo de água, movido pelo gradiente osmótico entre as duas faces da membrana (1º período experimental).

Em seguida foram realizados mais três períodos experimentais, introduzindo-se então, os agentes farmacolôgicos, como mostram os Quadros 1 e 2.

No último período experimental (49), Quadros 3 e 4, foi realizado um teste de "contra prova"; a finalidade deste teste foi de verificar se as bexigas estavam ainda mantendo a sua integridade funcional e também respondendo aos agentes farmacológicos.

Uma observação importante que se deve ser destacada, ainda dentro do procedimento experimental, diz respeito à utilização da vasopressina (Pitressin)^R. Uma vez que as ampolas desse hormônio encontravam-se estocadas há já algum tempo, resolvemos - de forma sistemática - realizar um teste da capacidade de atuação da vasopressina em cada dia que era realizado o experimento. Assim, não procedíamos a abertura de uma nova ampola da droga enquanto a aberta não fosse totalmente utilizada e, a cada dia, uma hemi-bexiga era selecionada ao acaso afim de se testar a capacidade da droga em promover o aumento do fluxo osmótico de água através da membrana.

QUADRO 1 - Protocolo Experimental A

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS			
	1º	2º	3º	4º
CONTROLE	Controle	Controle	Vasopressina	Agentes Adrenérgicos
EXPERIMENTAL	Controle	Agentes Adrenérgicos	Vasopressina + Agentes Adrenérgicos	Vasopressina

QUADRO 2 - Protocolo Experimental B

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS			
	1º	2º	3º	4º
CONTROLE	Controle	Vasopressina	Vasopressina + Isoprenalina	Vasopressina + Isoprenalina + Bloqueadores
EXPERIMENTAL	Controle	Vasopressina + Isoprenalina	Vasopressina + Isoprenalina + Bloqueadores	Vasopressina

RESULTADOS

I - ADRENALINA

Resolvemos utilizar a adrenalina em nossos experimentos pelo fato dessa catecolamina apresentar atividade tanto ao nível de receptores alfa como de beta adrenérgicos e cujos efeitos sobre a ação hidrosmótica da vasopressina já foram testados por diversos autores (HANDLER & ORLOFF, 1968) (22); (HARDY & DiBONA, 1982) (24); (JARD, 1971) (28), principalmente "in vitro".

Conforme pode ser verificado na Tabela I, a adrenalina (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho), por si só, não afetou a permeabilidade normal do epitélio a água: o fluxo observado foi de $1,02 \pm 0,11$ (N = 6) $\mu\text{l}/\text{min}$ nas hemi-bexigas controle para $0,93 \pm 0,22$ (N = 6) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga experimental, sendo a diferença entre as médias não estatisticamente significativa.

Da mesma forma, a adição de adrenalina à preparação, após a realização de um período controle não levou a alteração significativa do fluxo de água entre os dois períodos - vide Tabela II. Nessa mesma Tabela e no Gráfico 1 pode ser observado o efeito dramático da vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o transporte de água nessa estrutura.

Com o intuito de se verificar o efeito da adrenalina sobre a ação hidrosmótica da vasopressina, uma série de experimentos (N = 6) foi conduzida em hemi-bexigas gêmeas (provenientes do mesmo animal), sendo que um grupo recebeu vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) e o outro recebeu vasopressina em associação com a adrenalina (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho). Os re

sultados, ilustrados na Tabela III e no Gráfico 2, foram: $22,44 \pm 0,88 \mu\text{l}/\text{min}$, nas hemi-bexigas tratadas por vasopressina (controle) e $22,36 \pm 1,35 \mu\text{l}/\text{min}$ nas hemi-bexigas que receberam vasopressina e adrenalina simultaneamente (experimental). O expressivo bloqueio (49%; $P < 0,01$) do efeito hidrosmótico da vasopressina pela adrenalina está em concordância com os dados da literatura, principalmente com os de HANDLER & ORLOFF, 1968 (22).

Nossos resultados mostraram também a total reversibilidade do efeito bloqueador da adrenalina sobre a ação hidrosmótica da vasopressina. Como mostra a Tabela IV, o fluxo de água em presença de vasopressina após a bexiga ter sido submetida à lavagem posterior ao tratamento por adrenalina, apresentou valores de $22,4 \pm 0,88$ ($N = 6$) $\mu\text{l}/\text{min}$, enquanto que em outras bexigas, o fluxo de água estimulada por vasopressina foi de $23,0 \pm 2,10$ ($N = 6$) $\mu\text{l}/\text{min}$, essa diferença estatisticamente não significativa ($P > 0,05$, teste t, amostras não pareadas).

TABELA I - Efeito da adição serosal de Adrenalina (2 $\mu\text{l/ml}$ de banho) sobre o transporte de água em hemi-bexi gas de sapo, isoladas do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA EM $\mu\text{l/min}$	
	HEMI-BEXIGA CONTROLE	HEMI-BEXIGA EXPERIMENTAL ADRENALINA
1	1,29	0,73
2	1,15	0,37
3	0,91	0,85
4	0,87	0,70
5	0,59	1,97
6	1,31	0,98
$\bar{X}$	1,02	0,93
	$\pm$	$\pm$
EPM	0,11	0,22
P	N.S.	

- Períodos experimentais de 30 minutos

- N.S. = Não Significativo

TABELA II - Comparação entre os efeitos da Adrenalina (2 μl /ml de banho) e da Vasopressina (1 μl /ml de banho) sobre o fluxo osmótico de água em bexiga de sapo

FLUXO DE ÁGUA $\mu\text{l}/\text{min}$			FLUXO DE ÁGUA $\mu\text{l}/\text{min}$		
CONTROLE		ADRENALINA	CONTROLE		VASOPRESSINA
	1,00	0,73		1,29	21,76
	0,30	0,37		1,15	25,65
	0,50	0,85		0,91	23,61
	0,40	0,70		0,87	23,30
	0,71	1,97		0,59	19,90
	0,62	0,98		1,31	20,46
$\bar{X}$	0,75	0,93		1,02	22,44
	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$
EPM	0,19	0,22		0,11	0,88
P	N.S.			< 0,01	

- Períodos experimentais de 30 minutos

- N.S. = Não Significativo

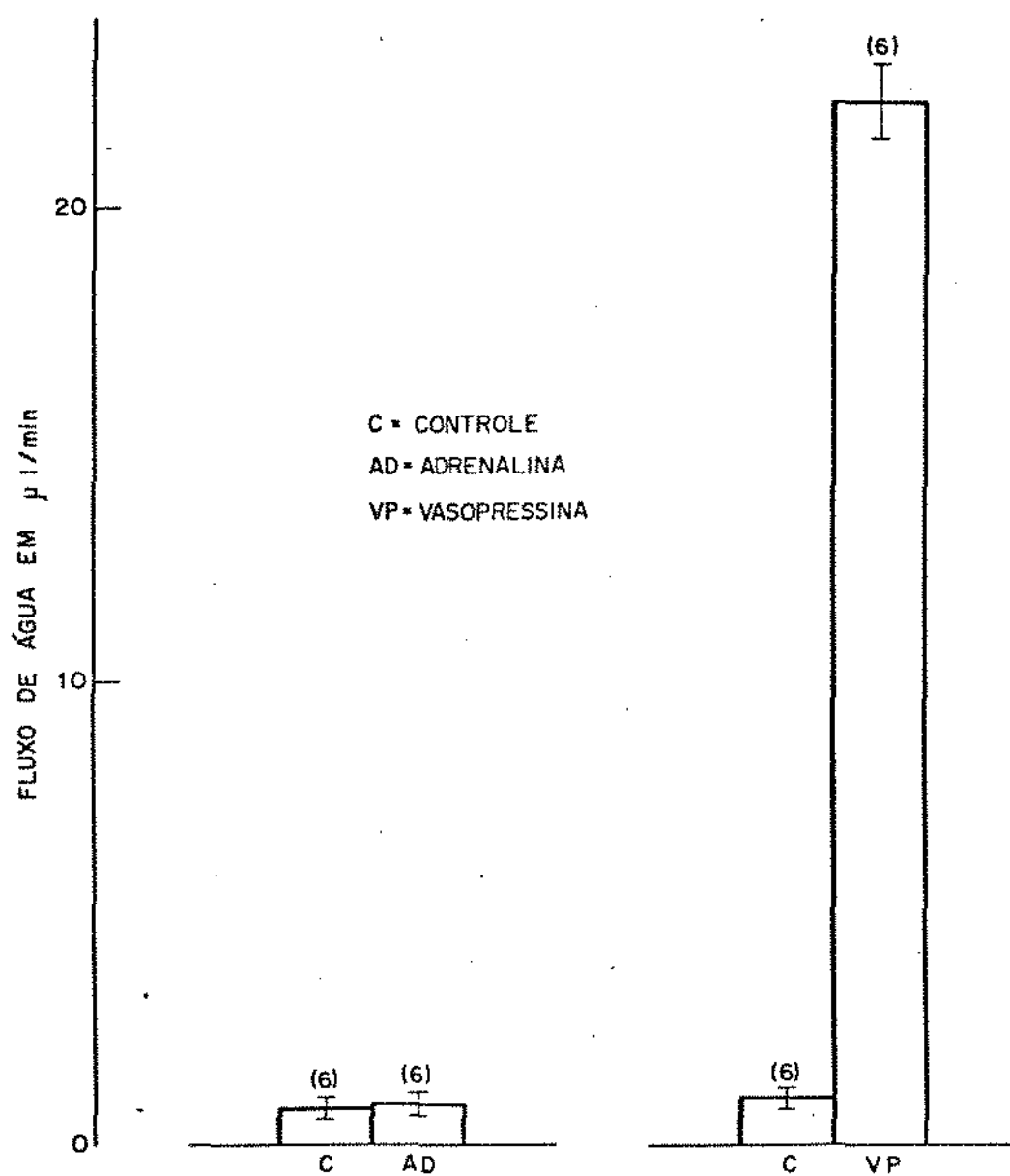


GRÁFICO 1 - Comparação entre os efeitos da Adrenalina ($2 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) e da Vasopressina ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o fluxo osmótico de água em bexiga de sapo. (6) = Número de experimentos.

