

WILSON FRANCO

ESTUDO DO EFEITO DA DOBUTAMINA (DOBUTREX)<sup>R</sup> E DA RADIAÇÃO  
LASER SOBRE A AÇÃO HIDROSMÓTICA DA VASOPRESSINA EM BEXIGA  
DE SAPO "IN VITRO"

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Farmacologia.

PIRACICABA - SP

1991

F848e

15672/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Este exemplar foi  
dovidosamente corrigido  
conforme as resoluções CCPG/83  
Piracicaba, 26. dezembro 1ª a 11*

WILSON FRANCO

ESTUDO DO EFEITO DA DOBUTAMINA (DOBUTREX)<sup>R</sup> E DA RADIAÇÃO  
LASER SOBRE A AÇÃO HIDROSMÓTICA DA VASOPRESSINA EM BEXIGA  
DE SAPO "IN VITRO"

Orientador: Prof. Dr. SAMIR TUFIC ARBEX \*

Tese apresentada à Faculdade de Odon-  
tologia de Piracicaba da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências, área  
de Farmacologia.

PIRACICABA - SP

1991

Dedico  
aos meus filhos  
RENATA, JULIANA e FÁBIO

e à minha esposa NEIDE.

Ao Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO N. SILVEIRA, Professor Titular do Departamento de Ciências Fisiológicas, FOA-UNESP, Araraquara, pela sua insubstituível ajuda, não só na parte científica deste trabalho como também pelo exemplo de atuação universitária, tão importante à minha formação.

Ao Prof. Dr. SAMIR TUFIC ARBEX,  
Professor Titular do Departamento  
de Ciências Fisiológicas, FOP-UNICAMP,  
pela valiosa orientação, apoio, amizade  
e elevado senso científico que sempre  
procurou transmitir.

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. CARLOS A. VOGT, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo apoio ao ensino e à pesquisa em nosso meio universitário.

Ao Prof. Dr. RENATO R. BIRAL, 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 dos cursos de pós-Graduação, da FOP-UNICAMP, pela amizade e dedicação profissional.

À Profa. Dra. MARIA DE LOURDES G. DA GAMA, coordenadora do curso de Pós-Graduação, 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 doutorado.

Aos membros do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar, por todas as facilidades oferecidas para realização da parte experimental deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

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

## CONTEÚDO

INTRODUÇÃO .....	01
REVISTA DA LITERATURA .....	13
PROPOSIÇÃO .....	17
MATERIAL .....	19
MÉTODOS .....	21
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	28
RESULTADOS .....	32
DISCUSSÃO .....	61
CONCLUSÕES .....	69
SUMÁRIO .....	72
SUMMARY .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## INTRODUÇÃO



É essencial para o bom funcionamento das células a manutenção de um ambiente com características constantes de uma série de parâmetros físicos e químicos, tais como temperatura; pH; concentração de solutos; volume. Especificamente, a manutenção da constância, dentro de certos limites, do volume e da composição dos fluidos do organismo, é tarefa das mais complexas porque não só ocorrem trocas substanciais de soluto e solvente entre os diversos compartimentos hídricos do organismo, como também 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 peça fundamental para o entendimento da biologia celular e do organismo.

O estudo de um organismo vivo - como um todo - esbarra na dificuldade de se padronizar situações experimentais. Dado o papel do rim na homeostase, o estudo da função renal "in vivo" é muito dificultado porque as variáveis envolvidas são muitas, o que obstaculiza bastante a padronização de condições experimentais. Em adição, essas dificuldades tornam-se maiores em função do pequeno tamanho do rim nas espécies animais.

Em vertebrados inferiores, dados a incapacidade do rim em proporcionar-lhes (a exemplo do que ocorre nos mamíferos) o máximo de reabsorção de água e eletrólitos, outras estruturas colaboram nessa tarefa. Assim, nos anfíbios, a bexiga urinária constitui-se uma extensão funcional do túbulo renal (PEACHEY, RASMUSSEN, 1961); seu epitélio reabsorve água, sódio e uréia da urina e secreta prótons para a mesma (LEAF, 1982; SILVEIRA et al., 1989). Do ponto de vista da homeostasia hídrica, essa estrutura funciona como um reservatório do qual a água pode ser reabsorvida em períodos de privação hídrica, ou resposta à presença de hormônio antidiurético na corrente sanguínea (HAYS, LEAF, 1962; CIRNE et al., 1981; DE ROUFFIGNAC, BANKIR, 1990).

Dadas, a facilidade de montagem de preparações de bexiga urinária de sapo, a possibilidade de controle de uma série de variáveis nos experimentos "in vitro", e a analogia morfológica, filogenética e funcional dessa estrutura com o ducto coletor de mamíferos, a preparação isolada desse epitélio tornou-se usualmente 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 (STEINMETZ, 1974; SILVEIRA et al., 1975).

#### 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 superfície mucosa, de uma porção intermediária formada por tecido frouxo 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 (HERRERA, 1971).

Em condições normais a membrana apresenta baixa permeabilidade à água de forma que o fluxo de água 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).

A bexiga urinária de sapo é caracterizada, morfológica e funcionalmente como um epitélio "tight". Ao contrário dos epitélios "leaky", os "tight" possuem alta resistência elétrica (de 5 a 20 kohms.cm<sup>2</sup>) e desenvolvem altas diferenças de potencial elétrico transepitelial (de 50 a 100 mV). O epitélio da bexiga urinária de sapo pode, portanto, transportar seletivamente íons e água, sem que ambos os processos sejam acoplados, podendo assim criar diferenças de potencial eletroquímico para as espécies químicas, entre as soluções banhantes (FROMTER, DIAMOND, 1972).

#### HORMÔNIOS E O BALANÇO HÍDRICO

Peptídeos neuro-hipofisários, tais como a Vasopressina (Hormônio Antidiu-

rético - ADH) desempenham papel fundamental na homeostasia hídrica nos vertebrados (HAYS, LEAF, 1962). Esse hormônio, produzido pelo sistema nervoso central (núcleos supra-ópticos e para-ventriculares do hipotálamo), promove extraordinário aumento da permeabilidade à água, sódio e uréia no ducto coletor renal de mamíferos e na pele e bexiga urinária de anfíbios (CIRNE et al., 1981; LEAF, 1982).

A interação entre aminas biogênicas e seus derivados, via receptores adrenérgicos e peptídeos neurofisiológicos (Vasopressina) foi demonstrada em células glandulares, em epitélio, e em fibras musculares (ORLOFF, HANDLER, 1962; JARD, 1971; HAYS, 1983), e no controle da homeostasia hídrica em vertebrados, através da modificação do fluxo plasmático renal em função da variação do tônus muscular das arteríolas do glomérulo (WATLINGTON, HUF, 1971), do fluxo sanguíneo na região cutânea (CHRISTENSEN, 1974), ou ainda no transporte de água e eletrólitos através das membranas biológicas (CIRNE et al., 1981).

Os hormônios esteróides, principalmente a aldosterona e seus derivados atuam no sentido de reter líquido no organismo em função de um maior reaproveitamento do sal que seria eliminado na urina. Além dessa ação, esses agentes também interferem com o mecanismo celular de ação do hormônio antidiurético (HAYS, 1983).

#### RECEPTORES PARA A VASOPRESSINA

Em preparações isoladas, a Vasopressina só é ativa quando adicionada do lado da irrigação sanguínea, isto é, do lado seroso (meio interno) o que levou HAYS, LEAF, 1962, a sugerir a existência de receptores para o hormônio nessa membrana.

Atualmente é conhecida a existência de dois receptores ( $V_1$  e  $V_2$  - isoreceptores) celulares diferentes para a Vasopressina. Esta subdivisão foi introduzida por MICHELL et al., 1979, baseados em efeitos produzidos por esses receptores quando acoplados ao hormônio.

*Receptores  $V_1$*  - desempenham um papel importante na regulação da pressão sanguínea, atuando a nível dos vasos, (COWLEY et al., 1980). São também im-

portantes na estimulação da glicogenólise e da neoglicogênese, principalmente em células hepáticas (KEPPENS, DE WULF, 1979). Esses efeitos decorrem da ativação desse receptor através do sistema fosfoinositídeo-cascata, ou seja, através da hidrólise de fosfolípidos da membrana celular são formados dois tipos de mensageiros: *Trifosfato Inositol* (IP<sub>3</sub>) que atua abrindo canais de cálcio de várias organelas celulares, alterando portanto os níveis deste íon, o qual participa de várias funções bioquímicas, como por exemplo, contração muscular, cofator-enzimático e através de diversos mecanismos pode interferir no transporte de água e eletrólitos, e *Diacilglicerol* que estimula a proteína Kinase C, a qual por sua vez, ativa um conjunto de enzimas que irão atuar sobre a degradação ou síntese do glicogênio ao nível das células hepáticas (BERRIDGE, 1987).

*Receptores V<sub>2</sub>* - participam da ação de neurohormônios hipofisários (Vasopressina e Ocitocina) sobre o transporte de água e solutos em membranas isoladas, nos túbulos coletores e no transporte de eletrólitos na porção espessa do ramo ascendente da alça de Henle dos mamíferos (MOREL, 1981), via sistema adenilciclase-cascata-AMPC-dependente (JARD, 1983). Estudos anteriores, em nosso laboratório, em que foi feita manipulação dos receptores alfa e beta-adrenérgicos, levaram-nos a sugerir também a presença de receptores dopaminérgicos nessa estrutura (FRANCO et al., 1991). Além disso, existem evidências da existência de outro sistema (complexo), funcionalmente distinto do anterior, já que concentrações elevadas de cálcio ou magnésio eliminam a resposta do fluxo hidrosmótico à Vasopressina sem afetar o transporte de sódio (ARGY et al., 1967). Outros estudos têm mostrado que a Prostaglandina E<sub>1</sub>, que apresenta efeito inibitório sobre o fluxo osmótico de água gerado pela Vasopressina em bexiga de sapo, é capaz de estimular o transporte de sódio neste epitélio (LIPSON, SHARP, 1971). Esses dados sugerem a presença de pelo menos dois receptores (V<sub>2</sub>, V<sub>2</sub><sup>1</sup> - isoreceptores) na bexiga urinária de sapo (FLORES et al., 1974; HAYS, 1976; 1983).

#### MECANISMO DE AÇÃO DA VASOPRESSINA (AVP)

Como foi mencionado anteriormente, o hormônio antidiurético promove aumento do transporte de água e solutos através da bexiga de sapo, via sistema

adenilciclase-cascata-AMPC-dependente (JARD, 1983). Portanto, a ativação desses receptores específicos, para o hormônio nesta estrutura apresenta semelhança com a estimulação dos receptores beta-adrenérgicos (LEFKOWITZ, et al., 1984). A contribuição desses autores focalizou um problema considerado inicialmente simples e que se tornou, na verdade, o início do conhecimento de uma sequência de reações extremamente precisa e complexa.

Atualmente está bem estabelecido que os receptores dos hormônios são proteínas bem individualizadas, distintas do sistema adenilciclase e relativamente livres para difundirem e interagirem ao nível da membrana celular (LEFKOWITZ, et al., 1984).

O sistema ou complexo adenilciclase é composto de pelo menos três proteínas: a *proteína catalítica*, que é relativamente inativa; uma *proteína ligadora de guanina-nucleotídeo* (Proteína G), que é a mediadora de vários ligantes reguladores e um ou mais *receptores hormonais* (GILMAN, 1984).

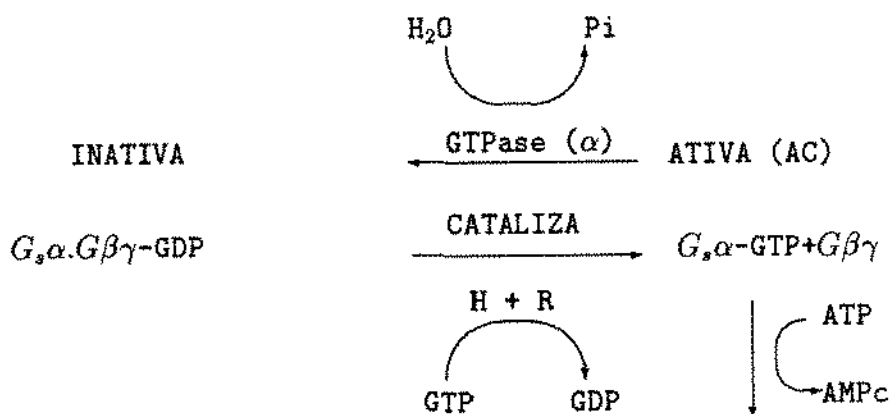
Pouco ainda é conhecido sobre as propriedades físicas da enzima adenilciclase. Aparentemente, assemelha-se à uma proteína glicolizada com peso molecular da ordem de 115 KDa, apresentando uma unidade catalítica (a qual tem um sítio de substrato para ATP), associada pelo menos a um sítio regulador desta unidade (HOWELETT, GILMAN, 1980; PFEUFFER et al., 1985).

Nos sistemas biológicos são encontrados vários tipos de Proteína G desempenhando atividade específica, como por exemplo,  $G_s$  (estimuladora);  $G_i$  (inibidora);  $G_t$  (transducina<sub>1,2</sub>), a qual participa no acoplamento do estímulo luminoso nos bastões da retina, e  $G_k$  encontrada em grande quantidade no cérebro, a qual, provavelmente, participa da regulação de canais de potássio, com atividade tipo muscarínica (STRYER, BOURNE, 1986). A proteína G é formada por três (sub-unidades)  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (GILMAN, 1987).

Na ausência do hormônio (AVP) ligado ao receptor, quase toda proteína G está na forma GDP inativa ( $G_s\alpha.G\beta\gamma - GDP$ ). A ligação do hormônio com o receptor específico ligado à Proteína G induz à liberação da ligação GDP e permite a entrada de GTP. A subunidade  $\alpha$  unida à GTP ( $G_s\alpha-GTP$ ) dissocia-se de  $\beta\gamma$ . Esse complexo na forma ativa, rapidamente se desloca em direção à enzima adenilciclase, a qual é ativada para catalizar a conversão ATP em AMPc (RODBELL, 1980; GILMAN,

1987). O ponto chave é que muitos complexos  $G_s\alpha$ -GTP são formados para cada ligação do hormônio, dando uma resposta amplificada. A proteína  $G$  possui ainda outra propriedade que permite o transporte de informações intermediárias entre o receptor-hormônio e a enzima. A ligação  $\alpha$ -GTP é lentamente hidrolizada para GDP. Em outras palavras, a proteína  $G$ , especificamente a subunidade  $\alpha$  é uma GTPase, e a atividade da enzima adenilciclase aos poucos vai sendo interrompida. Assim, essa proteína reguladora tem um dispositivo interno para desativação (MASTERS et al., 1986).

Na ausência da formação do complexo hormônio-receptor, algumas substâncias tem a propriedade de ativar a unidade catalítica da enzima adenilciclase, mesmo na ausência da unidade GTP reguladora, como por exemplo, as toxinas da cólera, coqueluche (pertusis) e o alcalóide Forscolina (KAHN, GILMAN, 1984; KACHADORIAN et al., 1987).



H= HORMÔNIO (AVP)

AC= ADENILCICLASE

R= RECEPTOR

ESQUEMA DE ATIVAÇÃO E DESATIVAÇÃO DO COMPLEXO ADENILCICLASE PELA  
VASOPRESSINA

O nível intracelular do AMPc é regulado pela enzima fosfodiesterase-nucleotídeos;  $Ca^{+2}$  e a proteína intracelular Calmodulina são alguns dos fatores reguladores de sua ativação (CHEUNG, 1982), a qual transforma-o na forma inativa (HAYS, 1983).

A hipótese mais aceita atualmente é a de que o AMPc formado, ao ligar-se à sub-unidade de uma proteína-quinase induz a uma fosforilação de proteínas de microtúbulos e microfilamentos a qual é traduzida em ordens para a síntese, transporte e incorporação de matrizes proteicas (poros) na estrutura lipídica da membrana luminal (exocitose) (TAYLOR et al., 1975; DE SOUZA, GROSSO, 1981; HANDLER, 1988).

