

Tesis de Posgrado

Control del balance acuoso en anfibios : Integración de mecanismos nerviosos, neuroendócrinos y comportamentales

Reboreda, Juan Carlos

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Reboreda, Juan Carlos. (1987). Control del balance acuoso en anfibios : Integración de mecanismos nerviosos, neuroendócrinos y comportamentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2070_Reboreda.pdf

Cita tipo Chicago:

Reboreda, Juan Carlos. "Control del balance acuoso en anfibios : Integración de mecanismos nerviosos, neuroendócrinos y comportamentales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2070_Reboreda.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CONTROL DEL BALANCE ACUOSO EN ANFIBIOS.
INTEGRACION DE MECANISMOS NERVIOSOS, NEUROENDOCRINOS
Y COMPORTAMENTALES

Autor: JUAN CARLOS REBORDA

Director: ENRIQUE T. SEGURA

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

Obligado 2490, Buenos Aires

Tesis para optar al titulo de
Doctor en Ciencias Biologicas

1987

- 2070 -
y. 2

A Silvia y Santiago

Agradecimientos

Al Dr. Enrique T. Segura por su estimulo, guia y constante apoyo durante la realizacion de este trabajo.

A la Srta. Vilma Di Sanzo por la invalorable ayuda y asistencia tecnica brindada.

A mis companeros de trabajo, Marcelo Cassini, Sergio D'agostino, Andres Lemoine, Eduardo Morguestern, Ruben Muzio, Guillermo Orti, Mauricio Papini, Silvia Petriella, Pablo Tubaro, Alberto Yorio y Silvano Zanutto por sus consejos, comentarios y compania.

A las Srtas. Maria Teresa Di Vietro y Maria Laura Pisano de la biblioteca del Instituto de Biologia y Medicina Experimental por su valiosa ayuda bibliografica.

A los investigadores, becarios y personal tecnico del Instituto de Biologia y Medicina Experimental.

A mi consejero de Tesis Dr. Osvaldo A. Reig.

A Esteban Corley y Gustavo Somoza.

Indice

Capitulo I

Introduccion general.....1
Adaptaciones comportamentales.....3
Adaptaciones morfologicas.....5
Piel y vascularizacion cutanea.....5
Rinon.....9
Vejiga urinaria y sacos linfaticos.....9
Adaptaciones fisiologicas:....11
Piel.....12
Rinon.....14
Vejiga urinaria.....16
Sistema hipotalamo-neurohipofisario y control del balance acuoso.....17
Objetivos experimentales....20

Capitulo II

Efectos de AVT, AII y catecolaminas sobre el balance acuoso.

Introduccion.....21
Materiales y metodos....23
Animales experimentales....23
Determinacion de la produccion de orina y de la captacion de agua a traves de la piel.... 24
Tratamientos experimentales....25
Administracion sistematica....25
Administracion intracerebroventricular....27
Técnicas quirurgicas....28
Preparacion de animales con canulas en el III ventriculo....28
Preparacion de animales hipofisoprivos....30
Análisis estadístico....31
Resultados....33
Efectos de la administracion sistematica e intracerebroventricular de solutos....33
Efectos de la administracion sistematica e intracerebroventricular de AVT....36
Efectos de la administracion sistematica e intracerebroventricular de AII....36
Efectos de los anestésicos....39
Efectos de la administracion sistematica de catecolaminas y agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos....45
Discusion....52

Capitulo III

Efecto de la osmolaridad del medio externo sobre el balance acuoso.

Introduccion....60

Materiales y metodos....62

Tratamientos experimentales....62

Determinacion del coeficiente de permeabilidad osmotica (Lpd)....64

Determinacion del flujo de agua en una preparacion de piel aislada....65

Determinacion de la osmolaridad plasmatica....66

Analisis estadistico....67

Resultados....67

Efectos del incremento de la osmolaridad del medio externo con sacarosa sobre el balance acuoso "in vivo"....67

Efectos del incremento de la osmolaridad del medio externo con NaCl sobre el balance acuoso "in vivo"....72

Efectos del incremento de la osmolaridad del medio externo con NaCl "in vitro"....77

Discusion....79

Capitulo IV

Efectos de AVT, AII, catecolaminas y de la osmolaridad del medio externo sobre la respuesta hidrosmotica.

Introduccion....88

Materiales y metodos....90

Deshidratacion y rehidratacion de los animales....90

Tratamientos experimentales....92

Determinacion de la osmolaridad plasmatica....94

Analisis estadistico....94

Resultados....95

Efectos de la deshidratacion sobre la osmolaridad plasmatica....95

Cambios en la captacion de agua, osmolaridad plasmatica y permeabilidad durante la rehidratacion....95

Efectos de AVT, AII y catecolaminas sobre la respuesta hidrosmotica....97

Efectos de la osmolaridad del medio externo sobre la captacion de agua durante la rehidratacion....100

Discusion....103

Capitulo V

Sensibilidad cutanea a soluciones de electrolitos.

Introduccion....108

Materiales y metodos....109

Experimentos "in vivo"....110

Experimentos "in vitro"....111

Resultados....115

Experimentos "in vivo"....115

Experimentos "in vitro"....116

Discusion....122

Capitulo VI

Conclusicnes....126

Bibliografia....129

Capitulo I.

Introduccion general.

Los anfibios, especialmente aquellos que han abandonado el agua, enfrentan generalmente ambientes hostiles a su fisiologia basica. La ectotermia y la presencia de una cubierta corporal permeable los hace mas suceptibles a los cambios ambientales que cualquier otro grupo de tetrapodos. Sin embargo, a traves de la combinacion de estructuras morfologicas, mecanismos fisiologicos y respuestas comportamentales han logrado adaptarse a la mayoria de los ambientes terrestres.

Los anfibios han tenido que desarrollar adaptaciones para resolver el problema de la perdida de agua asociada al mantenimiento de una piel humeda a traves de la cual intercambian gases. El exito de estas adaptaciones esta ejemplificado en la capacidad de algunas especies para habitar desiertos y lograr resolver bajo estas condiciones el problema de la falta de agua y de la baja humedad ambiente que acentua las perdidas de agua por evaporacion (Shoemaker, 1975).

El contenido de agua en los anfibios varia entre el 70 y el 80% de su peso corporal, presentando los mayores porcentajes las especies acuaticas (Thorson, 1964). El agua es intercambiada facilmente con el ambiente y los mecanismos involucrados en los

procesos de conservacion de agua funcionan potencialmente a nivel de las superficies respiratorias (piel y pulmones), el sistema digestivo, el rinon y la vejiga urinaria.

Las vias por las que los anfibios ganan agua son: 1) ingesta por la boca, 2) agua asociada a alimentos, 3) agua producida por el metabolismo oxidativo, y 4) captacion a traves de la piel; mientras que la perdida de agua se da por las siguientes vias: 1) evaporacion a partir de piel y pulmones, 2) agua eliminada en las heces, y 3) agua asociada a los productos de excrecion.

La principal ganancia de agua en anfibios se da a traves de la piel. Los valores de captacion de animales mantenidos en agua, en condiciones de estado estacionario, son de aproximadamente 500 ml/kg*dia (Shoemaker & Nagy, 1977). El agua es almacenada en la vejiga urinaria y su contenido en algunos anuros terrestres representa entre un 30 y 40% del peso corporal (Ruibal, 1962).

Los anfibios no ingieren agua por la boca en condiciones naturales (Bentley, 1966), y la ganancia de agua a traves de alimentos o por metabolismo oxidativo puede considerarse despreciable respecto del flujo osmotico de agua a traves de la piel. Asi, la tasa de agua obtenida a partir del metabolismo oxidativo es de 2.5 ml/kg*dia (Shoemaker et al, 1972; Shoemaker & McClanaham, 1975), mientras que el agua contenida en el alimento es totalmente utilizada en la excrecion urinaria de los residuos nitrogenados (Shoemaker & McClanaham, 1975).

En forma semejante, la principal via por la que los anfibios pierden agua es la piel, siendo el intercambio de agua entre la

piel y la atmosfera comparable al que se produce entre una superficie de agua y la atmosfera (Gray, 1928; Adolph, 1932; Littleford et al, 1947).

El agua eliminada con las heces es un 10% de la ingerida con los alimentos (Shoemaker & McClanaham, 1975). Esta cantidad, al igual que las perdidas por evaporacion a traves del pulmon, puede considerarse despreciable frente a la evaporacion cutanea.

La otra via a traves de la cual se pierden importantes cantidades de agua es el rinon. Los anfibios, cuando son mantenidos en agua, producen orina altamente diluida a tasas de 10-25 ml/kg*h, siendo la tasa de filtracion glomerular en esta situacion de 20-50 ml/kg*h (Shoemaker & Nagy, 1977).

A partir de estas generalidades resulta evidente que los principales factores que determinan el balance acuoso en anfibios son la captacion y perdida de agua a traves de la piel, y la eliminacion de agua asociada a productos de excrecion por los rinones actuando la vejiga urinaria como un reservorio interno.

Adaptaciones comportamentales.

Los anuros terrestres en general son nocturnos, evitando asi las altas temperaturas y la baja humedad ambiente durante el dia. Algunas especies construyen cuevas mientras que otras utilizan como refugio cuevas de otros animales (Bentley et al,

1958; Packer, 1963). Este comportamiento es mas frecuente en anfibios adaptados a ambientes aridos (Ruibal et al, 1969). Los refugios tienen un alto contenido de humedad evitandose los lugares muy soleados y expuestos a corrientes de aire.

La reduccion de la superficie de evaporacion constituye otra adaptacion comportamental para minimizar las perdidas de agua. Esta reduccion puede lograrse a traves de la postura (Ray, 1958; Pough et al, 1983) o mediante la agregacion. La agregacion, con estrecho contacto entre individuos, conduce a una reduccion de la superficie expuesta al medio por animal y disminuye la perdida de agua por evaporacion (Alvarado, 1967; Gehlbach et al, 1969; Johnson, 1969).

Un anfibio deshidratado posee motivaciones competitivas. Para escapar de las condiciones de desecacion debe aumentar la actividad al costo de aumentar las perdidas de agua por evaporacion (Heatwole et al, 1969). Por el contrario, si el animal asume una postura de conservacion de agua, reduce las perdidas de agua por evaporacion pero es incapaz de escapar de las condiciones de desecacion para el caso en que estas persistan. La actividad, principalmente comportamientos de escape y movimientos hacia gradientes de humedad, aumenta a medida que progresa la deshidratacion hasta alcanzar un maximo, luego del cual disminuye (posturas de conservacion de humedad). Un segundo pico de actividad se observa antes de la muerte por deshidratacion (Heatwole, 1960; 1971, Heatwole & Newby, 1972; Bundy & Tracy, 1977; Putnam & Hillman, 1977; Schmajuk & Segura,

1982).

Adaptaciones morfologicas.

Piel y vascularizacion cutanea.

La piel de los anfibios es altamente permeable al agua, la presencia de glandulas mucosas y la vascularizacion de la dermis presenta una gran variacion entre las distintas especies. Asi, la mayoria de las salamandras y ranas que habitan ambientes acuaticos poseen una piel lisa en la superficie ventral y lateral del cuerpo mientras que la mayoria de los anfibios terrestres y arboricolas poseen una piel granulosa. Esta correlacion entre el relieve de la epidermis y las caracteristicas del medio se presenta en los anfibios con pocas excepciones (Duellman & Trueb, 1986).

El relieve de la epidermis cumple una importante funcion durante la rehidratacion. En Bufo bufo la piel esta cubierta por finos surcos que forman tubos o canales cerrados de aproximadamente 0.1 mm de diametro (Christensen, 1974). La presencia de canales cutaneos facilita la captacion de agua a traves de la piel mediante: 1) aumento de la superficie potencialmente disponible para absorber agua, 2) humedecimiento de una superficie mayor de piel de la que contacta con la fuente de agua, y 3) aumento de la capacidad de la piel de extraer agua

a partir de una superficie humeda por la capilaridad atribuible a la estructura de la piel (Lillywhite & Licht, 1974).

Como en la mayoria de los vertebrados, el tegumento esta formado por una capa externa, la epidermis de origen ectodermico y una una capa subyacente, la dermis. La mayor parte de esta ultima capa es de origen mesodermico a excepcion de las celulas pigmentarias y las glandulas mucosas y granulosas que derivan del ectodermo. La estructura de la piel de los anfibios ha sido ampliamente estudiada (Farquhar & Palade, 1965; Lascano & Segura, 1971; Lindemann & Voute, 1976; Whitear, 1977). Esta compuesta por una epidermis formada por 5 a 7 capas de celulas epiteliales y una dermis subyacente que contiene vasos sanguineos, glandulas mucosas y granulosas y elementos fibrosos y celulares de tejido conectivo.

La epidermis contiene una o dos capas externas de celulas escamosas, parcialmente cornificadas (stratum corneum), tres o cuatro capas de celulas cubicas o poliedricas (stratum granulosum o stratum spinosum) y una capa basal de celulas cubicas o columnares (stratum basale o stratum germinativum). Las celulas del stratum corneum estan unidas entre si por los zonula occludens mientras que las celulas de los otros strata estan unidas por desmosomas. El stratum corneum esta separado del stratum granulosum por espacios intercelulares irregulares que son interrumpidos por filamentos de interconexion (desmosomas). Las fibras de las celulas cornificadas forman una doble red horizontal reforzada por bandas verticales de

tonofilamentos (Le Quang Trong & Bouligand, 1976). En las capas medias de la epidermis se encuentran células en botella, las cuales pueden reconocerse por su citoplasma menos fibroso y por la presencia de numerosas mitocondrias. Cercanas a la capa basal se ubican las células de Merkel, que poseen vesículas densas y emiten proyecciones que penetran en las células vecinas. El stratum corneum es reemplazado periódicamente (muda). Durante este proceso se rompen los desmosomas y el espacio entre el stratum corneum y granulosum se llena de mucus secretado por las células en botella.

La epidermis está separada de la dermis por una membrana basal de fibras colágenas. La dermis está formada por un stratum spongiosum, ubicado por debajo de la membrana basal y por un stratum compactum. Dentro de la dermis se encuentran glándulas mucosas y granulares, las cuales están rodeadas por una pared de células epiteliales que se continúa con la epidermis. Las glándulas granulosas poseen un mayor tamaño y una distribución más restringida que las glándulas mucosas. La dermis contiene además capilares, fibras nerviosas y bandas de músculo liso.

A la piel llegan nervios que contienen componentes somáticos y autonómicos. En la dermis hay un plexo profundo ubicado por debajo del stratum compactum y otro más difuso ubicado en el stratum spongiosum. Entre las bandas verticales de músculo liso así como en las paredes de las glándulas granulares se observan grupos de fibras amielínicas. Las glándulas mucosas no poseen inervación intrínseca si bien se observan algunas fibras que

pasan a corta distancia de sus paredes. En la dermis encontramos terminaciones mielinicas y amielinicas. Algunas fibras mielinicas forman terminaciones de tipo expandido las cuales, se presume, serian sensoriales (Whitear, 1955). A partir del plexo subepidermico de la dermis se proyectan fibras, principalmente amielinicas, hacia la epidermis. El ultimo nodo de Ranvier de estas fibras se encuentra en la ramificacion que abandona el plexo subepidermico. Las fibras que penetran en la epidermis se ramifican profusamente observandose fibras en la capa basal y en menor grado en las capas medias. Las fibras de las capas medias se ubican adyacentes a las celulas en botella pero no existen evidencias acerca de una relacion funcional (Whitear, 1974a; 1974b).

La piel de la region pelvica ha sido identificada como la principal area involucrada en la captacion de agua en anuros (Dole, 1967; McClanahan & Baldwin, 1969; Baldwin, 1974). Estudios comparativos de la vascularizacion de la region pelvica realizados en diversos anuros (Roth, 1973; Christensen, 1974), revelaron que: 1) esta region tiene una mayor vascularizacion respecto de otras regiones del cuerpo, 2) los anfibios terrestres (Bufo) poseen una mayor vascularizacion que los semiacuaticos (Rana), y estos a su vez poseen una mayor vascularizacion que los acuaticos (Xenopus).

La presencia de una intensa vascularizacion en la piel de la region pelvica resulta en una mayor cantidad de sangre que pasa cerca de la superficie y por lo tanto en una mayor evaporacion.

Rinon.

Los rinones de anfibios son organos pares ubicados lateralmente a la aorta dorsal. Los rinones derivan de los nefrostomas larvales. Durante la ontogenia de los anuros y urodelos se pierde la parte anterior del rinon (pronefros), permaneciendo en el adulto los nefrostomas de la region media y posterios (mesonefros). El rinon posee una abundante vascularizacion que proviene de numerosas arterias renales (ramificaciones de la aorta dorsal). Las arterias renales se ramifican formando ovillos de capilares o glomerulos. Cada glomerulo esta rodeado por una terminacion expandida de un tubulo renal (capsula de Bowman) a traves de la cual se realiza la filtracion del fluido extracelular. Los tubulos renales se extienden lateralmente a traves de una red de capilares, transportando la orina hacia el conducto de Wolff. Esta red de capilares esta formada por vasos derivados de la vena porta-renal la cual comunica con la cava posterior.

Vejiga urinaria y sacos linfaticos.

La vejiga urinaria de los anfibios es una proyeccion ventral de la cloaca y posee una estructura en forma de bolsa bilobulada que permanece distendida cuando se encuentra llena de orina. La pared de la vejiga esta formada por un epitelio liso, separado a

traves de una capa submucosa de bandas de musculo circular que tienen intercaladas bandas de musculo longitudinal.

El tamaño de la vejiga urinaria varia entre especies adaptadas a distintos ambientes. La vejiga de especies acuaticas (por ej. *Xenopus laevis*) es pequena pudiendo almacenar solo el 1% del peso corporal mientras que la vejiga de especies que habitan ambientes aridos puede llegar a almacenar hasta un 30% del peso corporal en orina altamente diluida (Ruibal, 1962; Claussen, 1974).

La utilidad potencial de la orina diluida almacenada en la vejiga en los procesos de osmoregulacion esta ampliamente reconocida. Sapos del genero *Bufo* sometidos a deshidratacion mantienen constante la concentracion de los fluidos corporales hasta que las reservas de orina vesical son agotadas (Ruibal, 1962; Shoemaker, 1964). Asi, la principal funcion de la vejiga es proveer reservas de agua para utilizar en periodos de sequia (Claussen, 1969; McClanahan, 1972; Claussen, 1973; 1974).

La vejiga comunica con la cloaca a traves de un esfinter. La cloaca es el receptaculo comun del canal alimenticio, conductos de Wolff, y vejiga urinaria. Su pared esta compuesta por un epitelio columnar ciliado y subyacente a este una capa submucosa compuesta por fibras de tejido conectivo limitada exteriormente por una capa de musculo circular y otra de musculo longitudinal que son continuacion de la musculatura del intestino. La apertura de la cloaca al exterior esta rodeada por un esfinter.

Los sacos linfaticos subcutaneos son posiblemente otro sitio

de almacenamiento de agua. Sin embargo el tamaño de los sacos linfáticos de especies acuáticas es mayor que el de especies terrestres por lo que su principal función sería la recolección de agua a partir de los tejidos (Carter, 1979).

Adaptaciones fisiológicas.

Los anfibios terrestres pasan parte de su vida en ambientes acuáticos y parte en ambientes terrestres. Esta situación hace que la regulación del balance acuoso sea más complicada que en un anfibio exclusivamente acuático ya que deben resolver el problema de una entrada osmótica de agua mientras permanecen en ambientes acuáticos y las pérdidas por evaporación mientras habitan ambientes secos.

Los mecanismos fisiológicos asociados con la economía del agua en anfibios incluyen la reducción de la pérdida de agua por evaporación a través de la piel, el incremento de la permeabilidad de la piel en condiciones de humedad ambiental apropiada, el control de la presión de filtración glomerular y la reabsorción tubular y vesical de agua.

Las estructuras asociadas con estos mecanismos son principalmente la piel, el riñón y la vejiga urinaria.

Piel.

Los anfibios captan agua osmoticamente a traves de la piel. En animales mantenidos en agua los valores de este flujo, en condiciones de estado estacionario, son de aproximadamente 500 ml/kg*dia (Bentley, 1974; Shoemaker & Nagy, 1977). La captacion de agua a traves de la piel varia entre especies, las especies terrestres poseen valores mayores de permeabilidad cutanea (Jorgensen, 1950; Ewer, 1952; Schmid, 1965; Bentley, 1971; Mullen & Alvarado, 1976) y con la temperatura (Dicker & Elliot, 1967, Spotila, 1972).

La piel de la mayoria de los anfibios ofrece poca o ninguna resistencia a la evaporacion de agua. La evaporacion produce el descenso de la temperatura corporal que durante el dia es inferior a la temperatura ambiente (Zug & Zug, 1979). La velocidad de evaporacion depende de la humedad ambiental, la temperatura, la velocidad del viento y el tamano corporal. En *Rana pipiens* la tasa de evaporacion puede variar entre 30-1600 ml/kg*dia (Tracy, 1976). En terminos generales, el tamano corporal es el factor intrinseco mas importante en la determinacion de las perdidas de agua por evaporacion en anfibios (Spight, 1967; Seymour & Lee, 1974).

El aumento de la temperatura ambiente produce un incremento de la frecuencia de descarga de las glandulas mucosas de la dermis, aparentemente debido a una modulacion de los aferentes perifericos sobre el hipotalamo anterior y el sistema simpatico (Lillywhite, 1971). La secrecion de mucus parece no afectar la perdida de agua por evaporacion pero tiene importancia en la

preservacion de la piel de animales deshidratados (Lillywhite & Litch, 1974).

Por otra parte, la deshidratacion aumenta la conductividad hidraulica de la piel. Existe una gran variacion interespecifica de los cambios de permeabilidad al agua. Algunas especies no presentan cambios mientras otras pueden aumentar la permeabilidad hasta 10 veces (Hillyard, 1975).

La permeabilidad de la piel es tambien afectada en varias especies de anfibios por ocitocina, arginina vasotocina o arginina vasopresina (Bentley, 1974). El efecto de estas hormonas es mayor en anuros que en urodelos y la sensibilidad aumenta luego de la metamorfosis (Bentley, 1971). Arginina vasotocina aumenta la permeabilidad de la membrana al agua (flujo hidrosmotico) y estimula el transporte de sodio a traves de la piel (flujo natriferico) (Bentley, 1973; DeSousa & Grosso, 1981). Sin embargo en algunas especies se ha observado un descenso del flujo de sodio por efecto de ocitocina o arginina vasotocina (Salibian, 1977).

La piel de los anuros adultos puede captar sodio y cloro hacia el interior del cuerpo en forma independiente (Salibian, 1977), aun cuando los animales estan expuestos a bajas concentraciones ambientales (0.2-1 mM) de estos iones. Los valores de flujo de sodio en agua para *Rana pipiens* y *Bufo marinus* medidos a partir de la excrecion de sodio renal son de 0.1-1 meq/kg*dia (Scheer et al, 1974; Garland & Henderson, 1975) mientras que las estimaciones usando sodio isotopico dan valores de 1-3

meq/kg*día (Greenwald, 1971; 1972; Mullen & Alvarado, 1976).

Rinón.

El riñón de los anfibios está admirablemente adaptado para la vida en ambientes acuáticos. Los anfibios mantenidos en agua excretan orina altamente diluida a tasas de 10-25 ml/kg*h. La tasa de filtración glomerular en esta situación es también alta (20-50 ml/kg*h) pudiendo aumentar en animales con sobrecarga de agua (Shoemaker & Nagy, 1977). En anuros solo la mitad del filtrado glomerular es reabsorbido en los tubulos, pero la reabsorción de sodio y cloro puede llegar al 99% (Garland & Henderson, 1975). El aumento de la concentración del medio (Mayer, 1969) o la privación de agua (Sawyer & Pang, 1975) producen un descenso de la excreción de orina mediante la reducción de la tasa de filtración glomerular y el incremento de la reabsorción tubular. Bajo estas condiciones la concentración de la orina se aproxima a la concentración plasmática ya que los anfibios anuros son incapaces de producir orina hipertónica.

La administración de arginina vasotocina o de hormonas neurohipofisarias de mamíferos produce una clara respuesta antidiurética en la mayoría de los anfibios anuros. El mecanismo de esta respuesta ha sido cuidadosamente estudiado mediante técnicas de "clearance" en *Bufo marinus* (Sawyer, 1957), *Rana catesbeiana* (Uranga & Sawyer, 1960; Pang et al, 1980) y *Rana esculenta* (Jard & Morel, 1963; Jard, 1966). La inyección de

peptidos neurohipofisarios produce un doble efecto sobre el rinon: 1) reduce la tasa de filtracion glomerular por vasoconstriccion de la vasculatura preglomerular (Pang et al, 1980) y 2) aumenta la reabsorcion de agua a partir del tubulo renal. Ambos efectos pueden ser concurrentes (Jard & Morel, 1963) o solo verse afectado el tubulo renal (Sawyer, 1957). El efecto glomerular depende del cambio en el numero de glomerulos activos (intermitencia glomerular) mas que de la reduccion de la filtracion en glomerulos independientes (Jard & Morel, 1963).

Por otra parte, el sistema nerviosos participa activamente en el control de la produccion de orina. Estudios histoquimicos de fluorescencia han demostrado que la vasculatura preglomerular esta densamente inervada por fibras adrenergicas (Falck et al, 1963, Unsicker, 1975). El flujo sanguineo renal en anfibios es afectado tanto por la administracion de catecolaminas (Richards & Schmidt, 1924; Richards et al, 1927; Adolph, 1936; Forster, 1943; Uranga, 1973; Gallardo et al, 1980, Morris, 1982; Segura et al 1982b) como por la estimulacion de los nervios renales (Bieter, 1929; Dieter, 1961; 1963; Yamagishi & Azuma, 1963). El efecto predominante de la estimulacion de los nervios renales es un descenso del flujo sanguineo renal (Bieter, 1929) debido a una vasoconstriccion de la vasculatura renal (Yamagishi & Azuma, 1963). Sin embargo, existen evidencias de que el flujo renal puede ser alterado por la accion de catecolaminas a nivel de los capilares glomeruiars y/o arteriolas aferentes (Richards & Schmidt, 1927; Hayman, 1927; Forster, 1943) a pesar de la

ausencia de musculo liso en la pared celular de esos vasos (Pak Poy, 1957; Bellocci et al, 1971; Unsicker, 1975). Ademas, en *Rana catesbeiana* el sistema nervioso esta involucrado en la regulacion del volumen de orina a nivel del tubulo renal (Gallardo et al, 1980). En tal sentido, estudios de microscopia electronica han revelado la asociacion de terminaciones nerviosas y varicosidades a las celulas tubulares. Esta asociacion es progresiva entre el tubulo proximal y el tubulo colector (Tsuneki et al, 1984).

Vejiga urinaria.

La orina de la vejiga puede ser absorbida osmoticamente hacia los tejidos, proceso que es acelerado en animales deshidratados o inyectados con arginina vasotocina o peptidos neurohipofisarios (Steen, 1929; Ewer, 1952; Sawyer & Schisgall, 1956; Ruibal, 1962).

Arginina vasotocina aumenta drasticamente la permeabilidad de la pared de la vejiga al agua. La hormona se une a receptores ubicados en la membrana basolateral (Campbell et al, 1972), activando una adenilato ciclasa que aumenta los niveles de 3',5' cAMP intracelular (Handler & Orloff, 1973). Existen evidencias sobre la activacion de una proteina-kinasa dependiente de cAMP (Schlondorff & Franki, 1980) y de la participacion de los microfilamentos y microtubulos celulares en esta respuesta (Taylor, 1977). El aumento de la permeabilidad al agua producido

por arginina vasotocina esta asociado a la aparición de pequeños agregados de partículas en la membrana luminal de la vejiga (Chevalier et al, 1974; Kachadorian et al, 1975; Wade, 1978; Muller et al, 1980) asumiéndose que estos agregados de partículas contienen canales selectivos al agua (Bourguet et al, 1981).

Por otra parte, la vejiga de anfibios es capaz de reabsorber sodio activamente. El flujo de sodio "in vitro" es aumentado por peptidos neurohipofisarios así como por aldosterona, insulina y adrenalina (Bentley, 1971; 1974; DeSousa & Grosso, 1981). En animales mantenidos en un ambiente sin sodio, la concentración urinaria de este cation es sensiblemente inferior a la concentración ureteral (Middler et al, 1967). Así, la vejiga urinaria de anfibios puede ser vista como una adaptación que resuelve las pérdidas de sodio en anfibios acuáticos y como un reservorio de agua que compensa las pérdidas de agua en anfibios terrestres.

Sistema hipotalamo-neurohipofisario y control del balance acuoso.

El lóbulo posterior de la hipófisis de anfibios libera dos peptidos diferentes, mesotocina y arginina vasotocina (Acher, 1974). Estos peptidos son producidos por la pars nervosa mediante la modificación de material neurosecretorio que

proviene del nucleo preoptico. El nucleo preoptico esta localizado en el hipotalamo por sobre el quiasma optico, lateral y caudalmente al receso preoptico y contactando con el tercer ventriculo. Los axones de este nucleo se dirigen a la eminencia media y al lobulo posterior de la hipofisis donde forman organos neurohemales para la secrecion (Zambrano & De Robertis, 1968).

Los efectos de los peptidos neurohipofisarios fueron observados por primera vez por Brunn (1921) quien encontro que ranas adultas mantenidas en un medio acuoso aumentaban el peso corporal por retencion de agua luego de la administracion de extractos de la pars nervosa.

Esta ganancia de peso es debida a un aumento de la captacion de agua y a una disminucion de la produccion de orina. En la mayoria de las especies de anfibios la inyeccion de extractos de la pars nervosa o de arginina vasototocina causa una retencion de agua (Bentley, 1974). Sin embargo, la remocion del lobulo posterior o la destruccion del nucleo preoptico produce solo efectos moderados sobre el balance acuoso (Jorgensen et al, 1956; 1969; Christensen & Jorgensen, 1972; Bakker & Bradshaw, 1977; Segura et al, 1982b).