TABELA III - Efeito da Adrenalina (2 $\mu\text{l/ml}$ de banho) sobre ação hidrosmótica da Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal

FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l/min}$)		
NÚMERO DO EXPERIMENTO	HEMI-BEXIGA CONTROLE VASOPRESSINA	HEMI-BEXIGA EXPERIMENTAL VASOPRESSINA + ADRENALINA
1	21,76	9,06
2	25,65	16,97
3	23,61	10,64
4	23,30	8,16
5	19,90	13,58
6	20,46	9,77
$\bar{X}$	22,44	11,36
	$\pm$	$\pm$
EPM	0,88	1,35
P	< 0,01	

- Períodos experimentais de 30 minutos

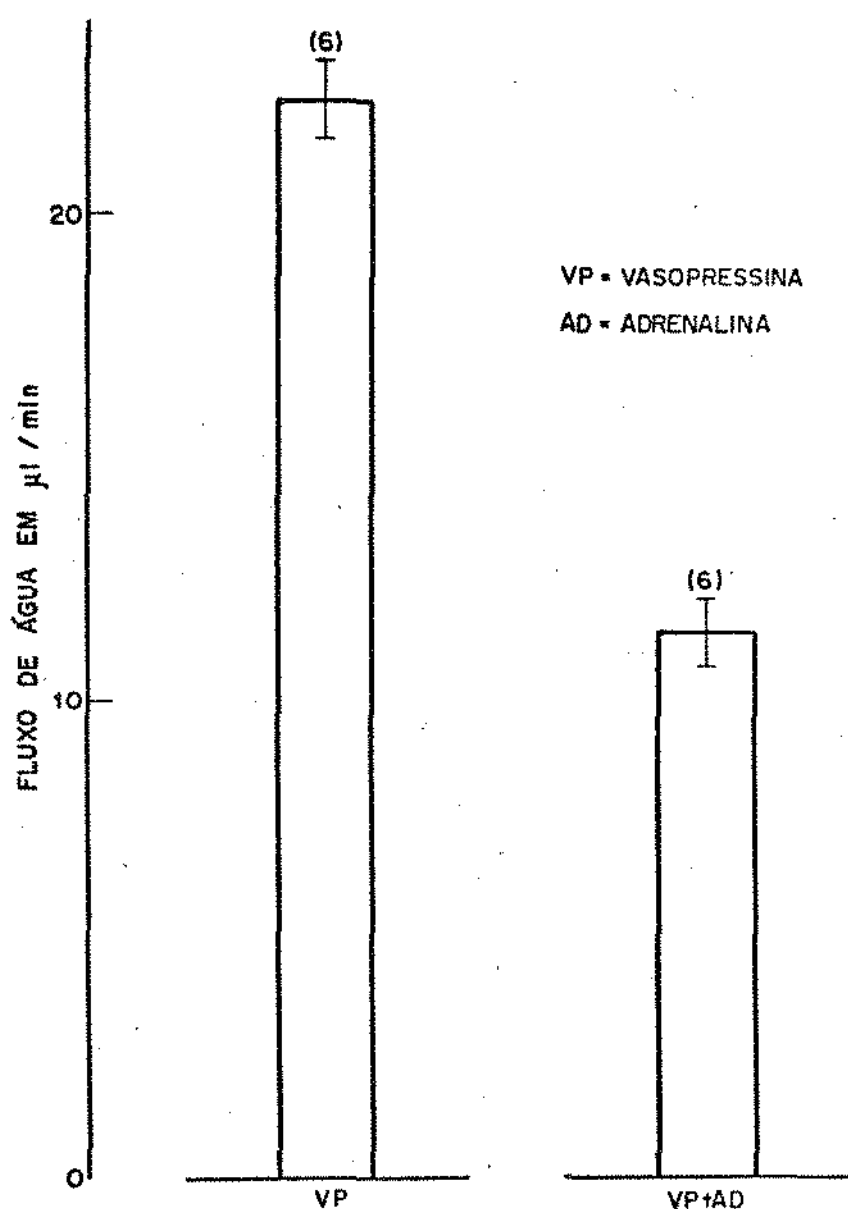


GRÁFICO 2 - Efeito da Adrenalina ($2 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemibexigas do mesmo animal.
(6) = Número de experimentos.

TABELA IV - Efeito comparativo entre a Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) após Vasopressina associada a Adrenalina (2 $\mu\text{l/ml}$ de banho) e o controle (Ringer Fosfato (250 mOsm/l)) sobre o transporte de água em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l/min}$)	
	VASOPRESSINA APÓS	VASOPRESSINA APÓS
	VASOPRESSINA + ADRENALINA	CONTROLE
1	20,45	21,76
2	27,11	25,65
3	19,73	23,61
4	31,49	23,30
5	18,24	19,90
6	21,03	20,46
$\bar{X}$	23,0	22,44
	$\pm$	$\pm$
EPM	2,10	0,88
P	N.S.	

- Períodos experimentais de 30 minutos

- N.S. = Não Significativo

II - DOPAMINA

A dopamina é uma catecolamina que apresenta atividade sobre receptores alfa e beta adrenérgicos (GOLDEBERG, 1974) (18), cujos efeitos farmacológicos são bem explorados ao nível do sistema cárdio-vascular e do sistema nervoso central, onde atua como um mediador químico. Entretanto, os efeitos dessa droga sobre a fisiologia celular e sobre os mecanismos de transporte através de membranas, não estão totalmente esclarecidos e, não raras vezes, sequer identificados.

Assim, decidimos investigar os efeitos desta substância sobre a ação hidrosmótica da vasopressina.

O efeito da dopamina (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o fluxo de água foi testado em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal de acordo com o protocolo experimental A. Conforme pode ser observado na Tabela V e no Gráfico 3, a adição de dopamina ao banho (face serosa ou meio interno) não provocou qualquer alteração significativa da permeabilidade normal do epitélio a água: de $1,00 \pm 0,35$ (N = 8) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga controle, para $0,65 \pm 0,25$ (N = 8) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga experimental. Em contraste, conforme mostra essa figura, pode ser apreciado o efeito da vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) nas mesmas condições.

A associação da vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) à dopamina (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) é mostrada na Tabela VI e no Gráfico 4; nessa situação, os valores obtidos foram: $22,95 \pm 1,61$ (N = 8) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga controle (somente vasopressina) para $7,73 \pm 0,65$ (N = 8) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga ex

perimental (vasopressina combinada com dopamina), sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ($P < 0,01$), demonstrando que ocorreu um bloqueio da atividade hidrosmótica da vasopressina.

Objetivando obter maiores detalhes sobre o efeito bloqueador da dopamina sobre a ação do hormônio anti-diurético, foram realizados os experimentos mostrados no Gráfico 5. Pode ser observado nesse Gráfico que o efeito bloqueador da dopamina mostrou-se reversível, já que a ação da vasopressina foi restaurada no período seguinte (4º), realizado sem a presença da dopamina. Deve-se notar que os valores obtidos nesse 4º período experimental $20,40 \pm 1,80$ ($N = 8$) $\mu\text{l}/\text{min}$, (com vasopressina, mas sem dopamina) não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$; teste t, amostras não pareadas) da aqueles verificados em outros grupos experimentais nas quais a vasopressina foi adicionada após o período controle $22,95 \pm 1,61$ ($N = 8$) $\mu\text{l}/\text{min}$, evidenciando a total recuperação da capacidade de aumento do transporte de água pelo epitélio que fora tratado previamente por dopamina.

Na Tabela VII, pode-se observar que no período experimental realizado na presença de dopamina, após o fluxo de água ter sido estimulado pela vasopressina, os valores de fluxo foram bem maiores $2,57 \pm 0,28$ ($N = 8$) $\mu\text{l}/\text{min}$, do que os valores encontrados na mesma condição experimental em bexigas que não tiveram contato prévio com o hormônio anti-diurético $0,65 \pm 0,25$ ($N = 8$) $\mu\text{l}/\text{min}$ sugerindo um efeito residual da vasopressina nessas condições experimentais.

TABELA V - Efeito da adição serosal de Dopamina (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o transporte de água em hemi-bexigas de sapo, isoladas do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l}/\text{min}$)	
	HEMI-BEXIGA CONTROLE	HEMI-BEXIGA EXPERIMENTAL DOPAMINA
1	0,26	0,01
2	0,37	0,57
3	0,55	0,52
4	0,27	0,67
5	0,34	0,52
6	1,13	0,42
7	2,77	0,17
8	2,36	2,32
$\bar{X}$	1,00	0,65
	$\pm$	$\pm$
EPM	0,35	0,25
P	N.S.	