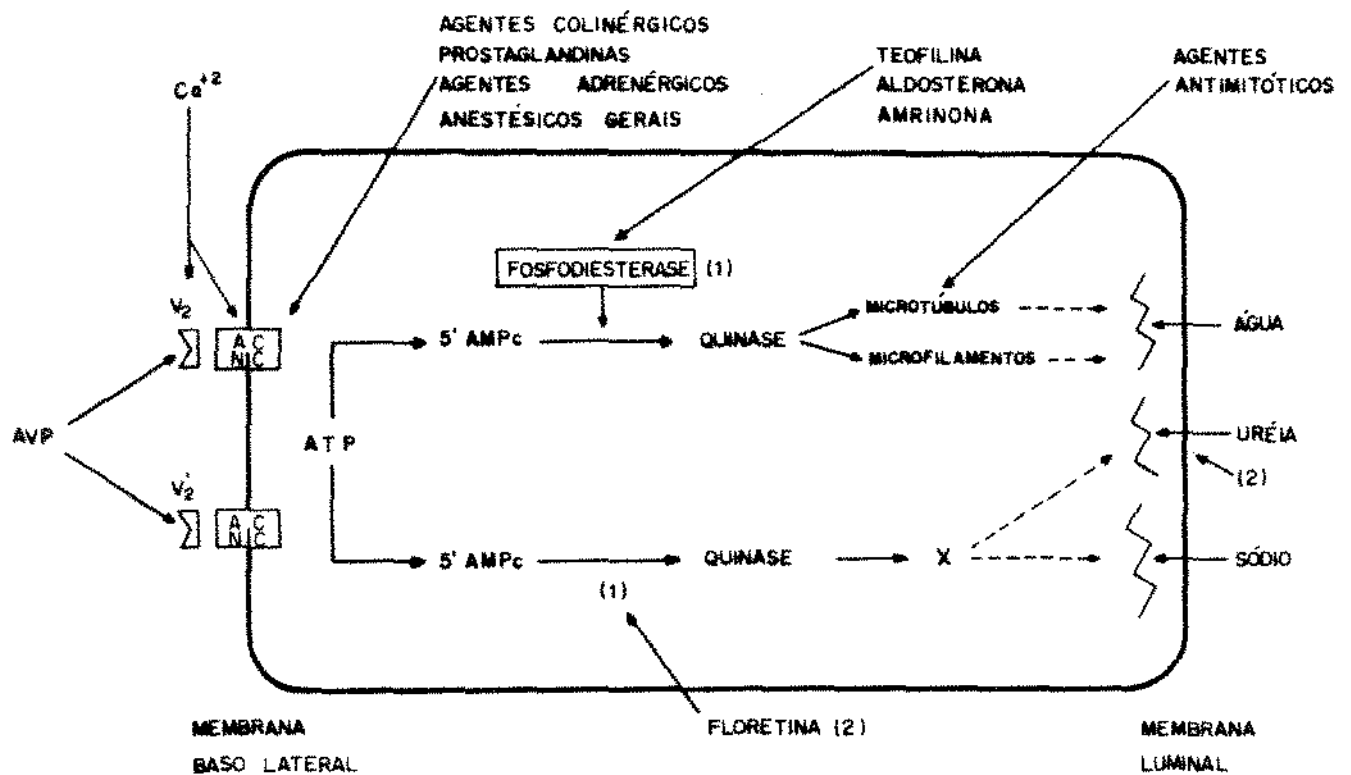
Para a resposta do tecido à Vasopressina, sabe-se que tanto os microfilamentos como os microtúbulos são independentemente necessários para a iniciação da agregação de partículas e do concomitante aumento da permeabilidade à água. Entretanto, somente os microfilamentos são necessários para a manutenção da resposta do tecido à Vasopressina (HAYS, 1983; HARDY, 1985).

Estudos de AL-ZAHID et al., 1977 e de HEBERT, ANDREOLI, 1980 baseados em cálculos da energia de ativação, a partir das variações da permeabilidade à água em várias temperaturas, apontaram para a conclusão de que a Vasopressina aumenta a permeabilidade à água por aumentar o *número de poros* (e não por aumentar o diâmetro dos poros, como tinha sido proposto inicialmente por KOEFOED-JOHNSEN, USSING, 1953) envolvidos no transporte de água através da membrana.

Considerando-se que a AVP eleva em vários epitélios, a permeabilidade à água e solutos hidrofílicos de baixo peso molecular (por exemplo, a uréia) levantou-se a hipótese de que esses solutos atravessariam a membrana servindo-se do mesmo poro de permeação à água. Entretanto, a verificação de que a estimulação pela Vasopressina podia ser bloqueada para cada espécie transportada (por exemplo, a Floretina inibe a estimulação pela AVP do transporte de uréia mas não o de água), indicou a existência de vias de permeação diferentes para a água e para esses solutos (LEVINE et al., 1973).

AGENTES FARMACOLÓGICOS QUE INTERFEREM NA AÇÃO HIDROSMÓTICA DA VASOPRESSINA

Nos últimos anos tem sido descrita a interferência de um grande número de drogas com as mais diversas características químicas e farmacológicas, que atuam em diferentes pontos da cadeia de eventos desencadeada pela interação da Vasopressina com os receptores na membrana baso-lateral da bexiga de sapo, como por exemplo, prostaglandinas (FORREST, GOODMAN, 1981); agentes antimitóticos (BURCH, HALUSHKA, 1981); metais pesados (GAGLIARDI et al., 1985); agentes colinérgicos (ARRUDA, SABATINI, 1980); catecolaminas (HANDLER et al., 1968; FRANCO et al., 1991); anestésicos gerais (LEVINE et al., 1979); oubaína (FINN, 1975); cálcio (PETERSEN, EDELMAN, 1964; HARDY, DIBONA, 1982); amrinona (LEVINE et al., 1981) e floretina (LEVINE et al., 1973). A Figura 1 esquematiza os possíveis locais de ação das drogas citadas anteriormente, ao nível celular da bexiga do sapo (adaptado de HAYS, R.M., 1976).



VP = VASOPRESSINA V<sub>2</sub>, V<sub>2</sub>' = RECEPTORES, AC = ADENILCICLASE  
C = FRAÇÃO CATALÍTICA DA ADENILCICLASE  
N = FRAÇÃO REGULADORA DA ADENILCICLASE

Figura 1



Como pode ser observado, muitos trabalhos foram realizados com a finalidade de se verificar a interferência de agentes químicos e farmacológicos sobre o transporte de água e eletrólitos em bexiga de sapo, na presença do hormônio anti-diurético (AVP). Entretanto, a interferência de agentes físicos sobre esses transportes é ainda pouco conhecida e, não raras vezes, sequer identificada na literatura. Entre esses agentes físicos, pode-se citar a radiação Laser, que, apesar de sua utilização no tratamento de várias patologias estar se tornando uma rotina diária, pouco se conhece a respeito dos seus efeitos a nível celular e bioquímico, que normalmente dão suporte aos resultados clínicos.

Visando a utilização da radiação Laser como uma nova ferramenta para o estudo do transporte de água e solutos através de membranas biológicas, são descritos a seguir alguns tópicos sobre esse tipo de radiação.

#### BREVE HISTÓRICO DA RADIAÇÃO LASER

A radiação Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), cujo princípio físico de emissão estimulada foi enunciado por ALBERT EINSTEIN em 1917, tem sido muito estudada, nos últimos anos, inclusive em tentativas de se verificar alguma eficácia terapêutica.

Somente em 1960, foi que MAIMAN e seus colaboradores construíram o primeiro Laser sólido de alta potência constituído basicamente de Rubi. PATEL e sua equipe desenvolveram em 1963 e 1964, respectivamente, o Laser He-Ne e o Laser Gás-Carbônico (CO<sub>2</sub>) (citado por GOLDMAN, 1981).

Atualmente os aparelhos de radiação Laser utilizados em pesquisas biológicas e áreas correlatas, são do tipo gasosos, como por exemplo, os Lasers de CO<sub>2</sub>, Nd-Yag e Arseneto de Gálio (JURI, 1990).

GOLDMAN e seus colaboradores em 1961, realizaram nos EUA as primeiras experiências visando identificar os efeitos da radiação Laser em animais. A partir dessa data, abriu-se um leque de perspectivas de pesquisas em Biofísica e Medicina, quando então o Laser passou a ser utilizado em cirurgia. A primeira intervenção cirúrgica ocular ao nível de retina, obtendo-se pleno êxito, foi realizada nessa época

em Nova York. A partir desse passo inicial incrementou-se a utilização desse agente físico em cirurgia e fatos interessantes foram notados, como por exemplo, que a cicatrização e a epitelização, em alguns casos, ocorriam de forma mais acelerada. Portanto, esse foi o embrião que serviu de orientação para o desenvolvimento cada vez maior de pesquisas voltadas aos efeitos da radiação Laser (citado por GOLDMAN, 1981a).

## ASPECTOS FÍSICOS DA RADIAÇÃO LASER

A radiação Laser é uma forma de energia que se propaga no espaço através de ondas eletromagnéticas e se diferencia das outras formas de luz por possuir alta *concentração de energia*, a qual é a base para o seu uso como instrumento terapêutico e cirúrgico. Três propriedades físicas fundamentais conferem-lhe essa característica: *Monocromaticidade*: devido à uma emissão de ondas de comprimento único, a radiação Laser produz apenas uma cor; *Coerência*: consiste no alinhamento de ondas eletromagnéticas no tempo e no espaço; e *Unidirecionalidade*: caracteriza-se por emissão de fótons em um só sentido.

Essas propriedades conferem à radiação Laser uma outra característica física, o *Brilho*, que indica uma concentração de energia muito superior à luz comum. Essa elevada concentração de energia (*Brilho*) e a monocromaticidade constituem-se na base para seus efeitos fotobiológicos (KARU, 1985). O tipo de efeito produzido pelo Laser é dependente do comprimento de onda fornecido pelo aparelho emissor, que, por sua vez, é determinado pelo tipo de material com o qual é construído. Por exemplo, o Laser de CO<sub>2</sub>, emite comprimento de onda da ordem de 10.600 nm (alta potência), o qual lhe confere um efeito ablativo sobre o material biológico, sendo portanto utilizado em cirurgias; enquanto que o Laser de Arseneto de Gálio, que emite comprimento de onda de 904 nm (baixa potência), possui um efeito bioestimulante sobre os mesmos tecidos (COLLS et al., 1984).

Por outro lado, efeitos que a radiação Laser produz nos tecidos biológicos, são dependentes das características de cada tecido. Deve, também, ser levado em consideração o fenômeno de *reflexão*, que ocorre sempre que um feixe de luz incide

sobre uma superfície qualquer e que varia em função do ângulo de incidência do mesmo. Quanto maior o ângulo, maior é a reflexão (por isso a aplicação da radiação Laser deve ser sempre perpendicular à superfície tratada). Ainda, ao penetrar nesses tecidos, a radiação Laser atravessa substâncias de diferentes densidades, resultando em alterações no trajeto da luz (*refração*). Em adição, substâncias dos tecidos ao entrarem em contato com o feixe de luz interagem com o mesmo e absorvem certa quantidade de energia, produzindo o fenômeno de *absorção* (KARU, 1987).

A penetração da radiação bioestimulante (baixa densidade) nos tecidos biológicos é bastante pequena. Estudos realizados em 1983 por ANDERSON e PARRICH, em tecido epitelial humano, mostraram que a penetração não é maior do que 15 mm.

Como será objeto deste trabalho o estudo de possíveis efeitos do agente farmacológico (Dobutamina) e da radiação Laser de baixa potência sobre o efeito hidrosmótico da Vasopressina em bexiga de sapo, serão descritos na revista da literatura os principais efeitos (fisiológicos e farmacológicos) desses agentes ao nível celular, de forma a subsidiar a discussão dos resultados obtidos.

REVISTA DA LITERATURA

## DOBUTAMINA

A Dobutamina que é derivada da Isoprenalina (TUTTLE, MILS, 1975), é a mais recente catecolamina de uso clínico atuante ao nível cárdio-vascular, apresentando efeito cronotrópico e inotrópico positivo e baixa alteração da resistência vascular periférica, (JARDIN et al., 1981; RUFFOLO, 1987; VINCENT et al., 1988); possui seletividade para receptores do tipo beta- adrenérgicos e alfa<sub>1</sub>-adrenérgico (SONNENBLICK et al., 1979; MACCARRONE, et al., 1984). Paralelamente à atividade cardioativa, a Dobutamina aumenta a excreção renal da água e solutos (LEIR, UNVERFERTH, 1983; RUFFOLO, 1987; RAMIRES et al., 1991).

Não foi observada nenhuma referência nestes trabalhos, tanto "in vivo" como "in vitro", quanto à sua atividade ao nível de receptor alfa<sub>2</sub>-adrenérgico, o qual desempenha importante papel no controle da homeostasia hídrica por modular a atividade do hormônio anti-diurético ao nível renal (INSEL, SNAVELY, 1981; GELLAI, EDWARDS, 1988).

## RADIAÇÃO LASER

São vários os efeitos atribuídos à radiação Laser de baixa potência. Entretanto, os de interesse para este estudo são os efeitos *anti-inflamatório*, *anti-álgico*, bem como os mecanismos de ação ao *nível molecular* propriamente dito.

### - EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

PALMIERI, 1983; SOTO, 1985, desenvolveram método para quantificar os possíveis efeitos do Laser, por meio do processo inflamatório que se segue à introdução intradérmica, na região dorsal de cobaias, de substâncias flogísticas, tais como bradicinina, histamina e prostaglandinas. Esse método utiliza como parâmetros

a diminuição do halo inflamatório e da temperatura local, tanto no processo agudo como no crônico (citado por TRELLES, 1990). KOVACS, 1974; MIRO, et. al., 1984, verificaram que esse tipo de radiação também estimula a microcirculação e promove regeneração parcial dos vasos linfáticos em tecidos com processo inflamatório, promovendo melhor drenagem da região inflamada. Provavelmente esses efeitos decorrem de alterações na pressão hidrosmótica capilar e da eliminação de acúmulo de catabólitos intermediários, como o ácido pirúvico e o ácido lático.

MESTER et al., em 1985, investigando o efeito do Laser sobre os níveis endógenos de várias substâncias, em tecido epitelial de ratos com processo inflamatório agudo, verificaram aumento nos níveis de Prostaglandinas E e F no exsudato nos períodos iniciais da aplicação, enquanto que nos períodos subsequentes diminuíram significativamente os níveis de PgE, mantendo-se inalterados os níveis de PgF. Essa diminuição da concentração de PgE seria um dos fatores responsáveis pela regressão dos sinais cardeais dos processos inflamatórios.

#### - EFEITO ANTI-ÁLGICO

DLSON et al., 1981, verificaram que a radiação Laser, quando aplicada em pontos pré-estabelecidos sobre os tecidos biológicos, atua inibindo a transmissão de estímulos dolorosos, promovendo elevação do limiar da excitabilidade dos receptores para dor nas membranas celulares. BENEDICENTI et al., em 1984, aventaram a hipótese de a irradiação Laser elevar os níveis de endorfinas (peptídeos opiáceos endógenos) no mecanismo analgésico central. A justificativa para tal efeito fundamenta-se em estudos sobre a aplicação de Laser em pacientes com crises de neuralgia do trigêmeo. Após a radiação, esses autores notaram aumento dos níveis de beta-endorfinas no liquor quando comparados aos níveis anteriores à estimulação. Depois de alguns minutos da administração de Naloxone (antagonista de opiáceos), aos pacientes ainda sob analgesia, observaram o retorno do quadro algico.

## - MECANISMOS DE AÇÃO AO NÍVEL MOLECULAR

LABAJOS et al. , em 1986, investigaram a absorção da radiação Laser em intestino delgado de cobaias, tanto "in vivo" como "in vitro", e observaram tanto diminuição como inibição do transporte de fluídos e eletrólitos, as quais poderiam estar relacionadas a um aumento dos níveis de cálcio celular e/ou da estimulação colinérgica conseqüente à irradiação. MAILLET, em 1987, sugeriu a possibilidade da ocorrência de eventos tais como: destruição de estruturas moleculares, ionização e rupturas de ligações químicas em tecidos biológicos quando submetidos à radiação Laser.

BENEDICENTI, 1982; LAM et al. , em 1985, observaram que, mediante o emprego da radiação Laser em cultura de linfócitos, onde foram utilizados precursores radioativos, houve incremento, em termos quantitativos, da síntese de ATP pela mitocôndrias, RNA e DNA.

VELEZ, COLLS, em 1988, trabalhando com radiação Laser de baixa potência em tecidos biológicos, especificamente com substâncias endógenas, por exemplo, mensageiros hormonais, verificaram por meio de ensaios bioquímicos, alterações quantitativas nos níveis de AMPc. Entretanto, em algumas situações houve diminuição e em outras aumento, da taxa desse nucleotídeo.

PROPOSIÇÃO



Como citado anteriormente, a Dobutamina tem seus efeitos farmacológicos bem explorados ao nível de receptores adrenérgicos no sistema cardio-vascular, mas sua interferência sobre os mecanismos de transporte de água através de membranas não estão totalmente esclarecidos. Fato semelhante ocorre com a radiação Laser, pois, apesar de todo seu desenvolvimento nessas últimas décadas, é praticamente desconhecida a natureza da interação entre esse agente físico e o material biológico, principalmente em relação ao transporte de água e solutos através de membranas.

É proposto neste trabalho, mediante a utilização de técnicas gravimétricas (BENTLEY, 1958 e PROCÓPIO, LACAZ VIEIRA, 1977), o estudo em bexiga isolada de sapo do transporte de água, verificando:

- o efeito da Dobutamina na cadeia de eventos que se seguem à interação da Vasopressina com os receptores da membrana e que são relacionadas à síntese e inativação do AMPc-dependente e também, *comparar* os resultados obtidos com os de outros agentes farmacológicos já conhecidos, em especial as catecolaminas beta- adrenérgicas;
- o efeito da radiação Laser de baixa potência sobre o transporte de água em condições padronizadas *com* ou *sem* Vasopressina.

Além do estudo “de per si” desses agentes, pretendemos contribuir para a melhor compreensão dos fenômenos de transporte através de membranas.

MATERIAL

## ANIMAL

Foram utilizados 263 (duzentos e sessenta e três) sapos *Bufo marinus paracnis*, adultos, sadios, de ambos os sexos, pesando em média 190 gramas. Os sapos eram mantidos num sapário, com água e alimento em abundância, à temperatura ambiente, de onde eram remetidos para o laboratório para a sua utilização.

## APARELHO - RADIAÇÃO LASER

O equipamento utilizado foi o Laser diódico de Arseneto de Gálio (AsGa), com potência de pico de 18 Watts e potência média de 12 mW, pulsando com frequência de 2.000 Hz, comprimento de onda de 904 nm (faixa infra-vermelho do espectro), modelo LIV-854, KLD Biosistemas.