El estimulo fisiologico responsable de la liberacion de AVT a partir de la neurohipofisis no es totalmente conocido. La cantidad de material neurosecretorio en el nucleo preoptico o en la pars nervosa disminuye en animales deshidratados (Levinsky & Sawyer, 1953; Tramezzani & Uranga, 1954; Jorgensen et al, 1956). Ademas, la actividad de AVT en plasma (determinada por

bioensayo) aumenta en anfibios sometidos a deprivación de agua, inmersión en NaCl 2%, hemorragia o anestesia con éter (Bentley, 1969). Sin embargo, los intentos de correlacionar los niveles circulantes de arginina vasotocina, mediante técnicas de radioinmunoensayo, con la tasa de producción de orina (Sawyer & Pang, 1975) o con el grado de deshidratación (Pang, 1974) han dado resultados inconsistentes desconociéndose hasta el presente los mecanismos que regulan la liberación de este péptido.

Objetivos experimentales.

En el presente trabajo se estudian las modificaciones del balance acuoso (captación de agua a través de la piel y producción de orina) en el anfibio anuro *Bufo arenarum*, en respuesta a cambios del medio interno y externo. Para ambas situaciones se intentará clarificar la participación de mecanismos endocrinos, neuroendocrinos y neurogénicos.

La aproximación experimental incluye el estudio de sapos sometidos a distintas situaciones fisiológicas. 1) Animales totalmente hidratados (en estado estacionario de captación de agua y producción de orina). Este grupo será sometido a la manipulación del medio interno a través de la administración de soluciones hipertónicas de distintos solutos, AVT, AII, anestésicos, catecolaminas y agonistas y antagonistas alfa y beta adrenérgicos siendo el medio externo constante. 2) Animales totalmente hidratados sometidos a la manipulación del medio externo (reducción del gradiente osmótico transepitelial con solutos permeables e impermeables). 3) Animales deshidratados a un 80% de su peso corporal sometidos durante la rehidratación a la manipulación del medio interno y del medio externo en forma semejante a 1 y 2.

Los modelos experimentales para cada situación fisiológica incluyen sapos intactos e hipofisoprivos administrados sistémica o intracerebroventricularmente con las hormonas, soluciones y drogas a estudiar.

Efectos de la carga de solutos y de la administracion de AVT, AII y catecolaminas sobre el balance acuoso.

Introduccion.

La homeostasis de los fluidos corporales en los anfibios es un complejo proceso fisiologico en el cual participan activamente el rinon, la vejiga urinaria y la piel. El sistema hipotalamo - neurohipofisario actua como un componente fundamental en la regulacion de este proceso. Asi, la administracion de extractos hipofisarios a sapos o ranas mantenidos en agua produce un marcado aumento del peso corporal conocido como "efecto Brunn" o "efecto del balance acuoso" (Brunn, 1921; Heller, 1941; Bentley, 1974). Esta respuesta parece ser mediada por Arginina Vasotocina (AVT), la principal hormona antidiuretica de los anfibios (Pang & Furspan, 1983). Arginina Vasotocina reduce la presion de filtracion glomerular (Pang et al, 1980) y promueve la reabsorcion de agua a traves de la pared de la vejiga urinaria (Ewer, 1952; Middler et al, 1967; DeSousa & Grosso, 1981) y del tubulo colector del rinon (Pang et al, 1980). Ademias, se ha propuesto que en anfibios anuros AVT aumenta el flujo hidrosmotico y natriferico de agua a traves de la piel (Bentley, 1957; Dicker & Elliot, 1967; Elliot, 1968b; Bentley, 1974;

DeSousa & Grosso, 1981). Sin embargo, sapos o ranas con lesiones del sistema productor de AVT (lesion del hipotalamo o hipofisectomia) son capaces de desarrollar respuestas antidiureticas y modificar la permeabilidad de la piel y de la vejiga urinaria al ser sometidos a deshidratacion, hemorragia o carga de sales (Jorgensen et al, 1956; Middler et al, 1967; Shoemaker & Waring, 1968; Jorgensen et al, 1969, Christensen & Jorgensen, 1972; Bakker & Bradshaw, 1977, Gallardo et al, 1980) sugiriendo la mediacion de factores extrahipofisarios en estas respuestas.

La posible participacion de mecanismos alternativos a AVT, como ser Angiotensina II (AII) o catecolaminas, en el control del balance acuoso de los anfibios ha sido solo parcialmente estudiada.

Angiotensina II es un potente estimulo dipsogenico en la mayoria de las clases de vertebrados estudiadas (Fitzsimons, 1979). En anfibios ha sido demostrada la existencia de un sistema renina-angiotensina (Wilson, 1984). Sin embargo, su participacion en el control del balance hidromineral no esta suficientemente aclarada (Coviello, 1970; Nolly & Fasciolo, 1971b; Coviello & Brauckman, 1973; Kobayashi et al, 1979; Frutcher et al, 1980).

En relacion con las catecolaminas, la participacion de mecanismos adrenergicos en el control de la funcion tubular y glomerular del rinon asi como en el control de los cambios de la permeabilidad de la piel de anfibios ha sido sugerida previamente por diversos autores (Bastide & Jard, 1968; Elliot,

1968a; Jard et al, 1968; Hillyard, 1979; Gallardo et al, 1980; DeSousa & Grosso, 1982; Pang et al, 1982; Segura et al, 1982b; Clevers & Morris, 1983; Gamundi et al, 1984; Morris, 1984; Segura et al, 1984; Yokota & Hillman, 1984). En tal sentido y respecto de la regulacion de la permeabilidad de la piel al agua se ha propuesto la participacion tanto de mecanismos alfa (Segura et al, 1982b, 1984) como beta adrenergicos (DeSousa & Grosso, 1982; Yokota & Hillman, 1984).

El objetivo de este capitulo es estudiar la participacion de AVT, AII y catecolaminas en la regulacion de la produccion de orina y la captacion de agua. En el mismo se intentara mostrar las limitaciones de una hipotesis fundada exclusivamente en las acciones de AVT para explicar los cambios de permeabilidad de los distintos epitelios involucrados en la economia del agua del sapo *Bufo arenarum* y analizar la participacion de los mecanismos alternativos citados precedentemente.

Materiales y metodos.

Animales experimentales.

Se utilizaron sapos machos *Bufo arenarum* Hensel provenientes de los alrededores de Buenos Aires que pesaban entre 100 y 150 gramos. Los animales eran usados luego de 2 a 3 semanas de aclimatacion en el laboratorio. Durante este periodo eran mantenidos en jaulas de 30 X 30 X 20 cm con libre acceso a una

fuente de agua y recibían alimentación forzada (aproximadamente 2 gramos de hígado) una vez por semana. Veinticuatro horas antes de cada experimento los animales eran transferidos a recipientes individuales de plástico opaco (10 X 10 X 15 cm) que contenían 150 ml de agua deionizada con el objeto de asegurar su hidratación máxima al comienzo de cada experimento.

Determinación de la producción de orina y de la captación de agua a través de la piel.

La producción de orina (PO) y la captación de agua a través de la piel (C) fueron determinadas gravimétricamente (Segura et al, 1982a). Los animales eran mantenidos en recipientes individuales de plástico opaco que contenían 150 ml de agua deionizada y pesados cada 15 minutos en una balanza Ohaus Dial-O-Gram con una precisión de 100 mg antes y después del vaciado de la vejiga. Cada experimento duró 2 horas tomándose la primera hora de mediciones como control y realizándose al comienzo de la segunda hora el correspondiente tratamiento experimental. La captación de agua y producción de orina para un determinado intervalo de tiempo ($T_n - T_{n-1}$) fue calculada de la siguiente forma:

$$C (T_n - T_{n-1}) = (P_{11}T_n - P_{vT_n-1} / P_{vT_n-1}) * 100 * 60 / (T_n - T_{n-1})$$

$$PO (T_n - T_{n-1}) = (P_{11}T_n - P_{vT_n} / P_{vT_n-1}) * 100 * 60 / (T_n - T_{n-1})$$

donde $P_{11}T_n$ es el peso del animal al tiempo T_n antes del vaciado

de la vejiga y PvT_n y PvT_{n-1} son los pesos luego del vaciado de la vejiga a los tiempos T_n y T_{n-1} respectivamente. Siendo la densidad del agua = 1 y asumiendo que la densidad de la orina es aproximadamente = 1 las unidades de C y PO son $ml * 100g$ de peso corporal $-1 * hora^{-1}$. El balance acuoso fue estimado como la diferencia entre los valores de captación de agua y producción de orina para un intervalo dado.

El procedimiento empleado para la determinación de los cambios en la captación de agua y en la producción de orina no produjo por sí mismo modificaciones de estos parámetros durante el transcurso del experimento tanto en grupos de sapos intactos (I) como hipofisoprivos (HR) (tabla I). Por otra parte los valores de producción de orina registrados mediante este procedimiento fueron semejantes a los obtenidos en sapos con canulación crónica de los conductos de Wolff (Petriella et al, 1987).

Tratamientos experimentales.

a) Administración sistémica.

Las siguientes hormonas soluciones y drogas fueron disueltas en NaCl 115 mM y administradas sistémicamente a través del saco linfático dorsal en un volumen de 1 ml/kg:

Arginina Vasotocina (Arg 8 Vasotocin, Sigma) 10 ng/kg, 100 ng/kg, 1 μ g/kg y 10 μ g/kg.

Angiotensina II (Val 5, Angiotensin II, Sigma) 10 μ g/kg y 100 μ g/kg.

Grupo	Captacion de agua (ml/100g*h)	Produccion de orina (ml/100g*h)
Intactos	2.81 +/- 0.31	4.07 +/- 0.20
(n=6)	2.91 +/- 0.16	3.79 +/- 0.21
	t=0.366 (2P<0.80)	t=0.847 (2P<0.50)
HR	2.73 +/- 0.33	4.96 +/- 0.54
(n=6)	2.79 +/- 0.24	4.02 +/- 0.20
	t=0.280 (2P<0.80)	t=1.704 (2P<0.20)

Tabla I: Variaciones de la captacion de agua a traves de la piel y de la produccion de orina de sapos intactos o hipofisectomizados con lesion del tegmentum (HR). Los valores corresponden a la media +/- error standard de la primer y segunda hora de mediciones. Durante este intervalo los animales fueron sometidos al vaciado periodico de la vejiga (ver materiales y metodos).

Adrenalina (Epinephrine, Sigma) 100 ug/kg.

Noradrenalina (Arterenol, Sigma) 100 ug/kg.

Metaraminol (Aramine, Merck Sharp & Dome) 5 mg/kg (agonista alfa adrenergico competitivo).

Isoproterenol (Sigma) 5 mg/kg (agonista beta adrenergico competitivo).

Tolazolina (Tolazoline, Sigma) 5 mg/kg (bloqueante alfa adrenergico competitivo).

Propranolol (Sigma) 5 mg/kg (bloqueante beta adrenergico competitivo).

Prazosin 5 mg/kg (bloqueante alfa 1 adrenergico competitivo).

Yohimbina 5 mg/kg (bloqueante alfa 2 adrenergico competitivo).

Uretano 2 g/kg.

MS 222 (Tricaine Metanosulphonate, Sigma). En este caso los animales fueron transferidos al comienzo de la segunda hora de mediciones a una solucion 0.2% (peso/volumen) de dicha droga.

En los experimentos de carga sistematica de solutos se ensayaron soluciones de NaCl 115 mM, NaCl 1M y Sacarosa 2M. La administracion de las soluciones se realizo a traves del saco linfatico dorsal siendo el volumen inyectado en este caso de 5 ml/kg.

b) Administracion intracerebroventricular.

Las siguientes soluciones hormonas y drogas fueron administradas intracerebroventricularmente (ICV):

NaCl 115 mM

NaCl 1 M

Arginina Vasotocina (Vasotocin, Sigma) 10 ug/ml.

Angiotensina II (Val 5, Angiotentin II, Sigma) 100 ug/ml y 1 mg/ml.

La microinyeccion (1 ul) fue aplicada mediante una jeringa Hamilton de 5 ul conectada a una canula de acero inoxidable ubicada en el III ventriculo a traves de un tubo de polietileno de 0.5 mm de diametro externo y 0.26 mm de diametro interno.

Tecnicas quirurgicas.

a) Preparacion de animales con canulas en el III ventriculo.

Los animales eran anestesiados por exposicion a eter. Posteriormente se procedia a eliminar la porcion de piel limitada lateralmente por los arcos superciliares, rostralmente por la linea que une la parte medio anterior de estos y caudalmente por la articulacion occipitovertebral. Acto seguido se realizaba una craneotomia de 0.5 mm de diametro en la posicion $X=0$, $Y=+2$ (figura 1). Mediante un micromanipulador Narishigue se descendia hasta la posicion $Z=2.5$ una canula de acero inoxidable de 0.28 mm de diametro externo y 12 mm de largo. El volumen muerto de la canula era de aproximadamente 0.1 ul. A unos 2 mm rostralmente a la posicion de la canula se ajustaba en el hueso un tornillo de bronce de 0.8 mm de diametro externo y el conjunto se fijaba con acrilico dental autocurable. Los animales eran utilizados 72 horas luego de la operacion. Una

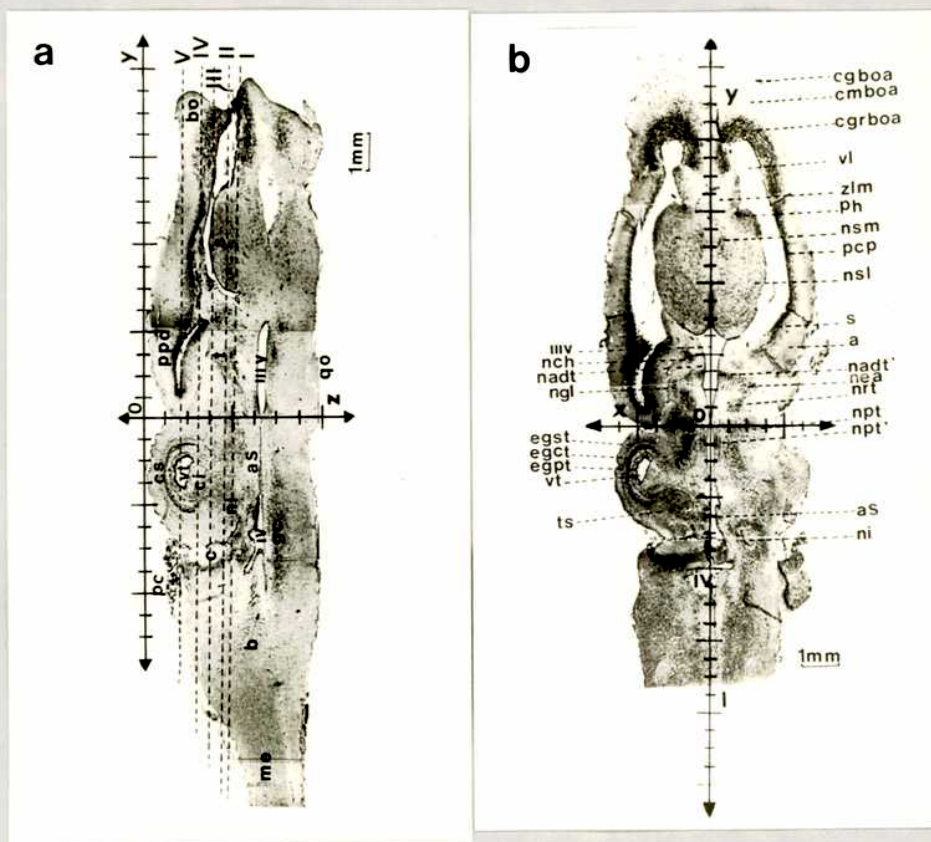


Figura 1: mapa estereotaxico del cerebro de *Bufo arenarum*. a) seccion sagital. b) seccion horizontal en $Z=2$. la ubicacion de la canula ICV fue $X=0$, $Y=2$, $Z=2.5$. aS: acueducto de Silvio, bo: bulbo olfatorio, c: cerebelo, cgboa: capa glomerular del bulbo olfatorio anterior, cmboa: capa mitral del bulbo olfatorio anterior, cgrboa: capa granular del bulbo olfatorio anterior, egst: estrato gris superficial del tectum, egct: estrato gris central del tectum, egpt: estrato gris periventricular del tectum, me: medula espinal, nadt: nucleo anterior dorsomedial del talamo, nadt': nucleo anterior dorsolateral del talamo, nch: nucleo del lecho de la comisura hipocampal, nea: nucleo entopeduncular anterior, ngl: nucleo geniculado lateral, ni: nucleo del istmo, nsl: nucleo septal lateral, nsm: nucleo septal medial, npt: nucleo posterolateral del talamo, npt': nucleo posterocentral del talamo, pcp: primordio de la corteza piriforme, ph: primordio del hipocampo, qo: quiasma optico, s: striatum, ts: torus semicircular, vl: ventriculo lateral, vt: ventriculo tectal, III V: tercer ventriculo, zlm: zona limitante media.

vez finalizado el experimento los animales eran sacrificados por decapitacion y sus cerebros extraidos. La ubicacion de las canulas era comprobada macroscopica y microscopicamente mediante cortes seriados transversales de 15 μ m de espesor coloreados con violeta de cresilo.

b) Preparacion de animales hipofisoprivos.

Los animales eran anestesiados por exposicion a eter, se practicaba una incision medial en la mucosa del techo de la cavidad bucal por debajo del hueso paraesfenoides, en el cual, mediante un torno dental se realizaba un orificio circular de aproximadamente 1.5 mm de diametro externo. Luego de exponerse el area hipotalamo-hipofisaria, se removia la hipofisis entera por succion con un capilar de vidrio de 0.8 mm de diametro externo conectado a una bomba de vacio. En todas las operaciones se agrego a la hipofisectomia una seccion retroquiasmatica del tegmentum mesencefalico. A continuacion se cubria el orificio del hueso con un pequeno trozo de esponja de gelatina absorbible (Gelfoam, Upjohn) y se suturaba la membrana mucosa. Los animales eran utilizados luego de 20 dias de realizada la operacion, considerandose que en este periodo se producia la atrofia total del complejo magnocelular (Rodriguez & Dellmann, 1970). Durante el periodo postoperatorio los animales fueron inyectados diariamente con ACTH (Synacthen, Ciba-Geigy 0.2 mg/kg) con el proposito de mantener el trofismo de la glandula adrenal. Finalizados los experimentos, los animales fueron sacrificados

por decapitacion y sus cerebros extraidos y fijados en hidrato de cloral 25% realizandose la tecnica de impregnacion argantica de Nonides. Los cerebros fueron deshidratados y embebidos en parafina realizandose cortes seriados de 10 um de espesor. la destruccion del sistema productor de AVT fue certificada en todos los casos observandose degeneracion retrograda del haz hipotalamo-neurohipofisario y alteraciones del complejo magnocelular (figura 2).

Analisis estadistico.

Los resultados se expresan como media +/- error estandard de la media. Para la comparacion dentro de los grupos se utilizo el test de Student para mediciones apareadas.

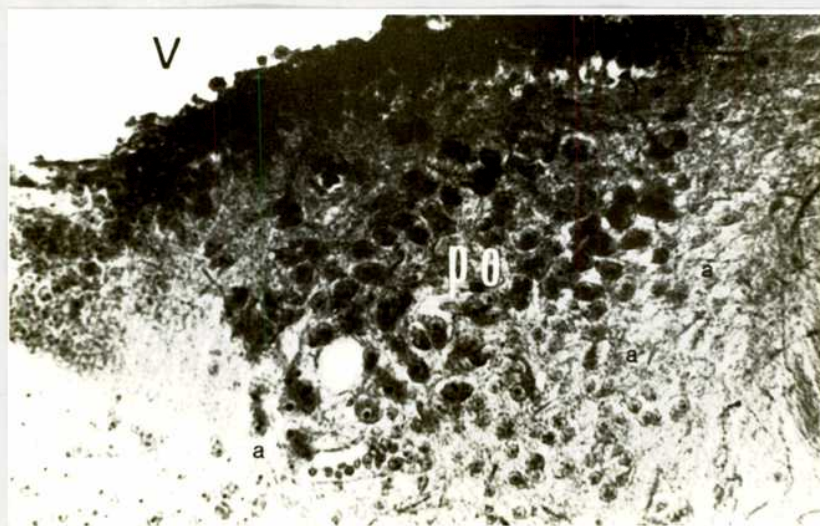


Figura 2: Microfotografía de una sección parasagital del cerebro medio de *Bufo arenarum*. El animal fue sometido a una hipofisectomia y lesión del infundibulum 4 semanas antes de ser sacrificado. En la figura se puede observar la degeneración del núcleo preóptico (PO), intensa picnosis de los núcleos y degeneración retrograda de los axones (a).

Resultados

Efectos de la carga sistémica e intracerebroventricular de solutos.

La carga sistémica de solutos (1 miliosmol/kg de NaCl o sacarosa) a sapos mantenidos en agua deionizada reprodujo la respuesta hidrosmotica o del balance acuoso (figura 3). La inyección de 0.5 ml/100g de NaCl 1M aumento un 58.37% ($2P < 0.001$) la captación de agua a través de la piel y redujo un 37.96% ($2P < 0.001$) la producción de orina. A diferencia de estos resultados, la inyección de sacarosa 2M produjo un menor incremento de la captación de agua (34.40%, $2P < 0.05$) y no modifico significativamente los valores de la producción de orina ($2P < 0.20$). Para evaluar la participación de la neurohipofisis en esta respuesta, un grupo de sapos implantados crónicamente con canulas intracerebroventriculares fue inyectado con 1 μ l de NaCl 1M. La microinyección de NaCl produjo un descenso del 29.36% ($2P < 0.01$) en la producción de orina pero no afecto significativamente ($2P < 0.10$) la captación de agua a través de la piel (figura 4). El grupo control (inyección intracerebroventricular de 1 μ l de NaCl 115 mM) no presento variaciones significativas de la producción de orina ($2P < 0.60$) ni de la captación de agua ($2P < 0.60$).

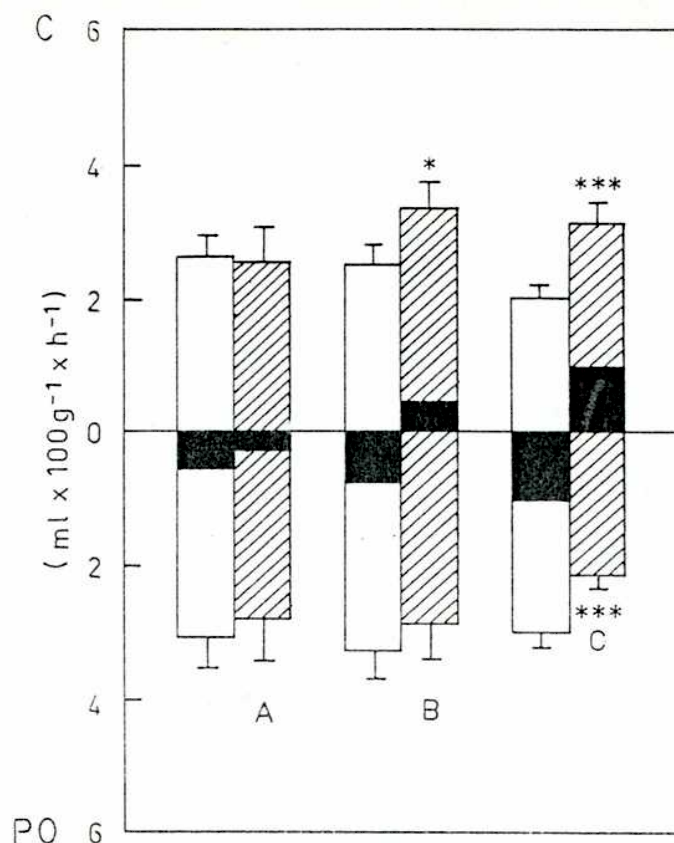


Figura 3: Cambios de la captación de agua a través de la piel (C) y de la producción de orina (PO) en 3 grupos de sapos (n=6 para cada grupo) administrados sistémicamente con 5 ml/kg de: NaCl 115 mM (A), Sacarosa 2M (B) y NaCl 1M (C). Las barras blancas corresponden a los valores de C y PO antes de la administración de la solución (control) mientras que las barras rayadas corresponden a los valores de C y PO después del tratamiento experimental. La parte oscura de cada columna indica el valor del balance acuoso (C-PO). * $2P < 0.05$, *** $2P < 0.001$.

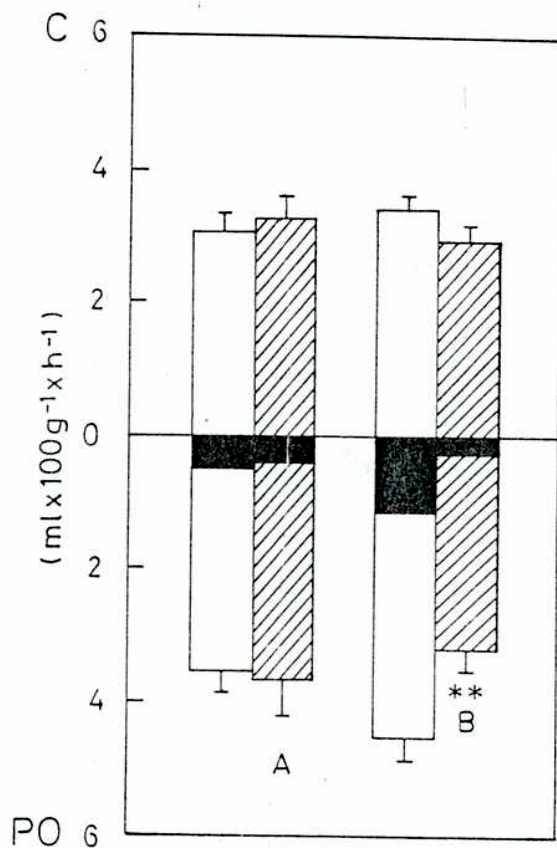


Figura 4: Cambios de la captación de agua y de la producción de orina en dos grupos de sapos administrados ICV con 1 μ l de: (A) NaCl 115 mM (n=5) y (B) NaCl 1M (n=12). Las barras blancas corresponden a los valores de C y PO antes de la microinyección. ** $2P < 0.01$.

Efectos de la administracion sistematica e intracerebroventricular de AVT.

La administracion sistematica de AVT exogena a sapos hidratados reprodujo parcialmente la respuesta hidrosmotica observada durante los experimentos de carga de solutos. La inyeccion de AVT provoco un aumento dosis dependiente del balance acuoso debido principalmente a la reduccion en la produccion de orina (figura 5). El descenso porcentual de la produccion de orina por la administracion de 10 ng/kg, 100 ng/kg, 1 ug/kg y 10 ug/kg de AVT fue del 34.70% ($2P < 0.01$), 46.32% ($2P < 0.01$), 62.39% ($2P < 0.01$) y 79.94% ($2P < 0.01$) respectivamente. En relacion con la captacion de agua solo se observaron cambios significativos de esta variable por la administracion de 10 ug/kg de AVT. En este caso el aumento de la captacion producido por la hormona fue de un 92.78 % ($2P < 0.01$).

Por otra parte, la administracion de 1 ul de AVT 10 ug/ml en el III ventriculo produjo un descenso del 35.53% ($2P < 0.05$) en la produccion de orina, pero no modifico significativamente ($2P < 0.30$) la captacion de agua a traves de la piel (figura 6).

Efectos de la administracion sistematica e intracerebroventricular de AII.

La administracion sistematica de 10 ug/kg o 100 ug/kg de AII exogena a sapos mantenidos en agua deionizada redujo la

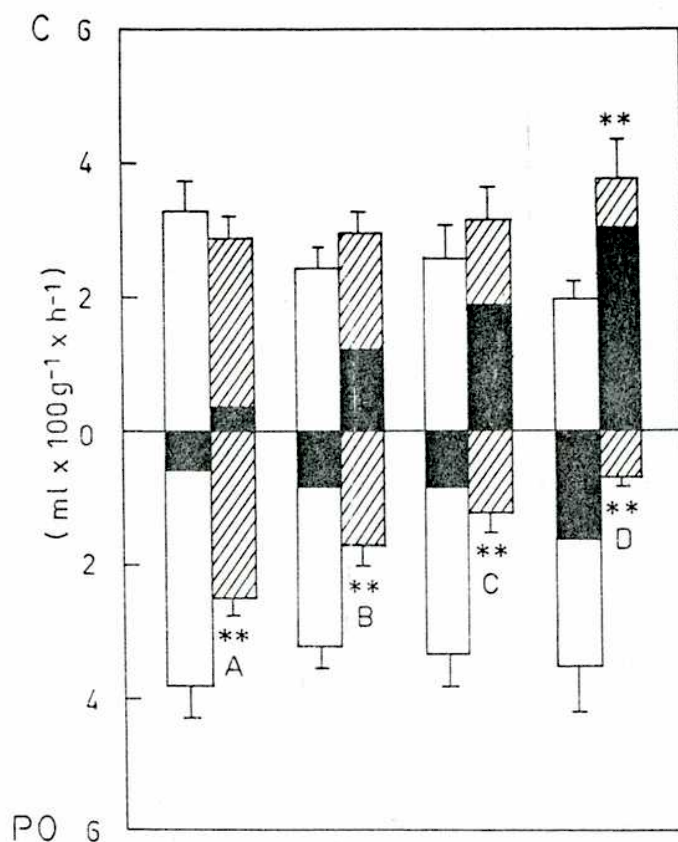


Figura 5: Cambios de la captacion de agua (C) y de la produccion de orina (PO) antes (barras blancas) y despues (barras rayadas) de la administracion sistematica de AVT: 10 ng/kg (A), 100 ng/kg (B), 1 ug/kg (C) y 10 ug/kg (D). ** 2P<0.01.

