

# EFFECTOS DE INHIBIDORES DE LA OCITOCINA EN LAS RESPUESTAS NATRIFERICA E HIDROSMOTICA DE LA PIEL DEL SAPO A LA OCITOCINA Y ANGIOTENSINA II

GABRIEL ORCE (\*) y ALFREDO COVIELLO (\*\*)

(Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán).

## SUMMARY

Previous reports from this laboratory demonstrated that 8-Leu-angiotensin II, an analog of angiotensin II (AT), significantly blocked the natriferic and hydrosmotic responses of toad skin to AT, without affecting the responses to neurohypophyseal hormones. The present work was undertaken in order to characterize the effects of oxytocin (O) analog on these responses to both O and AT.

4-Leu-oxytocin was found to be ineffective in inhibiting the response to O, whereas 1-6 alpha deaminocystathionine-2-0-methyltyrosine-oxytocin (MeDCOT-1), although devoid of effects *per se*, proved to have a dual behavior: while inhibiting the natriferic effects of peptide hormones (O and AT) without affecting that of catecholamines (norepinephrine), it seems to unspecifically potentiate the hydrosmotic response to all of these agents. These results dramatically contrast those previously reported by other authors for the same compound, and provide additional evidence for the existence of separate receptors for peptide hormones and catecholamines in toad skin.

En estudios previos realizados en este laboratorio se demostró que la angiotensina II ( $AT_{II}$ ) es capaz de aumentar la permeabilidad al agua de la piel aislada del sapo *Bufo arenarum* en presencia de un gradiente osmótico (efecto hidrosmótico) (Coviello y Brauckmann, 1973), en forma similar a la de otras hormonas (neurohipofisarias, catecolaminas).

La  $AT_{II}$  también estimula en este tejido, considerado un modelo funcional del nefrón distal de mamíferos, el transporte de sodio (efecto natriférico) (Coviello, Elso y Fernández, 1976).

Ambos efectos hormonales tendrían no sólo receptores diferentes —en cuanto es posible inhibir uno de ellos sin modificar el otro (Petersen y Edel-

---

(\*) Jefe de Trabajos Prácticos y (\*\*) Profesor del Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

man, 1964) o necesitar en piel dosis diferentes de un mismo inhibidor (Coviello, Orce y Causarano, 1974)— sino también sistemas mediadores intracelulares (Orloff y Handler, 1964) y barreras de permeabilidad diferentes (Lichtenstein y Leaf, 1965). De esta manera, un inhibidor puede disociar estos efectos selectivamente, bloqueando alguna etapa de estas cadenas (Feldman y Singer 1974).

Evidencia obtenida previamente (Coviello, Orce y Causarano, 1974) muestra que la 8-Leu-angiotensina II es capaz de bloquear los efectos de la  $AT_{II}$  en la piel del sapo sin modificar los de la vasopresina, sugiriendo receptores específicos. Sin embargo, considerando que esta falta aparente de inhibición podría ser debida a diferencias en afinidades hormona-receptor, se planteó la necesidad de realizar la prueba cruzada, mediante el uso de inhibidores de las hormonas neurohipofisarias, de los cuales los más estudiados son los de la ocitocina, hormona ésta cuyos efectos sobre la permeabilidad en membranas de anfibios son similares a los de la vasopresina.

## MATERIAL Y METODOS

Se usaron sapos *Bufo arenarum* de ambos sexos mantenidos una noche en agua del caño, de los cuales, después de desmedulados y descerebrados se obtuvo la piel ventral para las mediciones de permeabilidad osmótica (mitad pélvica) y de transporte de sodio (mitad superior). La permeabilidad osmótica (Posm) se midió por el método de la pesada descrito en otra comunicación a este Congreso (Aranda de Zamudio y Coviello). El transporte de sodio fue medido por la corriente de corto circuito (CCC). Los detalles de la técnica pueden consultarse en un trabajo previo (Coviello, Orce y Causarano, 1974). La 4-Leu-ocitocina (4-Leu-Oc) fue provista por gentileza del Dr. R. Walter (Roy y col., 1975). La 1-6 alfa desamino cistationina-2-O-metil-tirosina ocitocina (MeDCOT-1) fue gentilmente sintetizada por el Dr. K. Jost de Praga.