## SOLUÇÕES E DROGAS

- 1\*- Solução isotônica de Ringer Fosfato com osmolaridade de 250 mOsm/l, contendo (mM): NaCl= 110,0; KCl= 3,5; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O=0,5; Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O= 2,0; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O= 1,8; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. H<sub>2</sub>O= 10,0; com pH final da solução 7,4.
- 2\*- Solução de Ringer Fosfato (1\*) diluída (1:5) em água destilada, com osmolaridade de 50 mOsm/l.
- 3 - Vasopressina (Pitressin)<sup>R</sup> - Parke-Davis (U.K.); Sigma (USA).
- 4 - Dobutamina (Dobutrex)<sup>R</sup> - Eli Lilly, (Brasil).
- 5 - Propranolol - Ayerst, (Brasil).
- 6 - Fentolamina (Regitina)<sup>R</sup> - Ciba Pharm.Co. (USA).
- 7 - Rauwolscina - Boehringer - Mannheim Bioch. (USA).
- 8 - 3'5' AMPc - Sigma (USA).
- 9 - Teofilina - Calbiochem. (USA).
- 10 - Indometacina (Indocid)<sup>R</sup> - M.S.D. (Brasil).

MÉTODOS

## MONTAGEM DA PREPARAÇÃO NA FORMA DE LOBOS

Foi utilizada basicamente a técnica desenvolvida por BENTLEY, 1958 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 modo 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, 2ml 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.

Essa mesma técnica foi por nós adaptada para aplicação da radiação Laser na face serosa da membrana com a preparação mantida fora do banho durante o tempo de exposição da irradiação (Fig.2).

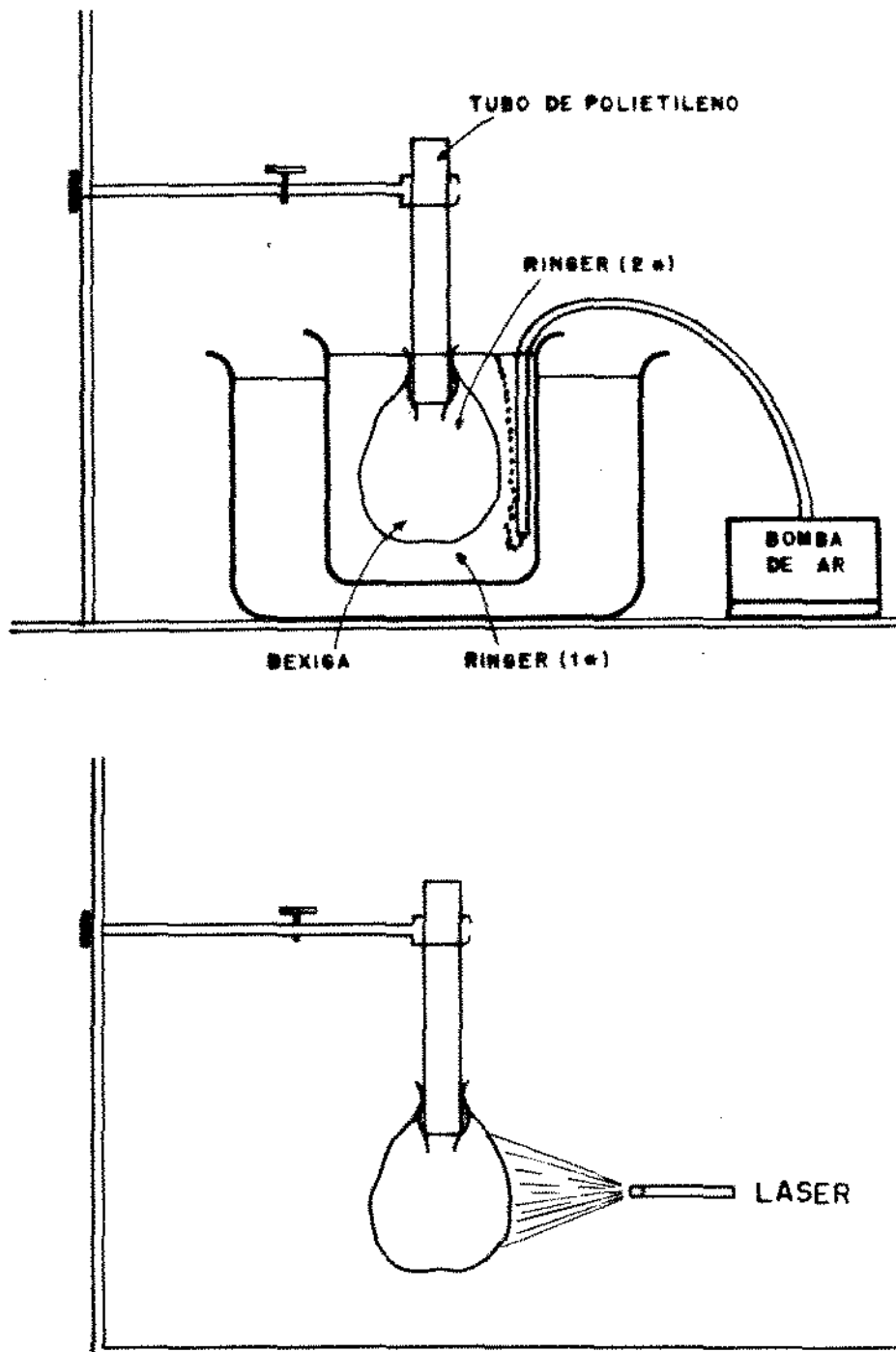


Figura 2 - ESQUEMA DA MONTAGEM PARA MEDIDA DO FLUXO DE ÁGUA ATRAVÉS DA BEXIGA DE SAPO (TÉCNICA DE BENTLEY, 1958)

## MONTAGEM DA PREPARAÇÃO NA FORMA DE LÂMINA

As preparações na forma de lobos, além de não permitirem a determinação correta da área da membrana, impossibilitam a aplicação da radiação Laser na face mucosa do epitélio. Assim, implantamos no nosso laboratório a técnica desenvolvida por PROCÓPIO, LACAZ VIEIRA, 1977 para determinação do fluxo de água, em preparações nas quais a membrana é colocada como uma lâmina entre duas câmaras de acrílico.

Essa técnica para medida do fluxo de água foi desenvolvida por aqueles pesquisadores para a pele de sapo. Uma vez que a bexiga é uma membrana mais fina, frágil e delicada que a pele do sapo, foi necessário desenvolver-se um suporte para adaptar a bexiga entre as câmaras. Esse suporte, construído previamente aos experimentos, era feita de duas arruelas de papel de filtro contendo uma tela de nylon entre si. Estas arruelas possuíam diâmetros interno e externo iguais aos das câmaras, de forma que somente a tela suportava a membrana após a montagem.

O papel de filtro, além de servir como moldura para a tela de nylon, tinha a finalidade de permitir que a bexiga fosse esticada quando da sua retirada do animal (Fig.3).

A câmara era fixada a um suporte ligado a um motor (adaptado de limpador de para-brisas), com objetivo que as câmaras fossem mantidas em movimento rotatório constante, e com isso as soluções nos compartimentos (mucoso e seroso) se mantinham sob agitação permanente e no mesmo nível. O compartimento seroso era preenchido até a metade de sua capacidade por 10 ml de solução Ringer Fosfato (1\*), enquanto o mucoso com capacidade para 4ml recebia 2ml de Ringer Fosfato (2\*). Estes volumes foram determinados de forma a permitir que os níveis das soluções ficassem exatamente iguais evitando-se, dessa forma, o estabelecimento de gradiente de pressão hidrostática entre os compartimentos.



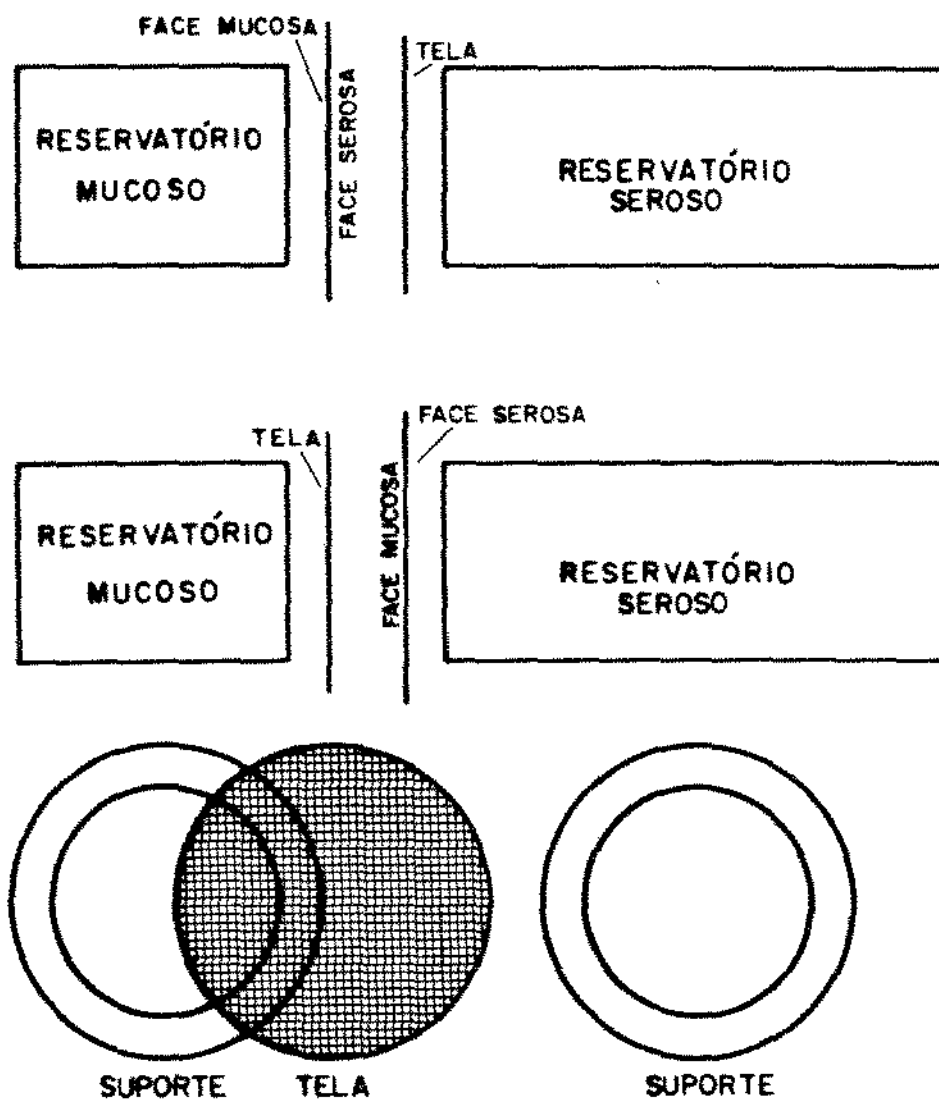


Figura 3 - ESQUEMA DA MONTAGEM DA BEXIGA DE SAPO PELA TÉCNICA ADAPTADA DE PROCÓPIO E LACAZ VIEIRA (1977), PARA MEDIDA DO FLUXO DE ÁGUA

Os resultados obtidos com as variações de peso (mg), pelas técnicas gravimétricas utilizadas, foram expressos como variações de volume ( $\mu\text{l}$ ), o que torna mais fácil a compreensão dos mesmos.

#### APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER

A fim de permitir a exposição de toda a área da membrana à radiação Laser, considerou-se como sendo de 9 a 15 graus o ângulo de dispersão e, a partir disso, a distância da fonte emissora à membrana foi calculada em 12 cm. Dessa forma, para se obter os diferentes níveis de energia, variou-se simplesmente o tempo de exposição da membrana, sendo que o período de maior duração foi de 90 segundos.

#### 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, 1978).

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## TÉCNICA DE BENTLEY: DOBUTAMINA E RADIAÇÃO LASER

As hemi-bexigas com solução isotônica de Ringer Fosfato (1\*), na face serosa, e com solução de Ringer Fosfato diluída (2\*), na face mucosa, foram deixadas em repouso pelo menos por 60 minutos (período de incubação), a fim de se adaptarem às condições "in vitro", enquanto que os períodos experimentais tiveram a duração de 30 minutos cada.

Após o período de incubação das hemi-bexigas, iniciava-se o período experimental: as mesmas eram esvaziadas, lavadas e preenchidas com solução de Ringer Fosfato diluída (2\*). As hemi-bexigas eram então enxugadas rapidamente com papel de filtro, com cuidado especial na parte em que estava amarrada ao tubo.

O conjunto (bexiga e tubo) era então pesado em uma balança de precisão (Mettler H-35-AR) e colocado no bequer (40ml), Fig.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 à 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 os outros períodos experimentais, introduzindo-se então os agentes farmacológicos ou irradiando Laser na face serosa da membrana.

Em alguns protocolos experimentais (último período) foram realizados testes de "contra-prova". A finalidade desses testes foi o de verificar se as hemi-bexigas estavam ainda mantendo sua integridade funcional e também respondendo aos agentes químicos e físico.

Uma observação importante que deve ser destacada, ainda dentro do procedimento experimental, diz respeito à utilização dos agentes farmacológicos. Esses agentes com exceção da Vasopressina, 3'5'AMPc e da Teofilina, foram adicionados na solução serosa (banho), 30 minutos antes do período subsequente. Neste período as hemi-bexigas não foram lavadas e as soluções, tanto no meio interno como no

externo, não foram substituídas, pois o objetivo era fornecer um espaço de tempo suficiente para que ocorresse a difusão desses agentes pelas estruturas (conjuntivo, vasos, fibras musculares) a fim de atingir o interior celular. Como o fluxo de água foi determinado a cada 30 minutos, o peso inicial do conjunto (tubo e bexiga) do período subsequente coincidia com o peso final do período precedente.

#### TÉCNICA DE PROCÓPIO - LACAZ VIEIRA ADAPTADA: RADIAÇÃO LASER

As hemi-bexigas (forma de lâmina), já montadas nas hemi-câmaras permaneceram banhadas em solução de Ringer Fosfato (1\*) na face serosa e solução de Ringer Fosfato (2\*) na face mucosa, por um período de 60 minutos, a fim de se adaptarem as condições "in vitro" (período de incubação). Os períodos experimentais em número de 5 (cinco) foram de 30 minutos cada.

O fluxo da água era determinado gravimetricamente, comparando-se o peso de 2 ml da solução colocada no compartimento mucoso (Ringer Fosfato (2\*)) no tempo zero, com o peso da solução remanescente nesse compartimento após 30 minutos. Entretanto, a adoção desse método suscitava um problema: nem todo o líquido contido no compartimento era passível de ser retirado por aspiração ao final do período experimental, permanecendo sempre um pequeno resíduo de líquido. Esse problema foi resolvido da seguinte forma: um pequeno volume (2 ml) de solução de Ringer Fosfato (2\*) era adicionado ao compartimento mucoso e imediatamente retirado, de forma a deixar no local um filme de líquido na membrana e nas paredes da câmara. Dessa maneira, iniciava-se sempre o período experimental com um volume residual de líquido no compartimento mucoso. A seguir, por meio de outra seringa com a mesma solução e cujo volume havia sido determinado gravimetricamente, colocava-se o líquido neste compartimento. Após 30 minutos retirava-se o volume restante do compartimento com a mesma seringa que fora utilizada para preenchê-lo, e pesava-se novamente. A diferença entre os pesos inicial e final dessa seringa correspondia ao volume transportado de água entre os meios seroso e mucoso. Assumia-se que o volume de solução remanescente ao final do período experimental de 30 minutos era igual ao volume pré-existente no compartimento por ocasião do umedecimento do mesmo.

Decorrido esse período as câmaras eram abertas e na face mucosa ou serosa, dependendo das condições experimentais foi irradiado Laser, sendo a outra hemi-bexiga utilizada como controle. Feito isso, as hemi-câmaras eram fechadas e reconstituídas as condições experimentais. Dependendo do período experimental, ocorria a adição ou não de Vasopressina no lado seroso.

Deve ser ressaltado que todos os protocolos experimentais selecionados permitiram sempre a utilização de experimentos pareados, os quais foram conduzidos em hemi-bexigas oriundas do mesmo animal. Desse modo, era possível a comparação entre os valores obtidos no período inicial (controle) com os do período experimental realizado posteriormente na mesma hemi-bexiga, ou então a comparação entre as hemi-bexigas gêmeas, onde uma delas serviu como controle e a outra como experimental. Dessa forma, as comparações puderam ser feitas no sentido “horizontal” (entre os períodos realizados na mesma hemi-bexiga) ou no sentido “vertical” (entre os períodos realizados concomitantemente na hemi-bexiga controle e na hemi-bexiga experimental).

RESULTADOS

## DOBUTAMINA

- Efeito da Dobutamina sobre o fluxo de água na presença e na ausência de Vasopressina.

Com o intuito de se verificar o efeito da Dobutamina sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina, experimentos foram conduzidos em hemi-bexigas gêmeas (provenientes do mesmo animal). O grupo "controle" recebeu Vasopressina (10mU/ml de banho) e o "experimental", Vasopressina em associação com Dobutamina em várias concentrações. Os resultados, mostrados na Tabela I, foram obtidos conforme Protocolo Experimental descrito no Quadro 1, e demonstram expressivo bloqueio (65%;  $P < 0,01$ ) da ação do hormônio com dose maximal  $10^{-3}M$ . Esse efeito persistiu com concentrações menores, observando-se relação dose dependente na faixa de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}M$ . A concentração de  $8 \times 10^{-4}M$  de Dobutamina corresponde à dose experimental capaz de provocar 50% de inibição da dose maximal, de forma que essa concentração de Dobutamina foi selecionada como padrão em todas as preparações.