- Períodos experimentais de 30 minutos

- N.S. = Não Significativo

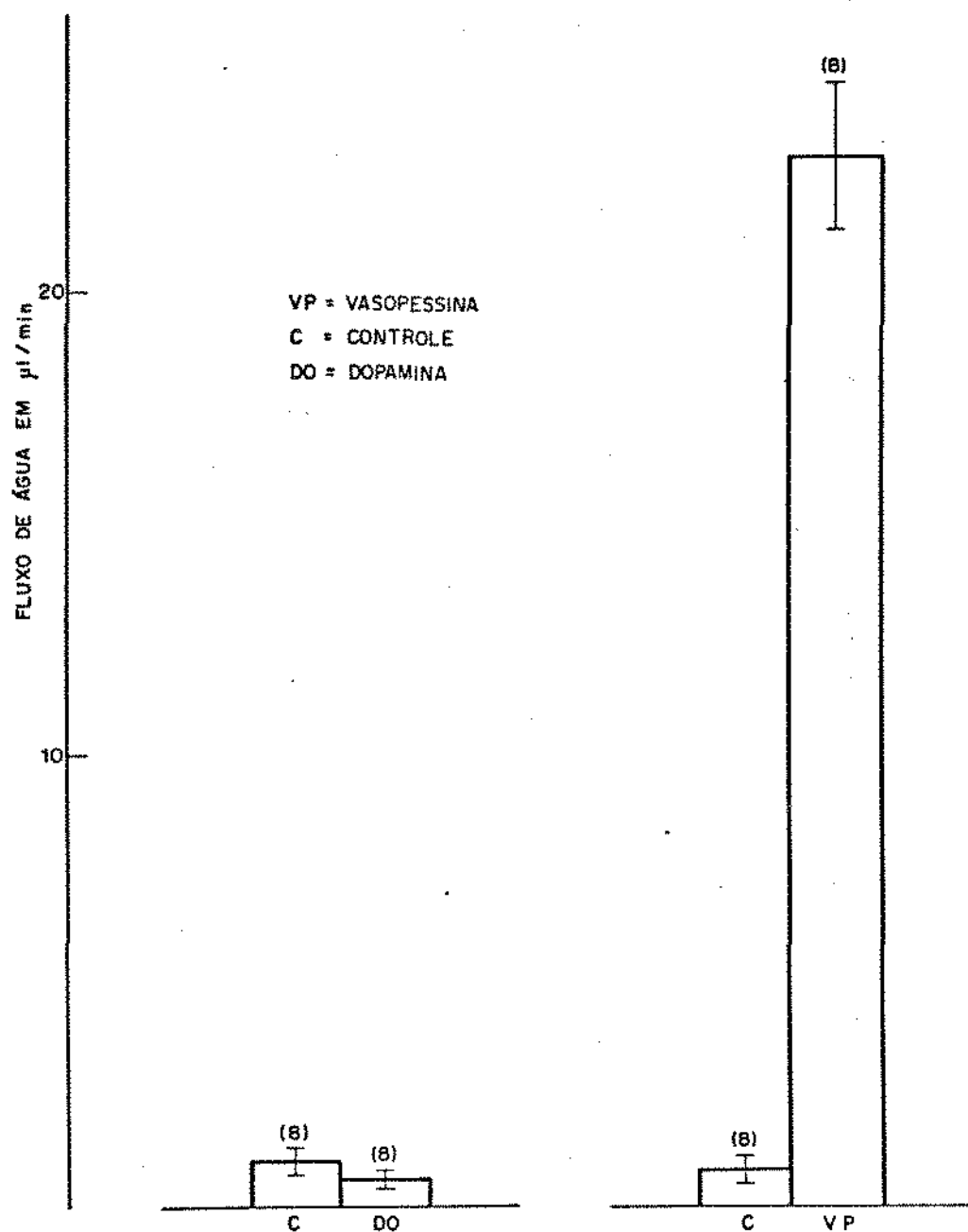


GRÁFICO 3 - Comparação entre os efeitos da Dopamina ($25 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) e da Vasopressina ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o fluxo osmótico de água em bexiga de sapo. (8) = Número de experimentos.

TABELA VI - Efeito da Dopamina (25 μ l/ml de banho) sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina (1 μ l/ml de banho) em experimentos conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal

FLUXO DE ÁGUA (μ l/min)		
NÚMERO DO EXPERIMENTO	HEMI-BEXIGA CONTROLE VASOPRESSINA	HEMI-BEXIGA EXPERIMENTAL VASOPRESSINA + DOPAMINA
1	15,78	8,71
2	24,63	8,74
3	31,24	9,98
4	23,11	7,30
5	18,43	7,65
6	22,54	4,11
7	24,63	6,34
8	23,23	9,00
$\bar{X}$	22,95	7,73
	$\pm$	$\pm$
EPM	1,61	0,65
P	< 0,01	

- Períodos experimentais de 30 minutos

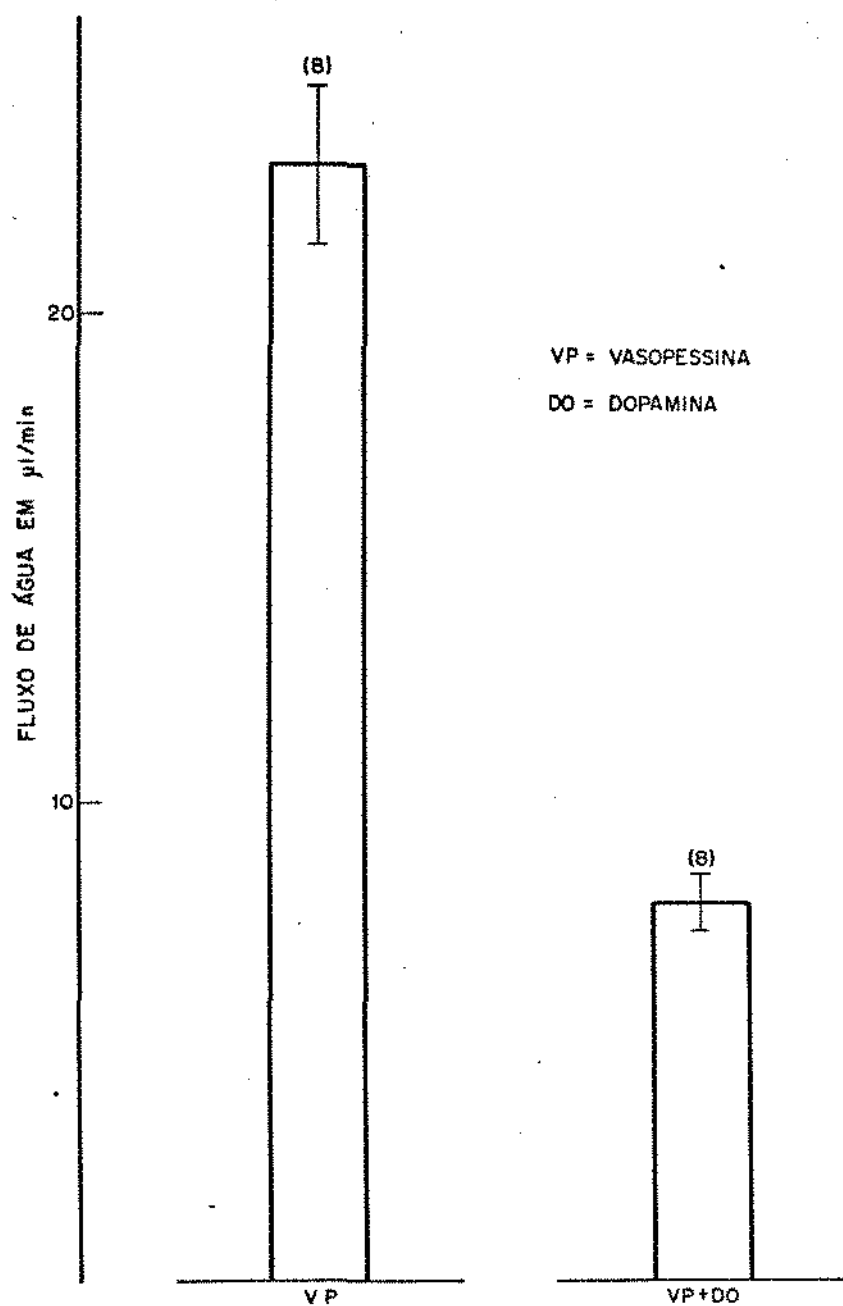


GRÁFICO 4 - Efeito da Dopamina ($25 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o efeito hidrosmótico da Vasopressina ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemibexigas do mesmo animal.

(8) = Número de experimentos.

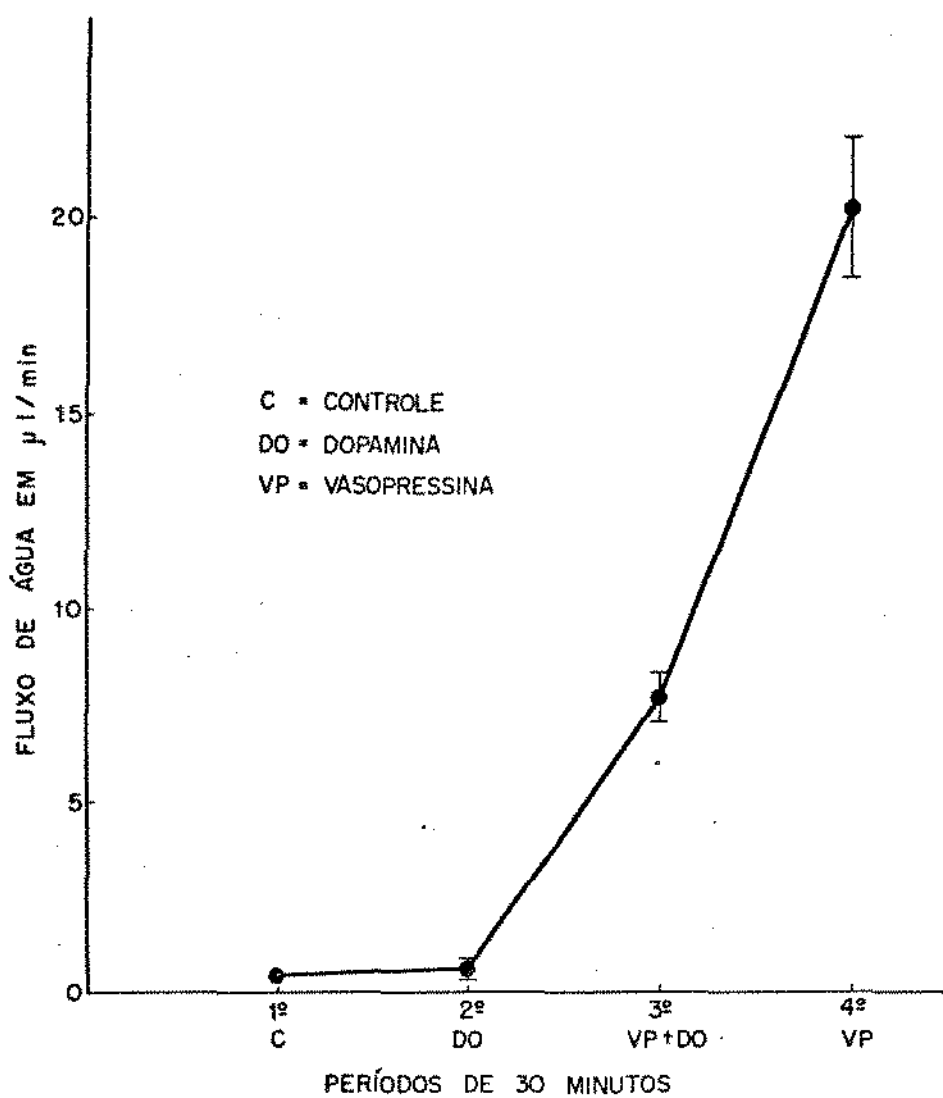


GRÁFICO 5 - Reversibilidade do efeito da Dopamina ($25 \mu\text{l/ml}$ de banho) sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina ($1 \mu\text{l/ml}$ de banho). Experimentos foram conduzidos nas mesmas hemi-bexigas.