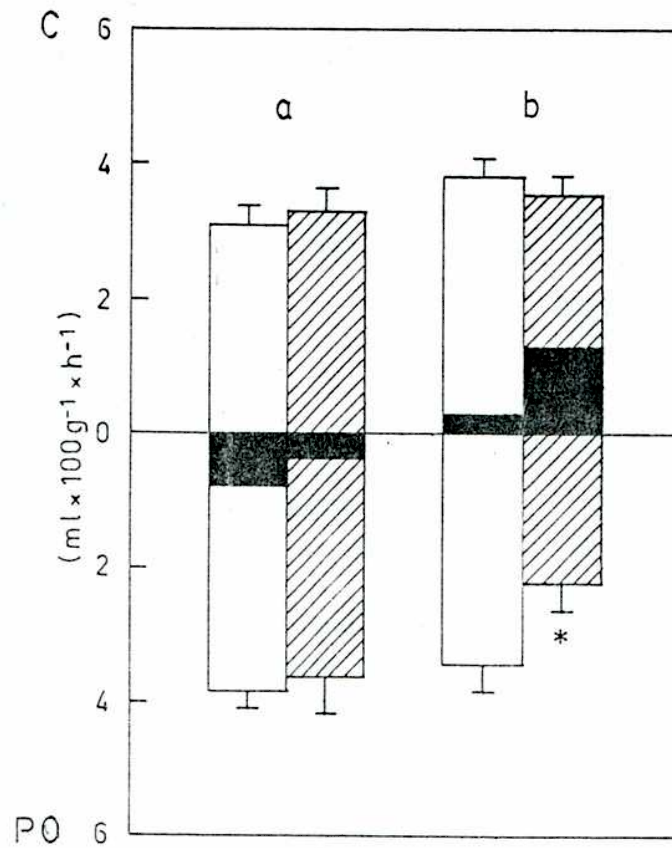


Figura 6: cambios en la captación de agua (C) y en la producción de orina (PO) en 2 grupos de sapos administrados intracerebroventricularmente con 1 μ l de (a) NaCl 115 mM (n=5) y (b) AVT 10 μ g/ml (n=6). Las barras blancas corresponden a los valores de C y PO antes de la microinyección. ** $2P < 0.01$.

produccion de orina en un 33% ($2P<0.05$) y 35.1% ($2P<0.05$) respectivamente, pero no modifico significativamente ($2P<0.50$) los valores de captacion de agua (figura 7). Resultados similares fueron obtenidos al repetir estos experimentos en sapos mantenidos en NaCl 23 mM (tabla II).

Por otra parte, la administracion de 1 ul de AII 100 ug/ml o 1 mg/ml en el III ventriculo redujo la produccion de orina en un 33.33% y 22.31% respectivamente, pero al igual que para los experimentos de administracion sistematica no fueron observados cambios significativos ($2P<0.50$) de la captacion de agua (figura 8).

Efectos de los anestésicos.

La anestesia con uretano o MS222 produjo marcados cambios en la captacion de agua a traves de la piel con independencia de la integridad del sistema productor de AVT (figuras 9 y 10). La administracion sistematica de uretano (2g/kg) aumento drasticamente la captacion de agua en el grupo de sapos intactos (111.36%, $2P<0.01$) asi como en el grupo de sapos hipofisoprivos (97.33%, $2P<0.01$). Resultados similares se obtuvieron bajo los efectos de la anestesia con MS222. En este caso la captacion de agua aumento un 98.75% ($2P<0.05$) en el grupo de sapos intactos y un 78.43% ($2P<0.05$) en el grupo de sapos hipofisoprivos. En relacion con la produccion de orina se observo un aumento de esta variable en el grupo hipofisoprivo bajo el efecto del

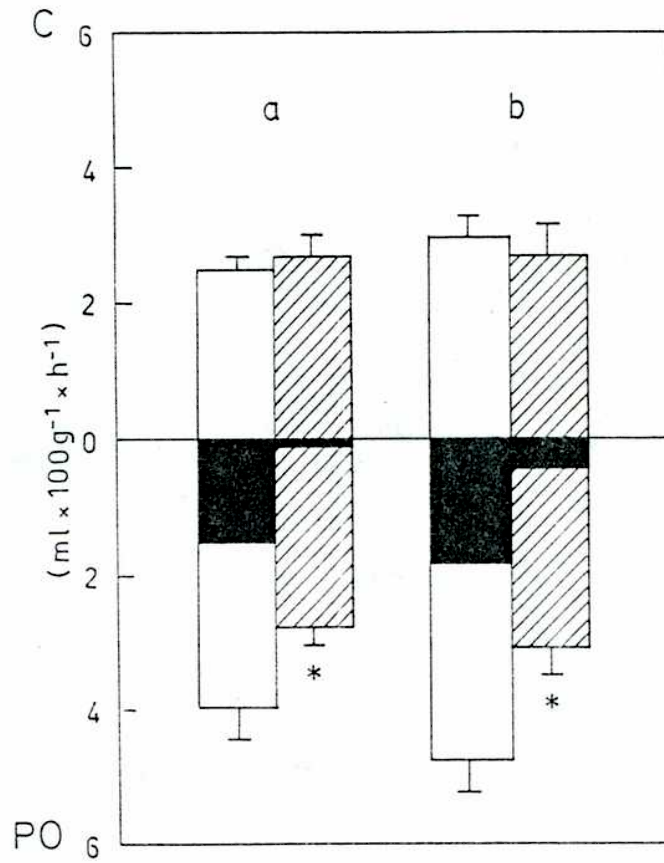


Figura 7: Cambios de la captacion de agua (C) y de la produccion de orina (PO) en 2 grupos de sapos administrados sistemicamente con (a) Angiotensina II 10 ug/kg (n=12) y (b) Angiotensina II 100 ug/kg (n=6).

Grupo	Captacion de agua (ml/100g*h)	Produccion de orina (ml/100g*h)
Control	3.04 +/- 0.41	3.23 +/- 0.27
AII (10ug/kg)	3.21 +/- 0.55	2.48 +/- 0.37
(n=6)	t=0.59, 2P<0.60	t=2.33, 2P<0.10
Control	2.96 +/- 0.32	4.82 +/- 0.45
AII (100ug/kg)	2.69 +/- 0.43	3.13 +/- 0.43
(n=6)	t=0.29, 2P<0.80	t=2.32, 2P<0.10

Tabla II: Variaciones de la captacion de agua y de la produccion de orina en 2 grupos de sapos mantenidos en NaCl 23 mM antes y despues de la administracion sistematica de AII 10 y 100 ug/kg. Los valores corresponden a la media +/- error estandard.

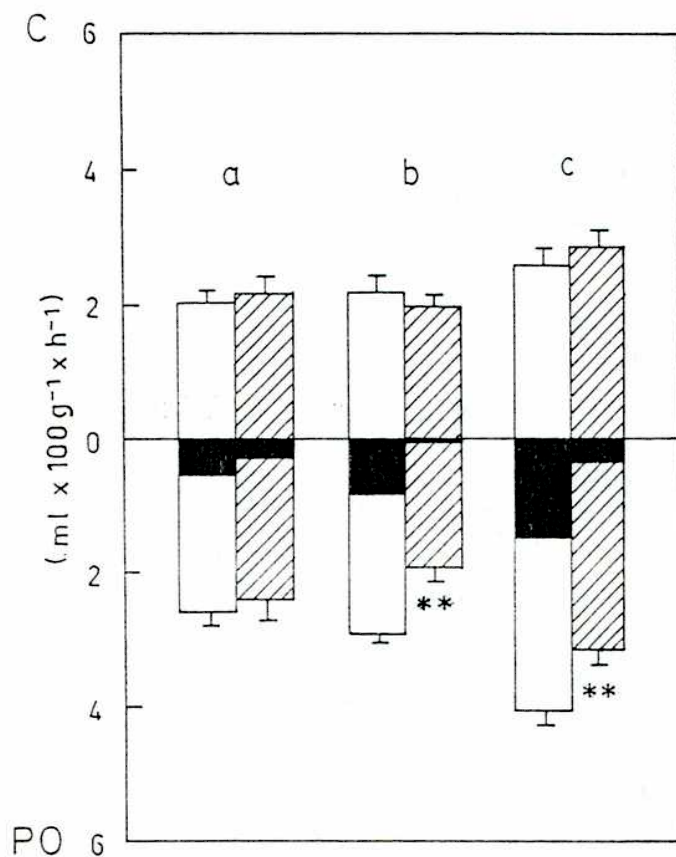


Figura 8: Captación de agua (C) y producción de orina (PO) antes y después de la administración ICV de 1 μ l de: (a) NaCl 115 mM (n=5), (b) AII 100 μ g/ml (n=12) y (c) AII 1 mg/ml (n=6).

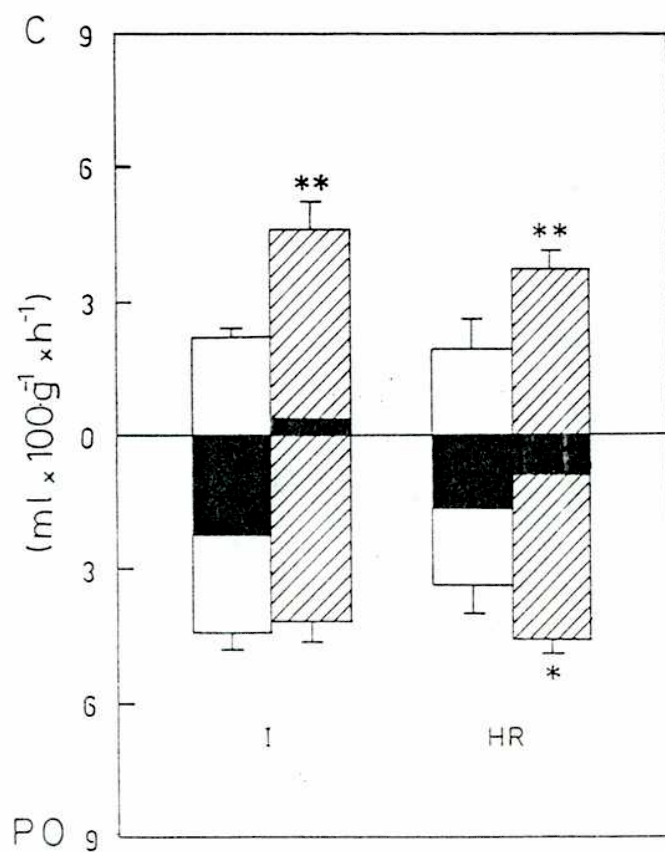


Figura 9: Captación de agua (C) y producción de orina (PO) en grupos de sapos intactos (I), n=6 e hipofisoprivos (HR), n=7 antes y después de la administración sistémica de uretano (2g/kg).

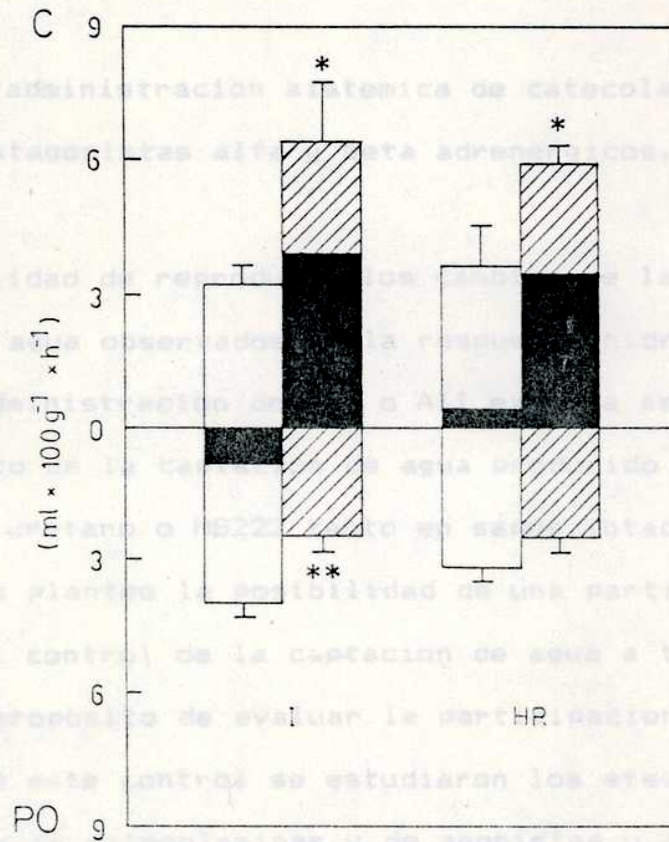


Figura 10: Captación de agua y producción de orina en grupos de sapos intactos (n=6) e hipofisoprivos (n=4) antes y después del agregado al medio externo de MS222 0.2 %.

uretano y un descenso de la misma durante la anestesia con MS222 en el grupo de animales intactos.

Efectos de la administracion sistematica de catecolaminas y agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos.

La imposibilidad de reproducir los cambios de la permeabilidad de la piel al agua observados en la respuesta hidrosmotica mediante la administracion de AVT o AII exogena asi como el marcado aumento de la captacion de agua producido durante la anestesia con uretano o MS222 tanto en sapos intactos como hipofisoprivos plantea la posibilidad de una participacion nerviosa en el control de la captacion de agua a traves de la piel. Con el proposito de evaluar la participacion del sistema adrenergico en este control se estudiaron los efectos de la administracion de catecolaminas y de agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos a sapos mantenidos en agua deionizada.

La administracion sistematica de adrenalina exogena (100 ug/kg) provoco un descenso del 37.39% ($2P < 0.05$) en la produccion de orina pero no modifico significativamente ($2P < 0.80$) los valores de captacion de agua (figura 11).

A diferencia de los resultados obtenidos con adrenalina, la administracion de noradrenalina (100 ug/kg) aumento la captacion de agua a traves de la piel pero no afecto la produccion de orina (figura 11). El incremento de la captacion de agua luego de la inyeccion de noradrenalina fue del 117.47% ($2P < 0.01$)

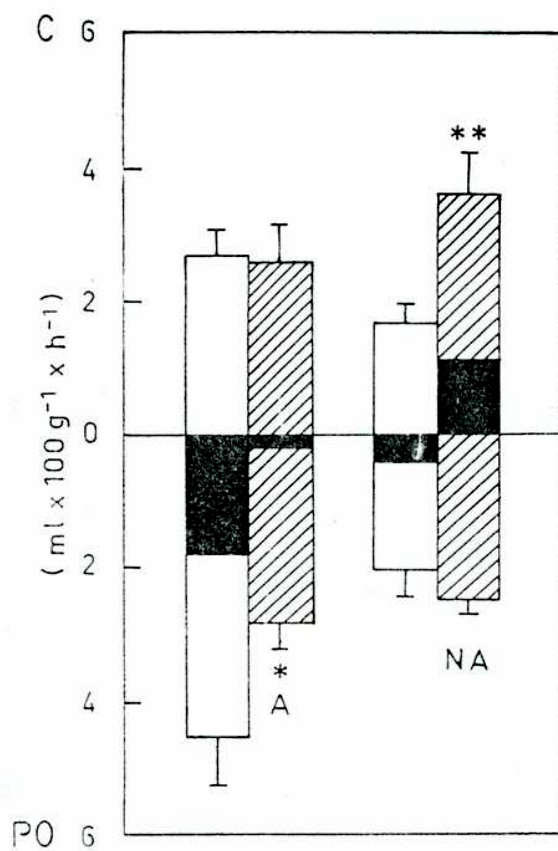


Figura 11: Captacion de agua y produccion de orina antes y despues de la de 100 ug/kg de adrenalina (A), n=6 o noradrenalina (NA), n=5. * 2P<0.05, ** 2P<0.01.

mientras que la producción de orina no presentó variaciones significativas ($2P < 0.50$).

La administración sistémica de un agonista alfa adrenergico (metaraminol 5mg/kg) reprodujo la respuesta observada con adrenalina mientras que la administración de un agonista beta adrenergico (Isoproterenol 5 mg/kg) reprodujo la respuesta observada con noradrenalina (figura 12). La producción de orina luego de la estimulación alfa adrenergica descendio un 20.9% ($2P < 0.05$) no registrandose cambios significativos en la captación de agua ($2P < 0.90$). A su vez, la estimulación beta adrenergica produjo un aumento de la captación de agua de un 39.62% ($2P < 0.01$) así como una leve reducción no significativa (27.35%, $2P < 0.10$) de la producción de orina.

Por otra parte, la administración de un bloqueante adrenergico (alfa 1 y alfa 2) competitivo (Tolazolina 5 mg/kg) produjo un aumento del 99.59% ($2P < 0.05$) en la captación de agua, pero no modifico ($2P < 0.30$) la producción de orina (figura 13). El bloqueo de los receptores adrenergicos alfa 2 con Yohimbina (5mg/kg) reprodujo parcialmente la respuesta observada con Tolazolina, obteniendose en este caso un aumento de la captación de agua del 40.52% ($2P < 0.05$). A diferencia de estos resultados el bloqueo de los receptores adrenergicos alfa 1 con Prazosin (5 mg/kg) no produjo cambios significativos ($2P < 0.40$) de la captación de agua (tabla III).

La administración de un bloqueante beta adrenergico (Propranolol, 5 mg/kg) a sapos hidratados no produjo modificaciones de la captación de agua ($2P < 0.50$) ni de la

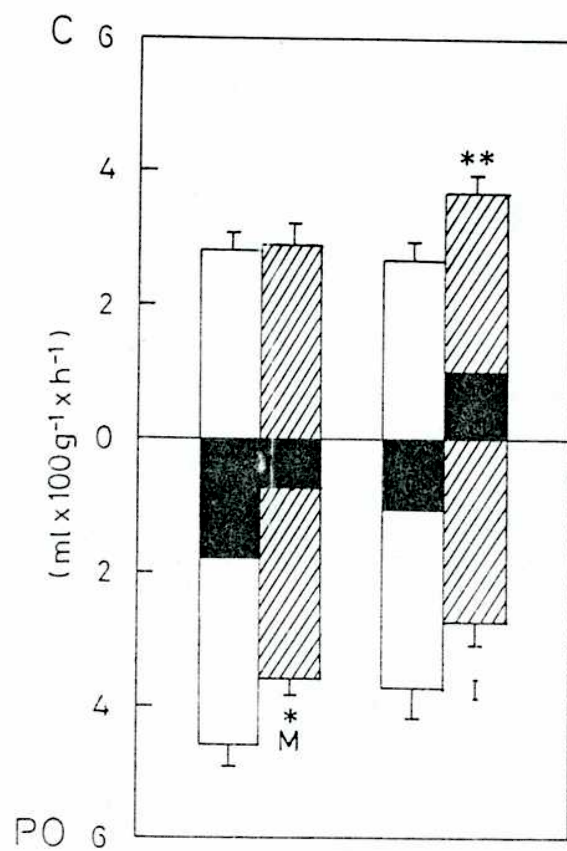


Figura 12: captación de agua y producción de orina antes y después de la administración sistémica de: Metaraminol (M), 5mg/kg (n=12) o Isoproterenol (I) 5 mg/kg (n=6). * $2P < 0.05$, ** $2P < 0.01$.

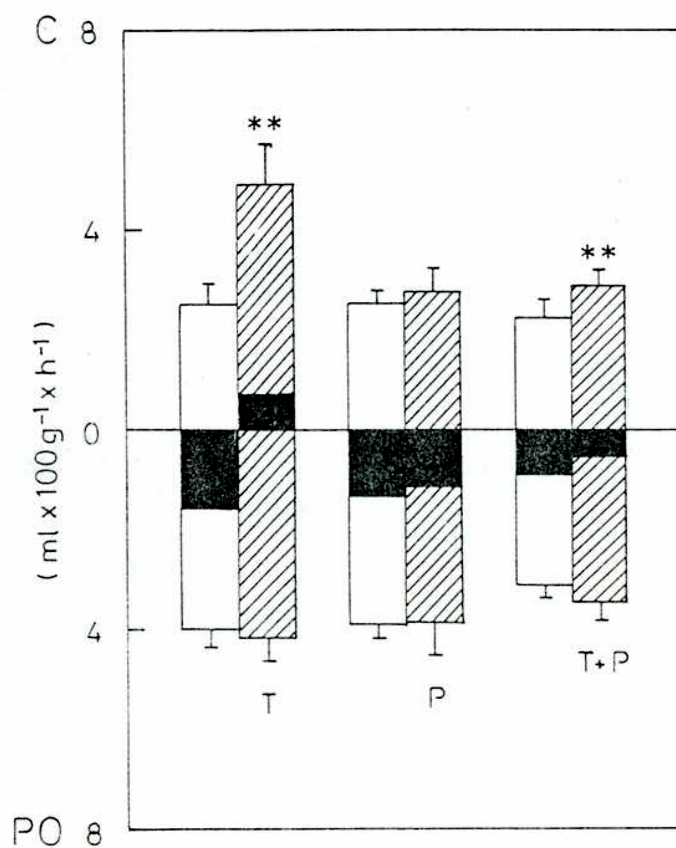


Figura 13: Captación de agua y producción de orina antes y después de la administración sistémica de Tolazolina 5 mg/kg (T), n=6; Propranolol 5 mg/kg (P), n=6 y Tolazolina 5 mg/kg + Propranolol 5 mg/kg (T+P), n=6. ** 2P<0.01.

Grupo	Captacion de agua (ml / 100g * h)	
Control	2.27 +/- 0.40	n=6, 2P<0.05
Yohimbina (5 mg/kg)	3.19 +/- 0.35	
Control	2.87 +/- 0.46	n=6, 2P<0.40
Prazosin (5 mg/kg)	3.50 +/- 0.39	

Tabla III: Valores de captacion de agua antes y despues de la administracion de un antagonista adrenergico alfa 1 (Prazosin) o de un antagonista alfa 2 (Yohimbina) a sapos mantenidos en agua deionizada.

produccion de orina ($2P < 0.80$). Sin embargo, el incremento en la captacion de agua producido por el bloqueo alfa adrenergico fue en gran parte reducido por el bloqueo beta adrenergico (figura 13). La administracion simultanea de Propranolol (5 mg/kg) y Tolazolina (5 mg/kg) produjo un aumento de la captacion de agua del 32.11% ($2P < 0.01$), siendo este aumento un 67.75% menor que el observado durante el bloqueo alfa adrenergico con Tolazolina (figura 13).

Discusion.

Los resultados presentados en este capitulo muestran que la respuesta hidrosmotica o del balance acuoso del anfibio anuro *Bufo arenarum* esta mediada tanto por AVT como por el sistema adrenergico. La participacion de AVT en esta respuesta esta principalmente asociada a los cambios en la produccion de orina mientras que la participacion del sistema adrenergico, en especial traves de receptores beta, esta asociada a los cambios de captacion de agua a traves de la piel.

Efectos de la administracion sistematica e ICV de NaCl, sacarosa y AVT sobre el balance acuoso.

Arginina vasotocina es el principio antidiuretico de la neurohipofisis de los vertebrados inferiores (Pang y Furspan, 1983), produciendo en la mayoria de los tetrapodos respuestas vasopresoras (Chan, 1977) y antidiureticas (Pang, 1977). La participacion de AVT en el control del balance acuoso en anfibios es controvertida. Arginina vasotocina es liberada por la neurohipofisis ante un descenso del volumen plasmatico o un aumento de la presion osmotica del plasma (Bentley, 1969; Sawyer & Pang, 1975). En anfibios AVT actua sobre el rinon, aumentando la reabsorcion tubular y produciendo vasoconstriccion preglomerular (Pang et al, 1980) y sobre la vejiga urinaria, aumentando la recaptacion de agua (Ewer, 1952; De Sousa y Grosso, 1981). Ademas, se ha propuesto que en los anfibios

anuros AVT aumenta el flujo hidrosmotico y natriferico de agua a traves de la piel (Bentley, 1957; Dicker y Elliot, 1967; Elliot, 1968b; Bentley, 1974, De Sousa y Grosso, 1981). La administracion de soluciones hiperosmoticas de NaCl a anfibios anuros hidratados aumenta la captacion de agua y reduce la produccion de orina (Shoemaker, 1965; Middler et al, 1967; Shoemaker & Waring, 1968; Christensen & Jorgensen, 1972). Esta respuesta, segun algunos autores (Shoemaker, 1965; Middler et al, 1967; Shoemaker & Waring, 1968, Bentley, 1974) estaria mediada por AVT. Sin embargo, animales con lesiones del sistema productor de AVT (lesiones hipotalamicas o hipofisectomia) son capaces de aumentar la permeabilidad de la piel al ser sometidos a una carga de sales (Christensen & Jorgensen, 1972; Bakker & Bradshaw, 1977), sugiriendo la participacion de factores extrahipofisarios en esta respuesta.

Los resultados obtenidos al administrar sistematica o ICV soluciones hiperosmoticas de NaCl o sacarosa muestran una disociacion entre los cambios en la captacion de agua y la produccion de orina. Esta respuesta diferencial parece depender tanto del soluto como de la via de administracion del mismo. Asi, la inyeccion sistematica de 1 miliosmol de NaCl o de sacarosa aumenta la captacion de agua a traves de la piel pero solo el NaCl reduce la produccion de orina. Ademias, la administracion de 2 microsmoles de NaCl en el III ventriculo reduce la produccion de orina pero no afecta la captacion de agua a traves de la piel. Estos resultados muestran la presencia de receptores hipotalamicos sensibles a los cambios en la concentracion de

NaCl (sodiorreceptores) cuya estimulación causa una reducción de la producción de orina. Este descenso podría deberse a la liberación de AVT a partir de la neurohipofisis. En tal sentido, la administración ICV de soluciones hipertónicas de NaCl produce un aumento de los niveles circulantes de AVT en mamíferos (McKinley, 1985), mientras que en anfibios, la administración intracarotídea de NaCl 1M produce una antidiuresis dependiente de la integridad de la hipófisis (Segura et al, 1987).

En relación con los cambios en la captación de agua, estos se producen (para el caso de sacarosa) aun en ausencia de respuestas antidiuréticas. Este resultado apoya la hipótesis de un control independiente de la captación de agua y de la producción de orina.

En forma semejante, los resultados obtenidos al administrar distintas dosis de AVT exógena muestran la existencia de diferentes umbrales en la respuesta renal y cutánea. La cantidad de AVT necesaria para reducir la producción de orina es aproximadamente 1000 veces menor que la necesaria para aumentar la captación de agua a través de la piel. Asumiendo que la hormona inyectada se redistribuye uniformemente en el espacio extracelular (aproximadamente 1/3 de los fluidos corporales) y que en el género Bufo el 80% del peso corporal corresponde a agua (Ferreira y Jesus, 1973), las dosis de AVT administradas implican niveles circulantes de 37.5 pg/ml, 375 pg/ml, 3.75 ng/ml y 37.5 ng/ml. Estas concentraciones son muy superiores a las determinadas en anfibios sometidos a deshidratación o

hemorragia (80 pg/ml, Sawyer y Pang, 1975), y en consecuencia resulta improbable que las respuestas correspondientes puedan darse en condiciones naturales.

Por otra parte, algunos autores proponen la participacion de un sistema ADH extrahipofisario en el control de la ingesta de liquidos en mamiferos (Szcepanska-Sadowska et al, 1982; 1984).

La ausencia de cambios de la captacion de agua en los experimentos de administracion ICV de soluciones de AVT sugieren que tal sistema no estaria presente en esta especie de anfibios. En relacion con el descenso de la produccion de orina consecutivo a la administracion ICV de AVT, la hipotesis mas parsimoniosa es que el mismo sea producido por la recirculacion y accion periferica de la hormona inyectada centralmente.

Efectos de la administracion de AII, anestésicos y catecolaminas sobre el balance acuoso.

La participacion de AII en la conducta de ingesta de agua ha sido demostrada en distintos grupos de vertebrados. La administracion intravenosa o intraperitoneal de AII es un potente estimulo dipsogenico en peces (Hirano et al, 1978), reptiles (Fitzsimons & Kaufman, 1977), aves (Evered & Fitzsimons, 1976; Snapir et al, 1976; Takei, 1977; Schwob & Johnson, 1977; Evered & Fitzsimons, 1981) y mamiferos (Fitzsimons & Simons, 1969; Epstein & Hsiao, 1975; Trippodo et al, 1976). Ademas, la administracion de AII intracraneal en dosis 1000 veces menores a las sistemicas produce una respuesta

dipsogenica en aves (Wada et al, 1975; Evered & Fitzsimons, 1976; Snapir et al, 1976, Schwob & Johnson, 1977) y en mamiferos (Epstein et al, 1970; Fitzsimons, 1980).

En anfibios se ha demostrado la presencia de un sistema renina-angiotensina (Wilson, 1984). En todas las especies de anfibios estudiadas han sido observados reservorios de renina (Hartroft, 1966; van Dongen & van der Heijden, 1969; Bellocci et al, 1971; Lammers & van Dongen, 1972; Lamers et al, 1973; 1974; Hanner & Ryan, 1980; Yunge et al, 1980) asi como evidencias bioquimicas de actividad de renina (Yunge et al, 1980). En *Bufo arenarum* se ha demostrado la existencia de renina y de Angiotensina (Nolly & Fasciolo, 1971a). Sin embargo, la participacion de esta hormona en la homeostasis del sodio parece no ser importante (Nolly & Fasciolo, 1971b). Por otra parte, en esta especie AII aumenta el flujo hidrosmotico y natriferico de agua "in vivo" (Coviello, 1970) e "in vitro" (Coviello & Brauckman, 1973) discrepando estos resultados con los obtenidos en otras especies de anfibios (Kobayashi et al, 1978). Por este motivo se decidio estudiar los efectos de AII sobre el balance acuoso de *Bufo arenarum*.

La administracion tanto sistematica como ICV de AII reduce la produccion de orina pero no afecta el flujo hidrosmotico y natriferico de agua. En relacion con los cambios de la produccion de orina, los resultados obtenidos no permiten afirmar que la respuesta observada sea producida directamente por AII. En anfibios la administracion sistematica de AII aumenta los niveles circulantes de catecolaminas (Carroll & Opdyke,

1982) que a su vez afectan la presión de filtración glomerular y la reabsorción tubular de agua reduciendo la producción de orina (Gallardo et al, 1980). Por otra parte, en mamíferos la administración sistémica (Share, 1979) o intracraneal (Keil et al, 1975, Hoffman et al, 1977) de AII aumenta los niveles circulantes de ADH. En tal sentido, los resultados obtenidos en los experimentos de administración ICV de AII son consistentes con la hipótesis de una regulación de la secreción de AVT por AII, si bien esta hipótesis no fue contrastada experimentalmente.

En relación con la captación de agua, la administración sistémica o ICV de AII no afectó este parámetro. Cabe señalar que las dosis empleadas en los experimentos de administración ICV (10^{-10} y 10^{-9} moles) son entre 100 y 1000 veces mayores que las necesarias para producir respuestas dipsogénicas en la paloma o en la rata (10^{-12} moles). Por lo tanto, resulta poco probable que la ausencia de cambios de la captación de agua por la piel en *Bufo arenarum* sea debida al empleo de dosis subumbrales de AII. Los resultados obtenidos sugieren que la acción dipsogénica de AII descrita en otras clases de vertebrados estaría ausente en esta especie de anfibios.

La ineficacia de AVT y AII en producir cambios en la captación de agua y los drásticos cambios de esta variable observados bajo el efecto de la anestesia tanto en animales intactos como hipofisoprivos sugieren la existencia de otros mecanismos involucrados en los cambios de permeabilidad de la piel.