A Tabela II mostra os resultados obtidos com várias concentrações de Dobutamina adicionadas ao banho de Ringer Fosfato (1\*) na ausência da Vasopressina, conforme Protocolo Experimental descrito no Quadro 1. Pode ser verificado que as diferenças entre as médias não são significantes em todas as concentrações utilizadas de Dobutamina.

O Gráfico I ilustra os resultados apresentados nas Tabelas I e II, referentes à adição da Dobutamina ao banho na ausência e na presença da Vasopressina. Esse mesmo gráfico mostra a total reversibilidade do efeito bloqueador da Dobutamina sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina: os valores observados para o fluxo de água em presença do hormônio antidiurético, após a hemi-bexiga ter sido submetida à lavagem posterior ao tratamento por Dobutamina associada à Vasopressina foram de  $16,30 \pm 1,15$  (N=6)  $\mu l/min$ , enquanto que em outras hemi-bexigas o fluxo de água estimulado pela Vasopressina foi de  $16,90 \pm 0,80$  (N=6)  $\mu l/min$ , sendo essa diferença estatisticamente não significante ( $P > 0,05$ , teste T, amostras não pareadas).



TABELA I

Comparação entre os efeitos da associação de Dobutamina (DO) em várias concentrações, e da Vasopressina (AVP) (10mU/ml de banho) sobre o fluxo osmótico de água ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ) em bexiga de sapo, isolada do mesmo animal.

		CONTROLE		EXPERIMENTAL	
N	DO(M)	AVP	AVP+DO	P	% INIB
9	$10^{-3}$	19,00±1,65	6,60±1,35	<0,01	65,30
6	$8 \times 10^{-4}$	16,90±0,80	11,70±1,20	<0,01	30,80
6	$10^{-4}$	20,50±1,80	18,70±1,75	<0,05	8,90
6	$10^{-5}$	15,70±1,20	14,60±1,30	N.S.	-----
6	$10^{-6}$	29,50±2,60	30,20±2,50	N.S.	-----

- N = Número de Experimentos.

- N.S. = Não Significante.

Quadro 1

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>
Controle	BASAL	BASAL	AVP	DO	BASAL
Experimental	BASAL	DO	AVP + DO	AVP	BASAL

BASAL = Ringer Fosfato (250 mOsm/l)

TABELA II

Efeito da Dobutamina (DO) em várias concentrações sobre o fluxo osmótico de água ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ) na ausência de Vasopressina (AVP) em bexiga de sapo, isolada do mesmo animal.

		CONTROLE	EXPERIMENTAL		
N	DO(M)	BASAL	DOBUTAMINA	P	% INIB
9	$10^{-3}$	1,65±0,20	1,35±0,20	N.S.	-----
6	$8 \times 10^{-4}$	1,50±0,20	2,00±0,20	N.S.	-----
6	$10^{-4}$	1,10±0,10	1,10±0,20	N.S.	-----
6	$10^{-5}$	1,30±0,20	1,30±0,20	N.S.	-----
6	$10^{-6}$	1,60±0,15	1,25±0,15	N.S.	-----

- N = Número de Experimentos.

Quadro 1

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1º	2º	3º	4º	5º
Controle	BASAL	BASAL	AVP	DO	BASAL
Experimental	BASAL	DO	AVP + DO	AVP	BASAL

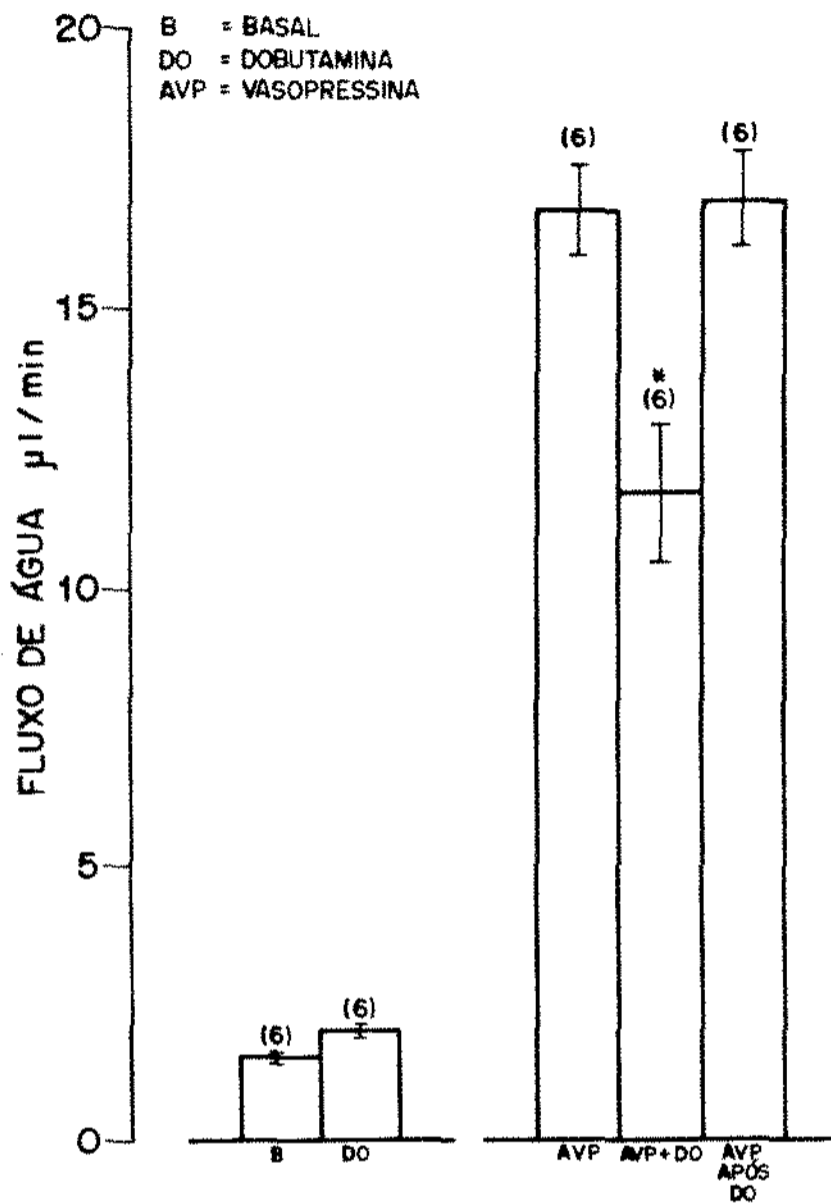


Gráfico 1 - Efeito da Dobutamina ( $8 \times 10^{-4} M$ ) sobre o fluxo de água na *ausência* e na *presença* da Vasopressina (10mU/ml de banho) em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal.  
 \*( $P < 0,01$ ) em relação ao controle (AVP)

- Efeito da Dobutamina sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina na presença de bloqueadores alfa ou beta adrenérgicos.

A fim de se avaliar com mais profundidade os eventos que poderiam estar ocorrendo mediante a ativação dos receptores alfa e beta adrenérgicos, foram utilizados bloqueadores específicos para esses receptores, em associação à Dobutamina.

A Tabela III e o Gráfico 2 construídos a partir de resultados obtidos com o Protocolo Experimental descrito no Quadro 2, ilustram o efeito do agente bloqueador beta adrenérgico Propranolol ( $10^{-4}\text{M}$ ) sobre o efeito da Dobutamina na ação da Vasopressina, em experimentos pareados, conduzidos em preparações de hemi-bexigas gêmeas. Pode ser observado, que a adição de Propranolol ao banho (grupo de hemi-bexigas experimentais) não provocou alteração do fluxo de água em relação ao observado no outro grupo de hemi-bexigas (controle) nas mesmas condições (Vasopressina associada à Dobutamina), sendo os valores observados de  $17,00 \pm 1,50$  ( $N=7$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$  na situação controle, para  $16,80 \pm 1,40$  ( $N=7$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$  na experimental.

A tabela IV e o mesmo Gráfico 2 mostram o efeito do agente bloqueador alfa adrenérgico (Fentolamina  $10^{-6}\text{M}$ ) sobre o efeito da Dobutamina associada à Vasopressina, também em experimentos pareados, conduzidos em preparações de hemi-bexigas gêmeas. Observe-se que no grupo das hemi-bexigas controles (Vasopressina associada à Dobutamina) o fluxo foi de  $16,90 \pm 1,30$  ( $N=7$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ , enquanto que nas hemi-bexigas experimentais (Vasopressina associada à Dobutamina e a Fentolamina), o fluxo foi de  $21,00 \pm 1,00$  ( $N=7$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ , sendo a diferença entre as médias estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ), indicando um aumento da atividade hidrosmótica da Vasopressina nessas condições.

Considerando que a Fentolamina é caracterizada como sendo uma droga bloqueadora de receptores alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub> adrenérgicos, portanto de ação inespecífica, resolvemos investigar em qual desses receptores a Dobutamina estaria atuando no bloqueio da atividade hidrosmótica da Vasopressina. Como pode ser observado na tabela V e ainda no Gráfico 2, o efeito do agente bloqueador alfa<sub>2</sub>-adrenérgico Rauwolscina ( $10^{-5}\text{M}$ ) sobre o efeito da Dobutamina associada à Vasopressina, em experimentos também pareados, conduzidos em preparações de hemi-bexigas gêmeas, foi o de aumentar o fluxo de água: de  $21,50 \pm 1,15$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$  no experimental,

para  $17,70 \pm 1,10$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$  no grupo das hemi-bexigas controles (Vasopressina associada à Dobutamina), sendo a diferença entre as médias também estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ), mostrando uma diminuição do efeito da Dobutamina sobre a atividade hidrosmótica da Vasopressina.

TABELA III

Efeito da adição de Propranolol (PROP) ( $10^{-4}M$ ) sobre o bloqueio produzido pela Dobutamina (DO) ( $8 \times 10^{-4}M$ ) na ação hidrosmótica da Vasopressina (AVP) (10mU/ml de banho), em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal. Fluxo de água expresso em  $\mu l/min$ .

HEMI-BEXIGA	CONTROLE	EXPERIMENTAL
N	AVP+DO	AVP+DO+PROP
1	13,50	13,80
2	16,90	16,30
3	20,10	19,60
4	17,90	18,50
5	23,70	23,00
6	13,50	14,00
7	13,00	12,50
X±EPM	17,00±1,50	16,80±1,40(N.S.)

- N = Número do Animal.

Quadro 2

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1º	2º	3º	4º	5º
Controle	BASAL	DO	AVP+DO	BASAL	AVP
Experimental	BASAL	DO + AG. BLOQ.	AVP + DO + AG. BLOQ.	DO	AVP + DO

AG. BLOQ. = Agentes Bloqueadores

TABELA IV

Efeito da adição da Fentolamina (FENT) ( $10^{-6}M$ ) sobre o bloqueio produzido pela Dobutamina (DO) ( $8 \times 10^{-4}M$ ) na ação hidrosmótica da Vasopressina (AVP) (10mU/ml de banho), em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal. Fluxo de água foi expresso em  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

HEMI-BEXIGA	CONTROLE	EXPERIMENTAL
N	AVP+DO	AVP+DO+FENT
1	21,00	23,40
2	20,00	26,10
3	13,80	17,60
4	10,35	20,00
5	18,90	21,50
6	17,20	19,30
7	16,70	18,70
X $\pm$ EPM	16,90 $\pm$ 1,30	21,00 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>

- a =  $P < 0,01$  (% ESTIM. = 19,50, (AVP+DO+FENT) em relação (AVP+DO)).

- N = Número do Animal.

Quadro 2

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>
Controle	BASAL	DO	AVP+DO	BASAL	AVP
Experimental	BASAL	DO + AG. BLOQ.	AVP + DO + AG. BLOQ.	DO	AVP + DO

TABELA V

Efeito da adição de Rauwolscina (RAU) ( $10^{-5}M$ ) sobre o bloqueio produzido pela Dobutamina (DO) ( $8 \times 10^{-4}M$ ) na ação hidrosmótica da Vasopressina (AVP) (10mU/ml de banho), em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal. Fluxo de água expresso em  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

HEMI-BEXIGA	CONTROLE	EXPERIMENTAL
N	AVP+DO	AVP+DO+RAU
1	17,00	18,60
2	13,30	19,30
3	20,30	22,60
4	21,00	26,80
5	17,70	22,10
6	16,90	19,40
$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$17,70 \pm 1,10$	$21,50 \pm 1,15^a$

-  $a = P < 0,01$  (% ESTIM. = 17,70, (AVP+DO+RAU) em relação (AVP+DO)).

- N = Número do Animal.

Quadro 2

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1º	2º	3º	4º	5º
Controle	BASAL	DO	AVP+DO	BASAL	AVP
Experimental	BASAL	DO + AG. BLOQ.	AVP + DO + AG. BLOQ.	DO	AVP + DO



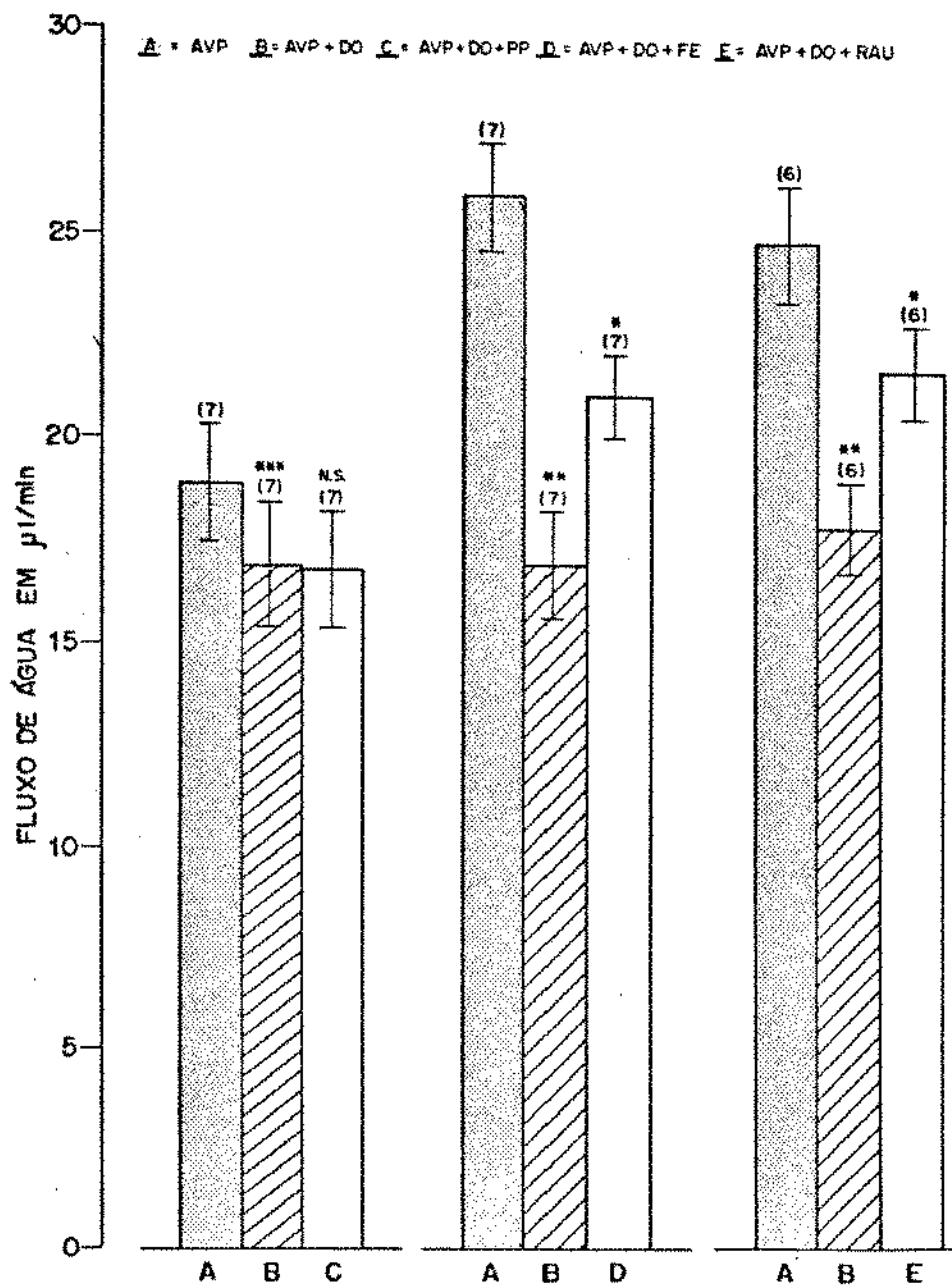


Gráfico 2 - Comparação entre os efeitos do Propranolol ( $10^{-4}M$ ), Fentolamina ( $10^{-6}M$ ) e da Rauwolscina ( $10^{-5}M$ ) sobre o efeito produzido pela Dobutamina ( $8 \times 10^{-4}M$ ) na ação hidrosmótica da Vasopressina ( $10mU/ml$  de banho) em hemi-bexigas de sapo, isoladas do mesmo animal.

\* ( $P < 0,01$ ) em relação ao controle (AVP + DO).

\*\* ( $P < 0,01$ ) em relação ao controle (AVP).

\*\*\* ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (AVP).