Se usó angiotensina II (Hypertensin CIBA) facilitada por CIBA-GEIGY, ocitocina sintética (Oc) (Syntocinon SANDOZ) y noradrenalina (NA) (SIGMA).

Los experimentos fueron realizados en trozos de piel pareados, aplicándose el test de "t" de Student en su análisis estadístico.

## RESULTADOS

### *Efecto del MeDCOT-1 sobre la CCC y la Posm y respuestas hormonales*

El MeDCOT-1 en dosis elevadas ( $10^{-6}$  M) no afecta la Posm ni la CCC basales en piel ni en vejiga. En esta concentración, el compuesto inhibe significativamente el efecto de la ocitocina ( $2 \cdot 10^{-8}$  M, Figura 1) y el de la angiotensina II ( $10^{-5}$  M, Figura 2) en la piel del sapo, sin modificar el de la noradrenalina ( $2 \cdot 10^{-7}$  M).

En contraste con estos resultados, el MeDCOT-1 potencia el efecto de diferentes concentraciones de Oc sobre la Posm, desplazando la curva dosis-respuesta de la misma hacia la izquierda (Figura 3). Se observa también un aumento no significativo de la respuesta hidrosmótica a la  $AT_{II}$  en concentración de  $10^{-7}$  M (Figura 4). Un efecto similar se registra en la respuesta hidrosmótica a la NA ( $2.10^{-8}$  M) que de  $53,9 \pm 12,3$  aumenta a  $69,3 \pm 11,0$  mg.  $cm^{-2} \cdot h^{-1}$  en la piel pretratada con MeDCOT-1 en concentración de  $10^{-6}$  M.

#### 4-Leu-ocitocina

Este compuesto presentó un débil efecto hidrosmótico en dosis de  $10^{-8}$  M en el mes de marzo (verano, efecto medio  $11,1 \pm 4,3$  mg.  $cm^{-2} \cdot h^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ), que desapareció al mes siguiente (otoño), aún usando concentraciones 100 veces mayores, ineficaces sin embargo para inhibir el efecto de la ocitocina en concentración de  $10^{-8}$  M.

### CONCLUSIONES

Los presentes experimentos muestran un efecto dual del MeDCOT-1 sobre las respuestas natriférica e hidrosmótica de la piel del sapo a la Oc: mientras potencia la respuesta hidrosmótica desplazando la curva dosis-respuesta hacia la izquierda, anula su efecto sobre la CCC.

Este comportamiento —en discordancia con los resultados de Barth y col. (1972)— muestra un curioso compuesto con propiedades agonistas y antagonistas a la vez de los efectos de una hormona en un mismo tejido. Es de hacer notar que los efectos inhibidores del MeDCOT-1 sobre el transporte de sodio y la Posm previamente citados fueron estudiados en vejiga y en piel, respectivamente, tejidos que presentan diferencias en su reactividad frente a agentes hormonales. Por ejemplo, las catecolaminas en vejiga no afectan la Posm (Handler, Bensinger y Orloff, 1968) mientras que la incrementan en piel; la  $AT_{II}$ , cuyo efecto hidrosmótico es fácilmente reproducible en piel, es difícil de ser obtenido en vejiga (Coviello 1972, Coviello y Brauckmann, 1973).

Esta acción dual del MeDCOT-1 podría explicarse sobre la base de que existen receptores diferentes para los transportes de sodio y de agua (Petersen y Edelman, 1964) en vejiga de sapo, disociables mediante diferentes concentraciones de  $Ca^{++}$ . Esta observación es coherente con el hecho de que se requieren diferentes concentraciones de un mismo inhibidor para bloquear los efectos sobre la CCC y la Posm de la  $AT_{II}$  (Coviello, Orce y Causarano, 1974).

Por otra parte, la acción del MeDCOT-1 sobre los efectos hormonales en la CCC parecen confirmar la existencia de receptores diferentes para las hormonas peptídicas (Oc y  $AT_{II}$ ) y para las catecolaminas (NA) ya que las primeras son las únicas inhibidas. Esta observación está en concordancia con los resultados publicados en otra comunicación a este Congreso (Aranda de Zamudio y Coviello) ya que los bloqueadores alfa y beta adrenérgicos no afec-

tan la respuesta de la piel del sapo a las hormonas peptídicas (AT<sub>II</sub> y vasopresina).