La participación de agentes adrenergicos en la regulación de

la permeabilidad de la piel de anfibios fue demostrada previamente "in vitro" (Jard et al, 1968; Bastide y Jard, 1968; De Sousa y Grosso, 1982; Gamundi et al, 1984) e "in vivo" (Elliot, 1968a; Hillyard, 1979; Segura et al, 1982a; 1982b; 1984; Yokota & Hillman, 1984). No existe, sin embargo coincidencia respecto de la participacion relativa de adrenalina y noradrenalina ni en cuanto a la accion de agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos en los cambios de permeabilidad de la piel.

Los resultados aqui descriptos, muestran que la adrenalina no modifica los valores de captacion de agua mientras que la noradrenalina los aumenta claramente. Los cambios en la captacion de agua observados con noradrenalina son reproducidos por la administracion de un agonista beta adrenergico (isoproterenol) y por la administracion de un bloqueante alfa adrenergico (tolazolina). Sin embargo, el aumento de la captacion de agua durante el bloqueo alfa adrenergico es reducido por el bloqueo simultaneo de los receptores beta adrenergicos, sugiriendo que tal respuesta es mediada en gran parte por receptores beta adrenergicos. Estos resultados permitirian explicar las discrepancias respecto de si la permeabilidad de la piel "in vivo" esta bajo control alfa (Segura et al, 1982a; 1982b) o beta adrenergico (Hillyard, 1979, Yokota y Hillman, 1984). En tal sentido, nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en *Bufo arenarum* "in vitro" por Gamundi et al (1984). Estos autores demostraron que tanto la estimulacion de receptores beta como el bloqueo de receptores

alfa 2 aumentan la captacion de agua. En nuestros experimentos, el aumento de captacion de agua observado con tolazolina (bloqueante alfa 1 y alfa 2) solo fue reproducido por el bloqueo con Yohimbina (alfa 2).

Si bien, los estudios realizados por De Sousa y Grosso (1982) y por Gamundi et al (1984) mostraron la presencia de receptores beta adrenergicos en la piel de *Bufo marinus* y *Bufo arenarum* asociados al aumento de la captacion de agua "in vitro", en los experimentos "in vivo" deben considerarse los posibles efectos de la estimulacion beta adrenergica sobre la vasculatura del parche pelvico. En tal sentido, los resultados de Mahany y Parsons (1979) muestran la influencia de variables cardiovasculares sobre el intercambio de agua a traves de la piel, sugiriendo que el aumento de la captacion podria deberse a un incremento tanto de la permeabilidad cutanea como de la perfusion vascular.

Por ultimo y en relacion con la participacion del sistema adrenergico en el control de la funcion renal, los resultados obtenidos con adrenalina y metaraminol son consistentes con lo observado por Gallardo et al (1980). Estos autores postulan un control alfa adrenergico de la vasoconstriccion preglomerular y de la reabsocion tubular, superpuesto al ya conocido control vasotocinergico. En tal sentido, la existencia de terminaciones nerviosas y varicosidades asociadas al tubulo renal en el rinon de *Rana catesbiana* (Tsuneki et al, 1984) constituiria una evidencia adicional acerca de la participacion del sistema adrenergico en la regulacion de la funcion renal en anfibios.

Capitulo III

Efectos de la osmolaridad del medio externo sobre el balance acuoso.

Introduccion

El balance acuoso en anfibios ha sido estudiado principalmente desde la perspectiva de mecanismos realimentados o controlados por el error. Asi, ante cambios del medio interno tales como la deshidratacion intracelular o extracelular se ponen en funcionamiento mecanismos compensatorios que restituyen el valor de dicha variable a su nivel de referencia. Como se mostro en el capitulo anterior dichos mecanismos compensatorios involucran entre otros factores al sistema hipotalamo-neurohipofisario, el sistema renina-angiotensina y el sistema adrenergico.

Sin embargo, se ha prestado poca atencion a la posible participacion de mecanismos anticipatorios o antealimentados (feedforward). La antealimentacion ha sido reconocida como necesaria por algunos autores (McFarland, 1970) y se refiere a respuestas producidas en ausencia de cambios en el medio interno ante estímulos que en el pasado han sido asociados con cambios del mismo (Toates, 1979).

El modelo experimental que se utilizara en este capitulo es el de anfibios sometidos a una reduccion del gradiente osmotico a

traves de la piel. Bajo estas condiciones, el flujo hidrosmotico de agua se reduce en forma proporcional a la caida del gradiente osmotico pudiendo llegar a invertirse con perdida de agua a traves de la piel, para el caso en que la osmolaridad externa supere a la interna (Bentley, 1957; Dicker & Elliot, 1967). En anfibios la deshidratacion producida por una exposicion cronica a ambientes hiperosmoticos es compensada con un incremento de la presion osmotica del plasma a traves de un aumento de las concentraciones de sodio, cloro y urea (Henderson et al, 1972; Ferreira & Jesus, 1973; Katz, 1973; Katz, 1975; Liggins & Grigg, 1985). En tal sentido, la mayoria de los trabajos previos ha puesto enfasis en la capacidad de adaptacion de animales mantenidos durante varias semanas en ambientes de alta salinidad, estudiando los cambios del medio interno y las modificaciones de la captacion de agua y produccion de orina asociadas a estos cambios (Henderson et al, 1972; Ferreira & Jesus, 1973; Katz, 1973; Katz, 1975; Garland & Henderson, 1975; Liggins & Grigg, 1985). Sin embargo, a excepcion del trabajo de Mayer (1969) se ha prestado poca atencion a los cambios del balance acuoso producidos inmediatamente despues de la reduccion del gradiente osmotico a traves de la piel.

El objetivo de este capitulo es estudiar los cambios en el corto plazo del flujo hidrosmotico y natriferico de agua y de la produccion de orina de sapos sometidos a una drastica reduccion del gradiente osmotico transepitelial. Se intentara contrastar la hipotesis de que los cambios en el medio interno preceden a los cambios de la funcion de los epitelios involucrados en la

regulación del balance acuoso planteándose como hipótesis alternativa la existencia de mecanismos antealimentados.

Materiales y métodos.

Determinaciones de la captación de agua a través de la piel y de la producción de orina.

La captación de agua a través de la piel y la producción de orina fueron determinadas gravimétricamente (Segura et al, 1982a). El procedimiento utilizado fue idéntico al descrito en el capítulo II. Los resultados se expresan como $\text{ml} \cdot 100 \text{ g de peso corporal}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. El balance acuoso fue estimado como la diferencia entre captación de agua y producción de orina para un período dado.

Tratamientos experimentales.

Los experimentos se realizaron en grupos de animales intactos e hipofisoprivos. El grupo de animales hipofisoprivos fue preparado en forma idéntica a la descrita en la sección materiales y métodos del capítulo II.

La duración de cada experimento fue de 2 horas. Durante la primera hora los sapos fueron mantenidos en recipientes individuales de plástico opaco conteniendo 150 ml de agua deionizada (control). Al comienzo de la segunda hora el

gradiente osmótico fue reducido mediante el reemplazo del agua por 150 ml de las siguientes soluciones:

Grupo intactos (I).

NaCl 23 mM (n=6)

NaCl 46 mM (n=6)

NaCl 69 mM (n=6)

NaCl 92 mM (n=6)

NaCl 115 mM (n=18)

NaCl 115 mM + Clorhidrato de Amilorida (Merk Sharp & Dome) 0.25 mM (n=12)

Sacarosa 46 mM (n=12)

Sacarosa 92 mM (n=12)

Sacarosa 138 mM (n=12)

Sacarosa 184 mM (n=12)

Sacarosa 230 mM (n=6)

Grupo hipofisoprivos (HR).

NaCl 115 mM (n=6)

NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida (Merk Sharp & Dome) 0.25 mM (n=6)

Sacarosa 46 mM (n=11)

Sacarosa 92 mM (n=6)

Sacarosa 138 mM (n=10)

Sacarosa 184 mM (n=9)

Sacarosa 230 mM (n=10)

El clorhidrato de amilorida produce una rapida reduccion del transporte de sodio por bloqueo de los canales del cation presentes en el lado externo de la piel. Dicho bloqueo es totalmente reversible y no afecta el flujo osmotico de agua (DeSousa, 1975).

Determinacion del coeficiente de permeabilidad osmotica (Lpd).

El Lpd fue calculado segun katchalsky y Curran (1965).

$$J_w = L_p * \Delta P + L_{pd} * \Delta \pi \quad (1)$$

donde J_w es el flujo de agua a traves de la piel, L_p es el coeficiente de permeabilidad hidraulica, ΔP el gradiente de presion hidrostatica y $\Delta \pi$ el gradiente osmotico a traves de la piel. $\Delta \pi = (O_i - O_e) * R * T$, donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta (293 grados Kelvin para todos los experimentos) y O_i y O_e la osmolaridad interna y externa respectivamente. Para todos los calculos se utilizo como valor de O_i 245 mOsm * Kg H₂O⁻¹.

De la ecuacion 1 se concluye:

$$L_{pd} = (J_w / \Delta \pi)$$

$$\Delta P = 0$$

J_w fue estimado de acuerdo a la formula utilizada por Jorgensen (1950):

$$J_w = C / 0.1 * S = C / 0.1 * 9 * PC^{2/3}$$

donde C es la captación de agua a través de la piel en $g \cdot h^{-1}$, S es la superficie corporal en cm^2 y PC el peso corporal en gramos. El factor de corrección 0.1 que multiplica al valor de S fue introducido en los cálculos debido a que la absorción de agua a través de la piel se realiza en más de un 90% por la región pélvica cuya superficie es aproximadamente un 10% de la superficie total del animal (McClanahan y Baldwin, 1969).

Determinaciones del flujo de agua a través de una preparación de piel aislada.

Los animales eran sacrificados por decapitación y posteriormente desmedulados. La piel de la región pélvica era rápidamente aislada obteniéndose una sección cuadrada de aproximadamente 4-5 cm de lado. Luego de 2 lavados en NaCl 115 mM la piel era montada a modo de diafragma entre dos hemisféricas de acrílico translúcido. El área expuesta al fluido que llenaba las hemisféricas era de 7.01 cm^2 . La composición de la solución del lado seroso de la piel era en milimoles/Kg: NaCl 105, KCl 2.4, PO_4HNa_2 3.6, PO_4H_2Na 0.4, CaCl 0.5 y glucosa 2 con una osmolaridad de 230 mOsm/Kg. Esta hemisférica recibió aireación en forma continua durante todo el experimento. La otra hemisférica era llenada con agua deionizada o con NaCl 23, 46, 69, 92 o 115 mM. El sistema se dejó estabilizar durante 30 minutos determinándose posteriormente el flujo de agua durante una hora a intervalos de 10 minutos mediante un capilar graduado en microlitros adosado a una de las hemisféricas.

Determinacion de la osmolaridad plasmatica.

Las determinaciones de osmolaridad plasmatica se realizaron en grupos de sapos intactos (n=6) e hipofisoprivos (n=6). Los animales fueron sometidos a la misma manipulacion (vaciado periodico de la vejiga) que se realizo en los experimentos de balance acuoso. Durante la primera hora los animales permanecieron en recipientes individuales que contenian agua deionizada. Al termino de la primera hora el agua fue reemplazada por NaCl 115 mM. Las muestras de sangre se extrajeron al final de la primera y de la segunda hora experimental a traves de una canula cronicamente implantada en la aorta dorsal (canulacion lateral).

El procedimiento seguido para la canulacion lateral de la aorta fue el siguiente (Lico, 1958). 24 horas antes del experimento los animales fueron anestesiados con tricainmetanosulfonato (MS222, Sigma) 3g/kg. Posteriormente, se practico una incision de unos 3 cm de largo en la piel del dorso, 1 cm a la izquierda del urostilo y desde la vertebra sacra hacia abajo divulsionandose luego los musculos coccigeo-iliacos hasta caer en el espacio retroperitoneal. Una vez ubicada la arteria aorta se realizo una insicion transversal en la pared de la misma unos 5 mm por encima de la bifurcacion de las arterias iliacas. A traves de la insicion se introdujeron aproximadamente 5 mm de un tubo de polietileno de 1 mm de diametro externo. El tubo se sujeto firmemente a la arteria con

una ligadura que tomo los labios anterior y posterior de la insiccion y , con otra ligadura a la piel. Se obtuvo de esta forma un desvio lateral de la arteria aorta que no impidio la circulacion a traves de la misma.

El volumen de sangre de las muestras vario entre 50 y 80 ul, lo que equivale a un 0.5-1 % de la volemia para un animal de 150 g. Las muestras fueron heparinizadas con Liquemine (Roche) 5000 U/ml a una concentracion final de 50 U/ml y posteriormente centrifugadas 15 minutos a 1000 X g. El volumen empleado para las mediciones de osmolaridad fue de 8 ul y las mismas se realizaron por duplicado en un osmometro de vapor marca Wescor 5120 C.

Analisis estadistico.

Los resultados se expresan como media +/- error standard de la media. En los experimentos "in vivo" la comparacion dentro de los grupos se realizo mediante el test de Student para mediciones apareadas o el analisis de la varianza de un factor para mediciones repetidas . En los experimentos "in vitro" se realizo el analisis de la varianza para la regresion lineal.

Resultados experimentales

Efectos del incremento de la osmolaridad del medio externo con sacarosa sobre el balance acuoso "in vivo".

En la primer serie de experimentos se estudiaron los efectos de la reduccion del gradiente osmotico mediante el agregado de soluciones de distinta concentracion de un soluto no permeable (sacarosa) sobre la captacion de agua a traves de la piel, la produccion de orina y el Lpd.

Los experimentos fueron realizados en grupos de animales intactos e hipofisoprivos con el proposito de determinar la participacion de hormonas neurohipofisarias en dichos cambios.

En el grupo de animales intactos, el incremento de la osmolaridad del medio externo con concentraciones de sacarosa mayores de 46 mM produjo un descenso significativo de la captacion de agua. Los valores de captacion medidos durante la reduccion del gradiente osmotico fueron (% del control en agua): 70.38 ($2P < 0.01$), 60.96 ($2P < 0.01$), 51.87 ($2P < 0.01$) y 42.07 ($2P < 0.001$) para concentraciones de sacarosa 92, 138, 184 y 220 mM respectivamente (figura 1). Ademias, con soluciones de sacarosa 184 y 220 mM se observo un aumento del Lpd de 2.08 ($2P < 0.001$) y 4.12 ($2P < 0.001$) veces respectivamente (figura 2).

Resultados semejantes se obtuvieron al repetir estos experimentos en animales hipofisoprivos. En este grupo la captacion de agua disminuyo (% del control en agua) a 69.26 ($2P < 0.10$), 69.35 ($2P < 0.01$), 43.75 ($2P < 0.001$) y 27.20 ($2P < 0.001$) para concentraciones de sacarosa 92, 138, 184 y 220 mM respectivamente (figura 3). Al igual que en el grupo de animales intactos, con soluciones de sacarosa 184 y 220 mM se observo un aumento en el Lpd de 1.75 ($2P < 0.01$) y 2.67 ($2P < 0.01$) veces

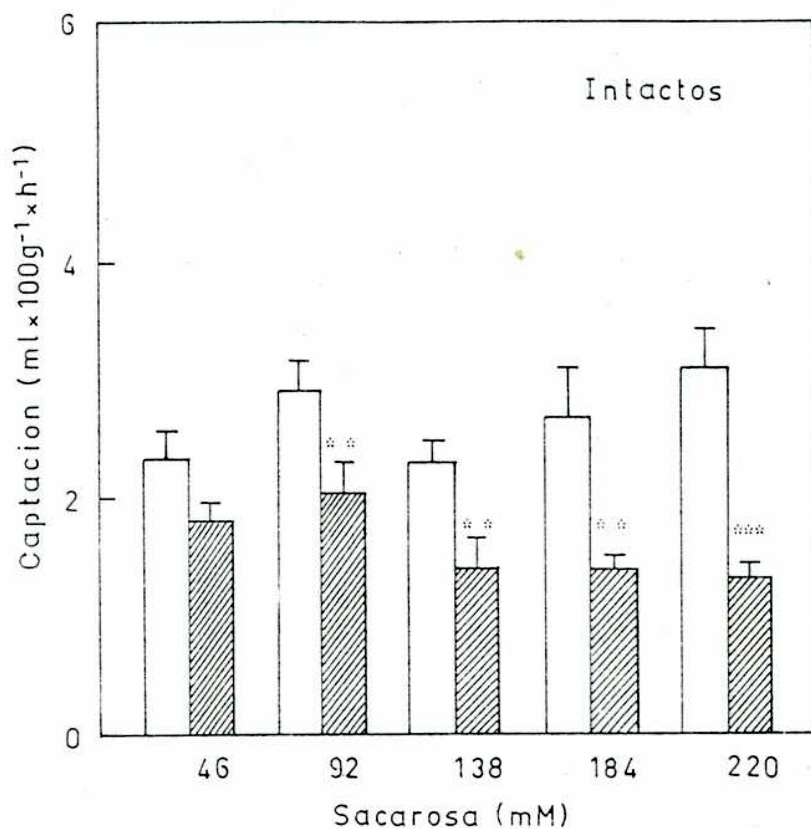


Figura 1: Cambios en la captacion de agua a traves de la piel en 5 grupos de sapos intactos sometidos la reduccion del gradiente osmotico transepitelial con sacarosa 46 mM (n=10), 92 mM (n=11), 138 mM (n=9), 184 mM (n=11) y 220 mM (n=7). Las columnas blancas corresponden al control en agua destilada mientras que las columnas rayadas al periodo de reduccion del gradiente. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

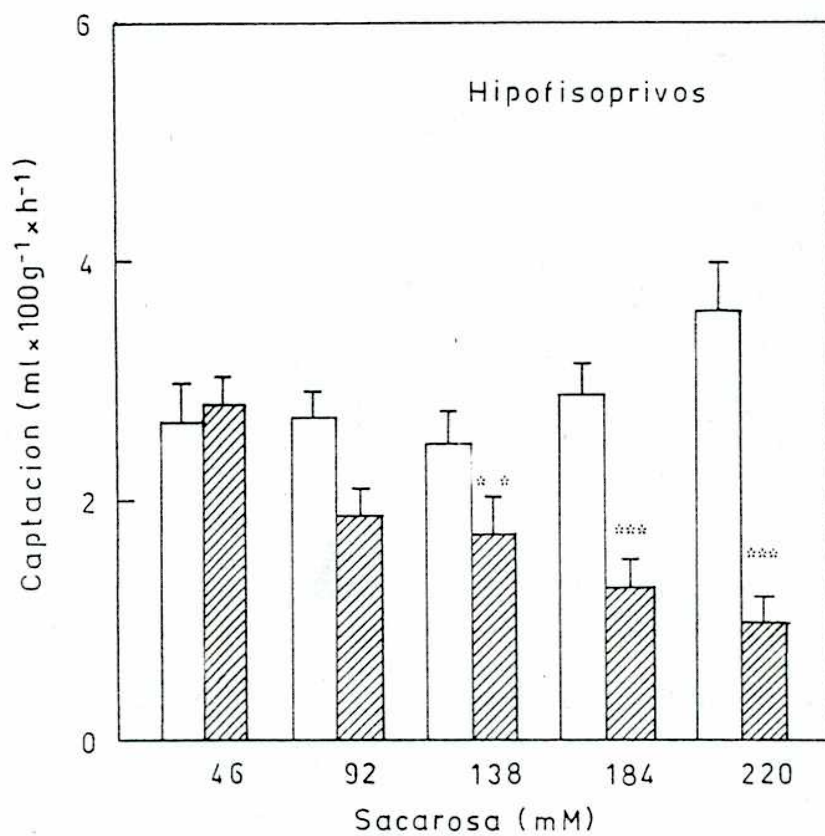


Figura 2: Cambios en la captacion de agua a traves de la piel en 5 grupos de sapos hipofisoprivos sometidos a la reduccion de gradiente osmotico con sacarosa. El numero de sujetos para cada grupo fue: 46 mM (n=11), 92 mM (n=6), 138 mM (n=10), 14 mM (n=9) y 220 mM (n=10). ** P<0.01, *** P<0.001.

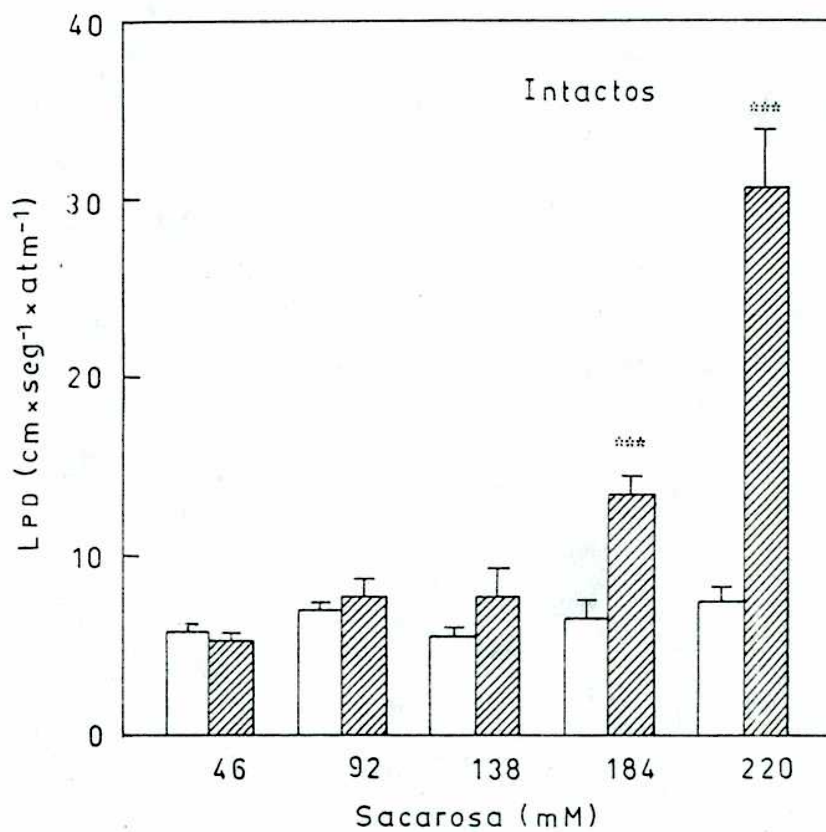


Figura 3: Cambios en el coeficiente de permeabilidad osmotica de la piel (Lpd) en 5 grupos de sapos intactos sometidos a reduccion del gradiente osmotico con sacarosa. *** $P < 0.001$.

respectivamente (figura 4).

Efectos del incremento de la osmolaridad del medio externo con NaCl sobre el balance acuoso "in vivo".

En estos experimentos se estudiaron los efectos de la reduccion del gradiente osmotico con NaCl sobre la captacion de agua, produccion de orina y Lpd.

Los experimentos fueron realizados en grupos de sapos intactos e hipofisoprivos.

A diferencia de los resultados obtenidos con sacarosa, la reduccion del gradiente osmotico con NaCl 23, 46, 69 y 92 no produjo un descenso de la captacion de agua a traves de la piel en el grupo de animales intactos (tabla I).

El reemplazo del agua deionizada por NaCl 115 mM (lo que equivale a un gradiente osmotico de 15 miliosmoles) tampoco estuvo asociado a una reduccion de la captacion de agua a traves de la piel tanto en el grupo de sapos intactos ($2P < 0.30$) como en el grupo de sapos hipofisoprivos ($2P < 0.20$) (figura 5). Sin embargo, la reduccion del gradiente osmotico con NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida 0.25 mM produjo un claro descenso de la captacion de agua para ambos grupos. La captacion de agua disminuyo (% del control en agua) al 52.82 ($2P < 0.001$) y 41.87 ($2P < 0.01$) en los grupos intactos e hipofisoprivos respectivamente (figura 6). Ademas, durante la reduccion del gradiente osmotico con NaCl 115 mM + amilorida se observo un drastico aumento del Lpd. Este aumento estuvo presente en ambos

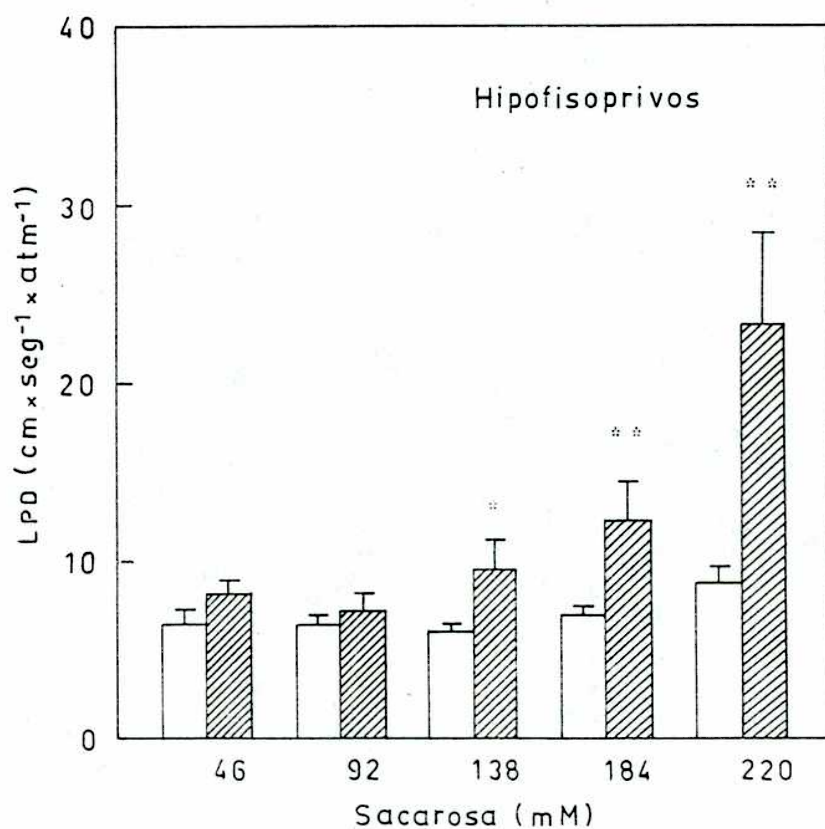


Figura 4: Cambios en el Lpd en 5 grupos de sapos hipofisoprivos sometidos a reduccion del gradiente osmotico con sacarosa. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Grupo Experimental	Captacion (ml/100g*h)	N	t	P
Control:	2.77 +/- 0.49			
NaCl 23 mM:	3.63 +/- 0.50	6	2.66	0.05
Control:	1.78 +/- 0.22			
NaCl 46 mM:	1.57 +/- 0.43	6	0.39	n.s.
Control:	2.54 +/- 0.30			
NaCl 69 mM:	2.58 +/- 0.25	12	0.20	n.s.
Control:	2.37 +/- 0.27			
NaCl 92 mM:	3.26 +/- 0.69	6	1.08	n.s.
Control:	3.14 +/- 0.32			
NaCl 115 mM	3.53 +/- 0.16	18	1.15	n.s.

Tabla I: Captacion de agua a traves de la piel de 5 grupos de animales mantenidos en agua destilada (control) y posteriormente sometidos a la reduccion del gradiente osmotico transepitelial con distintas concentraciones de NaCl.

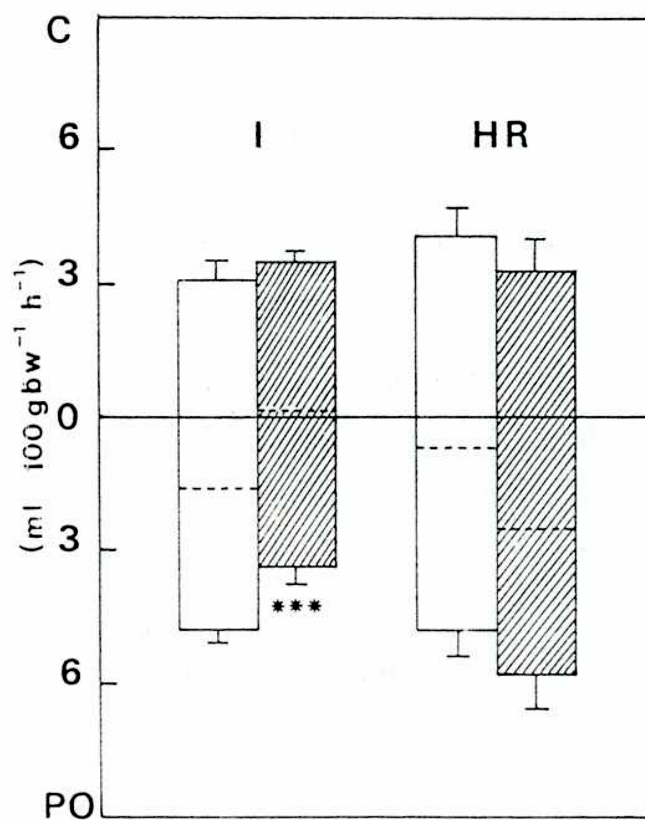


Figura 5: Cambios en la captación de agua a través de la piel (C) y en la producción de orina (PO) de un grupo de sapos intactos (I) $n=18$ o hipofisoprivos (HR) $n=6$. Las barras blancas corresponden a los valores control (agua destilada) de C y PO mientras que las barras rayadas corresponden a los valores luego del reemplazo del agua destilada por NaCl 115 mM. *** $P<0.001$.