N.S. - Não significante em relação ao controle (AVP + DO).

- Efeito da Dobutamina sobre a ação hidrosmótica do 3'5'AMPc e da Teofilina

Objetivando obter maiores detalhes sobre o efeito bloqueador da Dobutamina, na cadeia de eventos que se segue à interação da Vasopressina com os receptores da membrana baso-lateral da bexiga, foram realizados os experimentos, conforme Protocolo Experimental do Quadro 3, nos quais a Dobutamina foi associada ao 3'5'AMPc ou à Teofilina, que são drogas que mimetizam o efeito hidrosmótico da Vasopressina.

Pode ser observado na Tabela VI e no Gráfico 3, que em presença do 3'5'AMPc (1mM) o fluxo de água foi de  $7,55 \pm 0,50$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$  nas hemi-bexigas controles, enquanto que nas hemi-bexigas experimentais (Dobutamina associada ao 3'5'AMPc), o fluxo foi de  $7,35 \pm 0,40$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$  sendo a diferença entre as médias não estatisticamente significante. Esses dados sugerem que a Dobutamina estaria bloqueando o efeito hidrosmótico da Vasopressina em passo anterior da formação do nucleotídeo. Esta mesma Tabela e Gráfico ilustram novamente os resultados mediante a adição isolada da catecolamina ao banho.

Utilizando-se de Protocolo Experimental semelhante, verificou-se a ocorrência de bloqueio da ordem de 54% do efeito hidrosmótico da Teofilina pela Dobutamina, sendo os valores observados de  $5,70 \pm 0,45$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ , em presença de Teofilina nas hemi-bexigas controles e de  $2,60 \pm 0,40$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$  quando da associação de Dobutamina com Teofilina no grupo das hemi-bexigas experimentais. Vide Tabela VII e Gráfico 4.

O Protocolo utilizado nesses experimentos (Quadro 4) permitiu uma investigação mais profunda das causas de tal bloqueio: o fluxo de água foi determinado em presença de Dobutamina e Teofilina no grupo das hemi-bexigas controles, e em presença de Dobutamina, Teofilina e Fentolamina ( $10^{-6}\text{M}$ ) no grupo das experimentais. Os resultados são também apresentados na Tabela VII e Gráfico 4. Nessas condições experimentais verificou-se estimulação da ordem de 59% do fluxo de água, evidenciando o bloqueio pela Fentolamina do efeito inibitório da Dobutamina.

TABELA VI

Comparação entre os efeitos da Dobutamina ( $8 \times 10^{-4}M$ ) e do 3'5'AMPc (1mM), e associação desses agentes farmacológicos sobre o fluxo osmótico da água ( $\mu l/min$ ), em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal.

HEMI-BEXIGA	CONTROLE	EXPERIMENTAL	CONTROLE	EXPERIMENTAL
N	BASAL	DO	3'5'AMPc	DO+3'5'AMPc
1	1,40	0,90	9,40	9,00
2	1,00	1,15	7,70	7,00
3	0,90	1,60	7,90	8,30
4	1,30	0,90	5,40	7,10
5	2,00	1,00	8,00	6,50
6	1,10	1,25	6,80	6,10
X $\pm$ EPM	1,30 $\pm$ 0,15	1,15 $\pm$ 0,10(N.S.)	7,55 $\pm$ 0,50	7,35 $\pm$ 0,40(N.S.)

- N = Número do Animal.

Quadro 3

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS			
	1º	2º	3º	4º
Controle	BASAL	BASAL	3'5'AMPc	BASAL
Experimental	BASAL	DO	DO + 3'5'AMPc	BASAL

TABELA VII

Efeito da Dobutamina (DO) ( $8 \times 10^{-4}M$ ) sobre a ação hidrosmótica da Teofilina (TEOF) ( $10^{-4}M$ ) e associação desses agentes farmacológicos com a Fentolamina (FENT) ( $10^{-6}M$ ) em experimentos pareados conduzidos em hemi-bexigas provenientes do mesmo animal. Fluxo de água expresso em  $\mu l/min$ .

HEMI-BEXIGA	CONTROLE	EXPERIMENTAL	CONTROLE	EXPERIMENTAL
N	TEOF	DO+TEOF	DO+TEOF	DO+TEOF+FENT
1	5,10	3,40	3,10	5,90
2	6,70	2,90	2,70	7,10
3	5,00	2,10	3,00	9,40
4	4,10	1,10	2,20	8,40
5	6,10	2,20	3,50	5,30
6	7,10	4,00	1,80	3,70
$\bar{X} \pm EPM$	$5,70 \pm 0,45$	$2,60 \pm 0,40^a$	$2,70 \pm 0,25$	$6,60 \pm 0,80^b$

- a =  $P < 0,01$  (%INIB. = 54,40, (DO+TEOF) em relação a (TEOF)).
- b =  $P < 0,01$  (%ESTIM. = 59,10, (DO+TEOF+FENT) em relação a (DO+TEOF)).
- N = Número do Animal.

Quadro 4

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1º	2º	3º	4º	5º
Controle	BASAL	BASAL	TEOF	DO	DO + TEOF
Experimental	BASAL	DO	DO + TEOF	DO	DO + TEOF + FENT

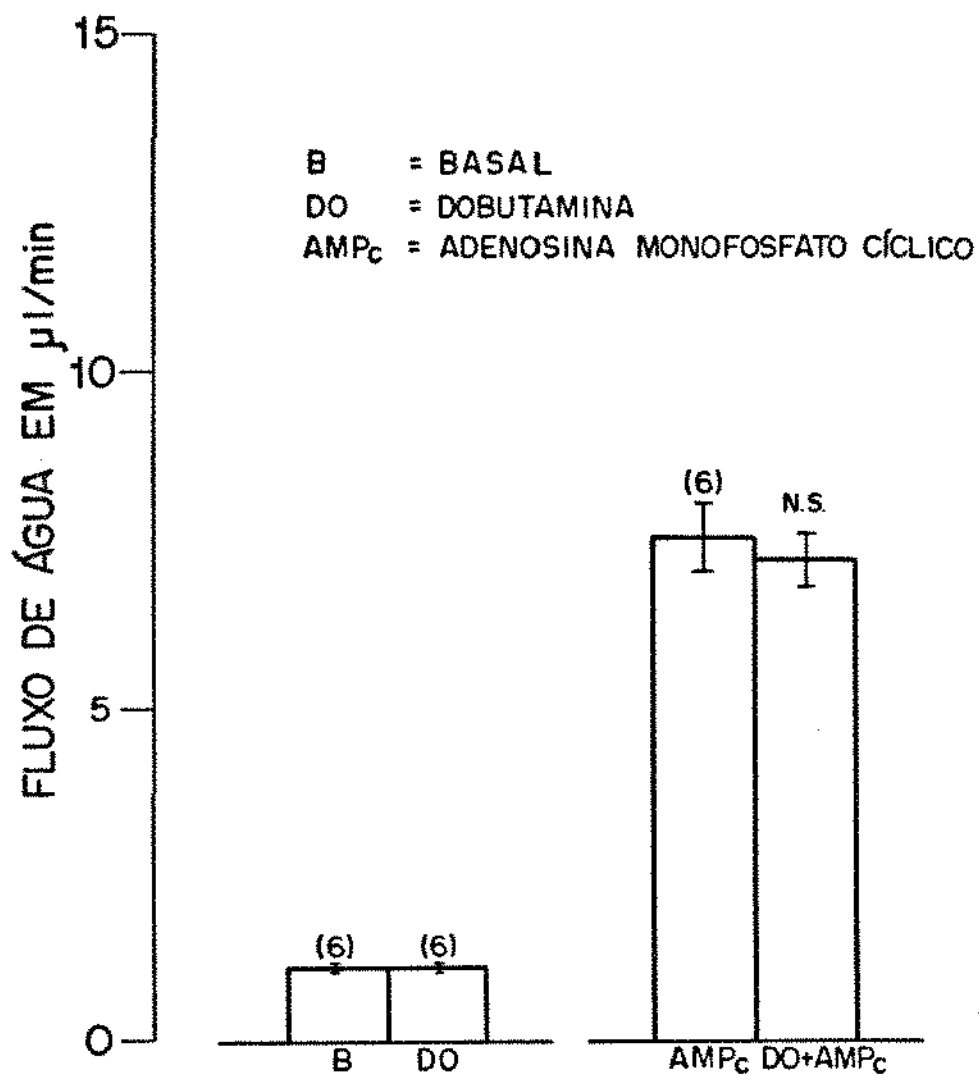


Gráfico 3 - Comparação entre os efeitos da Dobutamina ( $8 \times 10^{-4} M$ ) e do  $3'5'AMP_c$  (1mM) e a associação desses agentes farmacológicos sobre o fluxo hidrosmótico em bexigas de sapo, isoladas do mesmo animal.  
 N.S. - Não significante em relação ao controle ( $3'5'AMP_c$ ).

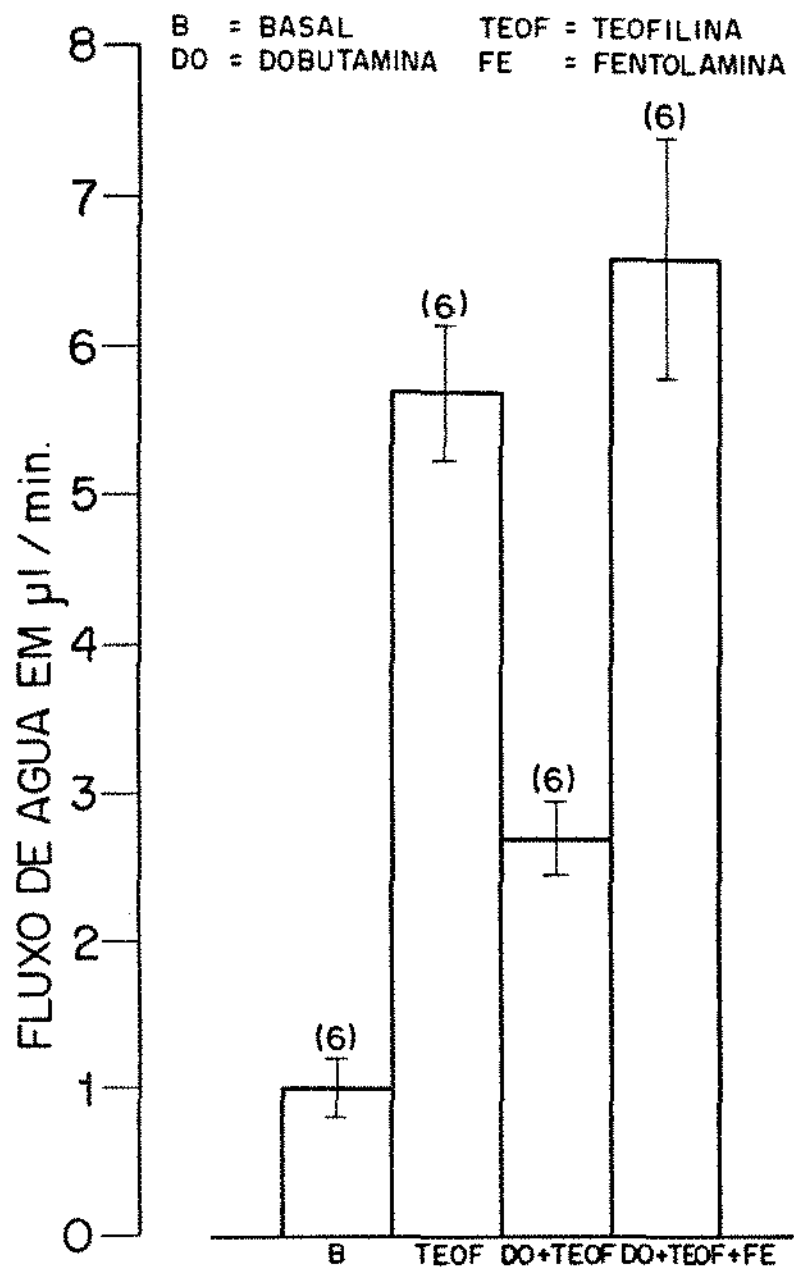


Gráfico 4 - Efeito da ação isolada da Teofilina ( $10^{-4}M$ ) e associação desse agente farmacológico com Dobutamina ( $8 \times 10^{-4}M$ ) e Fentolamina ( $10^{-6}M$ ) sobre o fluxo hidrosmótico em bexigas de sapo, isoladas do mesmo animal.

## RADIAÇÃO LASER

- Efeito da radiação Laser sobre o fluxo de água na presença e na ausência de Vasopressina

Utilizando-se o Protocolo Experimental descrito no Quadro 5, a Tabela VIII apresenta os resultados de experimentos conduzidos em hemi-bexigas gêmeas (provenientes do mesmo animal) e realizados quando da aplicação da radiação Laser ( $10\text{J}/\text{cm}^2$ ) na face serosa do epitélio associada à Vasopressina ( $10\text{mU}/\text{ml}$  de banho).

O fluxo de água em presença de Vasopressina ( $3^{\text{o}}$  período das hemi-bexigas do grupo experimental) foi de:  $12,90 \pm 1,00$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$  e, após a aplicação do Laser no período subsequente ( $4^{\text{o}}$ ), verificou-se significativo bloqueio, da ordem de 33% quando a Vasopressina foi novamente adicionada à preparação ( $5^{\text{o}}$  período).

Por outro lado, o fluxo obtido no  $5^{\text{o}}$  período no grupo das hemi-bexigas controles quando da aplicação da radiação Laser associada à Vasopressina sem o prévio tratamento no  $3^{\text{o}}$  período por esse hormônio, foi de  $12,35 \pm 1,30$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se este resultado for comparado com o obtido nas hemi-bexigas experimentais, no mesmo período ( $5^{\text{o}}$ ) verifica-se que, a diferença entre as médias é significativa ( $P < 0,05$ ).

O efeito da radiação Laser sobre o transporte de água em bexiga de sapo foi também estudado na ausência de Vasopressina. Obedecendo-se ao Protocolo Experimental constante do Quadro 6, foram realizados os experimentos apresentados na Tabela IX. Pode ser observado que a aplicação de radiação Laser de diferentes intensidades de energia na face serosa do epitélio, não provocou alterações da permeabilidade normal da membrana à água.

TABELA VIII

Influência da radiação Laser de baixa potência ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina (AVP) ( $10 \text{ mU/ml}$  de banho),  $\mu\text{l/min}$ , em bexigas de sapo provenientes do mesmo animal, ( $N=6$ ).

GRUPO CONTROLE	FLUXO	GRUPO EXPERIMENTAL	FLUXO	P
BASAL	$1,30 \pm 0,10$	AVP	$12,90 \pm 1,00$	$< 0,01$
BASAL + LASER	$1,25 \pm 0,25$	BASAL + LASER	$1,55 \pm 0,40$	N.S.
AVP	$12,35 \pm 1,30$	AVP	$8,55 \pm 1,10^a$	$< 0,05$

- a =  $P < 0,05$  (% INIB. = 33,70, (AVP+LASER) em relação ao período precedente (AVP)).
- N = Número de Experimentos

Quadro 5

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Controle	BASAL	BASAL + LASER	BASAL	BASAL + LASER	AVP	BASAL
Experimental	BASAL	BASAL	AVP	BASAL + LASER	AVP	BASAL



TABELA IX

Comparação entre os efeitos da radiação Laser em várias intensidades (INT) sobre o fluxo osmótico de água, ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ), em bexiga de sapo isoladas do mesmo animal.

		CONTROLE	EXPERIMENTAL	
N	INT( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	BASAL	BASAL+LASER	P
8	5	1,20 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,15	N.S.
5	10	1,75 $\pm$ 0,60	2,50 $\pm$ 0,70	N.S.
8	15	1,70 $\pm$ 0,60	1,90 $\pm$ 0,50	N.S.
6	20	1,10 $\pm$ 0,20	1,15 $\pm$ 0,25	N.S.

- N = Número de Experimentos.

Quadro 6

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS			
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>
Controle	BASAL	BASAL	BASAL + LASER	BASAL
Experimental	BASAL	BASAL + LASER	BASAL	BASAL + LASER

- Efeito da radiação Laser sobre o fluxo de água na ausência e na presença de Vasopressina - Técnica adaptada de PROCÓPIO E LACAZ VIEIRA (1977).

Para se poder investigar os efeitos da radiação Laser sobre o transporte de água, quando esta era aplicada sobre a face mucosa da membrana, foi necessário desenvolver-se uma preparação na forma de lâmina, já que, pela utilização da técnica de BENTLEY (1958), esta face fica voltada para o interior (meio externo) do lobo formado pela bexiga. Assim, optou-se por uma adequação da técnica de PROCÓPIO E LACAZ VIEIRA (1977), originalmente concebida para uso em pele de sapo.

Utilizando-se do Protocolo Experimental descrito no Quadro 5, a Tabela X apresenta os resultados de várias preparações realizadas quando da aplicação da radiação Laser ( $10\text{J}/\text{cm}^2$ ) na face *mucosa* do epitélio na ausência e na presença de Vasopressina ( $10\text{mU}/\text{ml}$  de banho), conduzidos em hemi-bexigas pareadas, montadas em forma de lâmina. Conforme pode ser verificado, as diferenças entre as médias nos diferentes grupos experimentais foram não significantes, evidenciando que a aplicação do Laser na face mucosa não alterou a permeabilidade normal do epitélio à água.