Los resultados obtenidos no permiten afirmar que la AT<sub>II</sub> y las hormonas neurohipofisarias tengan receptores diferentes (Coviello, Orce y Causarano, 1974).

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (6036b/75) y de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la República Argentina. La angiotensina II (Hypertensin (CIBA-GEIGY) fue donada por los Dres. P. Desaulle y K. Scheibli. Los inhibidores de la ocitocina (4-Leu-Ocitocina) y MeDCOT fueron gentilmente provistos por los Dres. R. Walter (University of Illinois Estados Unidos) y K. Jost (Academia Checoslovaca de Ciencias, Praga, Checoslovaquia).

## BIBLIOGRAFIA

1. ARANDA DE ZAMUDIO, S. y COVIELLO, A., 1977. Efecto de bloqueadores alfa y beta en la respuesta hidrosmótica de la piel del sapo *Bufo arenarum* a la adrenalina, vasopresin y angiotensina II. Com. VII Congreso Latinoam. de Zoología, 151-156 p., 4 figs.
2. BARTH, T., JARD, S., MOREL, F. and M. MONTEGUT, 1972. N alfa-Carbamoyl-2-0 Methyl tyrosine —Oxytocin on Amphibian epithelial cell receptors. *Experientia*, 28: 962-96
3. COVIELLO, A., 1972. Hydrosmotic effect of angiotensin II: Isolated toad bladder. *Acta physiol. latinoam.*, 22: 218-226.
4. COVIELLO, A. and BRAUCKMAN, E. S., 1973. Hydrosmotic effect of angiotensin II: Isolated toad skin. *Acta Physiol. latinoam.*, 23: 218-226.
5. COVIELLO, A., ELSON, G. R. and FERNÁNDEZ, F. M., 1976. Effect of angiotensin II on short circuit current in amphibian membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 25: 106-107.
6. COVIELLO, A., ORCE, G. and CAUSARANO, J., 1974. Effect of a competitive antagonist (Leu-angiotensin II) of angiotensin II on sodium and water transport in toad skin. *Acta physiol. latinoam.*, 24: 409-413.
7. FELDMAN, H. H. and SINGER, I., 1974. Comparative effects of tetracyclines on water flow across toad urinary bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 190: 358-364.
8. HANDLER, J. S., BENSINGER, R. and ORLOFF, J., 1968. Effect of adrenergic agents on toad bladder response to ADH, 3', 5'-AMP and theophylline. *Am. J. Physiol.*, 215: 1024-1031.
9. LICHTENSTEIN, N. S. and LEAF, A., 1965. Effect of amphotericin B on the permeability of the toad bladder. *J. clin. Invest.*, 44: 1328-1342.
10. ORLOFF, J. and HANDLER, J. S., 1964. The cellular mode of action of antidiuretic hormone. *Am. J. Med.*, 36: 686-697.
11. PETERSEN, M. J. and EDELMAN, I. S., 1964. Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the toad. *J. Clin. Invest.*, 43: 583-594.
12. ROY, J., HAVRAN, T., SCHWARTZ, I. L. and WALTER, R., 1975. Oxytocin analogs with substitutions in position 3 and 4. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 7: 171-178.