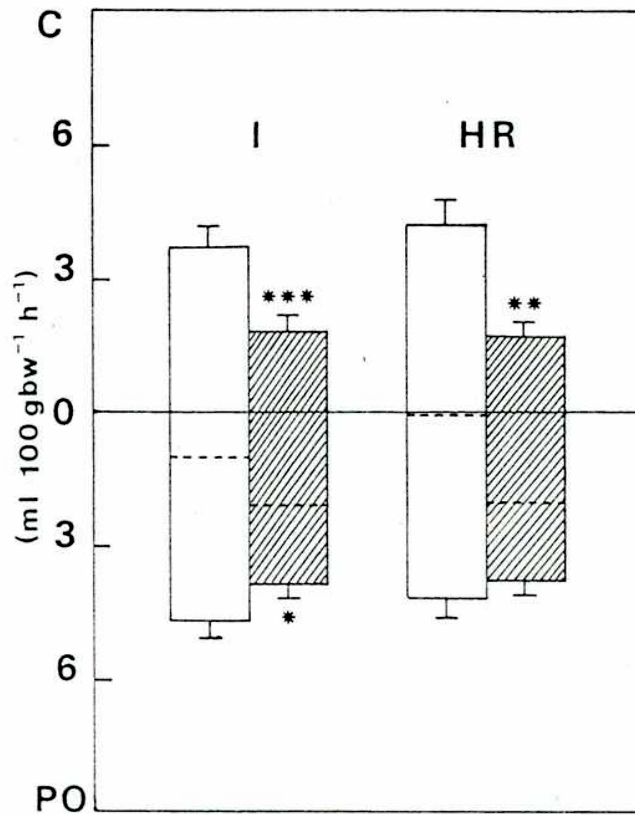


Figura 6: Cambios en la captación de agua a través de la piel y en la producción de orina en sapos intactos (n=12) o hipofisoprivos (n=6). Las barras blancas corresponden los valores control (agua destilada) y las barras rayadas a los valores luego del reemplazo del agua por NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida 0.25 mM (bloqueo del transporte de sodio). ** P<0.01, *** P<0.001.

grupos, y fue de 8.61 veces ($2P < 0.001$) para los sapos intactos y 6.83 veces ($2P < 0.001$) para los hipofisoprivos (figura 7).

Con relacion a la produccion de orina, durante la reduccion del gradiente osmotico con NaCl 115 mM se observo una disminucion del 27.58% ($2P < 0.001$) en el grupo de animales intactos. Este descenso no fue observado en el grupo de animales hipofisoprivos ($2P < 0.20$) (figura 5). Resultados similares se obtuvieron con la reduccion del gradiente osmotico mediante NaCl 115 mM + amilorida (figura 6). El grupo de animales intactos presento una antidiuresis del 18.05% ($2P < 0.001$) mientras que el grupo de animales hipofisectomizados no presento variaciones significativas ($2P < 0.50$).

La reduccion del gradiente osmotico con NaCl 115 mM no produjo cambios significativos de la osmolaridad plasmatica en el grupo de animales intactos. Al final de la primera hora (control en agua) la osmolaridad plasmatica fue de 242.7 ± 4.41 miliosmoles/kg mientras que al final de la segunda hora fue de 246.69 ± 4.04 miliosmoles/kg. En el grupo hipofisoprivo los valores obtenidos fueron 175.42 ± 7.50 y 209.75 ± 6.33 miliosmoles/kg respectivamente ($P < 0.001$).

Efectos del incremento de la osmolaridad del medio externo con NaCl "in vitro".

El flujo de agua a traves de una preparacion de piel aislada disminuyo significativamente al reducir el gradiente osmotico transepitelial ($F_{5,20} = 8.27$, $P < 0.001$). El analisis de la

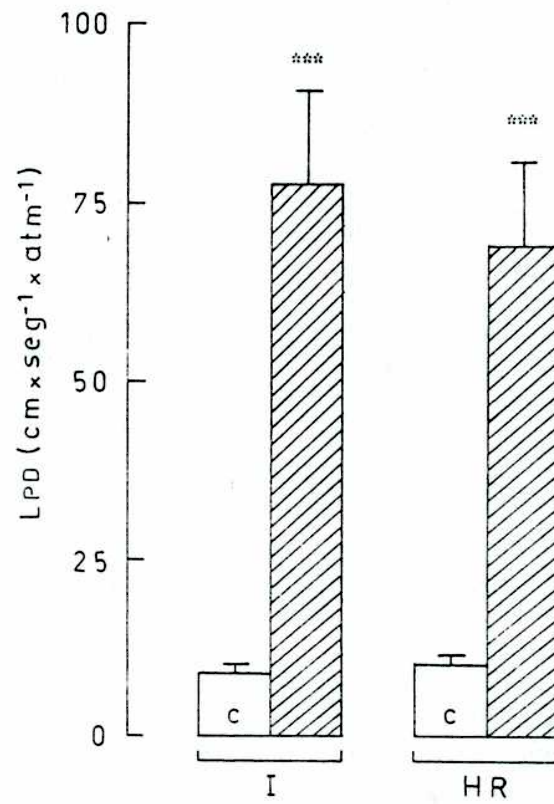


Figura 7: Modificación del Lpd durante el experimento de reducción del gradiente osmótico con NaCl + Amilorida. I: grupo de sapos intactos, HR: grupo hipofisoprivo, c control en agua.

*** $P < 0.001$.

varianza para la regresion lineal permitio interpretar los cambios de la variable independiente (flujo de agua) en funcion de la variable dependiente (concentracion del medio externo) ($F_{1,4} = 31.86$, $P < 0.01$) no siendo estadisticamente significativos los desvios de la regresion ($F_{4,20} = 1.15$). La relacion obtenida entre ambas variables fue:

$$J = 2.85 - (0.00949 * C)$$

donde J es el flujo de agua a traves de la piel en $\text{ul/cm}^2 \cdot \text{h}$ y C es la concentracion en miliosmoles del medio externo (figura 8).

Discusion

Los resultados presentados anteriormente son consistentes con la hipotesis del desarrollo de rapidos cambios del flujo natriferico, Lpd y produccion de orina producidos por la reduccion del gradiente osmotico transepitelial. El aumento del flujo natriferico y del Lpd se produce con independendencia del sistema hipotalamo-neurohipofisario mientras que la reduccion de la produccion de orina depende de la integridad del mismo. Estas modificaciones de la permeabilidad al agua y al sodio se producen en ausencia de modificaciones apreciables del medio interno.

Los resultados obtenidos muestran que la reduccion del gradiente osmotico mediante el aumento de la osmolaridad del medio externo con soluciones de un soluto no permeable (sacarosa) produce un descenso del flujo hidrosmotico de agua a

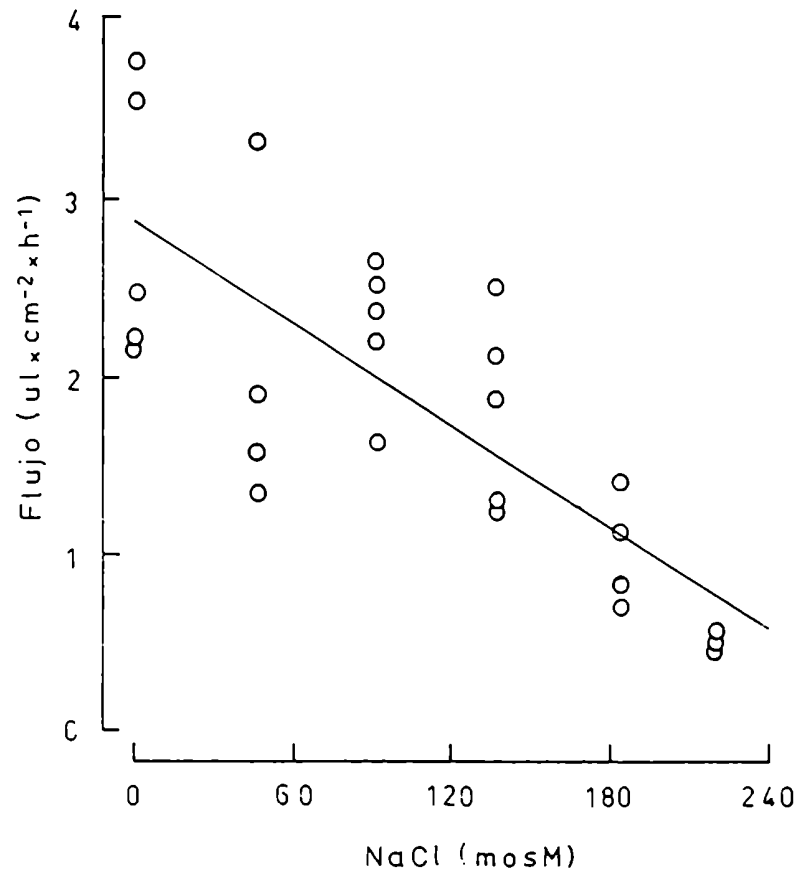


Figura 8: Variaciones del flujo de agua a través de la piel "in vitro" en función de la concentración (en miliosmoles/kg) de NaCl del lado mucoso.

traves de la piel en animales intactos e hipofisectomizados. Sin embargo este descenso no es proporcional a la reduccion del gradiente osmotico a traves de la piel para osmolaridades externas de 184 y 220 miliosmoles/kg observandose bajo estas condiciones un marcado aumento del Lpd. En forma semejante, durante la reduccion del gradiente osmotico con NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida 0.25 mM tambien produce un drastico incremento del Lpd. La diferencia entre las magnitudes de dichos aumentos segun se utilice sacarosa o NaCl + amiloride puede deberse a distintas causas. En primer termino el bloqueo de los canales o sitios de transporte de sodio puede ser incompleto con las concentraciones de amilorida utilizadas. En esta situacion los valores de captacion de agua medidos corresponderian a la suma de los flujos hidrosmotico y natriferico, obteniendose como resultado una sobreestimacion de los valores de Lpd. Sin embargo la concentracion de clorhidrato de amilorida utilizada en todos los experimentos estuvo un orden de magnitud por sobre las concentraciones que producen un bloqueo completo del flujo de sodio. Alternativamente, la piel de anfibios pudo ser mas sensible a la estimulacion con soluciones de NaCl que con soluciones de sacarosa obteniendose respuestas de mayor intensidad (este punto sera discutido con mas detalle en el capitulo V).

El desarrollo de un flujo natriferico subsiguiente a la reduccion del gradiente osmotico con NaCl esta respaldado por varias evidencias. La captacion de agua no disminuye significativamente cuando el agua del medio externo es

reemplazada con NaCl 23, 46, 69, 92 y 115 mM como sería esperable para el caso de un flujo exclusivamente hidrosmotico. Por otra parte, el bloqueo del flujo de sodio por el agregado de clorhidrato de amilorida reduce la captacion de agua, resultado consistente con la hipotesis del desarrollo de un flujo natriferico. Este flujo, al igual que el incremento del Lpd se produce con independencia de la integridad del sistema productor de AVT.

Una evidencia adicional del aumento del Lpd y del desarrollo de un flujo natriferico durante la reduccion del gradiente osmotico con NaCl es el resultado obtenido al restituir el gradiente osmotico original luego de la etapa de reduccion del mismo (figura 7). En esta situacion se observa un marcado aumento transitorio de la captacion de agua. Estos valores son significativamente mayores que los obtenidos en agua antes de la reduccion del gradiente osmotico y reflejan los cambios ocurridos durante la reduccion del mismo.

La posibilidad de que los cambios en el Lpd y en el flujo natriferico sean consecuencia de un cambio en las propiedades biofisicas de la piel ante la reduccion del gradiente osmotico transepitelial parece poco probable. En efecto, los experimentos realizados con una preparacion de piel aislada muestran resultados claramente distintos a los observados en el animal entero. En esta situacion, el flujo de agua disminuye en forma proporcional al gradiente osmotico. Por otra parte, la existencia de un descenso no lineal del flujo de agua (Celentano et al, 1978) o de un "efecto hidrosmotico salino" (Benedictis &

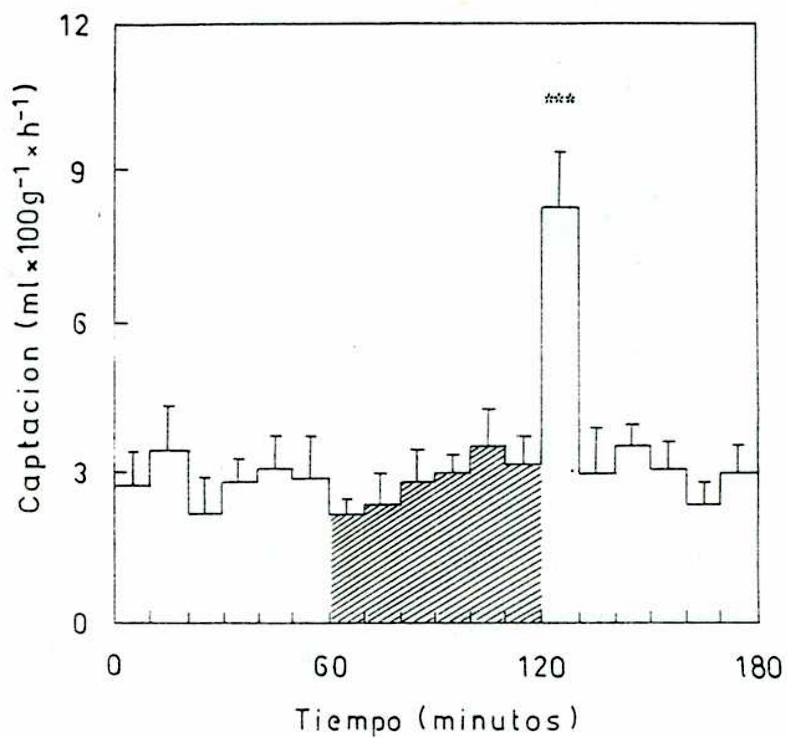


Figura 9: Evolucion de la captacion de agua a traves de la piel en un grupo de 6 sapos intactos. El medio externo fue durante los primeros 60 minutos agua destilada, entre los 60 y 120 minutos NaCl 115 mM (barras rayadas) y entre los 120 y 180 minutos agua destilada. *** $P < 0.001$.

Lacaz-Vieira, 1982) que modifique el Lpd no permiten explicar el mantenimiento de la captación de agua durante la reducción del gradiente osmótico con NaCl observada en el animal entero. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un control extraepitelial de la permeabilidad de la piel en el cual parece no estar involucrada AVT.

En relación con los cambios en la producción de orina un problema a tener en cuenta son aquellas disminuciones de la misma no asociadas a cambios en la captación de agua a través de la piel. Si asumimos que los animales durante el experimento se encuentran en estado estacionario, compensando la entrada osmótica de agua con la producción de orina, cualquier incremento o descenso en la captación de agua a través de la piel será compensado por un igual cambio en la producción de orina manteniéndose constante el balance acuoso. En tal sentido nos centraremos en aquellos cambios de la producción de orina no asociados a cambios de la captación de agua o lo que es igual aquellos cambios que resultan en modificaciones del balance acuoso. Una situación de este tipo es la que se presenta en el grupo de animales intactos sometidos a reducción del gradiente osmótico con NaCl. En este caso se observó un descenso significativo en la producción de orina subsiguiente a la reducción del gradiente osmótico. Este descenso está correlacionado con la integridad del sistema hipotálamo neurohipofisario para las concentraciones ensayadas.

Un problema que surge a partir de los resultados obtenidos es el del mecanismo de control involucrado en los cambios de Lpd,

flujo natriférico y producción de orina. Un mecanismo de realimentación negativa que actúe controlando el error de una variable interna (por ejemplo osmolaridad plasmática o volemia) parece no ser suficiente como explicación en este caso ya que la osmolaridad del plasma en el grupo de animales intactos no se modifica durante la reducción del gradiente osmótico con NaCl 115 mM. Con respecto al grupo de animales hipofisoprivos si bien se produce un aumento de la osmolaridad plasmática durante la reducción del gradiente osmótico debe tenerse en cuenta que este grupo a pesar de tener un tratamiento sustitutivo de ACTH, probablemente no posee un normal funcionamiento de su glándula adrenal resultando en una menor secreción de aldosterona y una incapacidad de reabsorción de sodio a través del tubo colector y del medio externo. En tal situación, la oferta de altas concentraciones de sodio externo durante el experimento y el déficit original de sodio que presentaban los animales puede explicar el aumento observado. Por otra parte, en este grupo, los valores de osmolaridad plasmática durante la reducción del gradiente osmótico fueron menores que los valores "homeostáticos" de la especie por lo cual no sería esperable que los cambios observados resultasen de un mecanismo de realimentación negativa. También resulta poco probable que durante los experimentos se produjese un descenso del volumen sanguíneo. El procedimiento utilizado para determinar captación de agua y producción de orina en animales mantenidos en agua destilada resulta en un balance acuoso negativo con el consiguiente descenso del peso corporal durante

el experimento (Segura et al, 1982a). Sin embargo se observan diferencias significativas de la variación del peso corporal entre grupos control (mantenidos en agua durante las dos horas) y los distintos grupos experimentales. Este resultado nos permite descartar la disminución del peso corporal (y su posible vinculación con un descenso de la volemia) como la causa de los cambios observados.

La hipótesis alternativa a un control realimentado es la de un control antealimentado. Un control antealimentado de la ingesta de líquidos ha sido descrito en anguilas transferidas de agua dulce a agua de mar (Hirano, 1974). Si bien los anfibios anuros no beben, captan agua a través de la piel y como discutiremos más adelante el control de la permeabilidad de la piel puede analogarse al control de la ingesta de líquidos de otros grupos de vertebrados. La hipótesis de respuestas antealimentadas en la permeabilidad de la piel y el tubo colector requiere de la capacidad de detectar cambios en el medio externo, procesar dicha información y producir una respuesta. Respecto a la capacidad de detectar cambios en el medio externo, en el capítulo V se presentan evidencias acerca de la existencia de una sensibilidad de la piel de *Bufo arenarum* a soluciones osmóticamente activas. Con relación a la vía eferente, es decir la vía por la cual se produce la respuesta, en el capítulo II se discutió la insuficiencia de los mecanismos neurohipofisarios para explicar los cambios en la permeabilidad de los epitelios así como la participación del sistema nervioso autónomo en dichos cambios. Los resultados obtenidos plantean la posibilidad

de una mediación nerviosa en los cambios de la permeabilidad de la piel y de una mediación neurohipofisaria en los cambios en la permeabilidad del tubo colector.

Capitulo IV

Efectos de AVT, AII, catecolaminas y de la osmolaridad del medio externo sobre la respuesta hidrosmotica.

Introduccion

La mayoria de los anfibios terrestres no ingieren agua por la boca (Bentley, 1966) y en su lugar captan agua a traves de la piel (Dole, 1967; McClanahan & Baldwin, 1969; Fair, 1970; Christensen, 1974; 1975; Tracy, 1976; 1978). La deshidratacion, con el consecuente aumento de la osmolaridad plasmatica (Shoemaker, 1964) produce la denominada respuesta hidrosmotica o del balance acuoso consistente en un descenso de la produccion de orina y un drastico aumento de la captacion de agua a traves de la piel (Shoemaker, 1965; Bentley, 1971; Christensen, 1974; Bakker & Bradshaw, 1977; Yokota & Hillman, 1984). La participacion de la hormona antidiuretica de los anfibios arginina vasotocina en estos cambios es controvertida. Asi, la destruccion del sistema productor de la hormona reduce la magnitud de la respuesta hidrosmotica (Shoemaker & Waring, 1968; Bakker & Bradshaw, 1977). Sin embargo, la remocion de la hipofisis (Shoemaker & Waring, 1968) o la seccion del tracto preoptico neurohipofisario asi como lesiones de la region preoptica o de la neurohipofisis (Jorgensen et al, 1969;

Christensen & Jorgensen, 1972) no modifican la velocidad de rehidratación de sapos deshidratados, mientras que lesiones en la pars distalis reducen la magnitud de la respuesta hidrosmótica (Christensen & Jorgensen, 1972).

Además, mecanismos alternativos a AVT actúan modificando la permeabilidad de la piel al agua. La administración de agonistas adrenérgicos produce cambios en la captación de agua "in vivo" (Elliott, 1968a; Hillyard, 1979; Segura et al 1982a; 1982b; 1984; Yokota & Hillman, 1984) e "in vitro" (Jard et al, 1968; Bastide & Jard, 1968; DeSouza & Grosso, 1982; Gamundi et al, 1984).

Por otra parte, a pesar que los anfibios no beben, el proceso de captación de agua a través de la piel en un anfibio deshidratado, puede analogarse a la ingesta de líquidos de las restantes clases de vertebrados. En tal sentido, dicho comportamiento es caracterizado tanto por la cantidad de líquido ingerido como por la tasa a la cual es ingerido, y puede ser representado como una curva de ingesta acumulada o curva de saciedad. Las curvas de saciedad son generalmente una función negativamente acelerada en el tiempo, siendo la forma exponencial predicha tanto por hipótesis causales (McFarland & McFarland, 1968) como funcionales (Sibly & McFarland, 1976; McCleery, 1977; McFarland & Houston, 1981).

El flujo de agua a través de la piel en anfibios posee un componente hidrosmótico y otro natriférico (DeSouza & Grosso, 1981) siendo el primero de ellos dependiente del gradiente osmótico transepitelial (Bentley, 1957; Dicker & Elliot, 1968).

Debido a que la deshidratación aumenta la osmolaridad del medio interno y que durante la rehidratación este parámetro decrece hasta retornar a los valores homeostáticos (245 miliosmoles/kg), el descenso de la tasa de captación de agua durante la rehidratación (Christensen, 1974) que produce una desaceleración de la ingesta acumulada puede ser simplemente el resultado de la reducción del gradiente osmótico transepitelial. Una hipótesis alternativa es que el descenso de la tasa de captación de agua durante la rehidratación sea producido tanto por la reducción del gradiente osmótico como por la modificación de la permeabilidad de la piel. En este caso resulta importante esclarecer la participación relativa de AVT, AII y catecolaminas en dicho cambio.

En este capítulo se estudiará la evolución temporal de la osmolaridad interna, captación de agua y permeabilidad hidrosmótica de la piel durante la rehidratación y la participación de AVT, AII y catecolaminas en dicho proceso. Asimismo se estudiará el efecto de la osmolaridad del medio externo sobre la velocidad de rehidratación.

Materiales y métodos

Deshidratación y rehidratación de los animales.

Antes de proceder a su deshidratación, el peso estándar de cada animal se determinó de la siguiente forma (Ruibal, 1962).

Los sapos eran mantenidos durante 24 horas en recipientes individuales de plástico opaco (15 x 15 x 10 cm) que contenían 150 ml de agua deionizada. Posteriormente, el peso del animal con su vejiga vacía se determinaba a intervalos de 15 minutos hasta que la variación del peso entre dos mediciones sucesivas era menor del 1%. Este valor fue tomado como el peso estándar (100%) y utilizado en los cálculos subsiguientes.

Los sapos eran deshidratados en jaulas individuales abiertas en un ambiente con buena ventilación a una temperatura de 23 C. Bajo estas condiciones los animales perdían aproximadamente un 10% de su peso corporal cada 24 horas. Una vez alcanzado el 80% del peso estándar cada animal era transferido a un recipiente cerrado donde se lo mantenía sin variaciones apreciables del peso corporal hasta el comienzo del correspondiente experimento. Todos los experimentos fueron realizados entre 48 y 72 horas después del inicio de la deshidratación.

Los animales eran rehidratados en recipientes individuales durante 3 horas (experimentos 1 y 3) o 1 hora (experimento 2). El peso corporal se determinaba a intervalos de 15 minutos mediante una balanza Ohaus Dial-O-Gram con una precisión de 100 mg.

Los sapos deshidratados raramente orinan durante las primeras 3 horas de rehidratación de tal forma que el aumento de peso corporal para un dado intervalo de tiempo es equivalente a la captación de agua en gramos durante dicho periodo. En aquellos casos en que un animal disminuyó de peso entre dos mediciones sucesivas, este fue excluido en el posterior análisis de los

datos.

Tratamientos experimentales.

Experimento 1.

Los animales fueron rehidratados durante 3 horas utilizandose como medio externo 150 ml de agua deionizada (n=10).

Se determino la captacion de agua a traves de la piel (ml/100 gramos de peso corporal * hora), la captacion acumulada de agua (ml/100g de peso corporal), la osmolaridad del plasma (miliosmoles/kg) y la permeabilidad de la interfase medio interno - medio externo (captacion de agua por unidad de gradiente osmotico = P). Este parametro es equivalente al Lpd multiplicado por una constante. La eleccion de P en vez del Lpd se debio a que este ultimo es un indice de la permeabilidad osmotica del epitelio y no contempla la variacion de la perfusion vascular del parche pelvico durante la rehidratacion (Mahany & Parsons, 1979).

Experimento 2.

Se estudiaron los efectos de AVT, AII y catecolaminas sobre los cambios en la respuesta hidrosmotica. La rehidratacion (1 hora) se realizo en agua deionizada y los animales fueron inyectados 10 minutos antes del inicio de la rehidratacion con: NaCl 115 mM (grupo control, n=6).

Arginina Vasotocina (Arg 8 Vasotocin, Sigma) 10 ug/kg (n=5).

Angiotensina II (Val 5 Angiotensin II, Sigma) 10ug/kg (n=6).

Salarasina (Sar 1, Ala 8 Angiotensin II, Sigma), 100 ug/kg (n=6).

Metaraminol (Aramine, Parke-Davis) 5mg/kg (n=6).

Tolazolina (Tolazoline, Sigma) 5 mg/kg (n=6).

Isoproterenol (Sigma) 5 mg/kg (n=6).

Propranolol (Sigma) 2.5 mg/kg (n=5).

Las drogas fueron disueltas en NaCl 115 mM y administradas a traves del sacc linfatico dorsal en un volumen de 1ml/kg de peso corporal.

Experimento 3.

Se estudio el efecto de la osmolaridad del medio externo sobre la velocidad de rehidratacion.

Los animales fueron deshidratados a un 80% de su peso estandard y posteriormente rehidratados en recipientes que contenian 150 ml de:

Agua deionizada (n=10).

NaCl 115 mM (n=12).

NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida (Merk Sharp & Dome) 1 mM (n=6).

Sacarosa 230 mM (n=6).

En los 4 grupos experimentales se determino la evolucion del peso durante las 3 primeras horas de rehidratacion.

Determinacion de la osmolaridad plasmatica

Con el objeto de estudiar la relacion entre la osmolaridad plasmatica y el grado de deshidratacion se tomaron muestras de sangre de 20 animales no anestesiados sometidos a distintos porcentajes de deshidratacion (0-20%). Las muestras fueron recogidas a traves de un tubo de polietileno (1 mm de diametro externo) colocado en la arteria aorta dorsal anteriormente a la bifurcacion de las iliacas (canulacion lateral). El volumen de sangre extraido (50-100 ul) fue heparinizado mediante el agregado de Lique mine (Roche) 5000 U/ml a una concentracion final de 50 U/ml y posteriormente centrifugado 15 minutos a 1000 x g. La osmolaridad del plasma fue determinada por duplicado mediante un osmometro de presion de vapor Wescor 5120 C.

Analisis estadistico.

Para determinar la relacion entre la osmolaridad del plasma y el porcentaje de deshidratacion se realizo el analisis de la regresion para una funcion lineal. En el experimento 1 se realizo el analisis de la varianza de un factor para mediciones repetidas y posteriormente el analisis de la regresion para una funcion exponencial. En el experimento 2 se realizo el analisis de la varianza de un factor para muestras independientes y posteriormente los contrastes entre los distintos tratamientos y el control mediante el test de Dunnett. En el experimento 3 se realizo el analisis de la varianza de 2 factores para mediciones

repetidas y posteriormente comparaciones apareadas.

Resultados

Efecto de la deshidratación sobre la osmolaridad plasmática.

La osmolaridad plasmática de sapos sometidos a deshidratación aumento en forma proporcional al porcentaje de deshidratación (figura 1). La relación obtenida fue:

$$O_1 = a + b * D$$

donde O_1 = osmolaridad plasmática en miliosmoles/kg, D = % de deshidratación (respecto al peso estándar) y a y b son constantes. La constante $a = 246.12$ miliosmoles/kg corresponde al valor homeostático de la osmolaridad plasmática mientras que la constante $b = 6.06$ relaciona el incremento en el porcentaje de deshidratación con el incremento de la osmolaridad plasmática. El coeficiente de regresión de esta función fue: $r^2 = 0.9225$.

Cambios en la captación de agua, osmolaridad plasmática y permeabilidad durante la rehidratación (experimento 1).

Se estudiaron los cambios en la captación de agua, captación acumulada de agua, osmolaridad del plasma y permeabilidad de la piel en un grupo de 10 sapos deshidratados a un $80.36 \pm 0.56\%$ de su peso estándar.

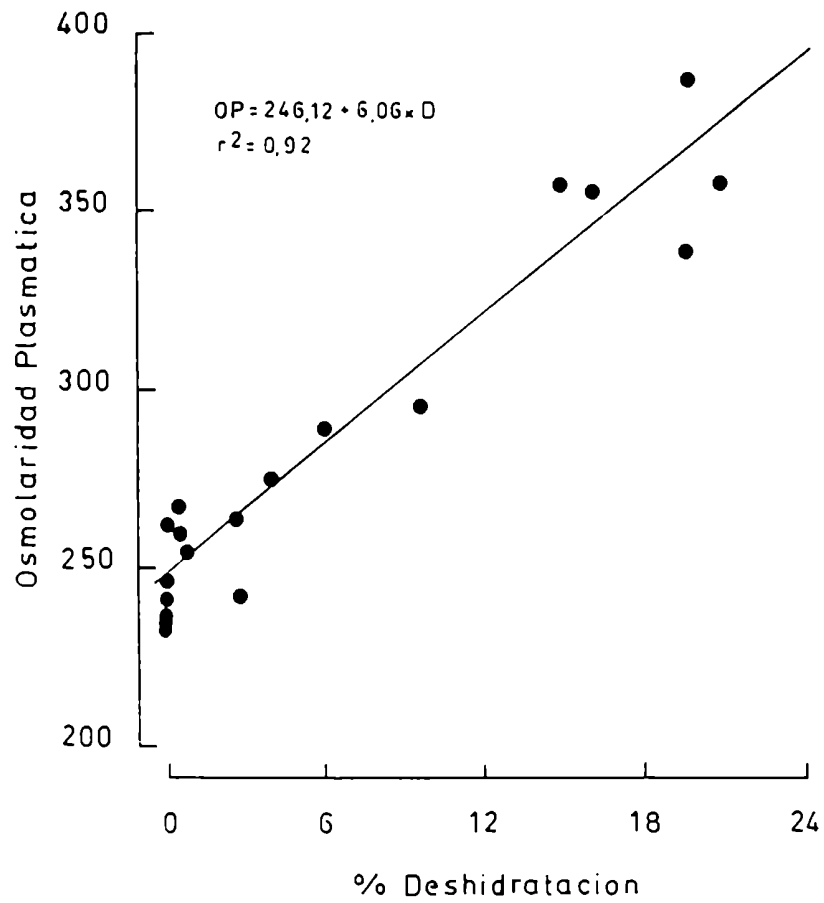


Figura 1: Variaciones de la osmolaridad plasmatica (miliosmoles/kg) en funcion de porcentaje de deshidratacion (respecto al peso estandard) de un grupo de 20 sapos no anestesiados.