Nessa mesma Tabela (X), pode também ser notado que a radiação Laser, quando aplicada sobre a face mucosa do epitélio, não interferiu com a resposta normal da membrana à Vasopressina: no 3º período do grupo das hemi-bexigas experimentais, verificou-se fluxo de  $3,00 \pm 0,25$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}.\text{cm}^2$ , em presença de Vasopressina. Após a aplicação da radiação Laser (4º período), verificou-se que o fluxo de água (5º período) em presença de Vasopressina foi de  $2,85 \pm 0,40$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}.\text{cm}^2$ , sendo essa diferença não estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

Foi observado ainda que o resultado obtido no 5º período nas hemi-bexigas controles quando da aplicação do Laser associada com a Vasopressina sem o prévio tratamento no 3º período com esse hormônio foi de  $2,90 \pm 0,60$  ( $N=6$ )  $\mu\text{l}/\text{min}.\text{cm}^2$ . Se este resultado for comparado com o obtido na hemi-bexiga experimental, no mesmo período (5º) a diferença entre as médias também é não significativa.

Com a finalidade de se estabelecer comparação entre os dados obtidos com

a montagem da bexiga em forma de lâmina, a radiação Laser foi aplicada na face *serosa* do epitélio. A Tabela XI apresenta os resultados obtidos na ausência e na presença de Vasopressina. Confirmando os resultados obtidos com as preparações realizadas pela técnica de BENTLEY (1958), a radiação Laser também alterou a permeabilidade à água do epitélio, em presença do hormônio.

TABELA X

Influência da radiação Laser de baixa potência ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) sobre o fluxo de água ( $\mu\text{l/min.cm}^2$ ), medido por meio de adaptação da Técnica de PROCÓPIO e LACAZ VIEIRA (1977), em bexigas de sapo provenientes do mesmo animal ( $N=6$ ), com ou sem Vasopressina ( $10\text{mU/ml}$  de banho). A radiação Laser foi aplicada sobre a face mucosa da membrana.

GRUPO CONTROLE	FLUXO	GRUPO EXPERIMENTAL	FLUXO	P
BASAL+LASER	$0,30 \pm 0,05$	BASAL	$0,25 \pm 0,05$	N.S.
BASAL	$0,27 \pm 0,06^a$	AVP	$3,00 \pm 0,25$	$<0,01$
BASAL+LASER	$0,20 \pm 0,03$	BASAL+LASER	$0,25 \pm 0,02$	N.S.
AVP	$2,90 \pm 0,60$	AVP	$2,85 \pm 0,40^b$	N.S.

- a = Não significante em relação ao período precedente (BASAL + LASER).
- b = Não significante em relação ao período precedente (AVP).
- N = Número de Experimentos.

Quadro 5

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Controle	BASAL	BASAL + LASER	BASAL	BASAL + LASER	AVP	BASAL
Experimental	BASAL	BASAL	AVP	BASAL + LASER	AVP	BASAL

TABELA XI

Influência da radiação Laser de baixa potência ( $10 \text{ J/cm}^2$ ) sobre o fluxo de água, ( $\mu\text{l/min.cm}^2$ , medido por meio de adaptação da Técnica de PROCÓPIO e LACAZ VIEIRA (1977), em bexigas de sapo provenientes do mesmo animal ( $N=5$ ), com ou sem Vasopressina ( $10 \text{ mU/ml}$  de banho). A radiação Laser foi aplicada sobre a face serosa da membrana.

GRUPO CONTROLE	FLUXO	GRUPO EXPERIMENTAL	FLUXO	P
BASAL+LASER	$0,90 \pm 0,08$	BASAL	$0,80 \pm 0,10$	N.S.
BASAL	$0,85 \pm 0,09$	AVP	$2,60 \pm 0,30$	$<0,01$
BASAL+LASER	$0,70 \pm 0,02$	BASAL+LASER	$0,95 \pm 0,06$	N.S.
AVP	$2,70 \pm 0,25$	AVP	$2,30 \pm 0,40^a$	$<0,05$

-  $a = P < 0,05$  (% INIB. = 11,55, (AVP) em relação ao período precedente (AVP)).

- N = Número de Experimentos.

Quadro 5

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Controle	BASAL	BASAL + LASER	BASAL	BASAL + LASER	AVP	BASAL
Experimental	BASAL	BASAL	AVP	BASAL + LASER	AVP	BASAL

- Efeito da radiação Laser sobre a ação hidrosmótica do 3'5'AMPc

Visando estabelecer um paralelo entre o efeito da Dobutamina sobre a atividade hidrosmótica do 3'5'AMPc em bexiga de sapo e o efeito da radiação Laser, foi investigado o efeito dessa radiação sobre a atividade hidrosmótica do nucleotídeo.

A Tabela XII (Quadro 7) apresenta os resultados obtidos em preparações pareadas nas quais a adição isolada ao banho de 3'5'AMPc (1mM), provocou um fluxo de água de  $5,15 \pm 0,35$  (N=10)  $\mu\text{l}/\text{min}$  no grupo das hemi-bexigas controles, enquanto que a aplicação da radiação Laser ( $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) na face serosa do epitélio associada ao 3'5'AMPc resultou num fluxo de  $6,60 \pm 0,60$  (N=10)  $\mu\text{l}/\text{min}$  nas hemi-bexigas experimentais, ocorrendo portanto, uma estimulação do efeito hidrosmótico do 3'5'AMPc nessas condições da ordem de 28,15%; ( $P < 0,01$ ).

TABELA XII

Efeito da radiação Laser de baixa intensidade ( $10\text{J}/\text{cm}^2$ ) sobre a ação hidrosmótica do  $3'5'\text{AMPc}$  ( $1\text{mM}$ ), no fluxo de água  $\mu\text{l}/\text{min}$ , em hemi-bexigas pareadas, isoladas do mesmo animal.

HEMI-BEXIGA	CONTROLE	EXPERIMENTAL
N	$3'5'\text{AMPc}$	LASER+ $3'5'\text{AMPc}$
1	7,00	9,50
2	6,20	9,70
3	5,40	6,50
4	3,80	6,00
5	4,50	4,00
6	3,50	4,30
7	4,80	5,50
8	5,50	7,50
9	5,10	6,70
10	5,80	6,00
X+EPM	$5,15 \pm 0,35$	$6,60 \pm 0,60$

-  $P < 0,01$  (%ESTIM. = 28,15, (LASER+ $3'5'\text{AMPc}$ ) em relação ao ( $3'5'\text{AMPc}$ )).

- N = Número do Animal.

Quadro 7

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS			
	1º	2º	3º	4º
Controle	BASAL	BASAL	BASAL	$3'5'\text{AMPc}$
Experimental	BASAL	$3'5'\text{AMPc}$	BASAL	$3'5'\text{AMPc} + \text{LASER}$

- Efeito da radiação Laser sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina na presença de Indometacina

Na tentativa de se obter maiores informações acerca do efeito da radiação Laser, quando aplicada na face serosa da bexiga sobre os níveis de Prostaglandinas, e por conseguinte, na sua interferência na ação hidrosmótica da Vasopressina, uma série de experimentos foram conduzidas em hemi-bexigas gêmeas.

A Tabela XIII, mostra os resultados obtidos de acordo com o Protocolo Experimental (Quadro 8). Analisando-se inicialmente os resultados obtidos quando da adição isolada ao banho de Vasopressina nas hemi-bexigas controles (3<sup>o</sup> período), verificou-se fluxo de  $17,50 \pm 1,80$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ , enquanto que nas hemi-bexigas experimentais (Vasopressina associada à Indometacina ( $10^{-6}\text{M}$ )), no mesmo período o fluxo foi de  $20,80 \pm 2,30$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ , sendo a diferença entre as médias estatisticamente significante ( $P < 0,05$ ).

Quando da aplicação da radiação Laser associada à Vasopressina no grupo das hemi-bexigas controles (5<sup>o</sup> período), o fluxo foi de  $15,20 \pm 0,70$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se esse valor for comparado com o obtido nas hemi-bexigas experimentais no mesmo período (Vasopressina associada à Indometacina) em que o resultado foi de  $18,20 \pm 0,90$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ , verifica-se uma estimulação do efeito hidrosmótico da Vasopressina da ordem de 19,70%; ( $P < 0,05$ ).

Comparando-se o resultado do 5<sup>o</sup> período (experimental) obtido com Vasopressina associada à Indometacina após a exposição da membrana ao Laser, com o do 3<sup>o</sup> período (experimental), observa-se que nessas condições, mesmo com a presença da Indometacina no banho, persistiu o efeito bloqueador do Laser sobre a Vasopressina da ordem de 14,30%; ( $P < 0,05$ ).

A Tabela XIV mostra os resultados obtidos quando da utilização do Protocolo Experimental descrito no Quadro 9. Com a aplicação do Laser no grupo das hemi-bexigas controles ao início do 6<sup>o</sup> período em presença de Vasopressina e Indometacina remanescente do 5<sup>o</sup> período (pois as soluções não foram trocadas), o fluxo foi de:  $16,70 \pm 1,00$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Por outro lado, a aplicação do Laser no grupo das hemi-bexigas experimentais, também ao início do 6<sup>o</sup> período em presença



de Vasopressina, remanescente do 5<sup>o</sup> período, resultou num fluxo de  $10,20 \pm 0,80$  (N=6)  $\mu\text{l}/\text{min}$ , sendo essa diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Entretanto, se for comparado o resultado obtido no 6<sup>o</sup> período do grupo das hemi-bexigas controles em que a associação Vasopressina e Indometacina foi testada em presença do Laser, com o resultado obtido no 5<sup>o</sup> período desse mesmo grupo de hemi-bexigas, verifica-se que a diferença entre as médias ( $16,70 \pm 1,00$  e  $17,30 \pm 1,60$ , respectivamente) é estatisticamente não significativa.

Comparação entre os efeitos da Indometacina (INDOCID) ( $10^{-6}M$ ) e da radiação Laser ( $10 J/cm^2$ ) sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina (AVP) (10mU/ml de banho), em bexigas de sapo isoladas do mesmo animal (N=6). Fluxo de água expresso em  $\mu l/min$ .

Obs:- As tabelas XIII e XIV diferem somente em relação aos Protocolos Experimentais.

TABELA XIII

GRUPO CONTROLE	FLUXO	GRUPO EXPERIMENTAL	FLUXO	P	% ESTIM.
AVP	17,50±1,80	AVP+INDOCID	20,80±2,30	<0,05	19,00
BASAL+LASER	1,40±0,30	BASAL+LASER	1,15±0,15	N.S.	-----
AVP	15,20±0,70 <sup>a</sup>	AVP+INDOCID	18,20±0,90 <sup>b</sup>	<0,05	19,70

- a =  $P < 0,05$  (% INIB. = 15,10, (AVP) em relação ao período precedente (AVP)).

- b =  $P < 0,05$  (% INIB. = 14,30, (AVP+INDOCID) em relação ao período precedente (AVP+INDOCID)).

- N = Número de Experimentos.

Quadro 8

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS				
	1º	2º	3º	4º	5º
Controle	BASAL	BASAL	AVP	BASAL + LASER	AVP
Experimental	BASAL	INDOCID	AVP + INDOCID	BASAL + LASER	AVP + INDOCID

TABELA XIV

GRUPO CONTROLE	FLUXO	GRUPO EXPERIMENTAL	FLUXO	P	% INIB.
AVP	15,50±1,30	AVP	14,00±1,10	N.S.	-----
AVP	14,00±1,10	AVP+LASER	11,70±0,70 <sup>b</sup>	<0,05	19,70
AVP+INDOCID	17,30±1,60	AVP	12,00±0,90	<0,01	44,20
AVP+INDOCID+LASER	16,70±1,00 <sup>a</sup>	AVP+LASER	10,20±0,80 <sup>c</sup>	<0,01	63,70

- a = Não significante em relação ao período precedente (AVP+INDOCID).
- b =  $P < 0,01$  (% INIB. = 19,70, (AVP+LASER) em relação ao período precedente (AVP)).
- c =  $P < 0,05$  (% INIB. = 17,70, (AVP+LASER) em relação ao período precedente (AVP)).

Quadro 9

HEMI-BEXIGAS	PERÍODOS DE 30 MINUTOS					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Controle	BASAL	AVP	AVP	BASAL	AVP + INDOCID	AVP + INDOCID + LASER
Experimental	BASAL	AVP	AVP + LASER	BASAL	AVP	AVP + LASER

DISCUSSÃO

---

A analogia morfológica, filogenética e funcional existente entre a porção distal do néfron dos mamíferos e a bexiga urinária de anfíbios, possibilita que esse epitélio seja utilizado como modelo para o estudo do transporte de água e eletrólitos através de membranas (SILVEIRA et al., 1975).

Com relação a metodologia empregada para determinação do fluxo de água (técnica de BENTLEY) pode-se afirmar que a mesma, em virtude da sua simplicidade e, principalmente, da sua reprodutividade, vem sendo largamente empregada. 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 (HANDLER et al., 1968; HARDY, DIBONA, 1982).

Uma crítica que pode ser feita a este sistema é que o gradiente de pressão osmótica não é mantido constante, sendo que o mesmo poderia ser reduzido durante o próprio período experimental. Entretanto, em experimentos anteriores (SILVEIRA et al., 1975) foi verificado que nesse intervalo de tempo o gradiente osmótico estabelecido através da membrana não se altera significativamente, pois o fluxo segue sendo proporcional ao período de leitura.

A utilização de outro método que não o de BENTLEY (1958) para a medida do fluxo de água se fez necessário para possibilitar o estudo da exposição da face mucosa da membrana ao Laser, já que, pelo método de BENTLEY, esta fica voltada para o interior do lobo formado pela bexiga. Assim, optou-se pela adaptação do método de PROCÓPIO e LACAZ VIEIRA (1977), originalmente descrito para a medida da absorção de água através da pele de sapo. Para tanto, foi necessário estabelecer uma maneira capaz de suportar a bexiga de sapo, em forma de lâmina, para a montagem entre as câmaras e, ao mesmo tempo, de evitar ao máximo a ocorrência de lesão da borda durante o manuseio da preparação na determinação do fluxo de água. Estes problemas foram resolvidos pela utilização de uma tela de nylon emoldurada, nas suas faces, por arruelas de papel de filtro cujos diâmetros internos correspondiam ao da câmara.

Uma vez que a câmara era mantida em movimento rotatório constante, as soluções nos compartimentos se mantinham sob agitação permanente (e no mesmo

nível) e, portanto, o acréscimo à camada estacionária adjacente à membrana, provocado pela presença da tela de nylon em contato com uma das faces da membrana (dependendo de qual seria exposta à radiação Laser), não invalida a metodologia utilizada.

Em adição, o método descrito por PROCÓPIO E LACAZ VIEIRA, permite quantificar com exatidão a área da membrana disponível para o transporte, (neste caso a área era de 7 cm<sup>2</sup>), possibilitando então, a obtenção de valores mais precisos para o coeficiente de permeabilidade osmótica da bexiga de sapo, nas condições estudadas. A implantação dessa metodologia permitiu também comprovar os resultados obtidos pelo método de BENTLEY (1958), o qual sofre críticas por requerer a utilização de bexigas de mesmo porte (e presumivelmente, de mesma área) para fins de comparação dos resultados.

#### DOBUTAMINA

Em trabalho anterior (FRANCO et al., 1991) foi verificado que as catecolaminas beta-adrenérgicas em geral provocam inibição da ação hidrosmótica da Vasopressina. No presente trabalho, utilizando-se da Dobutamina, verificou-se que essa catecolamina produziu efeito similar ao descrito para as demais já estudadas, em especial ao da Isoprenalina, cujo o bloqueio da ação da Vasopressina é da ordem de 16%. Esperar-se-ia resultado semelhante com a Dobutamina, pois a mesma é derivada da Isoprenalina. Entretanto, contrariando essa hipótese, foi observado que a inibição provocada pela Dobutamina é da ordem de 31%. A justificativa mais plausível para essa diferença é a modificação introduzida no Procedimento Experimental, em relação ao utilizado no caso da Isoprenalina. Tal modificação consistiu na adição de Dobutamina ao banho no período anterior ao experimental propriamente dito, no qual ocorria a adição de Vasopressina e/ou de outros agentes farmacológicos, como foi descrito no Procedimento Experimental.

O Gráfico 5 retrata (em porcentagem de inibição) o bloqueio produzido pela Dobutamina na ação hidrosmótica da Vasopressina em relação às outras catecolaminas investigadas em trabalho anterior (FRANCO et al., 1991).