TABELA VII - Efeito comparativo entre a Dopamina (25 $\mu\text{l/ml}$ de banho) após Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) e o controle (Ringer Fosfato (250 mOsm/l)) sobre o transporte de água em hemi-bexiga provenientes do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l/min}$)	
	DOPAMINA APÓS VASOPRESSINA	DOPAMINA APÓS CONTROLE
1	2,07	0,01
2	1,35	0,57
3	1,90	0,52
4	2,33	0,67
5	2,93	0,52
6	3,54	0,42
7	2,93	0,17
8	3,54	2,32
$\bar{X}$	2,57	0,65
	$\pm$	$\pm$
EPM	0,28	0,25
P	< 0,01	

- Períodos experimentais de 30 minutos

III - ISOPRENALINA

Os resultados de HANDLER & ORLOFF, 1968 (22) sugerem que o efeito bloqueador das catecolaminas sobre a ação hidrosmótica da vasopressina, seria exercido mediante a ativação de receptores alfa adrenérgicos presentes na face basal-lateral (serosa, meio interno) da membrana da bexiga urinária de sapo. Por outro lado, esses autores obtiveram resultados altamente variáveis com a isoprenalina, uma catecolamina conhecida como a ativadora por excelência dos receptores beta adrenérgicos, os quais, ao contrário dos receptores alfa adrenérgicos, ativam a enzima adenilciclase quando são estimulados. Dessa maneira, obtém-se em consequência um aumento da concentração de AMP cíclico (DE SOUZA & GROSSO, 1981) (11) e, por conseguinte dever-se-ia esperar uma estimulação do fluxo de água através das membranas celulares.

Objetivando contribuir com o estudo do processo de interação das catecolaminas com membranas e a sua interferência com os efeitos celulares da vasopressina sobre o epitélio urinário, resolvemos utilizar essa droga nos nossos experimentos.

A adição de isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) ao banho (meio interno, face serosa) não levou a alteração da permeabilidade normal do epitélio a água conforme é mostrado na Tabela VIII. Para efeito de comparação o Gráfico 6 apresenta, também, os resultados obtidos com a vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) nas mesmas condições.

A Tabela IX e o Gráfico 7 ilustram o efeito da iso

prenalina sobre a ação da vasopressina, em experimentos pareados (N = 7) conduzidos em preparações de hemi-bexigas (gêmeas) retiradas do mesmo animal. Os resultados mostram que essa catecolamina sintética induz a um bloqueio discreto, mas significativo ($P < 0,05$), do efeito hidrosmótico da vasopressina, embora esse efeito não seja tão evidente como os exercidos pela adrenalina e dopamina.

Em comparação com a total reversibilidade do efeito da dopamina e adrenalina, foi notado que o discreto efeito bloqueador da isoprenalina sobre a ação hidrosmótica da vasopressina parece não ser reversível. Conforme pode ser observado na Tabela X, o fluxo de água em presença de vasopressina após a bexiga ter sido submetida à lavagem posterior ao tratamento por isoprenalina, apresentou valores de $20,99 \pm 1,94$ (N = 7) $\mu\text{l}/\text{min}$, enquanto que em outras bexigas, o fluxo de água estimulado por vasopressina foi de $27,30 \pm 2,83$ (N = 7) $\mu\text{l}/\text{min}$, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$; teste t, amostras não pareadas).

Na Tabela XI pode-se observar que a adição de isoprenalina isoladamente após a instalação do efeito do hormônio anti-diurético na membrana, levou à obtenção de valores maiores ($P < 0,05$) que os observados no período com isoprenalina após o controle, revelando novamente um efeito duradouro da vasopressina sobre o epitélio.

Com o intuito também de se avaliar com mais profundidade os eventos que poderiam estar ocorrendo mediante a ativação dos receptores alfa e beta adrenérgicos, resolvemos utilizar bloqueadores específicos para esses receptores, em

associação à isoprenalina.

A Tabela XII e o Gráfico 8 ilustram o efeito do agente bloqueador beta adrenérgico (propranolol (28 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho)) sobre o efeito da isoprenalina na ação da vasopressina, em experimentos pareados conduzidos em preparação de hemi-bexigas (gêmeas) retiradas do mesmo animal. Pode ser observado, além do bloqueio já descrito da isoprenalina sobre o efeito hidrosmótico da vasopressina, que a adição de propranolol na hemi-bexiga experimental não provocou alteração do fluxo de água em relação ao observado na outra hemi-bexiga (controle) nas mesmas condições (vasopressina associada a isoprenalina); sendo os valores observados de: $13,24 \pm 1,29$ (N = 6) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga na situação controle, para $12,00 \pm 1,08$ (N = 6) $\mu\text{l}/\text{min}$ na hemi-bexiga experimental (presença de vasopressina associada à isoprenalina e ao propranolol).

A Tabela XIII e o mesmo Gráfico 8, ilustram o efeito do agente bloqueador alfa adrenérgico (fentolamina (0,3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho)) sobre o efeito da isoprenalina associada à vasopressina, também em experimentos pareados conduzidos em preparações de hemi-bexigas (gêmeas) retiradas do mesmo animal. Conforme pode ser observado na hemi-bexiga controle (vasopressina associada à isoprenalina) o fluxo foi de: $14,69 \pm 1,29$ (N = 6) $\mu\text{l}/\text{min}$, enquanto que na hemi-bexiga experimental (vasopressina combinada com isoprenalina e fentolamina), o fluxo foi de: $17,40 \pm 1,53$ (N = 6) $\mu\text{l}/\text{min}$, sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa (P < 0,05), indicando um aumento da atividade hidrosmótica

da vasopressina nessas condições. Esta mesma tabela ilustra o efeito bloqueador da isoprenalina sobre o hormônio anti-diurético, já descrito em outros grupos experimentais.

TABELA VIII - Efeito da adição serosal de Isoprenalina (10 μ l/ml de banho) sobre o transporte de água em hemi-bexigas de sapo, isoladas do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA (μ l/min)	
	HEMI-BEXIGA CONTROLE	HEMI-BEXIGA EXPERIMENTAL ISOPRENALINA
1	0,89	0,51
2	1,62	0,48
3	0,56	1,25
4	1,05	1,61
5	0,67	1,31
6	0,67	1,84
7	1,43	1,58
$\bar{X}$	1,15	1,22
	$\pm$	$\pm$
EPM	0,29	0,20
P	N.S.	

- Períodos experimentais de 30 minutos

- N.S. = Não Significativo

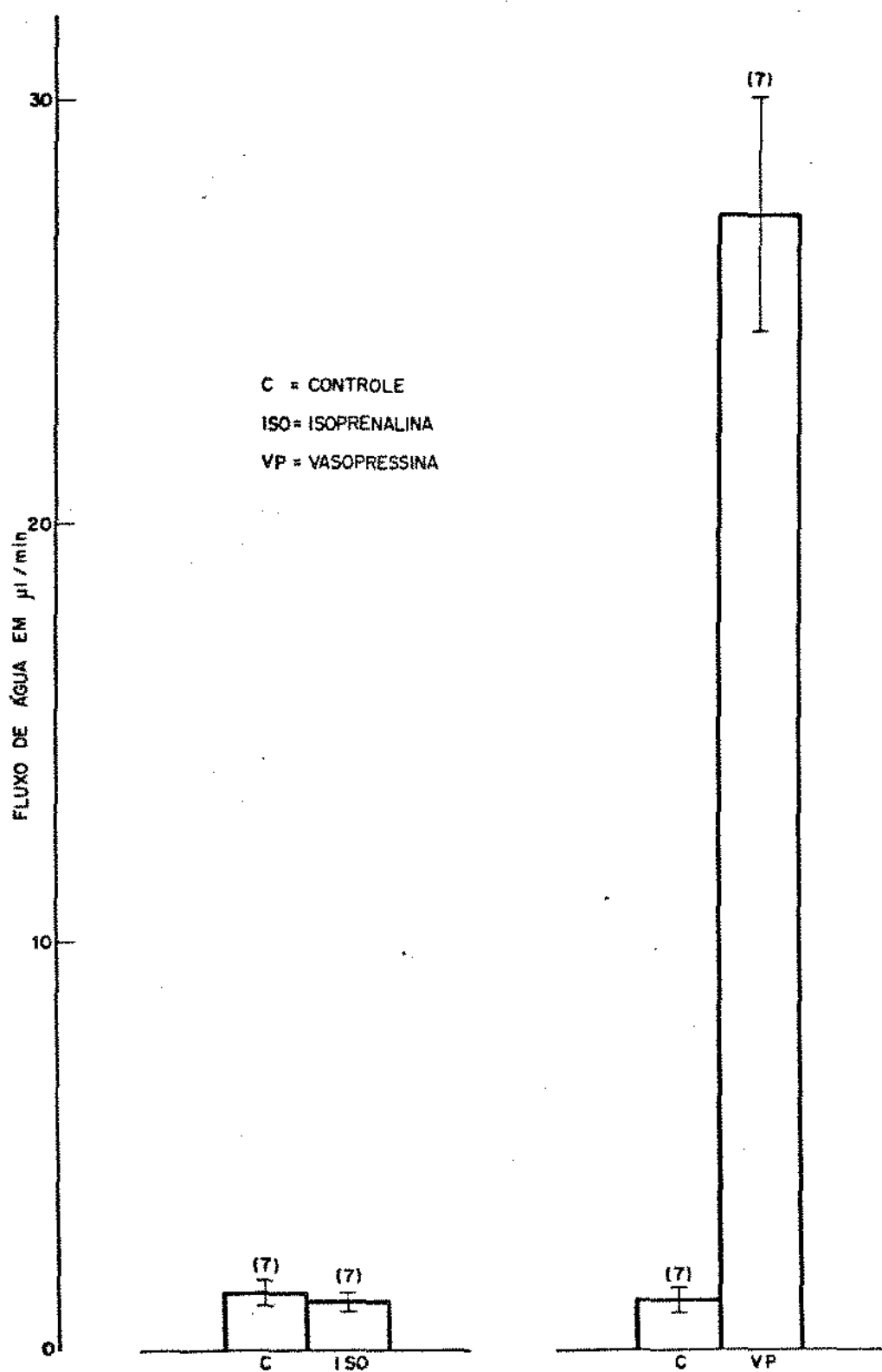


GRÁFICO 6 - Comparação entre os efeitos da Isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) e da Vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o fluxo osmótico de água na bexiga de sapo.