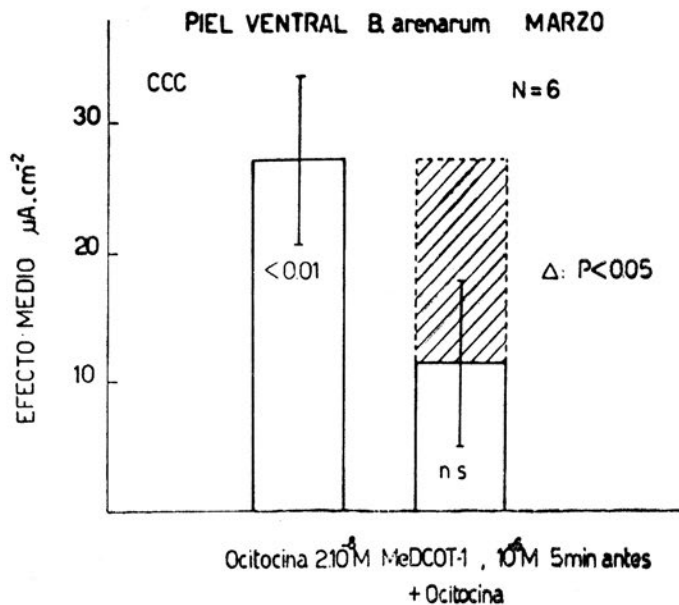


Figura 1

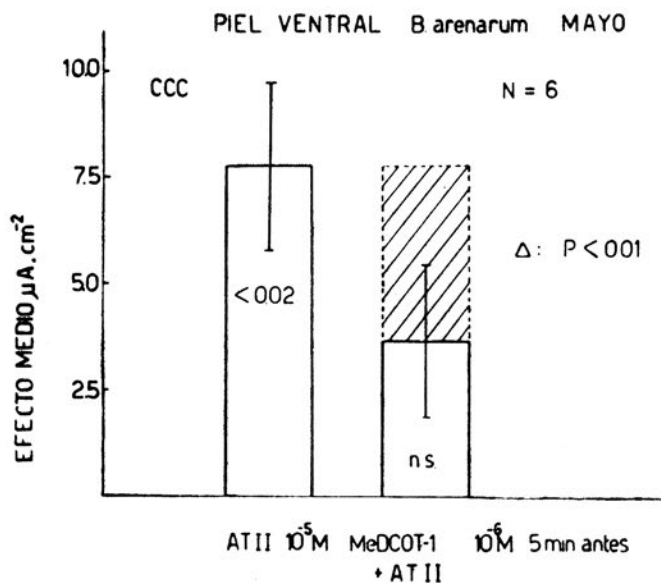


Figura 2

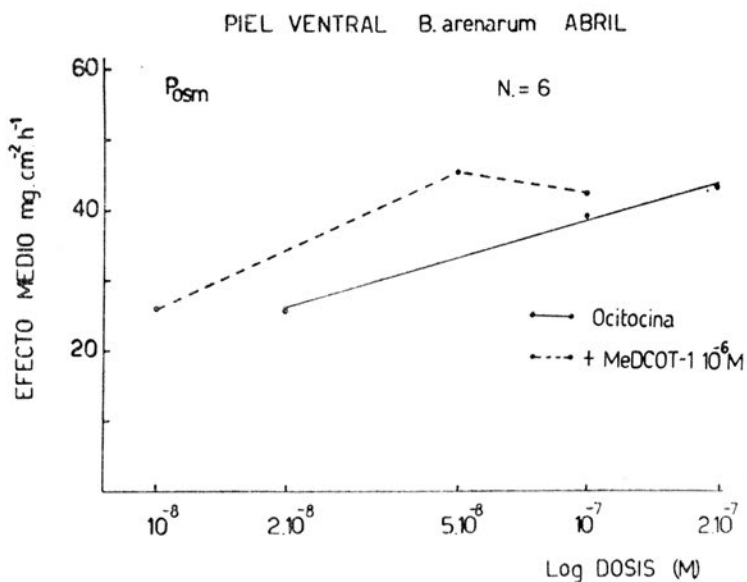


Figura 3

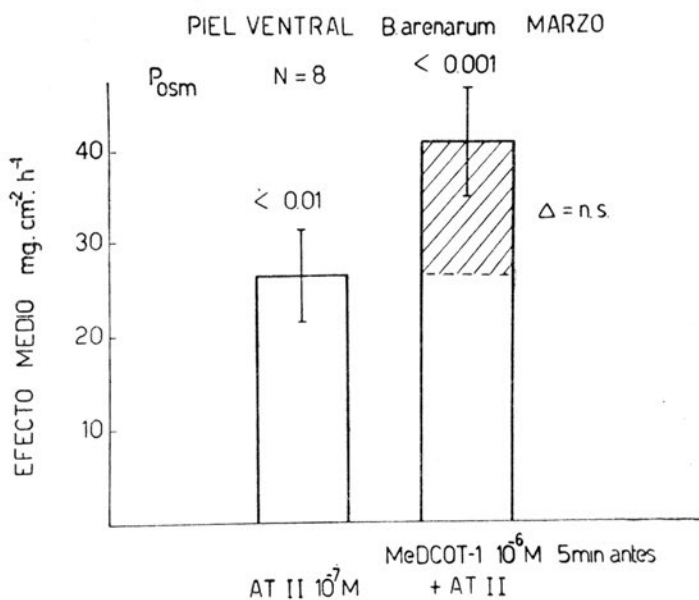


Figura 4