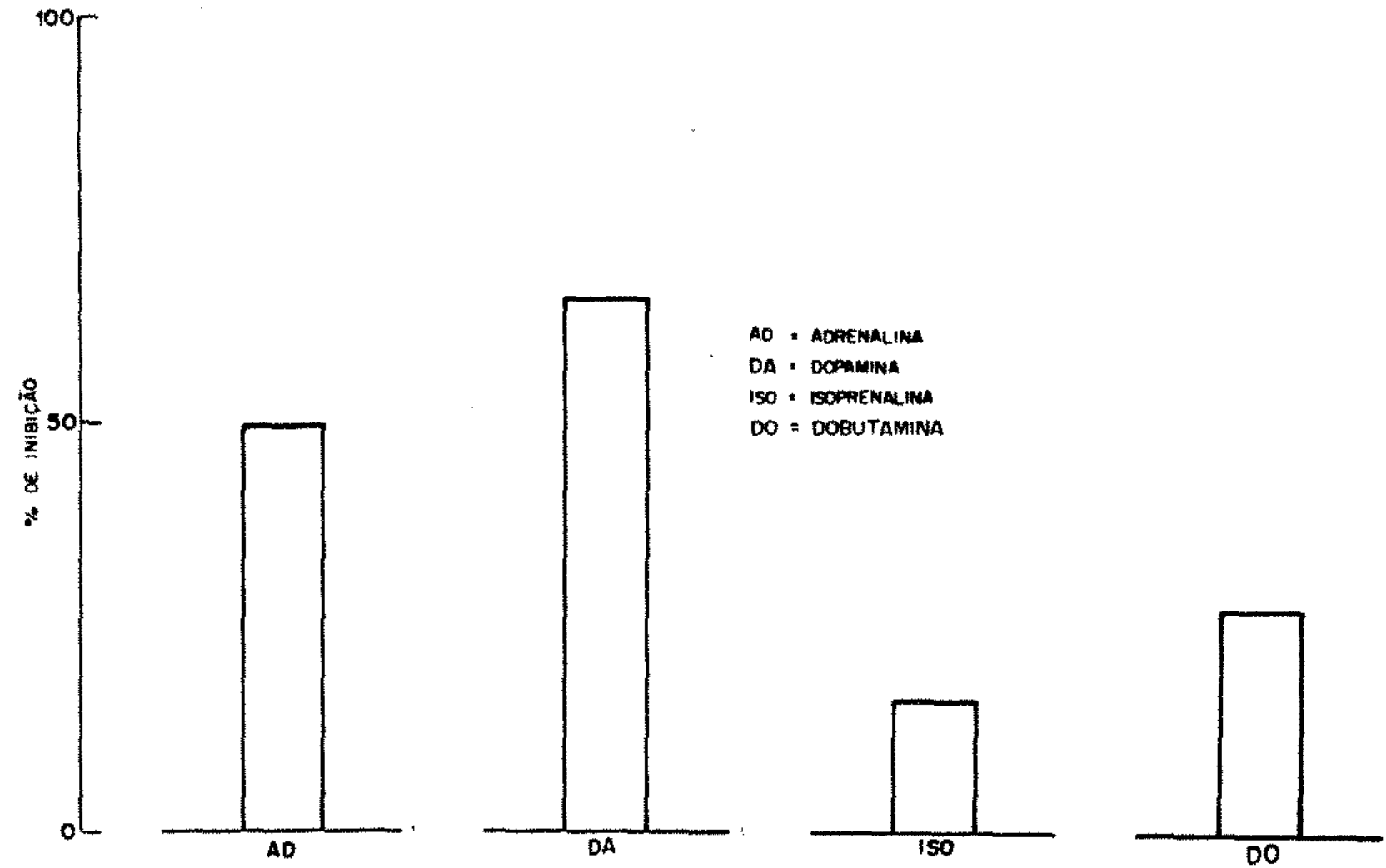


Gráfico 5 - Comparação do efeito inibitório da Dobutamina ( $8 \times 10^{-4}M$ ) com as demais catecolaminas beta-adrenérgicas sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina em bexigas de sapo.

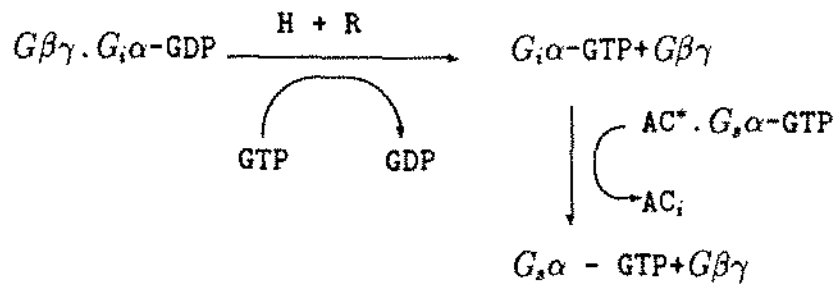
Por outro lado, a utilização da Dobutamina permitiu evidenciar, em Protocolos Experimentais nos quais os receptores alfa e beta adrenérgicos foram seletivamente bloqueados, que a inibição pelas catecolaminas da ação hidrosmótica da Vasopressina em bexiga de sapo, envolve a participação de receptores alfa-adrenérgicos.

Investigando mais profundamente este assunto, pela utilização de Rauwolscina - um bloqueador específico para receptores alfa<sub>2</sub> adrenérgico (GOLDBERG, ROBERTSON., 1987) - ficou evidenciada a participação desse tipo de receptor no bloqueio da estimulação pela Vasopressina do fluxo osmótico de água. Estes dados podem ser explicados da seguinte maneira: um mesmo sinal molecular pode aumentar ou diminuir a concentração celular do 3'5'AMPc, dependendo do tipo de receptores aos quais está ligado. Receptores beta-adrenérgicos ativam a enzima adenilciclase, enquanto receptor alfa<sub>2</sub>-adrenérgico a inibem. A diferença é devido às proteínas G que se acoplam à adenilciclase (LEFKOWITZ, et al., 1984).

Os receptores para a Vasopressina que apresentam atividade semelhante à verificada quando os receptores beta-adrenérgicos são estimulados (LEFKOWITZ, et al., 1984), são funcionalmente acoplados para a adenilciclase pela Proteína estimuladora G<sub>s</sub>, enquanto o receptor alfa<sub>2</sub>-adrenérgico é acoplado na mesma enzima por uma proteína inibitória G<sub>i</sub>, sendo que ambas contém o mesmo complexo Gβγ de G<sub>s</sub> mas apresentando diferentes sub-unidades α (GILMAN, 1987).

Quando ativado o receptor alfa<sub>2</sub>-adrenérgico ligado à G<sub>i</sub>, leva G<sub>i</sub>α à ligação GTP no lugar de GDP. Isto é o que causa a dissociação de G<sub>i</sub>α de Gβγ e ambos os produtos liberados contribuem na inibição da enzima adenilciclase: G<sub>i</sub>α inibe diretamente a enzima, enquanto Gβγ atua indiretamente pela ligação da unidade livre G<sub>s</sub>α, prevenindo-as, desse modo, da ativação da molécula de adenilciclase, ou seja promove uma associação das sub-unidades (LEVITZKI, 1988).





AC\* = ATIVA PELA VASOPRESSINA

AC<sub>i</sub> = INATIVA

#### ESQUEMA DE INATIVAÇÃO DA VASOPRESSINA PELA DOBUTAMINA VIA RECEPTOR ALFA<sub>2</sub>-ADRENÉRGICO

Para melhor caracterização do efeito desse agente adrenérgico sobre a ação da Vasopressina, o 3'5'AMPc foi adicionado às preparações em lugar da Vasopressina. Os resultados obtidos com a Dobutamina confirmam que o efeito desse agente adrenérgico se verifica em passo anterior à formação do nucleotídeo.

Por outro lado, a presença de Teofilina - um inibidor da atividade da enzima fosfodiesterase-nucleotídeo no banho, conjuntamente com a Dobutamina, levou à obtenção de resultados que apontam para um possível efeito da catecolamina sobre a geração (ou inativação) do 3'5'AMPc. Esta observação foi corroborada nos experimentos que os receptores alfa-adrenérgicos foram bloqueados pela Fentolamina, o que permitiu verificar-se a restauração da ação hidrosmótica da Teofilina, embora a Dobutamina estivesse presente no meio.

#### RADIAÇÃO LASER:

De uma maneira geral, os resultados obtidos indicam que a radiação Laser de baixa potência não afeta a permeabilidade normal da bexiga de sapo à água. Do mesmo modo, a resposta do tecido à ação hidrosmótica da Vasopressina não é afetada

quando a exposição à radiação Laser é feita previamente à adição de Vasopressina à preparação.

Em contraste, foi observado que a aplicação de Laser à face serosa do epitélio após a estimulação do fluxo de água por Vasopressina, levou a bloqueio significativo da ordem de 34% ( $P < 0,05$ ) da resposta do tecido a uma nova dose de Vasopressina. Esses dados sugerem que a transdução do efeito da interação da Vasopressina aos seus receptores na membrana, ou a translação desse efeito, podem ter sido alteradas pela exposição à radiação Laser, já que o efeito inibitório do Laser não foi observado quando a radiação foi aplicada sobre a face mucosa da membrana.

Por outro lado, foram utilizados experimentos nas quais o efeito da radiação Laser foi somado ao da presença de 3'5'AMPc na solução. O resultado mostra claramente ( $P < 0,01$ ) uma estimulação pelo Laser do efeito do 3'5'AMPc, embora a dispersão dos dados (Tabela XIII) tivesse sido elevada. Esses efeitos antagônicos da radiação Laser sobre a ação hidrosmótica da Vasopressina ou do 3'5'AMPc poderiam ser explicados da seguinte maneira: a radiação Laser apresentaria efeito negativo sobre a produção de 3'5'AMPc (e portanto, inibindo a ação da Vasopressina por interferir com a transdução de sinais gerados ao nível do complexo adenilciclase-dependente) e apresentaria efeito positivo sobre a ação do 3'5'AMPc (e portanto, sua atuação seria a de inibir a atividade da enzima fosfodiesterase-nucleotídeo).

A Vasopressina, além do seu efeito de aumentar a permeabilidade à água e eletrólitos 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 (BURCH, HALUSHKA, 1981).

Resultados semelhantes a estes foram obtidos por MESTER, et al, 1985, quando da aplicação da radiação Laser em tecidos epiteliais. Esses autores observaram que nos períodos iniciais da aplicação ocorria um aumento dos níveis de Prostaglandinas e que nos períodos subsequentes da aplicação ocorre uma diminuição significativa dessa substância.

Os mecanismos específicos da interação entre Prostaglandinas e Vasopressina não estão totalmente esclarecidos ao nível bioquímico. A hipótese mais aceita atualmente é que as Prostaglandinas, de um modo geral, produzem um bloqueio da interação da Vasopressina com o complexo adenilciclase-dependente (FORREST,

GOODMAN, 1981).

A utilização de droga do tipo (Indometacina), inibidora por excelência da enzima (ciclo-oxigenase), que participa da síntese de Prostaglandinas, leva à potenciação da ação hidrosmótica da Vasopressina (SATO, DUNN MICHAEL, 1984).

Os resultados das Tabelas XIII e XIV, convalidam de uma maneira geral, essas observações.

A aplicação do Laser nos grupos das hemi-bexigas (controles ou experimentais), em período precedente ou conjuntamente com a Vasopressina associada à Indometacina, mostram que a radiação Laser estimula a síntese de Prostaglandinas neste tipo de epitélio. Assim, pela utilização de Indometacina, verificou-se uma liberação do efeito hidrosmótico da Vasopressina.

## CONCLUSÕES

## DOBUTAMINA

1. A adição isolada da Dobutamina no banho não altera a permeabilidade normal da membrana à água, evidenciando neste epitélio a independência entre os receptores para a Vasopressina e para a Dobutamina.
2. Isoladamente a adição de 3'5'AMPc no banho aumenta o fluxo hidrosmótico na bexiga urinária de sapo. Uma vez que a associação desse nucleotídeo com Dobutamina não provoca alteração desse fluxo, fica evidente o efeito da catecolamina antes da formação do nucleotídeo.
3. A associação da Dobutamina, Vasopressina e de um agente bloqueador beta-adrenérgico (Propranolol), não restaura o efeito do hormônio anti-diurético. Entretanto, como a associação de agentes bloqueadores alfa-adrenérgicos (Fentolamina ou Rauwolscina) à Dobutamina e à Vasopressina, leva à restauração parcial do efeito do hormônio, fica evidente a participação de receptores alfa-adrenérgico (principalmente do tipo alfa<sub>2</sub>-adrenérgico) no fenômeno de bloqueio da ação permeabilizante da Vasopressina pela Dobutamina.
4. A associação da Dobutamina com Teofilina, promove decréscimo significativo da atividade hidrosmótica da metil-xantina, sendo essa ação regenerada quase que na totalidade mediante a adição desses agentes farmacológicos à Fentolamina. Esses resultados sugerem que a Teofilina atua não só bloqueando a atividade da enzima fosfodiesterase-nucleotídeo como também estimulando a enzima adenilciclase; na conversão do ATP em 3'5'AMPc.

## RADIAÇÃO LASER

1. A radiação Laser não afeta a permeabilidade normal da bexiga de sapo à água, quer quando aplicada sobre a face mucosa ou sobre a face serosa do epitélio.
2. A exposição de ambas as faces (serosa e mucosa), individualmente, da bexiga à radiação Laser não afeta a ação hidrosmótica da Vasopressina. Entretanto, uma vez estabelecida esta ação da Vasopressina, a radiação Laser, provoca, provavelmente uma perturbação molecular ao nível do complexo adenilciclase-dependente, produzindo como consequência uma diminuição significativa da reabsorção de água pela bexiga.
3. Na vigência da ação da Vasopressina, a radiação Laser pode ter dois efeitos antagônicos, com ação negativa sobre a produção do 3'5'AMPc, induzida pela Vasopressina e efeito positivo sobre a ação do nucleotídeo sobre a permeabilidade à água, por inibição da atividade da enzima fosfodiesterase-nucleotídeo.
4. Os resultados obtidos da aplicação da radiação Laser associada à Indometacina *antes e depois* do fluxo de água ter sido estimulado pela Vasopressina, evidenciam que a radiação Laser estimula, neste epitélio, a produção de Prostaglandinas.

SUMÁRIO

---

No presente trabalho é descrito e caracterizado o efeito de diversos agentes farmacológicos, em especial a Dobutamina e de um agente físico-radiação Laser - nos eventos que se seguem à interação da Vasopressina com os receptores da membrana de bexiga de sapo, e que são relacionados à síntese e inativação do 3'5'AMPc. O fluxo de água entre as duas faces da membrana foi medido gravimetricamente por meio da técnica de BENTLEY (1958) para preparações em formas de lobos e da técnica de PROCÓPIO e LACAZ-VIEIRA (1977), para preparações em forma de lâmina. Na ausência de Vasopressina, a Dobutamina ou aplicação de radiação Laser não provocou alteração da permeabilidade normal do epitélio à água. Em contraste, a ativação dos receptores adrenérgicos por Dobutamina ( $8 \times 10^{-4}M$ ) provocou bloqueio significativo (da ordem de 31%) da ação hidrosmótica da Vasopressina (10mU/ml de banho). De maneira semelhante, a aplicação do Laser ( $10J/cm^2$ ) na face serosa bloqueou significativamente (da ordem de 34%) a resposta do tecido a uma nova dose de Vasopressina. Esse efeito não foi verificado quando a face mucosa da membrana foi exposta à radiação.

Por outro lado, a associação do 3'5'AMPc com a radiação Laser promoveu aumento do fluxo de água, sugerindo que o agente físico pode ter apresentado efeitos antagônicos sobre o transporte de água, com efeito negativo sobre a produção de 3'5'AMPc, pelo complexo adenilciclase e com efeito positivo sobre a ação do nucleotídeo por inibição da enzima fosfodiesterase-nucleotídeo.

Foi verificado também que o inibidor da fosfodiesterase, Teofilina, promoveu aumento significativo do fluxo hidrosmótico, por provocar aumento da concentração de 3'5'AMPc. Quando foi associada Dobutamina à Teofilina, observou-se diminuição da atividade hidrosmótica da metil-xantina, sendo essa ação regenerada, quase que na sua totalidade, pela adição ao banho do antagonista alfa-adrenérgico, Fentolamina. Esses resultados sugerem que a Teofilina atua não somente bloqueando a atividade da fosfodiesterase, como também estimulando o complexo adenilciclase-dependente, na conversão do ATP em 3'5'AMPc.

Em contraste, quando da associação de Dobutamina, Vasopressina e um agente beta bloqueador, Propranolol, não ocorreu a restauração do efeito do hormônio anti-diurético. Por outro lado, a associação de agentes bloqueadores alfa-adrenérgicos, Fentolamina ou Rauwolscina ao meio contendo Dobutamina



e Vasopressina, levou à observação do pleno restabelecimento da ação da Vasopressina, evidenciando a participação de receptor alfa<sub>2</sub>-adrenérgico no bloqueio da ação hidrosmótica do hormônio, caracterizando esse receptor como sendo um agonista da diurese.

Os resultados obtidos quando da associação de Indometacina com a radiação Laser antes e depois do fluxo de água ter sido estimulado pela Vasopressina, apontam para a possibilidade de que o Laser estimularia a produção de Prostaglandinas neste tipo de epitélio, que por sua vez interferiria sobre a atividade hidrosmótica da Vasopressina.

SUMMARY

In the present work the effects of several pharmacological agents in special Dobutamine and a physical agent-Laser radiation - on the events that follow the interaction of Vasopressin with membrane receptors related to synthesis and inactivation of cyclic-AMP in the toad bladder, are described and characterized.

Water flow across the membrane was measured gravimetrically by the technique of BENTLEY(1958) in sac preparations of the membrane, and by the technique of PROCÓPIO & LACAZ VIEIRA (1977) in sheet preparations of the bladder. Dobutamine or the application of Laser radiation did not alter the normal water permeability of the epithelium in the absence of Vasopressin. In contrast, adrenoceptors activation by Dobutamine ( $8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) led to a significant (about 31%) blockage of the hydrosmotic action of Vasopressin. Similarly, low-energy Laser radiation ( $10/\text{Jcm}^2$ ) blocked the tissue response to Vasopressin after the previously treatment of the membrane with the hormone. This inhibitory effect was not observed when the mucosal face of the membrane was exposed to the Laser radiation.