(7) = Número de experimentos.

TABELA IX - Efeito da Isoprenalina (10 $\mu\text{l/ml}$ de banho) sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) em experimentos conduzidos em hemi-bexi gas provenientes do mesmo animal

FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l/min}$)		
NÚMERO DO EXPERIMENTO	HEMI-BEXIGA CONTROLE VASOPRESSINA	HEMI-BEXIGA EXPERIMENTAL VASOPRESSINA + ISOPRENALINA
1	29,20	24,74
2	24,60	17,64
3	35,07	22,64
4	36,68	20,22
5	16,72	18,20
6	19,37	25,83
7	29,30	17,23
$\bar{X}$	27,30	20,93
	$\pm$	$\pm$
EPM	2,83	1,23
P	< 0,05	

- Períodos experimentais de 30 minutos

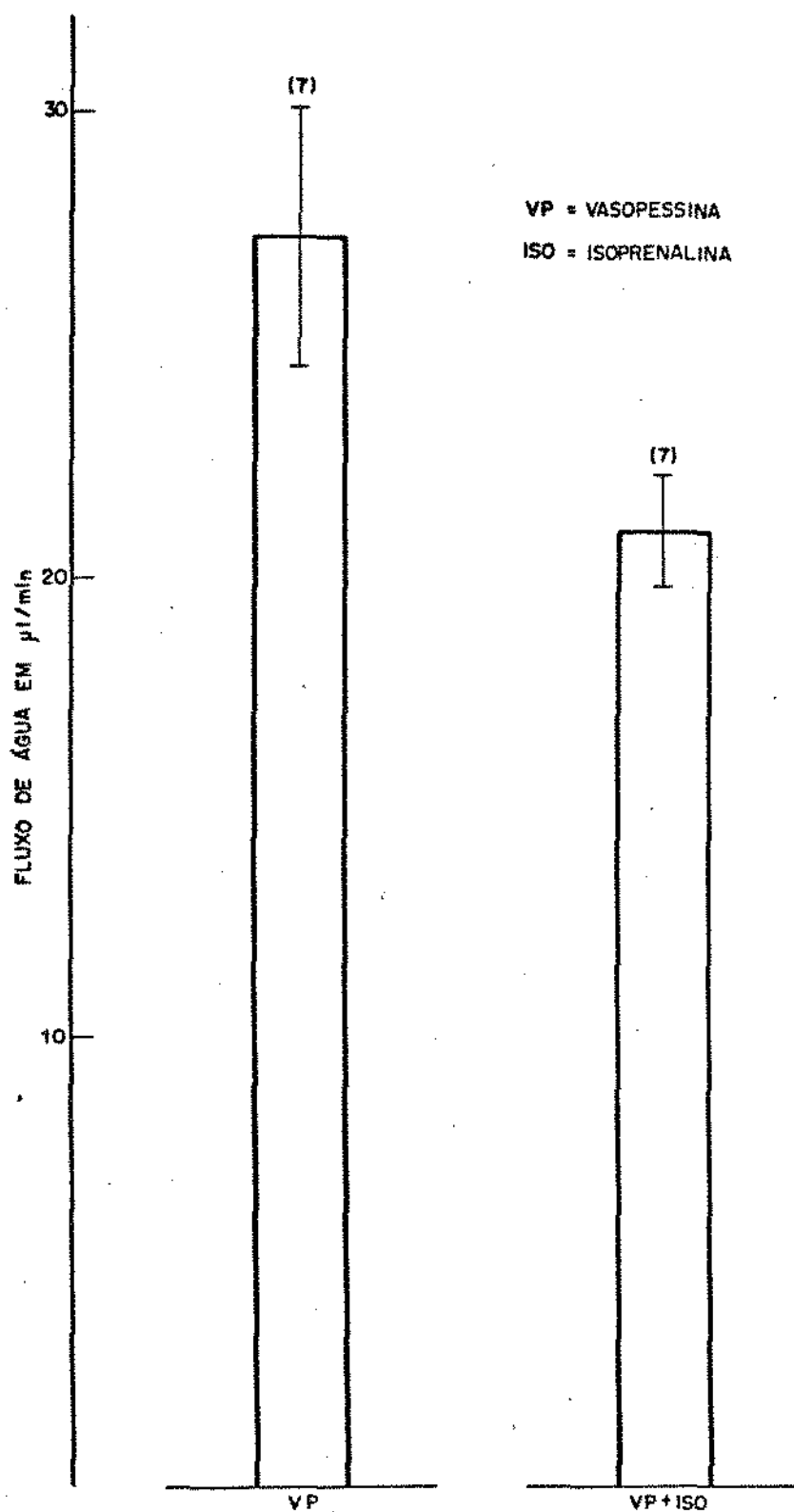


GRÁFICO 7 - Efeito da Isoprenalina ($10 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o efeito hidrosmótico da Vasopressina ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas do mesmo animal.
(7) = Número de experimentos.

TABELA X - Efeito comparativo entre a Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) após Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) as sociada a Isoprenalina (10 $\mu\text{l/ml}$ de banho) e o controle (Ringer Fosfato (250 mOsm/l)) sobre o transporte de água em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l/min}$)	
	VASOPRESSINA APÓS	VASOPRESSINA APÓS
	VASOPRESSINA + ISOPRENALINA	CONTROLE
1	18,38	29,20
2	18,92	24,60
3	27,70	35,07
4	12,48	36,68
5	20,30	16,72
6	25,87	19,37
7	23,30	29,30
$\bar{X}$	20,99	27,30
	$\pm$	$\pm$
EPM	1,94	2,83
P	< 0,05	

- Períodos experimentais de 30 minutos

TABELA XI - Efeito comparativo entre a Isoprenalina (10 $\mu\text{l/ml}$ de banho) após Vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) e o controle (Ringer Fosfato (250 mOsm/l)) sobre o transporte de água em hemi-bexiga proveniente do mesmo animal

NÚMERO DO EXPERIMENTO	FLUXO DE ÁGUA ($\mu\text{l/min}$)	
	ISOPRENALINA APÓS VASOPRESSINA	ISOPRENALINA APÓS CONTROLE
1	2,78	0,51
2	1,18	0,48
3	2,21	1,25
4	2,63	1,61
5	1,24	1,31
6	1,20	1,84
7	1,38	1,58
$\bar{X}$	1,80	1,22
	$\pm$	$\pm$
EPM	0,27	0,20
P	< 0,05	

- Períodos experimentais de 30 minutos

TABELA XII - Efeito da adição de Propranolol (28 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o bloqueio produzido pela Isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) da ação hidrosmótica da Vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal. Esta mesma tabela ilustra o efeito da Isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre ação hidrosmótica da Vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho)

HEMIBEXIGAS A		
NÚMERO DO EXPERIMENTO	VASOPRESSINA (CONTROLE)	VASOPRESSINA + ISOPRENALINA (EXPERIMENTAL)
1	13,23	12,71
2	27,32	14,57
3	18,97	11,08
4	22,37	17,92
5	11,57	7,30
6	12,05	9,00
$\bar{X}$	17,58	12,10
	$\pm$	$\pm$
EPM	2,61	1,57
P	< 0,05	

HEMIBEXIGAS B	
VASOPRESSINA + ISOPRENALINA (CONTROLE)	VASOPRESSINA + ISOPRENALINA + PROPRANOLOL (EXPERIMENTAL)
9,38	13,16
18,26	16,94
13,40	11,05
15,30	10,51
11,76	10,33
11,33	10,04
13,24	12,00
$\pm$	$\pm$
1,29	1,08
N.S.	