La captación acumulada de agua durante la rehidratación fue una función negativamente acelerada en el tiempo (figura 2a). Durante las 3 primeras horas de rehidratación todos los animales compensaron el déficit inicial de agua. Luego de 180 minutos la captación acumulada de agua fue de 24.74 ± 1.41 ml/100g de peso corporal. Por su parte, la tasa de captación de agua (figura 2b) disminuyó significativamente durante la rehidratación ($F_{9,99} = 45.75$, $P < 0.001$). El valor inicial (15 minutos) del flujo de agua a través de la piel fue 18.56 ± 1.91 (ml/100g*h) mientras que a los 180 minutos fue 2.78 ± 0.33 (ml/100g*h). En forma semejante, durante la rehidratación, la osmolaridad del plasma (figura 2c) disminuyó de 365.20 ± 3.38 miliosmoles/kg (0 minutos) a 246.03 ± 1.03 miliosmoles/kg (180 minutos) ($F_{9,99} = 199.38$, $P < 0.001$).

Por otra parte, la captación de agua por unidad de gradiente osmótico disminuyó significativamente durante la rehidratación ($F_{9,99} = 28.63$, $P < 0.001$) (figura 2d). El valor al inicio de la rehidratación (15 minutos) fue $52.68 \pm 6.08 \times 10^{-3}$ mientras que a los 180 minutos fue $10.99 \pm 1.31 \times 10^{-3}$ (ml/100g*h*mOsm).

Efectos de AVT, AII y catecolaminas sobre la respuesta hidrosmótica (experimento 2).

La captación de agua durante la primer hora de rehidratación en los grupos inyectados sistémicamente con AVT (10ug/kg), AII (10ug/kg) o Salarasina (100 ug/kg) (figura 3) no difirió

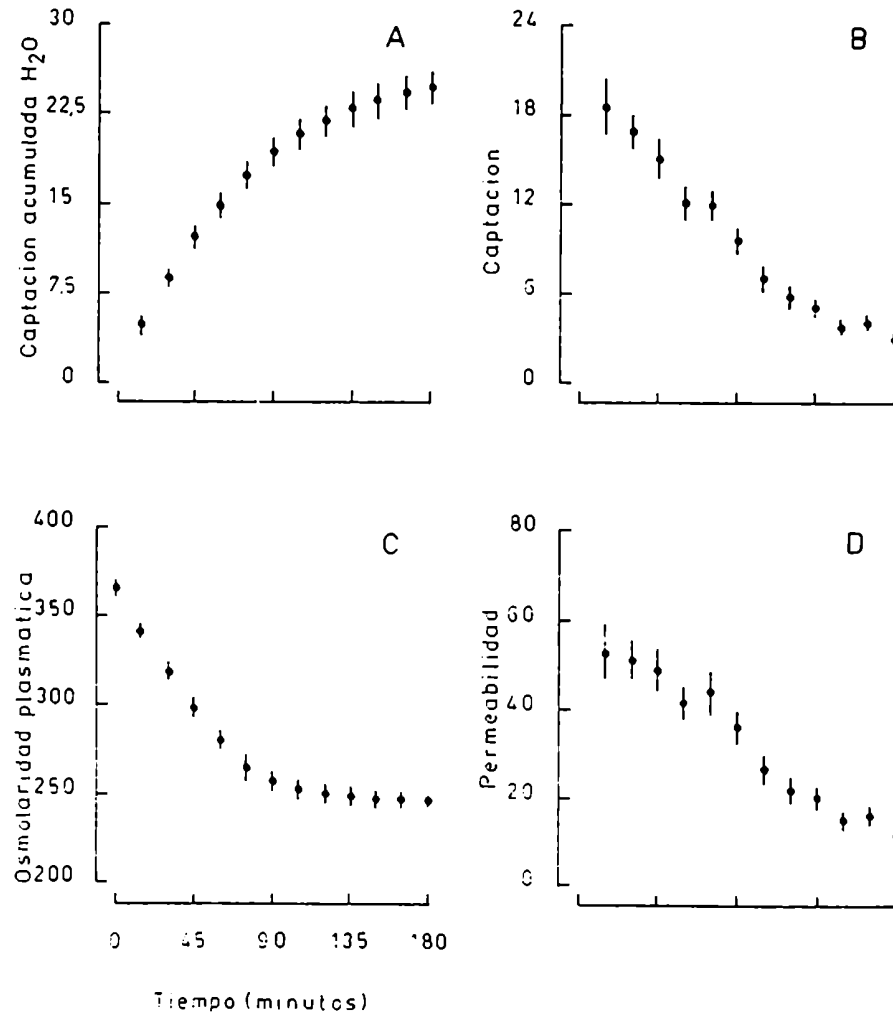


Figura 2: Evolucion de a) captacion acumulada de agua (ml/100g) b) captacion de agua (ml/100g*h), c) osmolaridad plasmatica (mOsmoles/kg) y d) permeabilidad de la interfase medio externo - medio interno (ml/100g*h*mOsmol) durante el proceso de rehidratacion (3 horas) en un grupo de 10 sapos. Osmolaridad del medio externo = 0 (agua deionizada).

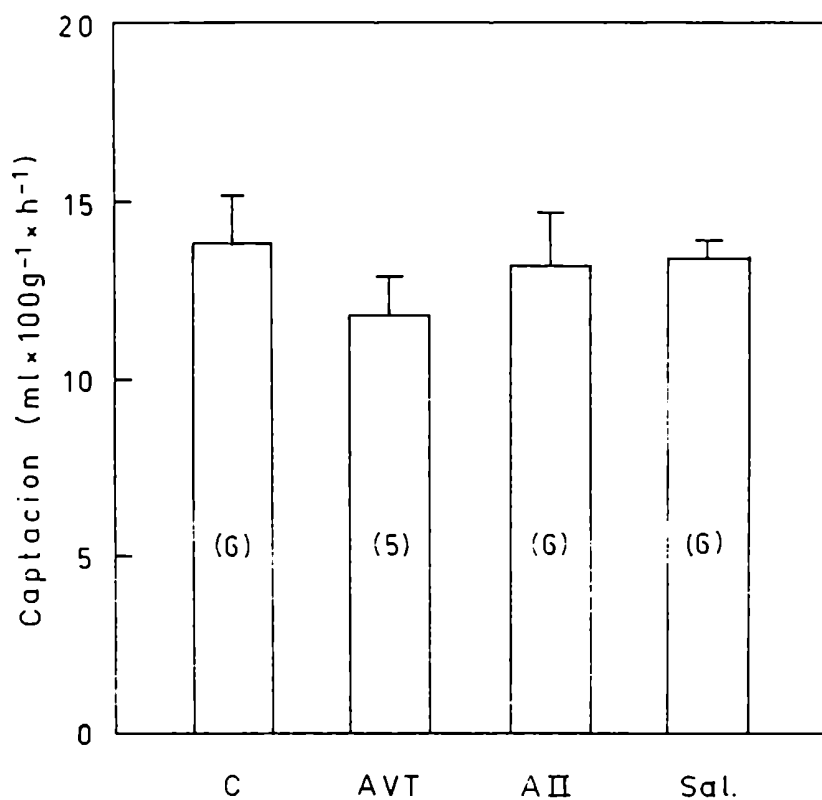


Figura 3: Captacion de agua a traves de la piel durante la primer hora de rehidratacion de 4 grupos de sapos ceshidratados al 80% de su peso estandard. Los grupos fueron inyectados 10 minutos antes del comienzo de la rehidratacion con C: NaCl 115 mM (control), AVT: Arginina vasotocina 10 ug/kg, AII: Angiotensina II 10 ug/kg y Sal: Salarasina 100 ug/kg.

significativamente del grupo control que recibió NaCl 115 mM ($F_{3,19} = 0.5385$).

Por otra parte, la administración sistémica de un agonista alfa adrenérgico (Metaraminol 5 mg/kg) o beta adrenérgico (Isoproterenol 5 mg/kg) así como con un bloqueante alfa adrenérgico (Tolazolina 5 mg/kg) tampoco produjo cambios significativos de la captación de agua (figura 4). Sin embargo la administración de un bloqueante beta adrenérgico (propranolol 2.5 mg/kg) redujo significativamente la captación de agua durante la primera hora de rehidratación. En este grupo el descenso de la captación de agua respecto del grupo control administrado con NaCl 115 mM fue del 61.94% ($P < 0.01$).

Efectos de la osmolaridad del medio externo sobre la captación de agua durante la rehidratación (experimento 3).

La captación acumulada de agua de un grupo de 12 sapos deshidratados a un 79.86 \pm 1.14 % de su peso estándar y rehidratados durante 3 horas en NaCl 115 mM no presentó diferencias significativas respecto al grupo control (peso estándar inicial 80.36 \pm 0.56) rehidratado en agua destilada (figura 5). El gradiente osmótico transepitelial al comienzo de la rehidratación fue de 138.23 miliosmoles/kg para el grupo rehidratado en NaCl 115 mM, mientras que para el grupo control rehidratado en agua fue de 365.19 miliosmoles/kg.

A diferencia de estos resultados, la captación acumulada de agua de un grupo de 6 animales (peso estándar al comienzo de la

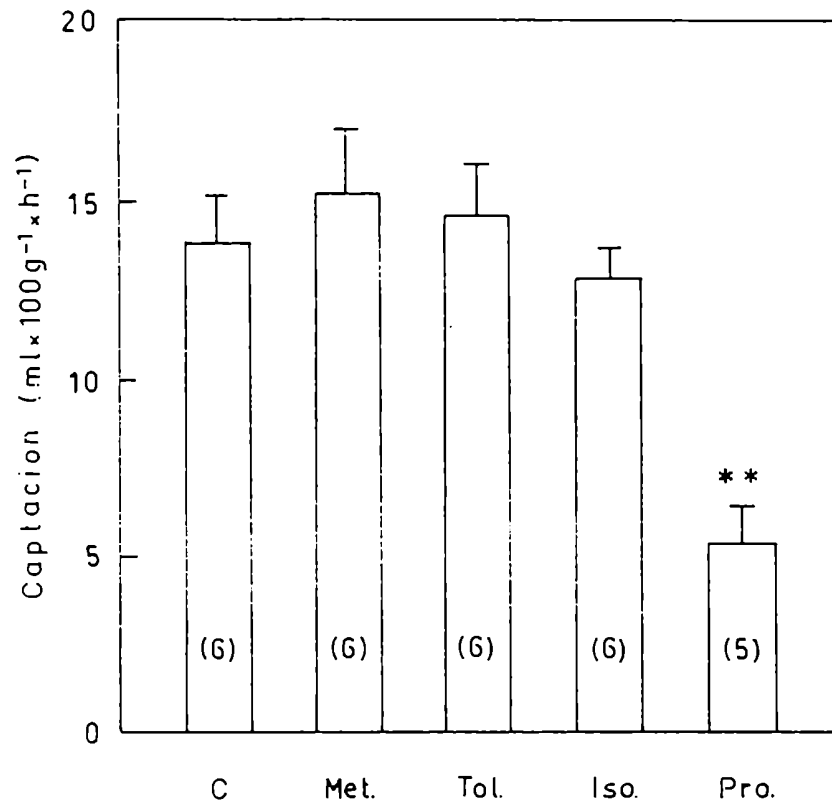


Figura 4: Cambios en la captacion de agua a traves de la piel durante la rehidratacion en 5 grupos de sapos deshidratados al 80% de su peso estandard. C: NaCl 115 mM, Met: Metaraminol 5 mg/kg, Tol: Tolazolina 5 mg/kg, Iso: Isoproterenol 5 mg/kg y Pro: propranolol 2.5 mg/kg. ** P<0.01.

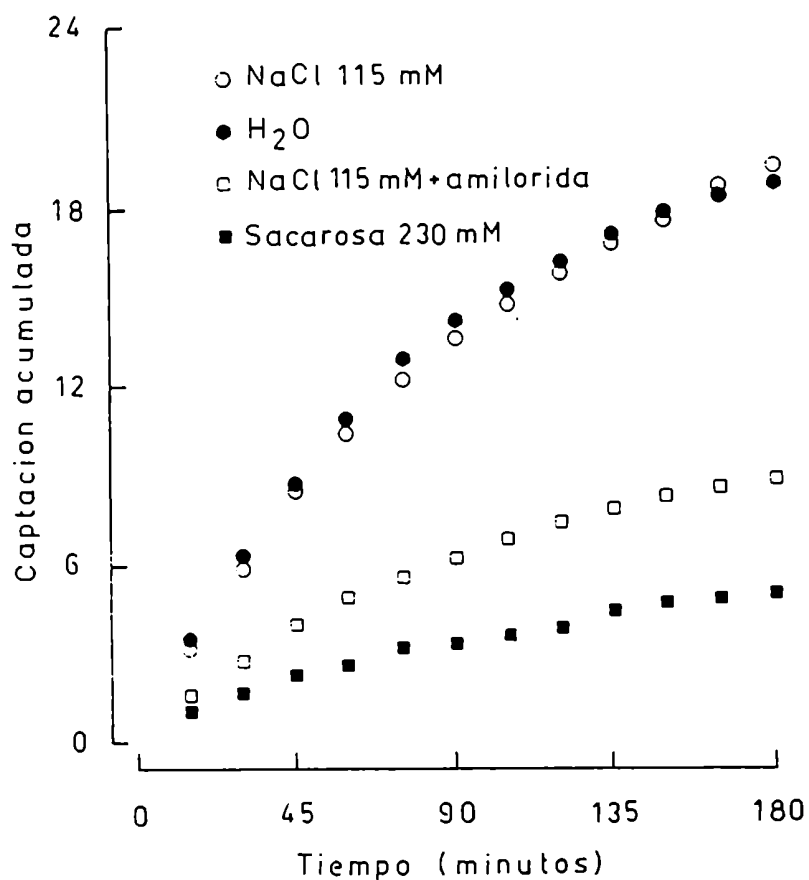


Figura 5: Captacion acumulada de agua (ml/100g) en funcion del tiempo de rehidratacion. Los animales fueron rehidratados en NaCl 115 mM (n=12), agua destilada (n=10), NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida 1 mM (n=6) y sacarosa 230 mM (n=6).

rehidratacion = 80.64 ± 0.33) rehidratados en NaCl 115 mM + clorhidrato de amilorida 1 mM, fue significativamente menor, durante toda la rehidratacion que la de los grupos control y NaCl 115 mM. El gradiente osmotico transepitelial del grupo NaCl 115 + Amilorida fue al comienzo de la rehidratacion de 133.50 miliosmoles/kg. Resultados semejantes a los del grupo precedente se obtuvieron con un grupo de 6 animales rehidratados en sacarosa 230 mM. En este grupo el peso estandard al inicio de la rehidratacion fue del 81.17 ± 0.76 % y el gradiente osmotico transepitelial de 130.28 miliosmoles/kg.

Discussion

Los resultados presentados anteriormente muestran que la tasa de captacion de agua durante la rehidratacion depende del flujo hidrosmotico y natriferico de agua y de la permeabilidad de la interfase medio interno-externo. Esta ultima variable esta bajo control del sistema beta adrenergico y covaria con la osmolaridad del medio interno.

La relacion entre el flujo hidrosmotico de agua y el gradiente osmotico transepitelial resulta evidente al comparar los resultados obtenidos en los grupos rehidratados en agua destilada y en sacarosa 230 mM. Sin embargo, la presencia de un flujo de agua proporcional al gradiente osmotico transepitelial no explica los resultados obtenidos en el grupo rehidratado en NaCl 115 mM.

Una hipotesis alternativa a un flujo exclusivamente hidrosmotico es la presencia de un flujo natriferico de agua durante la rehidratacion en un medio con oferta de Na^+ . Esta hipotesis esta respaldada por varias evidencias. En primer lugar, la captacion de agua a traves de la piel no difiere entre animales rehidratados en agua o en NaCl 115 mM a pesar de existir una marcada diferencia en el gradiente osmotico transepitelial entre ambos grupos. Ademias, la captacion de agua de animales rehidratados en NaCl 115 cae drasticamente al bloquear los canales de Na^+ mediante el agregado de clornidrato de amilorida al medio.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en animales hidratados sometidos a una reduccion del gradiente osmotico (capitulo III) y sugieren que *Bufo arenarum* posee la capacidad de recurrir a un flujo natriferico de agua en condiciones de gradiente osmotico reducido.

Por otra parte, la reduccion en aproximadamente un 25% del gradiente osmotico transepitelial durante la rehidratacion resulta insuficiente para explicar un descenso del 85% en la captacion de agua a traves de la piel. Esta observacion resulta evidente al calcularse la captacion de agua por unidad de gradiente osmotico, cociente que disminuye aproximadamente un 75% durante la rehidratacion.

Las variaciones en la permeabilidad de la interfase medio interno - medio externo durante la rehidratacion plantean el interrogante acerca de cual es el mecanismo de control actuante.

Los resultados obtenidos con AVT y AII sugieren que estas

hormonas no participarían de dicho control. La posibilidad de un control adrenergico de la permeabilidad de la piel fue discutida precedentemente en el capítulo II y los resultados obtenidos en el presente capítulo son consistentes con dicha hipótesis. El incremento de la permeabilidad de sapos hidratados por la administración del agonista beta adrenergico isoproterenol (capítulo II) tuvo su contraparte al observarse una reducción de la misma en animales deshidratados por acción de un bloqueante beta adrenergico (propranolol). Este resultado es el esperado para el caso de un control beta adrenergico de la permeabilidad ya que en animales deshidratados la estimulación beta adrenergica endogena sería máxima, mientras que en animales hidratados esta sería mínima.

Los resultados obtenidos no excluyen la posibilidad que los cambios en la captación de agua sean producto de una acción beta adrenergica sobre la vasculatura del parche pélvico. En tal sentido, los cambios observados pueden ser el resultado de una reducción del Lpd y/o de cambios en la perfusión vascular del parche pélvico (Mahany & Parsons, 1979) a través del cual los anfibios captan agua el 90% del agua (McClanahan & Baldwin, 1969). Por tal motivo en el presente capítulo se optó por definir un parámetro equivalente a captación de agua por unidad de gradiente osmótico en vez de utilizar el Lpd. Este cociente es un índice de la permeabilidad de la interfase entre el medio interno y el medio externo y contempla tanto los cambios en la permeabilidad de la epidermis como los cambios circulatorios producidos durante la rehidratación.

Un ultimo punto a discutir es si los cambios en la permeabilidad son funcion de alguna variable del medio interno. En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos en el grupo de animales rehidratados en agua graficandose la permeabilidad en funcion del peso estandard. Se observa una correlacion entre ambos parametros que sugiere una posible relacion funcional entre ambas variables. Dicha relacion predice con un buen ajuste la captacion de agua de animales sometidos a distintos porcentajes de deshidratacion rehidratandose en medios de concentraciones variables.

Estos resultados sugieren que la permeabilidad de la interfase medio interno medio externo seria una funcion del error del medio interno (osmolaridad plasmatica), modulada por el sistema beta adrenergico. La variacion continua de la permeabilidad de la interfase medio interno medio externo durante la rehidratacion constituye otra evidencia indirecta que apoyaria, por la rapidez de dicho ajuste, la participacion de mecanismos neurogenicos.

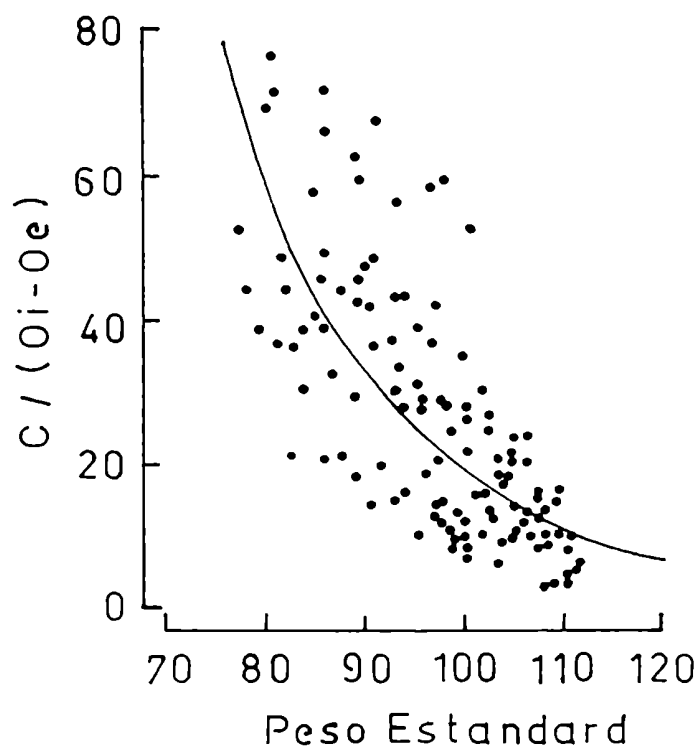


Figura 6: Variación de la permeabilidad de la interfase medio interno - medio externo ($\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mOsmol}$) en función del peso estándar (100 = animales totalmente hidratados con la vejiga vacía). El análisis de la regresión para los valores presentados en el gráfico presenta un mejor ajuste ($r^2=0.56$) a la siguiente función: $Y = 6706.1 * e (-0.059 * X)$, donde Y es la permeabilidad de la interfase y X es el peso estándar.

Capitulo V

Sensibilidad cutanea a soluciones de electrolitos.

Introduccion.

Los receptores cutaneos y sus fibras nerviosas aferentes constituyen una via espacialmente organizada para informar al sistema nervioso central acerca de la naturaleza de los fenomenos que ocurren en, o sobre la piel.

En la piel de anfibios anuros se ha demostrado la existencia de mecanorreceptores (Catton, 1958; 1976), termorreceptores (Spray, 1974; 1976) y nociceptores (Adrian, 1926; 1931; 1932; Hogg, 1935; Maruhashi et al, 1952; Dodt, 1954; Catton, 1958; Spray, 1976).

En relacion con la quimiorrepcion, esta sensibilidad se encuentra ampliamente desarrollada en la cavidad bucal de los anfibios (Sato, 1976) y en la piel de peces (Katsuki, 1969; Atama, 1971). Sin embargo, solo se ha reportado un caso en la piel de anfibios que involucra al organo de la linea lateral de *Xenopus laevis*. Esta especie detecta la concentracion salina del medio externo, siendo sensible a soluciones de NaCl, KCl, CaCl₂ y Na-Glutamato y a la remocion o lavado de las mismas con agua destilada (Onoda et al, 1970). No se conoce hasta el presente la existencia de quimiorreceptores en la piel de anfibios anuros de

vida adulta terrestre.

Teniendo en cuenta que en los anfibios el flujo hidrosmotico depende del gradiente osmotico entre el medio interno y el medio externo y que el flujo natriferico depende de la presencia de sodio en el medio externo resultaria adaptativo para estas especies poseer la capacidad de discriminar la presencia de sodio y/o la concentracion osmotica en el medio externo.

Por otra parte, como se discutió anteriormente, los cambios en la permeabilidad de la piel de *Bufo arenarum* desencadenados por cambios de la concentracion del medio externo y en ausencia de variaciones del medio interno (capitulo III) requieren la presencia de algun mecanismo de deteccion de dicho cambio.

El objetivo del presente capitulo sera estudiar la capacidad de deteccion de cambios en la concentracion de electrolitos del medio externo por la piel del anfibio anuro *Bufo arenarum*.

.

Materiales y metodos

Animales

Se utilizaron sapos machos de la especie *Bufo arenarum* que pesaban entre 100 y 150 gramos. Los animales fueron mantenidos durante las dos semanas previas a los experimentos en jaulas de 30 X 20 X 20 cm con libre acceso a una fuente de agua. Durante este periodo recibieron alimentacion forzada una vez por semana.

Experimentos "in vivo".

Se estudiaron las variaciones en el tiempo de latencia del reflejo flexor de los miembros posteriores de sapos descerebrados ante la estimulación con distintas concentraciones de soluciones de NaCl.

La lesión cerebral se realizó mediante un trocar, penetrándose al espacio raquídeo a la altura de la región cervical y destruyéndose posteriormente el cerebro anterior y medio. Luego de la lesión los animales fueron dejados en reposo durante 60 minutos, (tiempo de recuperación del "shock" espinal).

Durante el experimento los animales permanecieron suspendidos por la región anterior del cráneo. La estimulación de la pata se realizó descendiendo al animal e introduciendo la misma en un recipiente que contenía agua destilada o soluciones de distinta concentración de NaCl. Cada pata fue sumergida, previamente a la estimulación con NaCl, en agua destilada durante 45 segundos. En ninguno de los casos se observó la retracción del miembro posterior ante este procedimiento o en forma espontánea. A continuación se reemplazó el agua destilada por la correspondiente solución de NaCl. Cada animal fue sometido a 10 ensayos para cada concentración, probándose en forma alternada la pata izquierda y la derecha. Los ensayos en los que no se observó la respuesta durante los 45 segundos de estimulación fueron considerados negativos. Inmediatamente después de la retracción del miembro o luego de 45 segundos de estimulación para los ensayos negativos la solución de NaCl fue nuevamente

reemplazada por agua destilada. Cada animal fue ensayado con soluciones de NaCl 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 molar.

La temperatura ambiente así como la de las soluciones empleadas fue en todos los experimentos de 20°C.

Analisis estadístico.

Los resultados se expresan como tiempo de latencia (segundos) del reflejo flexor del miembro estimulado. La comparación entre las distintas concentraciones se realizó a través del análisis de la varianza de un factor para mediciones repetidas. A su vez, para determinar la relación entre la variable dependiente y la independiente se realizó el análisis de la regresión para las funciones lineal, logarítmica y exponencial.

Experimentos "in vitro".

Se estudiaron los cambios en la frecuencia de potenciales de acción registrados en una preparación de piel aislada con su correspondiente inervación ante la estimulación con distintas concentraciones de soluciones de NaCl.

Los animales fueron sacrificados por destrucción del encefalo y medula. Posteriormente se procedió a disecar la rama cruris lateralis del nervio peroneal (figura 1) junto con un parche de piel de unos 10-15 cm² de la región postero-externa de la pata posterior. En algunos experimentos también se disecó la rama

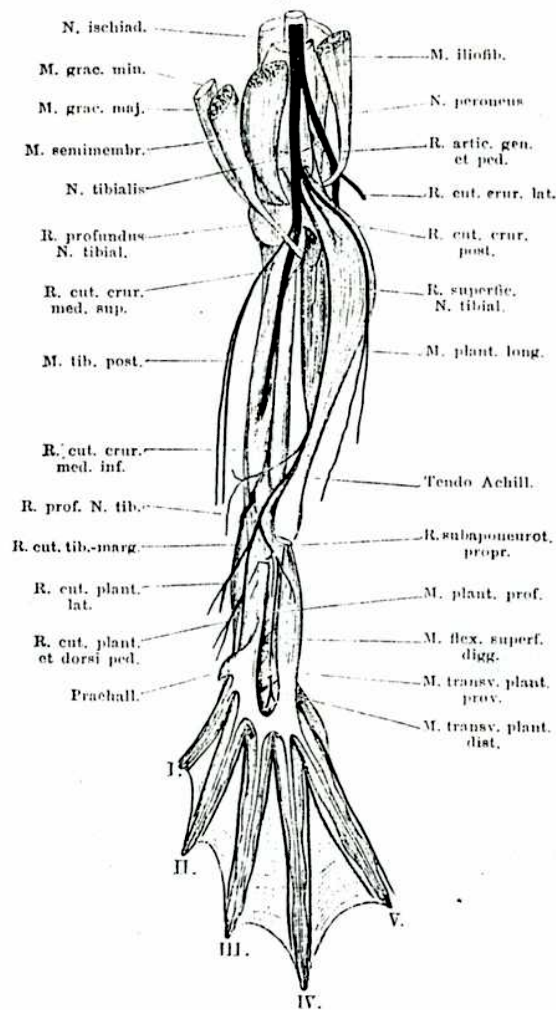


Figura 1: Esquema de la inervacion del miembro posterior de un anfibio anuro mostrando la rama cutanea cruris lateralis del nervio peroneal. Tomado de Anatomie des Froshes (Gaupp, 1896).

cutanea femoralis medialis con la porcion de piel inervada por esta. La diseccion del nervio se realizo bajo lupa binocular y se separo el paquete vascular que acompaña al nervio asi como el perineuro que lo recubre. La preparacion de piel y nervio ya aislada fue lavada 2 veces en solucion Ringer de la siguiente composicion NaCl 115mM, KCl 2.4mM, PO_4HNa_2 3.6mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0.4mM, CaCl_2 0.5mM y glucosa 2mM e inmediatamente montada a modo de diafragma en un dispositivo de plexiglas. El nervio (aproximadamente 10-15 mm de largo) fue montado sobre un par de electrodos reversibles de Ag-AgCl de 0.4 mm de diametro y el conjunto fue cubierto con aceite mineral. El sistema soporte de la piel junto con el electrodo fueron colocados en un micromanipulador Leitz-Wetzlar con el cual se hizo descender la preparacion sobre una capsula de plexiglas de 25 mm de diametro y 20 mm de altura. La capsula fue llenada alternativamente con agua destilada o la solucion de NaCl a probar mediante dos jeringas de 10 ml conectadas a una llave de 3 vias.

La actividad electrica del nervio fue amplificada mediante un preamplificador Tektronix 122. La frecuencia de descargas del nervio fue cuantificada con un contador digital de pulsos. En todos los experimentos se realizo un registro directo de la actividad electrica mediante un osciloscopio Tektronix 5103 N y un poligrafo Grass modelo 7.

El procedimiento experimental seguido fue el siguiente. En primer lugar se determino la frecuencia de descargas del nervio al estimular la piel con agua destilada. Esta fase duro 45 segundos y la actividad electrica registrada fue tomada como

actividad basal de la preparacion (mecanoreceptores, receptores de dolor, termoreceptores). A continuacion, el agua destilada fue reemplazada por la solucion de NaCl a ensayar registrandose la actividad electrica durante 45 segundos. Finalmente la solucion de NaCl fue nuevamente reemplazada por agua destilada registrandose la actividad por otro periodo de 45 segundos. Este procedimiento fue repetido en la misma preparacion aproximadamente cada 15 minutos, ensayandose soluciones de NaCl 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1M. La preparacion de piel y nervio mantuvo la actividad electrica durante 3 - 4 horas, siendo durante dicho periodo sensible a estimulacion mecanica y termica.