On the other hand, association of cyclic-AMP with Laser radiation promoted an increase in the water flow suggesting that the physical agent may present dual effects on the water transport, one being negative on the cyclic-AMP production by the adenylate-cyclase complex and the other being positive on the nucleotide action by phosphodiesterase - nucleotide inhibition.

It was also seen that Theophylline - the phosphodiesterase inhibitor - stimulated water transport by increasing cyclic-AMP concentration in the tissue. The association of Dobutamine with Theophylline led to a decrease in the methyl-xanthine hydrosmotic activity, being this effect restored almost completely by the presence in the serosal bathing solution of an alpha-adrenergic antagonist, Phentolamine. These results suggest that Theophylline acts not only by blocking phosphodiesterase activity, but also by stimulating adenylate-cyclase-dependent complex in the conversion mechanism of ATP to cyclic-AMP.

In contrast, when Dobutamine, Vasopressin and an beta-adrenergic antagonist, Propranolol were associated, the hydrosmotic response of the tissue to Vasopressin was not restored. On the other hand, the association of alfa-adrenergic agent Phentolamine or Rauwolscine to the Dobutamine and Vasopressin serosal bathing solution restored the action of Vasopressin, evidencing

alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptor participation on the blockage of the hydrosmotic action of the hormone, further characterizing this receptor as one diuresis agonist.

The results obtained by the association of Indomethacin with Laser radiation before and after the stimulation of water flow by Vasopressin point to the possibility that Laser radiation would stimulate Prostaglandins synthesis in this tissue, interfering in this way with the hydrosmotic activity of Vasopressin.

**BIBLIOGRAFIA**

- AL-ZAHID, G., SCHAFFER, J.A., TROUTMAN, S.L. et al. Effect of antidiuretic hormone on water and solute permeation, and the activation energies for these processes, in mammalian cortical collecting tubules. *J. Memb. Biol.* v.31, p.103, 1977.
- ANDERSON, R.R., PARRICH, J. Microvasculature can be selectively damaged using dye Laser: A basic theory and experimental evidence in human skin. *Lasers Surg. Med.* v.1, n.3, p.263-276, 1983.
- ARGY, W.P. Jr., HANDLER, J.S., ORLOFF, J.  $Ca^{+2}$  and  $Mg^{+2}$  effects on toad bladder response to cyclic AMP, theophylline and ADH analogues. *Am. J. Physiol.* v. 213, p. 803-808, 1967.
- ARRUDA, J.A.L., SABATINI, S. Cholinergic modulation of water transport in the toad bladder. *Am. J. Physiol.* v.239 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 8), p. 154F - 159F, 1980.
- BENEDICENTI, A. La valutazione dell'incremento di ATP in linfociti sottoposti a biostimolazione con luce Laser 904 nm infrared. *Atlante di Laserterapia.* p. 51- 70, 1982.
- BENEDICENTI, A., GOLLA, G., CINGANO, L. et al. Valoración radioinmunoológica del nivel de beta-endorfina en el líquido cefáleo-raquídeo antes y después de irradiar con luz láser 904 nm, en la neuralgia del trigémino. *Inv. Clínica Láser.* v.1, p.7-12, 1984.
- BENTLEY, P. J. The effects of neurohypophysial extracts on water transfer across the of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo Marinus*. *J. endocrinol.* v.17, p. 201-209, 1958.
- BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* v.56, p. 159-193, 1987.
- 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.* v. 21, p. 142-149, 1981.
- CHEUNG, W.Y. Calmodulin: an overview. *Fed. Proc.* v. 41, p. 2253-2257, 1982.
- CHRISTENSEN, C.U. Adaptation in the water economy of some anuram amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 47 A, p. 1035-1049, 1974.

- CIRNE, B.R., REIS, H.A., SILVEIRA, J.E.N. Skin water uptake and renal function in the toad. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 69A, p.219-224, 1981.
- COLLS, J. La Terapia Laser, hoy. *Centro de Documentacion Laser - Barcelona*, p. 85-120, 1984.
- COWLEY, A.W. Jr., SWITZER, S.J., GUINN, M. Evidence and quantification of the vasopressin arterial pressure control system in the dog. *Cir. Res.* v. 46, p. 58-67, 1980.
- DE ROUFFIGNAC, C., BANKIR, L. L'econome de l'eau chez les mammiferes. *La Recherche*, v. 22, n.221, p. 654-665, 1990.
- 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)*. v.77, p. 281-295, 1981.
- EINSTEIN, A. Zur quantum theorie des strahlung. *Phy. Z.* v. 18, p. 121-128, 1917.
- FINN, A.L. Action of ouabain on sodium transport in toad urinary bladder. Evidence for two pathways for sodium entry. *J.Gen Physiol.* v. 65, p. 503-514, 1975.
- FLORES, J., WITKUM, P.A., BECKMAN, B. et al. Reserve of Vasopressin-sensitive adenylate ciclase in toad urinary bladder. *Biochem. Biophys. Acta.* v.362, p.501-508, 1974.
- FORREST, J.N., GOODMAN, D.B.P. pH Dependent Prostaglandin E<sub>2</sub> production and somatostatin: modulators of the action of vasopressin in the toad urinary bladder. *Ann. Ny. Acad. Sci.* v. 372, p. 180-193, 1981.
- FRANCO, W., ARBEX, S.T., SILVEIRA, J.E.N. Effect of adrenergic agents on the hidrosmotic action of vasopressin the isolated toad bladder. *Revista de Ciências Médicas - Botucatu*, v.12, p. 15-22, 1991.
- FROMTER, E., DIAMOND, J.M. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature New Biol.* - London, v.235, p.9-13, 1972.
- GAGLIARDI, A.R.T., VEIGA, J.P.R., ROSA, T.T. et al. Pentavalent antimonial inhibition of the osmotic effect of oxytocin on the isolated toad bladder. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v.18, p. 567-571, 1985.

- GELLAI, M., EDWARDS, R.M. Mechanism of alfa<sub>2</sub> - adrenoceptor agonist-induced diuresis. *Am. J. Physiol.* v. 255 (Renal Fluid Electrolyte. 24), p. 317F-323F, 1988.
- GILMAN, A.G. G Proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cells.* v. 36, p. 577-579, 1984.
- ——— G Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* v. 56, p.615-645, 1987.
- GOLDBERG, M.R.; ROBERSTSON, D. Review of pharmacology and use in molecular studies of alfa<sub>2</sub>-adrenoreceptor. *Pharmacol.* v. 35, p.143-180, 1987.
- GOLDMAN, L. Introduction to the Lasers in Medicine. IN: *The Biomedical Laser.* New York, Springer- Verlag, 1981 p. 1-5.
- ——— Laser medicine in America. An overview. *Lasers Surg. Med.* v.1, n.4, p. 285-288, 1981a.
- HANDLER, J.S. Antidiuretic hormone moves membranes. *Am. J. Physiol.* v. 255, p. 375F-382F, 1988.
- 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.* v. 215, n.5, p.1024- 1031, 1968.
- HARDY, M.A. Microfilaments and the effects of antidiuretic hormone on water permeability. *Am. J. Physiol.* v. 248 (Cells Physiol. 17), p. 183C-184C, 1985.
- HARDY, M.A., DIBONA, D.R. Extracellular Ca<sup>+2</sup> and the effect of antidiuretic hormone on the water permeability of the toad urinary bladder: An example of flow induced alteration of flow. *J.Memb. Biol.* v. 67, p.27-44, 1982.
- HAYS, R.M. Antidiuretic Hormones. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. *New Engl. J. Med.* v. 295, n.12, p. 659-665, 1976.
- ——— Alteration of luminal membrane structure by antidiuretic hormone (Review). *Am. J. Physiol.* v. 245, n. 5, p. 289c, 1983.



- HAYS, R.M., LEAF, A. Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. *J. Gen. Physiol.* v. 45, p. 905-912, 1962.
- HEBERT, S.C., ANDREOLI, T.E. Interactions of temperature and ADH on transport processes in cortical collecting tubules. *Am J. Physiol.* v. 238, p. 470 F, 1980.
- HERERRA, F.C. Membranes an ion transport- Frog skin and toad bladder. *Interscience*, v.3, p. 1-47, 1971.
- HOWELETT, A.C., GILMAN, A.G. Hydrodynamic properties of the regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* v. 255, p. 2861-2866, 1980.
- INSEL, P.A., SNAVELY, M.D. Catecholamines and the kidney: Receptors and renal function. *Ann. Rev. Physiol.* v.43, p.625-636, 1981.
- JARD, S. The mode of action of ADH. *J. Physiol.* v.63, p.99-146, 1971.
- ——— Vassopressin: mechanisms of receptor activation. *Progress in Brain Res*, v. 60, p. 383-394, 1983.
- JARDIN, F., SPORTICHE, M., BRAZIN, M. et al. Dobutamine: a Hemodynamic evaluation in human septic shock. *Crit. Care Med.* v. 9, n. 4, p. 329-332, 1981.
- JURI, H. Características dos Lasers. IN: *Laser em Medicina e Biologia*, São Paulo, Roca, 1990, p.13-17.
- KACHADORIAN, W.A., COLEMAN, R.A., WADE, J.B. Water permeability and particle aggregates in ADH-AMPC and forskolin-treated toad bladder. *Am. J. Physiol.* v. 253 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 22), p. 120F-125F, 1987.
- KAHN, R.A., GILMAN, A.G. ADP rybosylation of Gs Promotes the Dissociation of its  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *J. Biol. Chem.* v. 259, n. 10, p. 6235-6240, 1984.
- KARU, T. Photobiology of the regulation of cellular metabolism with low intensity visible light. *S.R.C.T.L. de La Acad. de las Ciencias de la URSS.* v. 8, p. 1- 56, 1985.
- ——— Photobiological fundamentals of low-power Laser therapy. *IEEE J. Of Quantum Elec.* v.23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.

- KEPPENS, S., DE WULF, H. The nature of the hepatic receptors involved in vasopressin-induced glycogenolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 588, p. 63-69, 1979.
- KOEFOED-JOHNSEN, V., USSING, H.H. The contributions of diffusion and flow to the passage of H<sub>2</sub>O through living membranes. *Acta Physiol. Scand.* v. 28, p.60- 76, 1953.
- KOVACS, I. Stimulation of wound healing by Laser rays as estimated by means of the rabbit ear chamber method. *Acta Chir. Acad. Sci. Hungr.* v.15, n. 4, p. 427- 432, 1974.
- LABAJOS, M., FERNANDEZ-PEREZ, J.A., RUIZ, M.D. et al. Effect of the irradiation of the Ga-As Diode Laser on Intestinal absorption: in vitro in vivo studies. *Lasers Med. Surg.*, v.1, p.21-25, 1986.
- LAM, T.S., ABERGEL, P., CASTEL, J.C., et al. Effects of Lasers on the biology of human skin fibroblasts. *Min. Riflessoter e Laserter.* V. 2, p. 89-98, 1985.
- LEAF, A. From toad bladder to kidney. *Am. J. Physiol.* v. 242 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 11), p. 103F-111F, 1982.
- LEFKOWITZ, R.J., CARDN, M.G., STILES, G.L. Mechanisms of membrane-receptor regulation. *New Engl. J. Med.* v. 310, p. 1570-1578, 1984.
- LEIR, C.V., UNVERFERTH, D.V. Dobutamine. *Ann. Intern. Med.* v.99, p. 490-496, 1983.
- LEVINE, S.D., FRANKI, N., HAYS, R.M. Effect of phoretin on water and solute movement in the toad bladder. *J. Clin. Invest.* v. 52, p. 1435-1442, 1973.
- LEVINE, S.D., JACDBY, M., SATRIANO, J.A. et al. The effects of amrinone on transport and cyclic AMP metabolism in toad urinary bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 216, p. 220-224, 1981.
- LEVINE, S.D., WEBER, H., SCHLONDORFF, D. Inhibition of adenylate cyclase by general anesthetics in toad urinary bladder. *Am. J. Physiol.* v. 327, p. 372-378, 1979.
- LEVITZKI, A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science.* v. 240, p.800-806, 1988.

- LIPSON, L.C., SHARP, G.W.G. Effect of Prostaglandin E<sub>1</sub> on sodium transport and osmotic water flow in the toad bladder. *Am. J. Physiol.* v. 220, p. 1046-1052, 1971.
- MACCARRONE, C., MALTA, E., RAPER, C. Beta-adrenoceptor selectivity of Dobutamine: In vivo in vitro studies. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* v. 6, n.1, p.132-141, 1984.
- MAILLET, H. IN: *O Laser: Princípios e Técnicas de aplicação.* 1a. edição, São Paulo, Manole, 1987, p. 154-157.
- MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature.* v. 187, p. 493, 1960.
- MASTERS, S.B., STROUD, R.M., BOURNE, H.R. Family of G proteins chains: amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Protein Engineering.* v. 1, p. 47, 1986.
- MESTER, E., MESTER, A.F., MESTER, A. The biomedical effects of Laser applications. *Lasers in Surgery and Medicine - Budapeste.* v. 5, p. 31-39, 1985.
- MICHELL, R., KIRK, C.J., BILLAH, M.M. Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. *Biochem. Soc. Trans.* v.7, p. 861-865, 1979.
- MIRO, L., COUPE, M. CHARRAS, C., et al. Estudio capilaroscópico de la acción de un Laser As-Ga sobre la microcirculación. *Inv. Clínica Laser.* v. 1, p. 9-14, 1984.
- MOREL, F. Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am. J. Physiol.* v. 240, p. 159F, 1981.
- OLSON, J.E., BOGGAN, J.C., FULLER, T.A., et al. "Laser action spectrum of reduces excitability in nerve cells". *Brain Res.* v. 204, n. 2, p. 436-440, 1981.
- 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.* v. 41, p. 702-709, 1962.
- PEACHEY, L.D., RASMUSSEN, H. Structure of the toad's urinary bladder as related to its physiology. *J. Biophys. Biochem.* v. 10, p. 529-553, 1961.

- PETERSEN, M.J., EDELMAN, I.S. Calcium inhibition of action of vasopressin on the urinary bladder of the toad. *J. Clin. Invest.* v. 43, p.583, 1964.
- PFEUFFER, E., MOLLNAR, S., PFEUFFER, T. Adenylate cyclase from brain cortex: purification and characterization of the catalytic unit. *J. Europ. Mol. Biol. Org. (EMBO)*. v. 4, p. 3675-3679, 1985.
- PROCOPPIO, J., LACAZ-VIEIRA, F. Ionic exchangers in isolated and open-circuit toad skin. *J. Membrane Biol.* v. 35, p.219-237, 1977.
- RAMIRES, J.A.F., TSANACLIS, A., GIMENEZ, P.L., et al. Acute effects of Dobutamine and Dopamine on renal and respiratory functions in patients on prolonged mechanical ventilation. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v. 24, p. 35-42, 1991.
- RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature.* v. 284, p. 17-20, 1980.
- RUFFOLO, R.R. Review: The Pharmacology of Dobutamine. *Am. J. Med. Sci.* v. 294, n. 4, p. 224-248, 1987.
- SATO, M.; DUNN MICHAEL, J. Interactions of vasopressin, prostaglandins, and cAMP in rate renal papillary collecting tubule cells in culture. *Am. J. Physiol.* v. 247, p. 423F-433F, 1984.
- SILVEIRA, J.E.N., CIRNE, B.R., MALNIC, G. Effect of nonelectrolytes and tonicity on hidrosmotic properties of toad bladder. *Acta Physiol. Latnoam.* v. 25, p. 399-411, 1975.
- SILVEIRA, J.E.N., PEREZ, S.E.A., CIRNE, B.R. et al. Characteristics of toad bladder urinary acidification. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v. 22, p. 1163- 1170, 1989.
- SNEDECOR, G.W., COCHRAN, G.W. IN: *Statistical Methods*. 7ª edição, USA, The IOWA State University Press, 1978.
- SONNENBLICK, E.H., FRISHMAN, W.H., LEJEMTEL, T.H. Dobutamine: A new synthetic cardioactive sympathetic amine. *New Engl. Med.* v. 300, p. 17-22, 1979.
- STEINMETZ, P.R. Celular mechanisms of urinary acidification. *Physiol. Rev.* v. 54, p.890-956, 1974.

- STRYER, L., BOURNE, H.R. G Proteins: a family of signal transducers. *Ann. Rev. Cell. Biol.* v.2, p. 391-419, 1986.
- TAYLOR, A., MAFFLY, R., REAVEN, E. Evidence for involvement of microtubules in the action of vasopressin. *Ann. Ny. Acad. Sci.* v. 253, p. 723, 1975.
- TRELLES, M. Laser clínico - Aplicações em várias especialidades. IN: *Laser em Medicina e Biologia.* São Paulo, Roca, 1990, p. 19-48.
- TUTTLE, R.R., MILS, J. Dobutamine: Development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility. *Circ. Res.* v. 36, p. 185-196, 1975.
- VELEZ, M., COLLS, J. Comportamiento de la luz en la interacion com los tejidos, en especial el Laser de baja potencia. *Centro de Documentación Laser - Barcelona.* v. 15, p. 6-21, 1988.
- VINCENT, J.L., REUSE, C., KAHN, R.J. Effects on right ventricular function of a change from dopamine to dobutamine in critically ill patients. *Crit. Care. Med.* v. 16, p. 659-662, 1988.
- WATLINGTON, C.O., HUF, E.G. Beta-adrenergic stimulation of frog skin mucous glands: non specific inhibition by adrenergic blocking agents. *Comp. Gen. Pharmacol.* v. 2, p. 295-305, 1971.