- Os resultados são expressos em $\mu\text{l}/\text{minuto}$
- Períodos experimentais de 30 minutos
- N.S. = Não Significativo

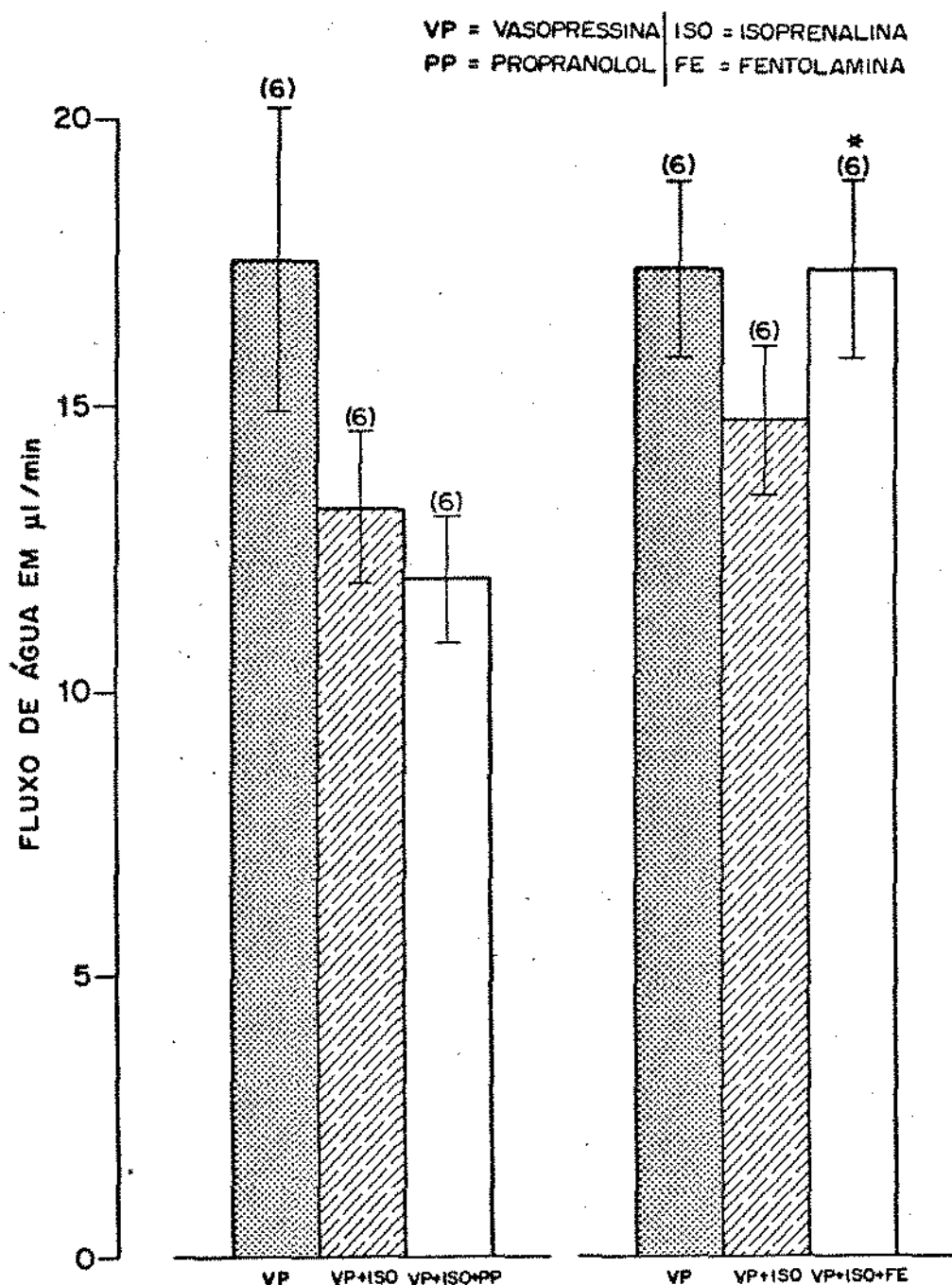


GRÁFICO 8 - Comparação entre os efeitos do propranolol (28 µl/ml de banho) e da fentolamina (0,3 µl/ml de banho) sobre o efeito produzido pela Isoprenalina (10 µl/ml de banho) na ação hidrosmótica da Vasopressina (1 µl/ml de banho) em hemi-bexi gas de sapos, isolados do mesmo animal.

(6) = Número de experimentos.

* = Significante ($P < 0,05$) em relação ao controle (Vasopressina + Isoprenalina).

TABELA XIII - Efeito da adição de fentolamina (0,3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre o bloqueio produzido pela Isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) na ação hidrosmótica da Vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal. Esta mesma tabela ilustra para o efeito da Isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho) sobre ação hidrosmótica da Vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de banho)

HEMIBEXIGAS A		
NÚMERO DO EXPERIMENTO	VASOPRESSINA (CONTROLE)	VASOPRESSINA + ISOPRENALINA (EXPERIMENTAL)
1	16,81	13,46
2	22,66	17,00
3	18,95	13,57
4	14,84	12,09
5	19,17	13,55
6	11,97	9,19
$\bar{X}$	17,40	13,14
	$\pm$	$\pm$
EPM	1,52	1,03
P	< 0,01	

HEMIBEXIGAS B	
VASOPRESSINA + ISOPRENALINA (CONTROLE)	VASOPRESSINA + ISOPRENALINA + FENTOLAMINA (EXPERIMENTAL)
13,97	20,04
18,56	19,76
16,22	21,09
14,23	15,17
15,97	17,22
9,20	11,15
14,69	17,40
$\pm$	$\pm$
1,29	1,53
< 0,05	

- Os resultados são expressos em $\mu\text{l}/\text{minuto}$
- Períodos experimentais de 30 minutos

DISCUSSÃO

Com relação a metodologia por nós empregada para medida do fluxo de água, pode-se afirmar que a mesma, em virtude da sua simplicidade e, principalmente, da sua reprodutibilidade, vem sendo largamente empregada, conforme se depreende com o grande número de citações na literatura, das quais poderíamos mencionar, como exemplo, os trabalhos de HANDLER & colab. (1968) (22); JARD (1971) (28); HARDY & colab. (1982) (24).

Foi demonstrado que possíveis fontes de erro, tais como a secagem durante as pesagens e as variações do tônus muscular da bexiga, não levam a alterações significantes da medida do fluxo, já que as variações de peso devidas ao transporte de água são bem maiores que aquelas devidas às citadas interferências.

Uma crítica que pode ser feita a este sistema é que se trabalha com um gradiente de pressão osmótica que não é mantido constante, sendo que o mesmo poderia ser reduzido durante o próprio período experimental. Entretanto, SILVEIRA (1972) (45) verificou que a variação de peso da bexiga é linear em relação ao tempo no período experimental de 40 minutos, o que comprova que o gradiente inicialmente estabelecido nos nossos experimentos não deve se alterar significativamente, já que utilizamos períodos de 30 minutos. Além disso, nos nossos experimentos, o volume do compartimento seroso foi de 40 ml, o que contribui para minimizar ainda mais esse possível fator de erro.

Examinando os dados obtidos por HANDLER & colab. (1968) (22) em bexiga de sapo, observamos que a utilização

de agentes bloqueadores alfa e beta adrenérgicos (fentolami
na e propranolol, respectivamente) não interferem com a res
posta do tecido à vasopressina. Dessa forma, pode-se supor
que nessa estrutura, os receptores da membrana para a vaso
pressina e para os agentes alfa e beta adrenérgicos seriam
distintos.

Os nossos resultados, como mostram os Gráficos 3,
5 e 8, confirmam, de uma maneira geral, essas observações.
Verificamos que na ausência de vasopressina, a permeabilida
de da membrana à água é baixa e que a adição de catecolami
nas (tanto adrenalina (2 $\mu\text{l/ml}$ de banho), como dopamina
(25 $\mu\text{l/ml}$ de banho), ou isoprenalina (10 $\mu\text{l/ml}$ de banho)) ao
banho não altera essa situação.

Verificamos, também, por outro lado, que a associa
ção da vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) com qualquer uma des
as catecolaminas, leva a um bloqueio do efeito hidrosmótico
da vasopressina, como mostra o Gráfico 9, na qual os efei
tos da adrenalina, dopamina e isoprenalina são comparados em
termos de porcentagem de inibição.

Analisando os nossos resultados quanto à reversibi
lidade do efeito bloqueador das catecolaminas (Isoprenalina
e Dopamina) sobre ação hidrosmótica da vasopressina, verifi
camos que a dopamina apresenta reversibilidade de efeito, en
quanto o bloqueio apresentado pela isoprenalina não é rever
sível.

É sabido que a ativação de receptores beta adrenér
gicos provoca um aumento da concentração de AMP cíclico
(HANDLER & colab., 1969) (23). Dessa forma esperar-se-ia uma

exacerbação e não um bloqueio do efeito da vasopressina, pelo emprego de agentes beta adrenérgicos, principalmente a isoprenalina. Contrariamente a essa hipótese, observamos a um discreto, mas significativo, bloqueio da (ordem de 16%) do efeito hidrosmótico da vasopressina.

Antes de analisarmos esses resultados, descreveremos um modelo proposto por LEWITZKI (1982) (34), que servirá de suporte para essa análise.

Este modelo detalha a ativação e a inibição da enzima adenil-ciclase por hormônios a nível molecular: segundo esse modelo, a estimulação dessa enzima requer a presença, numa concentração ótima, de Guanosina Trifosfato (GTP). Dessa forma, o sistema seria composto de três unidades funcionais: 1º) o receptor para o hormônio ou para o neurotransmissor; 2º) a unidade proteica que, ao manter o GTP em níveis adequados, regularia a atividade da enzima adenil-ciclase; 3º) a unidade catalítica da molécula da enzima adenil-ciclase, que promove a transformação de ATP em AMP cíclico. Esse autor propõe que os principais eventos na ativação da adenil-ciclase são o encontro bimolecular entre o agonista e o receptor, de um lado e a formação do complexo entre a unidade reguladora e a unidade catalítica, de outro.

Examinando esse modelo, duas hipóteses poderiam ser aventadas para os nossos resultados: 1º) uma participação dos receptores beta adrenérgicos na ativação ou inibição da unidade reguladora do complexo enzimático, de forma que a concentração ótima de GTP ou não fosse atingida ou fosse largamente ultrapassada; 2º) uma ação da isoprenalina sobre re

ceptores alfa adrenérgicos dessa membrana, os quais, comprovadamente, levam a um bloqueio do efeito da Vasopressina.

Essa última hipótese parece ser a mais plausível, já que em nossos experimentos, com a adição simultânea de isoprenalina (10 $\mu\text{l/ml}$ de banho), de um agente beta bloqueador (propranolol (28 $\mu\text{l/ml}$ de banho)) e de vasopressina (1 $\mu\text{l/ml}$ de banho) ao banho, continuou-se a verificar o bloqueio do efeito hidrosmótico do hormônio, ao contrário do que ocorreu quando da utilização dessa catecolamina associada a um agente alfa adrenérgico (Fentolamina (0,3 $\mu\text{l/ml}$ de banho)) e à vasopressina. Nessa situação verificou-se uma liberação do efeito hidrosmótico da vasopressina, como mostra o Gráfico 10.