La temperatura ambiente asi como la de las soluciones ensayadas fue en todos los casos de 20 C.

Analisis estadistico.

Se adopto la denominacion de respuesta "on" a la producida por la aplicacion de NaCl, y respuesta "off" a la producida por el lavado con agua destilada luego de la estimulacion con NaCl.

Para cuantificar la respuesta "on" se determino la frecuencia de descargas para intervalos de 5 segundos a partir del momento de la aplicacion del estimulo, tomandose el intervalo donde la frecuencia (descargas/segundo) fue mayor. En todos los casos la mayor frecuencia de descargas se produjo en el intervalo 5-10 o 10-15 segundos. Con relacion a la respuesta "off", debido a la menor duracion de la misma (4-5 segundos), se determino la frecuencia de descargas para intervalos de 1 segundo a partir

del momento de aplicacion del agua destilada. Al igual que para la respuesta "on" se tomo el intervalo de mayor frecuencia de descargas.

Los resultados se expresan como incremento de la actividad electrica basal (media +/- error standard de la media). La actividad electrica basal correspondio a la frecuencia de descargas registradas en el nervio al estimular el parche de piel con agua destilada a 20 C y el valor de la misma fue de 4.1 +/- 1.7 descargas/seg (media +/- desviacion standard, n=80). Este criterio fue adoptado debido a las diferencias de actividad electrica observadas entre preparaciones y dentro de una misma preparacion en el transcurso del experimento.

La relacion entre el incremento en la frecuencia de descargas y la concentracion del estimulo se determino mediante el analisis de la regresion para una funcion lineal, logaritmica y exponencial.

Resultados experimentales.

Experimentos "in vivo".

La estimulacion de la piel del miembro posterior con soluciones de NaCl 0.2 a 1 molar produjo la retraccion del mismo (respuesta "on"). La concentracion umbral a partir de la cual se observo la respuesta vario entre individuos. Los umbrales observados fueron 0.3M (n=1), 0.4 M (n=2), 0.5 M (n=4) y 0.6 M

(n=6). Por otra parte, la latencia de la respuesta para la concentracion umbral fue tambien variable entre animales obteniendose valores de 10.1 a 26.7 segundos.

El tiempo de latencia de la respuesta "on" disminuyo al aumentar la concentracion de la solucion de NaCl ($F_{5,30} = 14.09$, $P < 0.001$) (figura 2). Dicha disminucion presento un mejor ajuste a una funcion exponencial ($r^2 = 0.59$) que a una funcion lineal ($r^2 = 0.46$) o logaritmica ($r^2 = 0.50$). La relacion obtenida entre tiempo de latencia y concentracion de NaCl sobre la piel fue:

$$L = 41.31 * e^{-2.56 * C}$$

donde L es el tiempo de latencia en segundos del reflejo flexor del miembro estimulado y C es la concentracion molar de NaCl.

El lavado con agua destilada de la pata previamente estimulada con soluciones de NaCl produjo la retraccion de la misma (respuesta "off"). Esta respuesta tuvo tiempos de latencia menores de 2 segundos, su duracion fue de pocos segundos y la posterior aplicacion de agua destilada no logro evocarla. La respuesta "off" se presento incluso luego de estimular la pata con concentraciones subumbrales de NaCl. (tabla I). Los umbrales observados para la respuesta "off" fueron (concentracion de NaCl aplicada previamente al lavado) 0.2 M (n=2), 0.3 M (n=4) y 0.4 M (n=3).

Experimentos "in vitro".

La estimulacion de un parche de piel aislada con soluciones de

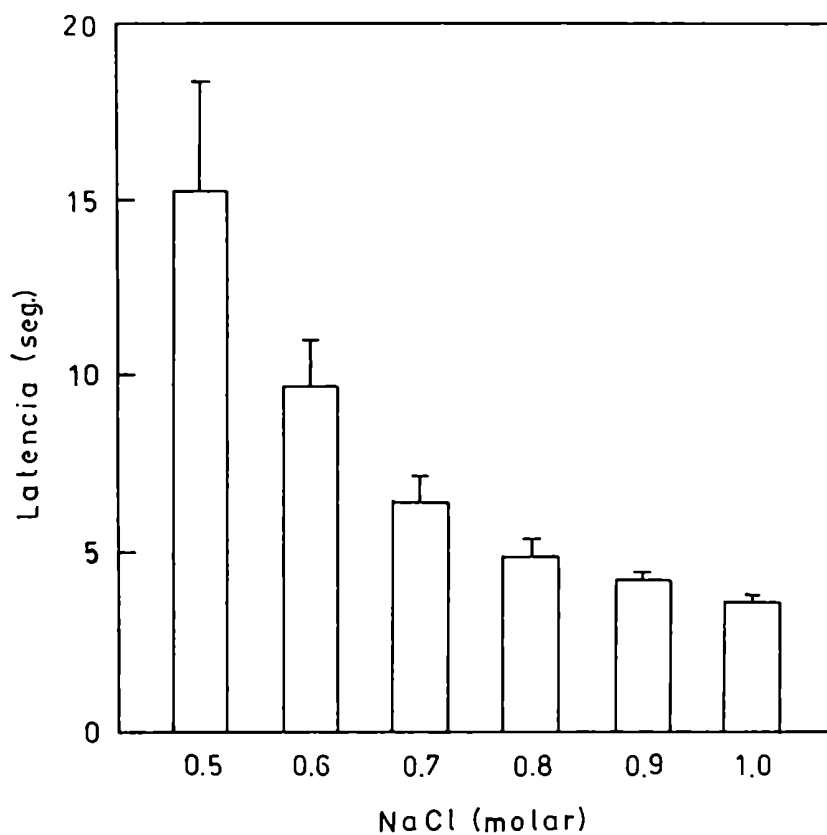


Figura 2: Tiempo de latencia en segundos del reflejo flexor del miembro posterior en función de la concentración del estímulo. Cada barra corresponde a la media \pm error standard de 8 animales. En abscisas concentración molar de NaCl.

NaCl	"on"	"off"
0.2	0/8	1/8
0.3	1/8	5/8
0.4	3/8	8/8
0.5	7/8	8/8
0.6	8/8	8/8
0.7	8/8	8/8
0.8	8/8	8/8
0.9	8/8	8/8
1.0	8/8	8/8

Tabla I: Concentraciones de NaCl y cantidad de animales que presentaron la respuesta "on" y "off" para cada concentracion. Los datos corresponden a los experimentos con animales descerebrados (in vivo).

distinta concentración de NaCl produjo un aumento en la frecuencia de descargas registradas en el nervio (respuesta "on"). El aumento de la frecuencia de descargas se presentó entre 2 y 4 segundos después de la aplicación del estímulo y alcanzó los valores máximos durante los primeros 15 segundos mostrando posteriormente una lenta acomodación sin retornar a los valores basales (figura 3). La menor concentración de NaCl que produjo un incremento significativo de la actividad eléctrica del nervio fue 0.4 M (2.2 veces la actividad basal), mientras que para concentraciones de NaCl 1 M se obtuvieron aumentos de la actividad eléctrica del nervio de 25.3 veces ($P < 0.001$). La intensidad de la respuesta "on" fue proporcional a la concentración de la solución con que se estimuló la piel (figura 4). El incremento de la frecuencia de descargas al aumentar la concentración de NaCl con que se estimuló la piel presentó un mejor ajuste a una función exponencial ($r^2 = 0.93$) que a una función lineal ($r^2 = 0.78$) o logarítmica ($r^2 = 0.62$). La relación obtenida fue:

$$I = 0.38 * e^{(4.23 * C)}$$

donde I es el incremento de la actividad eléctrica en el nervio luego de la estimulación con NaCl y C es la concentración molar de NaCl.

El lavado de la piel con agua destilada luego de la estimulación con soluciones de NaCl produjo un marcado aumento de la frecuencia de descargas en el nervio (respuesta "off"). Este aumento se produjo durante los primeros dos segundos posteriores al lavado con agua destilada y duró aproximadamente

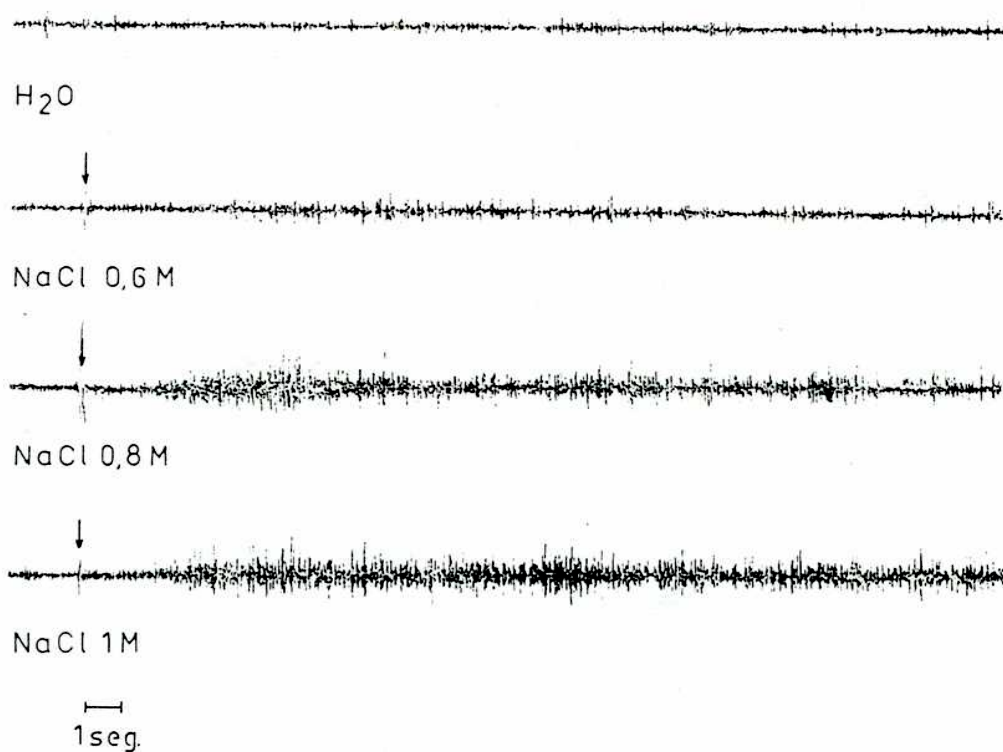


Figura 3: Registros poligraficos de la actividad electrica de la rama cutanea cruris lateralis del nervio peroneal durante la respuesta "on". a) Actividad electrica basal (estimulacion con agua destilada), b) $NaCl\ 0,6\ M$, c) $NaCl\ 0,8\ M$, d) $NaCl\ 1\ M$. Las flechas indican el momento de aplicacion del estimulo.

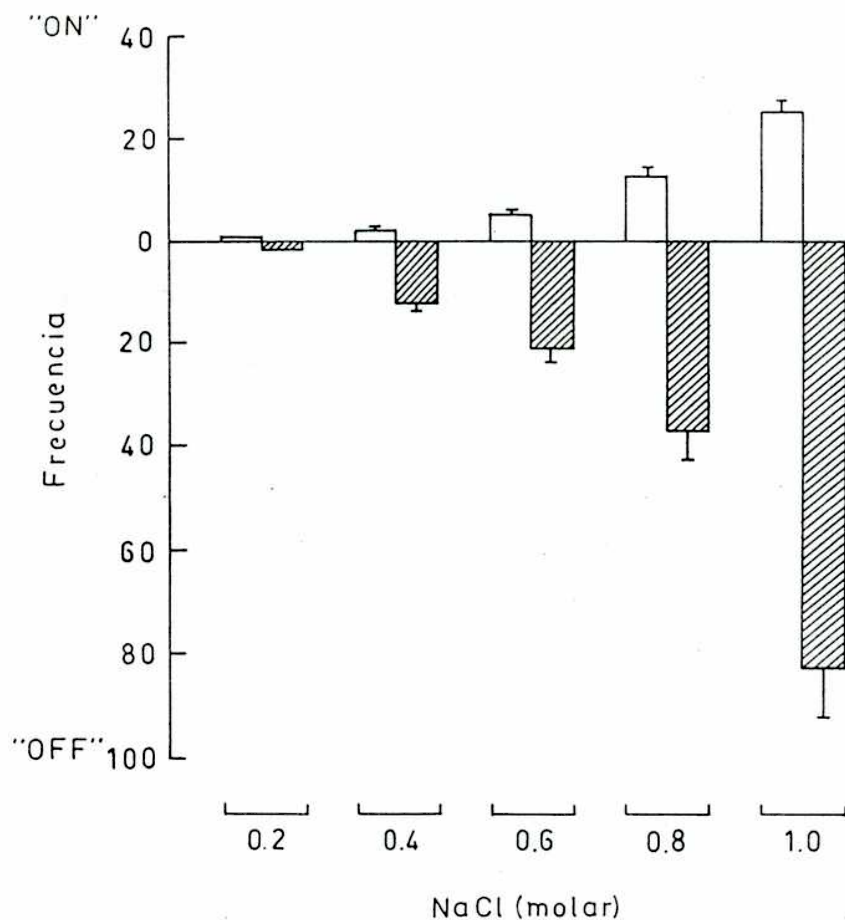


Figura 4: Frecuencia de descarga (espigas/seg) de la rama cutanea cruris lateralis al estimular la piel con soluciones de NaCl (parte superior del grafico) y al remover el NaCl (parte inferior del grafico). Los valores corresponden al cociente entre la frecuencia maxima de la respuesta (on o off) y la frecuencia basal (estimulacion con agua destilada previamente a la estimulacion con NaCl). Cada barra corresponde a la media +/- error estandard de 8 preparaciones.

5 segundos, mostrando una rapida acomodacion hasta volver a los valores basales (figura 5). El incremento de actividad electrica del nervio durante la respuesta "off", luego de la estimulacion con NaCl 0.4 M fue de 11.8 veces ($P < 0.001$). Por su parte, el aumento de la frecuencia basal al "lavar" NaCl 1 M fue de 82.8 veces ($P < 0.001$). La respuesta "off" fue proporcional a la concentracion de NaCl con que se estimulo previamente a la piel (figura IV 5) mostrando la relacion entre la variable dependiente y la independiente un mejor ajuste a una funcion exponencial ($r^2 = 0.85$) que a una funcion lineal ($r^2 = 0.71$) o logaritmica ($r^2 = 0.58$). La relacion obtenida fue:

$$I = 0.89 * e^{(4.69 * C)}$$

donde I es el incremento de la actividad electrica luego del lavado con agua destilada y C es la concentracion molar de NaCl con que se estimulo la piel previamente al lavado.

Discussion

Los resultados obtenidos tanto con animales descerebrados ("in vivo") como con una preparacion de piel aislada con su correspondiente inervacion ("in vitro") son consistentes con la hipotesis de la existencia de una sensibilidad cutanea a soluciones de electrolitos en *Bufo arenarum*.

La presencia de una sensibilidad cutanea esta avalada por varias evidencias. En primer lugar, la estimulacion de los miembros posteriores de sapos descerebrados con soluciones de

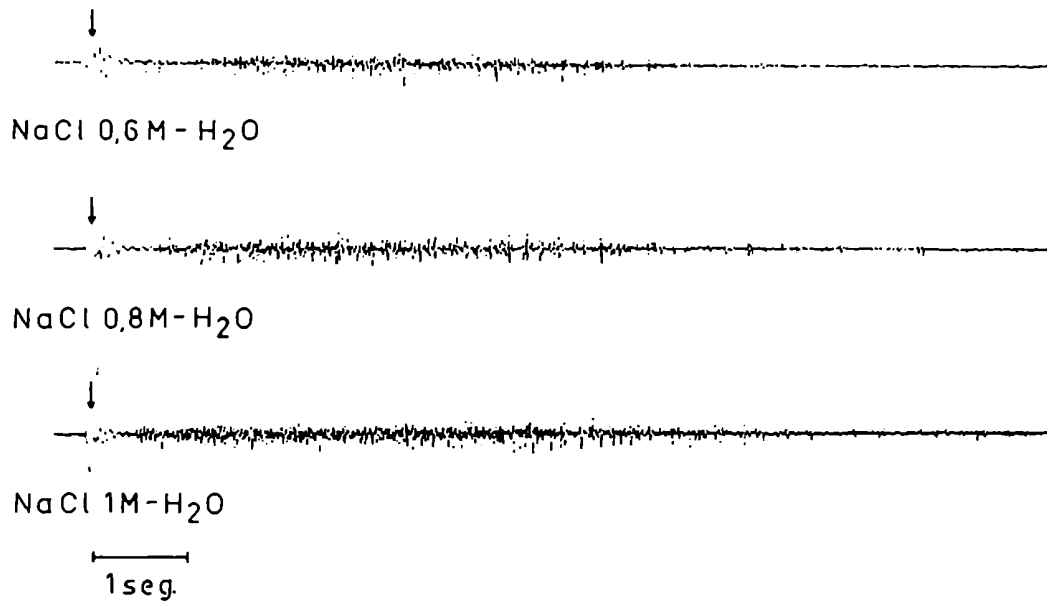


Figura 5: Registro poligrafico de la actividad electrica en la rama cutanea cruris lateralis del nervio peroneal durante la respuesta "off" luego de estimular la piel con a) NaCl 0.6 M, b) NaCl 0.8 M, c) NaCl 1 M. Las flechas indican el momento de la remocion del NaCl (lavado).

NaCl produce una respuesta flexora cuya latencia es función de la concentración del estímulo. Esta respuesta "in vivo" tiene su correlato neurofisiológico al observarse "in vitro" un incremento en la frecuencia de descargas que es proporcional a la concentración de NaCl. En forma semejante, la respuesta "off" que presentan los animales descerebrados, tiene su correlato neurofisiológico al observarse un aumento en la frecuencia de descargas "in vitro" al lavar con agua la piel previamente estimulada. La respuesta "off" en los experimentos "in vitro" es proporcional a la concentración de NaCl con que se estimula previamente la piel y, para todas las concentraciones ensayadas, el aumento de la frecuencia de descargas en la respuesta "off" es mayor que para la respuesta "on". Por último, la respuesta a la estimulación con NaCl y a la remoción del estímulo se registran en distintos nervios cutáneos (rama cutánea cruris lateralis del nervio peroneal, rama cutánea femoralis medialis) sugiriendo que dicha sensibilidad está distribuida ampliamente en la piel.

Respecto al estímulo adecuado que actúa sobre la piel, la estimulación con distintas sales que incluyeron, aniones y cationes mono y bivalentes (NaCl, KCl, LiCl, KI, CaCl₂, MgCl₂, SO₄Na₂ y SO₄Mg) y un catión orgánico (cloruro de colina) produjo respuestas "on" y "off" tanto "in vivo" como "in vitro" con umbrales de 0.4 - 0.6 molar. Sin embargo también se obtuvieron respuestas con urea (0.8 molar) y en algunos experimentos se observó una respuesta a altas concentraciones de sacarosa (1-2 molar). Estos resultados plantean el interrogante acerca de si

los quimiorreceptores descritos responden a cambios de la osmolaridad o de la concentracion de electrolitos del medio.

La existencia de una respuesta a la remocion del estimulo fue descrita previamente por Konishi (1966) en receptores palatales de la carpa (*Cyprinus carpio* L.) sensibles a soluciones hipotonicas de electrolitos y por Onoda et al (1970) en receptores cutaneos de *Xenopus laevis* sensibles a soluciones hipertonicas. Este ultimo ejemplo es el unico caso de quimiorrepcion cutanea descrito en anfibios e involucra al organo de la linea lateral. Los anfibios anuros de vida terrestre no conservan el organo de la linea lateral luego de la metamorfosis (Russell, 1976). Por tal motivo, la sensibilidad observada en *Bufo arenarum* a pesar de ser semejante a la descrita en *Xenopus laevis* en lo que refiere a estimulo adecuado y respuesta a la remocion del estimulo no involucraria las mismas estructuras.

En la epidermis de anfibios (generos *Bufo* y *Rana*) se han descrito terminaciones nerviosas amielinicas libres provenientes del plexo subepidermico que se ramifican profusamente en el stratum basale y en menor grado en el stratum granulosum (Whitear, 1955; 1974a; 1974b) y que se postula podrian ser elementos de transduccion de varios estímulos. Dichas terminaciones podrian constituir el sustrato morfologico de la sensibilidad descrita si bien esta seria una hipotesis a contrastar en futuros estudios.

VI. Conclusiones.

En el presente trabajo se ha estudiado el control del balance acuoso en el anfibio anuro *Bufo arenarum* bajo 3 situaciones experimentales: a) Sapos en estado estacionario de captación de agua y producción de orina sometidos a tratamientos farmacológicos con AVT, AII, catecolaminas y agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos, b) Sapos en estado estacionario de captación de agua y producción de orina sometidos a una reducción del gradiente osmótico transepitelial, y c) sapos rehidratándose sometidos a tratamientos farmacológicos con AVT, AII, catecolaminas y agonistas y antagonistas alfa y beta adrenergicos, y a la reducción del gradiente osmótico transepitelial.

Los resultados obtenidos en las 3 situaciones experimentales muestran que en el control del balance acuoso de *Bufo arenarum* están involucrados componentes neuroendocrinos y neurogenicos, y que estos componentes actúan tanto ante cambios del medio interno del animal (respuestas retroalimentadas) como ante cambios del medio externo del animal (respuestas antealimentadas)(figura 1).

Las principales conclusiones que se desprenden de los resultados obtenidos son:

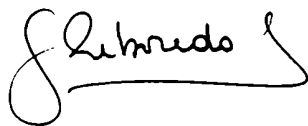
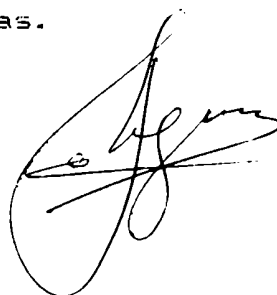
AVT actúa modificando la permeabilidad de los epitelios involucrados en los procesos reabsorción de agua (tubulo colector de riñon y vejiga urinaria) pero en concentraciones "fisiológicas" no produce cambios detectables en la

permeabilidad de la piel.

El sistema nervioso participa activamente en el control de la permeabilidad de los epitelios involucrados en el balance acuoso. Esta participacion parece ser principalmente importante en el control de la captacion de agua a traves de la piel, la cual es estimulada por efectores beta adrenergicos.

A diferencia de otros grupos de vertebrados, en esta especie de anfibios, AII no esta involucrada en la conducta de ingesta de agua.

La modificacion del medio externo sin que medien variaciones detectables del medio interno produce cambios en la permeabilidad de los epitelios. Estos cambios incluyen: antidiuresis renal (mediada por AVT) y aumentos del Lpd y del flujo natriferico de agua (mediados probablemente por el sistema adrenergico). En relacion con este punto, Bufo arenarum posee una quimiorrepcion cutanea que podria estar involucrada en las respuestas antealimentadas descriptas.

Handwritten signature of J. Lebrido.Handwritten signature, possibly of the author or a reviewer.

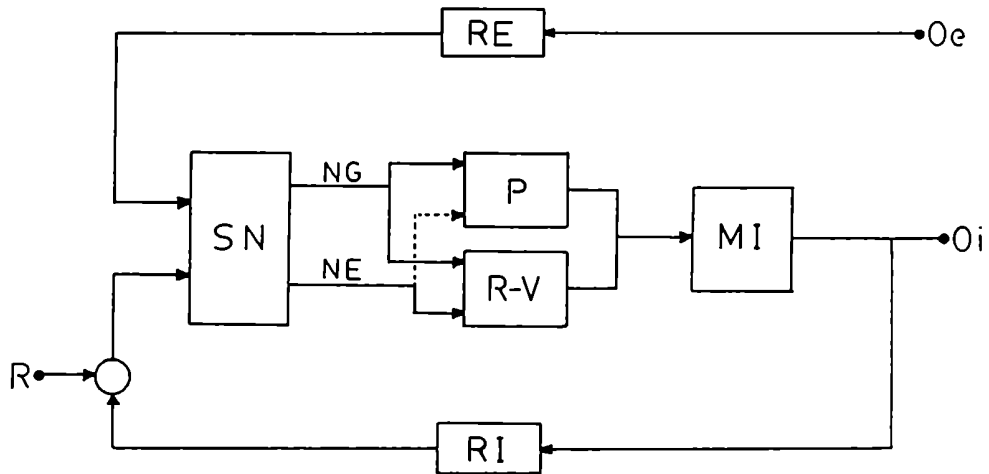


Figura 1: En el diagrama de bloques se muestran los principales subsistemas, componentes e interacciones que participan en el control del balance acuoso en *Bufo arenarum*. MI: medio interno, NE: componentes neuroendocrinos, NG: componentes neurogenicos, O_i : osmolaridad interna, O_e : osmolaridad externa, P: piel, R: valor de referencia de la osmolaridad del medio interno, RE: receptores externos (quimiorreceptores), RI: receptores internos (osmoreceptores), R-V: rinon y vejiga, SN: sistema nervioso.

Bibliografia:

Acher R.: Chemical of the neurohypophysial hormones: an example of molecular evolution. En: Handbook of Physiology, Section 7 Vol IV pp. 119-130, 1974.

Adolph E.F.: The vapor tension relations of frogs. Biol. Bull. 62: 112-125, 1932.

Adolph E.F.: Epinephrine and urine formation in the frog. Am. J. Physiol. 115: 200-209, 1936.

Adrian E.D.: The impulses produced by sensory nerve endings. Part 4. Impulses from pain receptors. J Physiol. 62: 32-51, 1926.

Adrian E.D.: Sensory impulses produced by heat and injury . J Physiol. 74: 17-18, 1932.

Adrian E.D., M.K. Cattell & H. Hoagland: Sensory discharges in single nerve fibres. J. Physiol. 72: 377-391, 1931.

Alvarado R.H.: The significance of grouping on water conservation in *Ambystoma*. Copeia 1967: 667-668.

Atama J.: Structures and functions of the sense of taste in the catfish (*Ictalurus natalis*). Brain Behav. Evol. 4: 273-294,

1971.

Bakker H.R. & S.D. Bradshaw: Effects of hypothalamus lesions on water metabolism of the toad *Bufo marinus*. *J. Endocrinol.* 75: 161-172, 1977.

Baldwin R.A.: The water balance response of the pelvic "patch" of *Bufo punctatus* and *Bufo boreas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A: 1285-1295, 1974.

Bastide F. & S. Jard: Actions de la noradrenaline et de l'ocytocine sur le transport actif de sodium et la permeabilite a l'eau de la peau de grenouille. Role du 3',5'-AMP cyclique. *Biochim. Biophys. Acta* 150: 113-123, 1968.

Bellocci M., R. Picardi & C.D. Martino: Juxtaglomerular apparatus in mesonephros of newt (*Triturus cristatus*). A morphologic study. *Z. Zellforsch* 114: 203, 1971.

Benedictis E.M. & F. Lacaz-Vieira: Electrolytes control flows of water across the apical barrier in toad skin: The hydrosmotic salt effect. *Membrane Biol.* 67: 125-135, 1982.

Bentley P.J.: The effects of vasopressin on water uptake of the toad, *Bufo marinus*, while bathed in different hypotonic solutions. *J. Endocrinol.* 16: 126-134, 1957.

Bentley P.J., A.K. Lee & A.R. Main: Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that live in areas of varying aridity. *J. Exp. Zool.* 35: 677-684, 1958.

Bentley P.J.: Adaptations of Amphibia to arid environments. *Science* 152: 619-623, 1966.

Bentley P.J.: Neurohypophysial function in Amphibia: hormone activity in the plasma. *J. Endocr.* 43: 359-369, 1969.

Bentley P.J.: Endocrines and osmoregulation. pp 135-197. New York: Springer, 1971.

Bentley P.J.: Role of the skin in amphibian sodium metabolism. *Science* 181: 686-687, 1973.

Bentley P.J.: Actions of neurohypophysial peptides in amphibians, reptiles and birds. En: *Handbook of Physiology*, section 7: Endocrinology, Vol 4: The pituitary gland and its neuroendocrine control. Part 1 pp 545-563, 1974.

Bieter R.N.: The effects of splanchnics upon glomerular blood flow in the frog's kidney. *Am. J. Physiol.* 91: 436-460, 1929.

Bourguet J., J. Chevalier, M. Parisi & R. Gobin: Role des agregats de particles intramembranaires induits par l'hormone

antidiuretique. J. Physiol. (Paris) 77: 629-641, 1981.

Brunn F.: Beitrag zur kenntnis der wirkung von hypophysenextrakt auf den wasserhaulshalt des frosches. Z. Ges. Exptl. Med. 25: 170-175, 1921.

Bundy D. & C.R. Tracy: Behavioral responses of american toads (*Bufo americanus*) to stressful, thermal and hidrics environments. Herpetologica 33: 455-458, 1977.

Campbell B.J., G. Woodward & V. Borberg: Calcium-mediated interactions between the antidiuretic hormone and renal plasma membranes. J. Biol. Chem. 247: 6167-6175, 1972.

Carroll R.G. & D.F. Opdyke: Evolution of angiotensin II-induced catecholamine release. Am. J. Physiol. 243: R65-R69, 1982.

Carter D.B.: Structure and function of the subcutaneous lymph sacs in the anura (Amphibia). J. Herpetol. 13: 321-327, 1979.

Catton W.T.: Some properties of frog skin mechanoreceptors. J. Physiol. 141: 305-322, 1958.

Catton W.T.: Cutaneous mechanoreceptors. En: Frog Neurobiology. W. Precht y R. Llinas eds., Berlin Springer-Verlag, pp: 629-642, 1976.

Celentano F., G. Monticelli & M.N. Orsenigo: Non linear volume flow dependence on osmotic pressure difference in frog skin. *J. Physiol.(Paris)*, 74: 365-367, 1978.

Chan D.K.O.: Comparative physiology of the vasomotor effects of neurohypophysial peptides in vertebrates. *Amer. Zool.* 17: 751-762, 1977.

Chevalier J., J. Bourguet & J.S. Hugon: Membrane associated particles: Distribution in frog urinary bladder epithelium at rest and after oxitocin treatment. *Cell Tiss. Res.* 152: 129-140, 1974.

Christensen C.U.: Adaptations in the water economy of some anuran amphibia. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A: 1035-1049, 1974.

Christensen C.U.: Effect of dehydration, vasotocin and hypertonicity on net water flux through the isolated, perfused pelvic skin of *Bufo bufo bufo* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 51A: 7-10, 1975.