Da mesma forma, a ativação de possíveis receptores dopaminérgicos na bexiga de sapo deveria, a exemplo de outros tecidos (KEBABIAN & colab., 1979) (29), levar a um aumento da concentração de AMP cíclico e, portanto, a um efeito sinérgico em relação a ação da vasopressina. Nesse caso, o bloqueio da ação do hormônio pela dopamina na bexiga de sapo parece ser decorrente de uma atividade dessa catecolamina sobre receptores alfa adrenérgicos, os quais, seguramente estão presentes nessa estrutura.

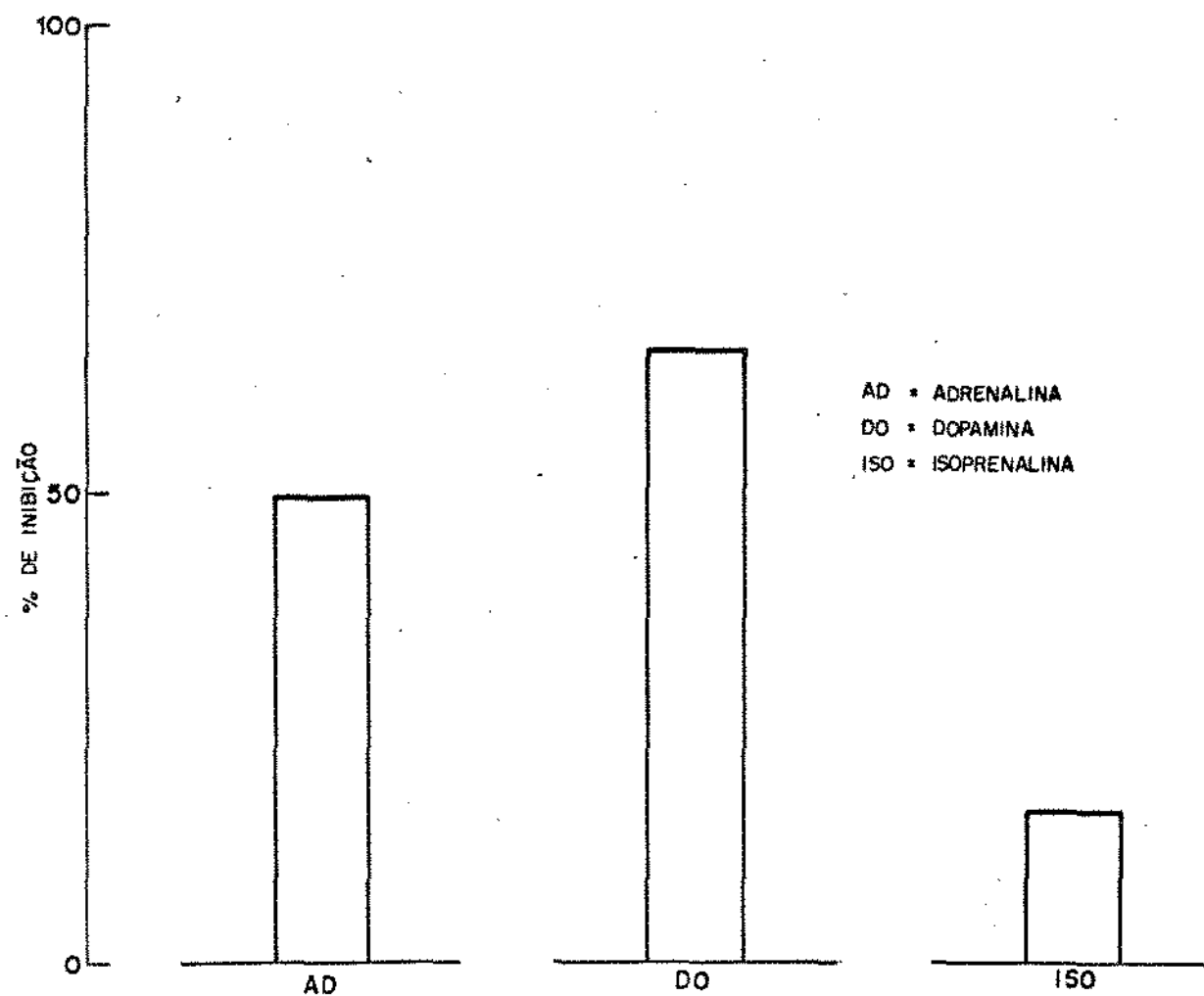


GRÁFICO 9 - Porcentagem de inibição das catecolaminas sobre o efeito hidrosmótico da Vasopressina.

CONCLUSÕES

Baseando-se na análise dos resultados obtidos, podemos concluir que:

1 - A adição isolada de cada uma das catecolaminas estudadas não altera a permeabilidade normal do epitélio à água;

2 - Os receptores para a vasopressina e para os agentes adrenérgicos estudados são distintos;

3 - Os agentes adrenérgicos provocam um bloqueio do efeito hidrosmótico da vasopressina em bexiga de sapo;

4 - Agentes adrenérgicos do tipo adrenalina e dopamina promovem um bloqueio marcante (da ordem de 50%), o qual é reversível, enquanto a isoprenalina induz a um bloqueio discreto (da ordem de 16%), o qual não é reversível;

5 - A associação da isoprenalina, vasopressina e de um agente bloqueador beta adrenérgico (propranolol), não restaurou o efeito da vasopressina. Ao contrário, a associação de um agente bloqueador alfa adrenérgico (fentolamina) à isoprenalina e à vasopressina, restaurou o efeito do hormônio, evidenciando a participação de receptores alfa adrenérgicos no fenômeno de bloqueio da ação hidrosmótica da vasopressina pelas catecolaminas.

SINOPSE

O presente trabalho relaciona a manipulação de receptores adrenérgicos por diversos agentes farmacológicos com a ação hidrosmótica da vasopressina em bexiga de sapo. O fluxo de água foi medido pelo método de BENTLEY, 1958 (3), que consiste na determinação gravimétrica do fluxo de volume quando se impõe uma diferença de pressão osmótica entre as duas faces da membrana. Foi constatado que, em condições de controle ou somente em presença de agentes adrenérgicos, o fluxo de água apresentou-se com valores muito baixos (da ordem de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$) a despeito de gradiente osmótico de considerável magnitude (4,5 atm). Foi evidenciada, também, a independência entre os receptores para a vasopressina e para os agentes adrenérgicos. Na presença de vasopressina (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) o fluxo de água aumenta extraordinariamente (cerca de 20-30 vezes), num processo mediado pelo AMP cíclico. A ativação de receptores adrenérgicos por adrenalina (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$) provocou um bloqueio significativo (da ordem de 50%) da ação hidrosmótica da vasopressina. Efeito semelhante, embora de maior magnitude, foi observado pela adição de dopamina (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$), a qual, além de atuar sobre receptores adrenérgicos, atua também sobre receptores dopaminérgicos.

A isoprenalina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$) induziu a um bloqueio discreto (cerca de 16%) da ação da vasopressina. Associando-se essa catecolamina a um agente beta bloqueador (propranolol (28 $\mu\text{l}/\text{ml}$)) persistiu a observação do bloqueio discreto da ação da vasopressina. Por outro lado, a associação da isoprenalina a um agente alfa bloqueador (fentolamina (0,3 $\mu\text{l}/\text{ml}$)) levou a observação do pleno restabelecimento da

ação da vasopressina, evidenciado a participação de receptores alfa adrenérgicos no bloqueio do efeito hidrosmótico da vasopressina pela isoprenalina e caracterizando, na bexiga de sapo, uma interação entre essa catecolamina e receptores alfa adrenérgicos.

SUMMARY

The present work correlates adrenergic receptor manipulation by several pharmacological agents to the hydrosmotic response of the toad urinary bladder to vasopressin. Water flow was measured by the technique of BENTLEY (1958) (3) which consists of the gravimetric determination of the volume flow when an osmotic pressure difference is imposed between the two faces of the membrane. It was observed very low values for the water flow (about 1 $\mu\text{l}/\text{min}$) in control conditions or in the presence of the adrenergic agents alone in spite of an osmotic gradient of considerable magnitude (4.5 atm). The independence between vasopressin receptors and adrenergic agents receptors could be demonstrated. Vasopressin (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) increased extraordinarily the water flow (about 20-30 times) through a cyclic AMP-mediated process. The adrenoceptor activation by epinephrine (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$) lead to a significant blockage (about 50%) of the hydrosmotic action of vasopressin. Similar results, although in a higher extent, were observed by the addition of dopamine (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$) which interacts not only with the adrenoceptors but also with dopaminergic receptors. A small blockage (about 16%) of the vasopressin effect was seen by the use of isoproterenol (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$). The association of this catecholamine to a beta-adrenoceptor blocking drug (propranolol (28 $\mu\text{l}/\text{ml}$)) resulted in a discrete decrease of the vasopressin effect. On the other hand, association of isoproterenol to a alpha-adrenoceptor blocking drug (phentolamine (0,3 $\mu\text{l}/\text{ml}$)) restored the effect of vasopressin, evidencing a role for alpha-adrenoceptors on the blockage of the hydrosmotic effect of vasopressin, and further characterizing an interaction between this

catecholamine and alpha-adrenoceptors in the toad bladder.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AL-ZAHID, G.; SCHAFER, J.A.; TROUTMAN, S.L.; ANDREOLI, T.E. Effect of antidiuretic hormone on water and solute permeation, and the activation energies for the se processes, in mammalian cortical collecting tubules. J. Membrane Biol. 31:103, 1977.
- 2 - AMBALAVANAR, S.R.; FOSTER, W.; SCHNIEDEN, H. Effects of sympathomimetics on water movement across toad isolated bladder. J. Pharm. Pharmacol. 24:501-502, 1972.
- 3 - BENTLEY, P.J. The effects of neurohypophysial extracts on water transport across the wall of the isolated urinary bladder of the toad Bufo marinus. J. Endocrinol. 17:201-209, 1958.
- 4 - ———— Physiological properties of the isolated frog bladder in hyperosmotic solutions. Comp. Biochem. Physiol. 12:233-239, 1964.
- 5 - ———— IN: Endocrine and Osmoregulation, Springer-Verlag, Berlin, ed. by B. Berde, 1971, pág. 161-197.
- 6 - BURCH, M.R. & HALUSHKA, P.V. The role of thromboxane A_2 in the control of vasopressin-stimulated water flow in the toad urinary bladder. Ann. Ny. Acad. Sci. 372:204-205, 1981.

- 7 - BURCH, M.R. & HALUSHKA, P.V. Inhibition of Prostaglandin Synthesis Antagonizes the Colchicine - Induced Reduction of Vasopressin - Stimulated Water Flow in the Toad Urinary bladder. Mol. Pharmacol. 21:142-149, 1981.
- 8 - CHEVALIER, J. & HUGON, J.A. Membrane - associated particles: distribution in frog urinary bladder epithelium at rest and after oxytocin treatment. Cell Tissue Res. 152:129, 1974.
- 9 - CIRNE, B.R.; REIS, H.A.; SILVEIRA, J.E.N. Skin water uptake and renal function in the toad. Comp. Biochem. Physiol. 69A:219-224, 1981.
- 10 - CHRISTENSEN, C.U. Adaptation in the Water economy of some anuran amphibia. Comp. Biochem. Physiol. 47A: 1035-1049, 1974.
- 11 - DE SOUZA, R.C. & GROSSO, A. Osmotic Water Flow Across the Abdominal Skin of the toad Bufo marinus: Effect of vasopressin and Isoprenaline. J. Physiol. (Paris) 77:281-295, 1981.
- 12 - ——— FORSKOLIN Mimics the Hydrosmotic Action of Vasopressin in the urinary Bladder of Toads Bufo marinus. J. Physiol. 365:307-318, 1985.

- 13 - DEYRUP, I.J. IN: Physiology of the Amphibia, ed. by John A. Moore, Academic Press, New York, 1964, pág. 251-328.
- 14 - DIAMOND, J.M. Solute-linked water transport in epithelia. IN: HOFFMAN, J.F. (ed.) Membranes transport processes. Ny. Reaven Press, 1978, Vol. 1, pág. 257.
- 15 - FAHRENHOLZ, F.; BOER, R.; CRAUSE, P.; FRITZSCH, G.; GRZONKA, Z. Interacions of Vasopressin Agonists and Antagonist with Membrane Receptors. Eur. J. Pharmacol. 100:47-58, 1984.
- 16 - FORREST, J.N. & GOODMAN, D.B.P. pH Depedent Prostaglandin E₂ production and somatostatin: Modulators of the Action of Vasopressin in the toad urinary bladder. Ann. Ny. Acad. Sci. 372:180-193, 1981.
- 17 - GOLDBERG, D.N. Cyclic nucleotides and cell function. IN: Cell Membranes, 1ª ed., H.P. Publishing Co., Inc. Publishers, 1975, Chapter 19, pg. 190.
- 18 - GOLDBERG, L.I. DOPAMINE - Clinical uses of an endogenous catecholamine. New Eng. J. Med., 291:707-710, 1974.
- 19 - HAYS, R.M. & LEAF, A. Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. J. Gen. Physiol. 45:905-912, 1962.

- 20 - HAYS, R.M. Antidiuretic Hormone. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. New Engl. J. Med. 295(12):659-665, 1976.
- 21 - ——— Alteracion of luminal membrane structure by antidiuretic hormone (Review). Am. J. Physiol. 245(5)-289C, 1983.
- 22 - HANDLER, J.S.; BENSINGER, R.; ORLOFF, J. Effect of adrenergic agents on toad bladder response to ADH, 3'5' AMP, and theophylline. Am. J. Physiol. 215(5):1024-1031, 1968.
- 23 - HANDLER, J.S.; PRESTON, A.S.; ORLOFF, J. Effect of adrenal steroid hormones on the response of the toad's urinary bladder to vasopressin. J. Clin. Invest. 48: 823, 1969.
- 24 - HARDY, M.A. & DiBONA, D.R. Extracellular Ca^{+2} and the effect of antidiuretic hormone on the water permeability of the toad urinary bladder: An example of flow induced alteration of flow. J. Membrane Biol. 67:27-44, 1982.
- 25 - HARMANCI, M.C.; STERN, P.; KACHADORIAN, W.A.; VALTIN, H.; DISCALA, V.A. Vasopressin and collecting duct intramembranous particle clusters: a dose-response relationship. Am. J. Physiol. 239F:560, 1980.

- 26 - HEBERT, S.C. & ANDREOLI, T.E. Interactions of temperature and ADH on transport processes in cortical collecting tubules. Am. J. Physiol. 238:470F, 1980.
- 27 - HERRERA, F.C. Membranes and ion transport - Frog skin and toad bladder. Interscience 3:1-47, 1971.
- 28 - JARD, S. The mode of action of ADH. J. Physiol. (Paris), 63:99-146, 1971.
- 29 - KEBABIAN, J.W. & CALNE, D.B. Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93-96, 1979.
- 30 - KOEFOED-JOHNSEN, V. & USSING, H.H. The contributions of diffusion and flow to the passage of H₂O through living membranes. Acta Physiol. Scand. 28(60), 1953.
- 31 - LACAZ-VIEIRA, F. & MALNIC, C. IN: BIOFÍSICA. 1ª ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1981, cap. 15, p. 348.
- 32 - LEVINE, S.D.; FRANKI, N.; HAYS, R.M. Effect of phoretin on water and solute movement in the toad bladder. J. Clin. Invest. 52:1435-1442, 1973.
- 33 - LEVINE, S.D.; LEVINE, R.; WORTHINGTON, R.; HAYS, R.M. Selective inhibition of osmotic water flow in toad urinary bladder by general anesthetics. Proc. 5th Biophys. Congress., p. 68, Copenhagen, 1975.

- 34 - LEVITZKI, A. Activation and inhibition of adenylate cyclase by hormones: mechanistic aspects. Trends Pharmacol. 3:203-208, 1982.
- 35 - MALNIC, G. & MARCONDES, M. IN: FISIOLOGIA RENAL. 2ª ed., São Paulo, E.P.U., 1983, cap. 10, p. 181, 183.
- 36 - MULLER, J.; KACHADORIAN, W.A.; DISCALA, V.A. Evidence that ADH-stimulated intramembrane particle aggregates are transferred from cytoplasmic to luminal membranes in toad bladder epithelial cells. Journal of Cell Biology 85:83-95, 1980.
- 37 - ORLOFF, J. & HANDLER, J.S. The similarity of effects of vasopressin, adenosine 3'5' - phosphate (cyclic AMP), and theophylline on the toad bladder. J. Clin. Invest. 41:702-709, 1962.
- 38 - ——— The celular mode of action of antidiuretic hormone. Am. J. Med. 36:686, 1964.
- 39 - ORLOFF, J.; HANDLER, J.S.; BERESTRON, S. Effect of Prostaglandin (PgE₁) on the permeability response of toad bladder to vasopressin, theophylline and adenosine 3'5' Monophosphate. Nature 205:397, 1965.
- 40 - PALMER, G.L. & LORENZEN, M. Antidiuretic hormone-dependent membrane capacitance and water permeability in the toad urinary bladder. Am. J. Physiol. 244: 195F-204, 1983.

- 41 - PEACHEY, L.D. & RASMUSSEN, H. Structure of the toad's urinary bladder as related to its physiology. J. Biophys. Biochem. Cytol. 10:529-553, 1961.
- 42 - PETERSON, M.J. & EDELMAN, I.S. Calcium inhibition of action of vasopressin on the urinary bladder of the toad. J. Clin. Invest. 43:583, 1964.
- 43 - SATO, M. & DUNN MICHAEL, J. Interactions of vasopressin, prostaglandins, and cAMP in rate renal papillary collecting tubule cells in culture. Am. J. Physiol. 247:423F-433, 1984.
- 44 - SCHAFER, J.A. & ANDREOLI, T. Cellular constraints to diffusion. The effect of antidiuretic hormone on water flows in isolated mammalian collecting tubules. J. Clin. Invest. 51:1264, 1972.
- 45 - SILVEIRA, J.E.N. Fluxo de água em bexiga isolada de sapo em função da constituição do meio. Botucatu, 1972 [Tese (Doutoramento) - Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas - UNESP].
- 46 - SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, G.W. IN: Statistical Methods. 5ª ed., IOWA, The IOWA State University Press, 1956.

- 47 - SMYTHE, C.M.; NICKEL, J.F.; BRADLEY, S.E. The effect of epinephrine (USP), β -epinephrine on glomerular filtration rate, renal plasma flow, and the urinary excretion of sodium, potassium, and water in normal man. J. Clin. Invest. 31:499-506, 1952.
- 48 - STEINMETZ, P.R.; OMACHI, R.S.; FRAZIER, H.S. Independence of hydrogen ion secretion and transport of other electrolytes in turtle bladder. J. Clin. Invest. 46:1541-1548, 1967.
- 49 - STEINMETZ, P.R. Cellular mechanisms of urinary acidification. Physiol. Rev. 54:890-956, 1974.
- 50 - TAYLOR, A.; MAMELOK, M.; REAVEN, E.; MAFFLY, R. Vasopressin: possible role of microtubules and microfilaments in its action. Science 181:347, 1973.
- 51 - TAYLOR, A.; MAFFLY, R.; REAVEN, E. Evidence for involvement of microtubules in the action of vasopressin. Ann. Ny. Acad. Sci. 253:723, 1975.
- 52 - WADE, J.B.; STETSON, D.L.; LEWIS, S.A. ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism. Ann. Ny. Acad. Sci. 372:106-117, 1981.
- 53 - WATLINGTON, C.O. & HUF, E.G. β -adrenergic stimulation of frog skin mucous glands: non specific inhibition by adrenergic blocking agents. Comp. Gen. Pharmacol. 2:295-305, 1971.

54 - ZUSMAN, R.M.; KEISER, H.R.; HANDLER, J.S. Vasopressin stimulated prostaglandin E biosynthesis in the toad urinary bladder. J. Clin. Invest. 60:1339-1347, 1977.