Christensen C.U. & C.B. Jorgensen: Role of the pars distalis and pars nervosa of the hypophysis in the water economy of the toad *Bufo bufo bufo* (L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 18: 19-174, 1972.

Claussen D.L.: Studies in water loss and rehydration in anurans. *Physiol. Zool.* 42: 1-14, 1969.

Herpetologica 30: 360-365, 1974.

Clevers J. & J. Morris: 6-Hydroxidopamine produces a weight increase in toads. Comp. Biochem. Physiol. 76C: 339-344, 1983.

Coviello A.: Natriferic and hidrosmotic effect of angiotensin II in the toad Bufo paracnemis. Acta Physiol. Latinoam. 20: 349-358, 1970.

Coviello A. & E.S. Brauckman: Hidrosmotic effect of angiotensin: Isolated toad skin. Acta Physiol. Latinoam. 23: 18-23, 1973.

DeSousa R.C.: Mecanismos de transport de l'eau et de sodium par les cellules des epithelia d'amphibiens et de tubule renal isole. J. Physiol. (Paris) 71: 5-71, 1975.

DeSousa R.C. & A. Grosso: The mode of action of vasopressin: membrane microstructure and biological transport. J. Physiol. (Paris) 77: 643-669, 1981.

DeSousa R.C. & A. Grosso: Osmotic water flow across the abdominal skin of the toad *Bufo marinus*: Effect of vasopressin and isoprenaline. *J. Physiol.* 329: 281-296, 1982.

Dicker S.E. & A.B. Elliott: Water uptake by *Bufo melanostictus*, as affected by osmotic gradients, vasopressin and temperature. *J. Physiol.* 190: 359-370, 1967.

Dieter E.: Die wirkung von adrenalin auf die aktivitat der nierenerven beim frosch. *Pflugers Archiv* 273: 29-38, 1961.

Dieter E.: Die wirkung des depressorreflexes auf die gefabe der froschniere. *Pflugers Archiv* 276: 368-377, 1963.

Dodt E.: Schmerzimpulse bei temperaturreizen. *Acta physiol. Scand.* 31: 83-96, 1954.

Dole J.: The role of substrate moisture and dew in the water economy of the leopard frog , *Rana pipiens*. *Copeia* 141-149, 1967.

Duellman W.E. & L. Trueb: *Biology of amphibians*, Cap. 8 Relationships with the environment. pp. 197-228, 1986.

Elliott A.B.: Effect of adrenaline on water uptake in *Bufo*. *J. Physiol.* 197: 87P-88P, 1968a.

Elliot A.B.: Natriuretic and hydrosmotic effects of neurohypophysial peptides and their analogues in augmenting fluid uptake by *Bufo melanostictus*. *J. Physiol.* 197: 173-182, 1968b.

Epstein A.N. & S. Hsiao: Angiotensin as a dipsogen. In: Control mechanisms of drinking, ed. G. Peters, J.T. Fitzsimons & Lisette Peters-Haefeli, pp. 108-116. Berlin, Heidelberg & New York: Springer-Verlag, 1975.

Epstein A.N., J.T. Fitzsimons & B.J. Rolls: Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *J. Physiol.* 210: 457-474, 1970.

Evered M.D. & J.T. Fitzsimons: Drinking induced by angiotensin in the pigeon *Columba livia*. *J. Physiol.* 263: 193P-194P, 1976.

Evered M.D. & J.T. Fitzsimons: Drinking and changes in blood pressure in response to angiotensin II in the pigeon, *Columbia livia*. *J. Physiol.* 310: 337-352, 1981.

Ewer R.F.: The effect of pituitrin on fluid distribution in *Bufo regularis* Reuss. *J. Exp. Biol.* 29: 173-177, 1952.

Fair J.W.: Comparative rates of rehydration from soil in two species of toads, *Bufo boreas* and *Bufo punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 281-27, 1970.

Falck B., J. Haggendal & C. Owman: The localization of adrenaline in adrenergic nerves in the frog. *Quart. J. Exp. Physiol.* 48: 253-257, 1963.

Farquhar, N.G. & G.E. Palade: Cell functions in amphibian skin. *J. Cell. Biol.* 26: 263-291, 1965.

Ferreira H.G. & C.H. Jesus: Salt adaptation in *Bufo bufo*. *J. Physiol.* 228: 583-600, 1973.

Fitzsimons J.T.: The physiology of thirst and sodium appetite. *Monographs of the Physiological Society* 35. Cambridge University Press, 1979.

Fitzsimons J.T.: Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 87: 117-167, 1980.

Fitzsimons J.T. & B.J. Simons: The effect on drinking in the rat of intravenous angiotensin, given alone or in combination with other stimuli of thirst. *J. Physiol.* 203: 45-57, 1969.

Fitzsimons J.T. & S. Kaufman: Cellular and extracellular dehydration and angiotensin as stimuli to drinking in the common iguana *Iguana iguana*. *J. Physiol.* 265: 443-463, 1977.

Forster R.P.: The effect of epinephrine upon frog renal

haemodynamics in the intact animal. Am. J. Physiol. 140: 221-225, 1943.

Fruchter J, M. Yang & P.K.T. Pang: The renin-angiotensin system in bullfrog and mudpuppies. Fed. Proc. 39: 946, 1980.

Gallardo R, P.K.T. Pang & W.H. Sawyer: Neural influences on bullfrog renal function. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 165: 233-240, 1980.

Gamundi, S., A. Scheucher & A. Coviello: Efecto de la estimulación adrenergica sobre la permeabilidad de la piel aislada de Bufo arenarum. Primeras Jornadas Cientificas de la Sociedad de Biologia de Tucuman. Tucuman, diciembre de 1984.

Garland H.O. & I.W. Henderson: Influence of environmental salinity on renal and adrenocortical functions in the toad, Bufo marinus. Gen. Comp. Endocrinol. 27: 136-143, 1975.

Gaupp E., A. Ecker & R. Wiedersheim: Anatomie des froshes. Braunscheig. F. Vieweg und sohn, 1896.

Gehlbach F.R., J.R. Kimmel & W.A. Seems: Aggregations and body water relations in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) from the Gran Canyon rims, Arizona. Physiol. Zool. 42: 173-182, 1969.

Gray J.: The role of water in the evolution of the terrestrial

vertebrates. Brit. J. Exp. Biol. 6: 26, 1928.

Greenwald L.: Sodium balance in the leopard frog (*Rana pipiens*).
Physiol. Zool. 44: 149-161, 1971.

Greenwald L.: Sodium balance in amphibians from different
habitats. Physiol. Zool. 45: 229-237, 1972.

Handler J.S. & J. Orloff: The mechanism of action of
antidiuretic hormone. En: Handbook of Physiology. Renal
Physiology. Washington, DC: Am. Physiol. Soc., sect 8, cap 24 pp
791-814, 1973.

Hanner R.H. & G.B. Ryan: Ultrastructure of the renal
juxtaglomerular complex and peripolar cells in the axolotl
(*Ambystoma mexicanum*) and toad (*Bufo marinus*). J. Anat. 130:
445, 1980.

Hartroft P.M.: Juxtaglomerular (J.G.) cells of the american
bullfrog as seen by light and electron microscopy. Fed. Proc.
25: 238, 1966.

Hasegawa Y., T.X. Watanabe, H. Sokabe & T. Nakajima: Chemical
structure of angiotensin in the bullfrog *Rana catesbiana*. Gen
Comp. Endocrinol. 50: 75-80, 1983.

Hayman J.M.: Estimations of afferent arteriole and glomerular

capillary pressures in frog kidney. *Am. J. Physiol.* 79: 389-409, 1927.

Heatwole H.: Burrowing ability and behavioral responses to dessication of the salamander *Plethodon cinereus*. *Ecology* 41: 661-668, 1960.

Heatwole H., F. Torres, S.B de Austin & A. Heatwole: Studies on anuran water balance. I. Dynamics of evaporative water loss in the coqui, *Eleutherodactylus portoricensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 28: 245-269, 1969.

Heatwole H., E. Cameron & G.J.W. Webb: Studies on anuran water balance. II. Evaporative water loss, vital limit, and behavioral responses to dessication in *Notaden bennetti*. *Herpetologica* 27: 365-378, 1971.

Heatwole H. & R. Newby: Interaction of internal rhythms and loss of body water in influencing activity levels of amphibians. *Herpetologica* 28: 156-162, 1972.

Heller H.: Differentiation of an (amphibian) water balance principle from the antidiuretic principle of the posterior pituitary gland. *J. Physiol.* 100: 124-141, 1941.

Henderson I.W., B.R. Edwards, H.O. Garland & I. Chester Jones: Renal function in two toads, *Xenopus laevis* and *Bufo marinus*.

Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 3: 350-359, 1972.

Hirano T.: Some factors regulating the water intake by the eel *Anguilla japonica*. J. Exp. Biol. 61: 737-747, 1974.

Hirano T., Y. Takei & H. Kobayashi: Angiotensin and drinking in the eel and the frog. In "Osmotic and volume regulation, Alfred Benzon Symposium XI" (C.B. Jorgensen, and E Skadhauge, eds.) pp. 123-128. Academic Press, New York-London, 1978.

Hillyard S.D.: Variation in the effects of the antidiuretic hormone on the isolated skin of the toad, *Scaphiopus couchi*. J. Exp. Zool. 195: 196-200, 1975.

Hillyard S.D.: The effect of isoproterenol on the anuran water balance response. Comp. Biochem. Physiol. 62C: 93-95, 1979.

Hoffman, W.E, M.I. Phillips, P.G. Schmid, J. Falcon & J.F. Weet: Antidiuretic hormone release and the pressor response to central AII and cholinergic stimulation. Neuropharmacology 16: 463-472, 1977.

Hogg B.M.: Slow impulses from the cutaneous nerves of the frog. J. Physiol. 84: 250-258, 1935.

Jard S. & F. Morel: Actions of vasotocin and some of its analogues on salt and water excretion by the frog. Am. J.

Physiol. 204: 222-226, 1963.

Jard E.: Etude des effets de la vasotocin sur l'excretion de l'eau et des electrolytes par la rein de la grenouille *Rana esculenta* L.: analyse a l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caracteres structuraux requis pour son activite biologique. J. Physiol (Paris), Suppl 15, 58: 1-124, 1966.

Jard S., F. Bastide & F. Morel: Analyse de la relation "dose-effet biologique" pour l'action de l'ocytocine et de la noradrenaline sur la peau et la vessie de la grenouille. Biochim. Bioph. Acta 150: 124-130, 1968.

Johnson C.R.: Aggregation as a means of water conservation in juvenile *Lymnodinastes* from Australia. Herpetologica 25: 275-276, 1969.

Jorgensen C.B.: The amphibian water economy with special regard to the effect of neurohypophyseal extracts. Acta Physiol. Scand. 22; Supl. 78: 1-79, 1950.

Jorgensen C.B., K.G. Wingstrand & P. Rosenkilde: Neurohypophysis and water metabolism in the toad, *Bufo bufo* (L.). Endocrinology 59: 601-610, 1956.

Jorgensen C.B., P. Rosenkilde & K.G. Wingstrand: Role of the

preoptic-neurohypophyseal system in the water economy of the toad, *Bufo bufo* L.. Gen. Comp. Endocrinol. 12: 91-98, 1969.

Kachadorian W.A., J.B. Wade & V.A. DiScala: Vasopressin: induced structural change in toad bladder luminal membrane. Science 190: 67-69, 1975.

Katchalsky A. & P.F. Curran: In: Non equilibrium thermodynamics biophysics. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1965.

Katsuki Y., T. Yanagisawa, A.L. Tester & J.I. Kendall: Shark pit organs: Response to chemicals. Science 163: 405-407, 1969.

Katz U.: Studies on the adaptation of the toad *Bufo viridis* to high salinities: oxygen consumption, plasma concentration and water content of the tissues. J. Exp. Biol. 58: 785-796, 1973.

Katz U.: NaCl adaptation in *Rana ridibunda* and a comparison with the euryhaline toad *Bufo viridis*. J. Exp. Biol. 63: 763-773, 1975.

Keil L.C., J. Summy-Long & W.B. Severs: Release of vasopressin by angiotensin II. Endocrinology 96: 1063-1065, 1975.

Kobayashi H., Uemura H., Wada M. & Y. Takei: Ecological adaptation of angiotensin-induced thirst mechanism in tetrapods. Gen. Comp. Endocrinol. 38: 93-104, 1979.

Konishi J.: Fresh-water fish chemoreceptors responsive to dilute solutions of electrolytes. *J. Gen. Physiol.* 49: 1241-1264, 1966.

Lammers A.P.M. & W.J. van Dongen: Morphology of juxtaglomerular apparatus in *Bufo bufo*- Some light microscopic and electronmicroscopic observations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 22: 355, 1972.

Lammers A.P.M., W.J. van Dongen & J.A.M. Kemenade: The morphology of the juxtaglomerular apparatus in the toad, *Bufo bufo*. *Z. Zellforsch.* 138: 545, 1973.

Lammers A.P.M., W.J. van Dongen & J.A.M. Kemenade: An ultrastructural study of the juxtaglomerular apparatus in the toad, *Bufo bufo*. *Cell. Tissue Res.* 153: 449, 1974.

Lascano E.F. & E.T. Segura: Estudio morfologico de la piel del sapo *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 47: 6-16, 1971.

Le Quang Trong Y. & Y. Bouligand: Les desmosomes et l'orientation des tonofilaments dans le tegument des anoures. *Bull. Soc. Zool. France* 101: 637-645, 1976.

Levinsky N.G. & W.H. Sawyer: Significance of neurohypophysis in regulation of the fluid balance in the frog. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 82: 272-274, 1953.

Lico M.C.: Metodo de canulacion lateral permanente de la aorta del sapo. Rev. Soc. Arg. Biol. 34: 147, 1958.

Liggins G.W. & G.C. Grigg: Osmoregulation of the cane toad, *Bufo marinus*, in salt water. Comp. Biochem. Physiol. 82A: 613-619, 1985.

Lillywhite H.B.: Thermal modulation of cutaneous mucus discharge as a determinant of evaporative water loss in the frog, *Rana catesbeiana*. Zeit. Vergl. Physiol. 73: 84-104, 1971.

Lillywhite H.B. & P. Litch: Movement of water over toad skin: Functional role of epidermal sculpturing. Copeia 1974: 165-171.

Lindemann B. & C. Voute: Structure and function of the epidermis. En: R. Llinas & W. Precht (eds.), Frog Neurobiology, Berlin Springer Verlag, pp 169-210, 1976.

Littleford R.A., W.F. Keller & N.E. Phillips: Studies on the vital limits of water loss in plethodontid salamanders. Ecology 28: 440-447, 1947.

Mayer N.: Adaptation de *Rana esculenta* a des milieux varies. Etude speciale e l'excretion renale de l'eau et des electrolytes au cours des changements de milieux. Comp. Biochem. Physiol. 29: 27-50, 1969.

Mahany T.M. & R.H. Parsons: Circulatory effects on water exchange in *Rana pipiens*. *Amer. J. Physiol.* 234: R172-R177, 1978.

Maruhashi J., K. Mitzuguchi & I. Tasaki: Action currents in single afferent nerve fibres elicited by stimulation of the skin of the toad and the cat. *J. Physiol.* 117: 129-151, 1952.

McClanahan L.L. Jr & R. Baldwin: Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 28: 381-389, 1969.

McClanahan L.L. Jr: Changes in body fluids of burrowed spadefoot toads as a function of water potential. *Copeia* 1972: 209-216.

McCleery R.H.: On satiation curves. *Anim. Behav.* 25: 1005-1015, 1977.

McFarland D.J.: *Feedback mechanisms in animal behavior*. London: Academic Press, 1971.

McFarland D.J. & F.J. McFarland: Dynamic analysis of an avian drinking response. *Med. Biol. Engng.* 6: 659-668, 1968.

McFarland D.J. & A.I. Houston: *Quantitative Ethology. The state space approach*. Pitman, London, 1981.

McKinley M.J.: Volume regulation of antidiuretic hormone secretion. En: Current Topics in Neuroendocrinology: Neurobiology of vasopressin. D. Ganten and D. Pfaff editors. Springer-Verlag, 1985.

Middler S.A., C.E. Kleeman & E. Edwards: Neurohypophyseal function in the toad *Bufo marinus*. Gen. Comp. Endocrinol. 9: 38-48, 1967.

Morris J.L.: Seasonal variation in responses of the toad renal vasculature to adrenaline. Arch. Pharmacol. 320: 246-254, 1982.

Morris J.L. & I.L. Gibbins: Inervation of the renal vasculature of the toad (*Bufo marinus*). Cell. Tissue Res. 231: 357-376, 1983.

Morris J.L.: Catecholamines increase urine formation in isolated toad (*Bufo marinus*) kidneys perfused at constant rate. Comp. Biochem. Physiol. 79C: 219-225, 1984.

Mullen T.L. & R.H. Alvarado: Osmotic and ionic regulation in amphibians. Physiol. Zool. 49: 11-23, 1976.

Muller M., W.A. Kachadorian & V.A. DiScala: Evidence that ADH-stimulated intramembranous particle aggregates are transferred from cytoplasmic to luminal membranes in toad

bladder epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 85: 83-95, 1980.

Nolly H. & J.C. Fasciolo: The renin-angiotensin system in *Bufo arenarum* and *Bufo paracnemis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 823, 1971a.

Nolly H. & J.C. Fasciolo: Renin-angiotensin system and homeostasis in *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 833, 1971b.

Onoda N., T. Hashimoto & Y. Katsuki: Chemoreception in the lateral line organ in *Xenopus laevis*. *Proc. Japan Acad.* 46: 783-787, 1970.

Packer W.C.: Dehydration, hydration and burrowing behavior in *Heleiporus eyrey* (Gray)(Leptodactylidae). *Ecology* 44: 643-651, 1963.

Pak Poy R.K.F.: Electron microscopy of the amphibian renal glomerulus. *Aust. J. Exp. Biol.* 35: 583-594, 1957.

Pang P.K.T., Sawyer W.H. & C. Casals: Circulating levels of arginine vasotocin in lower vertebrates. *Amer. Zool.* 14: 1244, 1974.

Pang P.K.T.: Osmoregulatory functions of neurohypophyseal hormones in fishes and amphibians. *Amer. Zool.* 17: 739-749,

1977.

Pang P.K.T., S.M. Galli-Gallardo, N. Collie & W.H. Sawyer: Renal and peripheral vascular responsiveness to arginine vasotocin in bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Amer. J. Physiol.* 239: R156-R160, 1980.

Pang P.K.T., Uchiyama M. & W.H. Sawyer: Endocrine and neural control of amphibians renal functions. *Fed. Proc.* 41: 2365-2370, 1982.

Pang P.K.T. & P.B. Furspan: Evolution of neurohypophyseal hormone actions in vertebrates. *Amer. Zool.* 23: 655-662, 1983.

Petriella S., J.C. Reboreda, M. Otero & E.T. Segura: Adaptative control of the water economy in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. I. Antidiuretic responses to osmotic cutaneous stimulation without changes in plasma osmolarity. (en preparacion, 1987)

Pough F.H., T.L. Taigen, M.M. Stewart & P.F. Brussard: Behavioral modification of evaporative water loss by a Puerto Rican frog. *Ecology* 64: 244-252, 1983.

Putnam R.W & S.S. Hillman: Activity responses of anurans to dehydration. *Copeia* 1977: 746-749.

Ray C.: Vital limits and rates of dessication in salamanders.

Ecology 39: 75-83, 1958.

Richards N. & C.F. Schmidt: A description of the glomerular circulation in the frog's kidney and observations concerning the action of adrenaline and various other substances upon it. Am. J. Physiol. 71: 178-208, 1924.

Richards N., J.B. Barnwell & R.C. Bradley: The effect of small amounts of adrenaline upon the glomerular blood vessels of the frog's kidney perfused at constant rate. Am. J. Physiol. 79: 410-419, 1927.

Rodriguez E.M. & H.D. Dellmann: Hormonal content and ultrastructure of the disconnected neural lobe of the grass frog (*Rana pipiens*). Gen. Comp. Endocrinol. 15: 272-288, 1970.

Roth J.J.: Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. J. Morph. 140: 443-460.

Ruibal R.: The adaptative role of bladder water in the toad *Bufo cognatus*. Physiol. Zool. 35: 218-223, 1962.

Ruibal R., L. Tevis Jr & V. Roig: The terrestrial ecology of the spadefoot toad *Scaphiopus hammondii*. Copeia 1969: 571-584.

Russell I.J.: Amphibian lateral line receptors. In: Frog Neurobiology. Petch W. & R. Llinas eds. Berlin:

Springer-Verlag, pp 513-550, 1976.

Salibian A.: Transporte de cloro y de sodio a traves de la piel in situ de anfibios sudamericanos. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile 35: 121-163, 1977.

Sato M.: Physiology of the gustatory system. En: Frog Neurobiology. Pretch W. & R. Llinas eds. Berlin: Springer-Verlag. pp 576-587, 1976.

Sawyer W.H. & R.M. Schisgall: Increased permeability of the frog bladder to water in response to dehydration and neurohypophysial extracts. Am. J. Physiol. 187: 312-314, 1956.

Sawyer W.H.: Increased renal reabsortion of osmotically free water by the toad (*Bufo marinus*) in response to neurohypophyseal hormones. Am. J. Physiol. 189: 564-568, 1957.

Sawyer W.H. & P.K.T. Pang: Endocrine adaptation to osmotic requeriments of the environment. Endocrine factors in osmoregulation by lungfishes and amphibians. Gen. Comp. Endocrinol. 25: 224-229, 1975.

Sawyer W.H.: Evolution of neurohypophyseal hormones and their receptors. Fed. Proc. 36: 1842-1847, 1977.

Scheer B.T., M.W. Mumbach & A.R. Thompson: Salt balance and

osmoregulation in salientian amphibians. En: Chemical Zoology. Amphibia and Reptilia. ed. M. Florkin & B.T. Scheer. New York: Academic, pp. 51-65, 1974.

Schlondorff D. & N. Franki: Effect of vasopressin on cyclic AMP-dependent protein kinase in toad urinary bladder. Biochim. Biophys. Acta 628: 1-12, 1980.

Schmajuk N.A. & E.T. Segura: Behavioral regulation of water balance in the toad, *Bufo arenarum*. Herpetologica 38: 296-301, 1982.

Schwob J.E. & A.K. Johnson: Angiotensin-induced dipsogenesis in domestic fowl (*Gallus gallus*). J. Comp. Physiol. Psychol. 91: 182-188, 1977.

Schmid W.D.: Some aspects of the water economies of nine species of amphibians. Ecology 46: 261-269, 1965.

Segura E.T., U.C. Bandsholm , A. Bronstein & D. Woscoboinik: Role of the CNS in the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. I Effects of handling, brain lesions, anesthesia and reversible coma upon water uptake, urine production and overall water balance. J. Comp. Physiol. 146: 95-100, 1982a.

Segura E.T., U.C. Bandsholm & A. Bronstein: Role of the CNS in

the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. II Adrenergic control of water uptake across the skin. *J. Comp. Physiol.* 146: 101-106, 1982b.

Segura E.T., J.C. Reboreda, A. Skorka, M.E. Cuello & S. Petriella: Role of the CNS in the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. III Skin permeability increases to raised osmotic pressure of the external "milieu". *J. Comp. Physiol. B* 154: 573-578, 1984.

Segura E.T., M.E. Cuello, S. Petriella & G. Orti: Antidiuretic responses to osmotic, ionic or volume stimulation of the brain in the unanesthetized toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 107-110, 1987.

Seymour R.S. & A.K. Lee: Physiological adaptations of anuran amphibians to aridity: Australian prospects. *Austr. Zool.* 18: 53-65, 1974.

Sibly R.M.: How incentive and deficit determine feeding tendency. *Anim. Behav.* 23: 437-446, 1975.

Sibly R.M. & D.J. McFarland: The fitness of behaviour sequences. *Am. Nat.* 110: 601-617, 1976.

Share L.: Interrelations between vasopressin and the renin-angiotensin system. *Fed. Proc.* 38: 2267-2271, 1979.

Shoemaker V.H.: The effects of dehydration on electrolyte concentrations in a toad, *Bufo marinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 13: 261-271, 1964.

Shoemaker V.H.: The stimulus for the water-balance responses to dehydration in toads. *Comp. Biochem. Physiol.* 15: 81-88, 1965.

Shoemaker V.H.: Adaptations to aridity in amphibians and reptiles. En: *Physiological adaptation to the environment*, pp. 143-154. Ed. F.J. Vernberg, New York: Intext Educational, 1975.

Shoemaker V.H. & H. Waring: Effect of hypothalamic lesions on the water-balance response of a toad (*Bufo marinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 24: 47-54, 1968.

Shoemaker V.H., R. Balding, R. Ruibal & L.L. McClanahan Jr: Uricotelism and low evaporative water loss in a South American frog. *Science* 175: 1018-1020, 1972.

Shoemaker V.H. & L.L. McClanahan Jr: Evaporative water loss, nitrogen excretion and osmoregulation in phyllomedusine frogs. *J. Comp. Physiol.* 100: 331-345, 1975.

Shoemaker V.H. & K.A. Nagy: Osmoregulation in amphibians and reptiles. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 449-471, 1977.

Snafir N., B. Robinzon & M. Goldschalk: The drinking response of the chicken to peripheral and central administration of angiotensin II. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5: 5-10, 1976.

Spight T.M.: The water economy of salamanders: Exchange of water with the soil. *Biol. Bull. Woods Hole Mass.* 132: 126-132, 1967.

Spight T.M.: The water economy of salamanders: Evaporative water loss. *Physiol. Zool.* 41: 195-203, 1968.

Spotila R.J: Role of temperature and water in the ecology of lungless salamanders. *Ecol. Monog.* 42: 95-125, 1972.

Spray D.C.: Characteristics specificity and efferent control of frog cutaneous cold receptors. *J. Physiol.* 237: 15-38, 1974.

Spray D.C.: Pain and temperature receptors of anurans. En: *Frog Neurobiology*. W. Pretch & R. Llinas eds., Berlin: Springer-Verlag, pp 607-628, 1976.

Steen W.B.: On the permeability of the frog's bladder to water. *Anat. Record* 43: 215-220, 1929.

Stille W.T.: The water absorption responses of an anuran. *Copeia* 1958: 217-218.

Szczepanska-Sadowska Ewa, J. Sobocinska & B. Sadowski: Central

dipsogenic effect of vasopressin. *Am. J. Physiol.* 242: R372-R379, 1982.

Szczepanska-Sadowska E., C. Simon-Oppermann, D. Gray & E. Simon: Control of central release of vasopressin. *J. Physiol. (Paris)* 79: 432-439, 1984.

Taylor A.: Role of microtubules and microfilaments in the action of vasopressin. En: *Disturbances in body fluid osmolality*, ed. Andreoli T.E., J.J. Grantham & F.C. Rector Jr. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc. pp 97-124, 1977.

Takei Y.: Angiotensin and water intake in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp. Endocrinol.* 31: 364-372, 1977.

Thorson T.B.: The partitioning of body water in amphibia. *Physiol. Zool.* 37: 395-399, 1964.

Toates F.M.: Homeostasis and drinking. *Behav. Brain Sci.* 2: 95-139, 1979.

Tracy C.R.: A model of the water and energy dynamics of a terrestrial amphibian. *Ecol. Monogr.* 46: 293-326, 1976.

Tracy C.R.: The role of dehydration and antidiuretic hormone on water exchange in *Rana pipiens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A:

559-562, 1978.

Tramezzani J.H. & J. Uranga: Variaciones de la sustancia gomori-positiva y actividad antidiuretica en la neurohipofisis de sapos hidratados y deshidratados. Rev. Soc. Arg. Biol. 30: 148-151, 1954.

Trippodo N.C., R.E. McCaa & A.C. Guyton: Effect of prolonged angiotensin II infusion on thirst. Am. J. Physiol. 230: 1063-1066, 1976.

Tsuneki K., H. Kobayashi, R. Gallardo & P.K.T. Pang: Electron microscopic study of innervation of the renal tubules and urinary bladder epithelium in *Rana catesbeiana* and *Necturus maculosus*. J. Morph. 181: 143-153, 1984.

Unsicker K., S. Axelsson, C. Owman & K.G. Svensson: Innervation of the male genital tract and kidney in the Amphibia *Xenopus laevis* Daudin, *Rana temporaria* L. and *Bufo bufo* L.. Cell. Tissue Res. 160: 453-484, 1975.

Uranga J. & W.H. Sawyer: Renal responses of the bullfrog to oxitocin, arginine vasotocin and frog neurohypophysial extract. Am. J. Physiol. 198: 1287-1290, 1960.

Uranga J.: Effects of glomerulopressin, oxitocin and norepinephrine on glomerular pressure in the toad. Gen. Comp.

Endocrinol. 20: 515-521, 1973.

van Dongen W.J. & C.A. van der Heijden: Demonstration of renal juxtaglomerular granules and evaluation of index of granulation in toad *Bufo bufo*. Z. Zellforsch. 94: 40, 1969.

Wada M., H. Kobayashi & D.S. Farner: Induction of drinking in the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*, by intracranial injection of angiotensin II. Gen. Comp. Endocr. 26: 192-197, 1975.

Wade J.B.: Membrane structural specialization of the toad urinary bladder revealed by the freeze-fracture technique.III. Location, structure, and vasopressin dependence of intramembrane particle arrays. J. Membr. Biol. 40: 281-296, 1978.

Warburg M.R.: On the thermal and water balance of three central Australian frogs. Comp. Biochem. Physiol. 20: 27-43, 1967.

Wilson J.X.: The renin-angiotensin system in nonmammalian vertebrates. Endocr. Rev. 5: 45-61, 1984.

Whitear M.: Dermal nerve endings in *Rana* and *Bufo*. Quart. J. micr. Sci. 96: 343-349, 1955.

Whitear M.: The nerves in frog skin. J. Zool. 172: 503-529, 1974a.

- Whitear M.: The vesicle population in frog skin nerves. *J. Neurocytol.* 3: 49-58, 1974b.
- Whitear M.: A functional comparison between the epidermis of fish and amphibians. *Symp. Zool. Soc. London* 39: 291-313, 1977.
- Yamagishi W. & T. Azuma: The innervation of the renal blood vessels of the toad. *Jpn. J. Physiol.* 13: 399-412, 1963.
- Yokota S.D. & S.S. Hillman: Adrenergic control of the anuran cutaneous hydroosmotic response. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53: 309-314, 1984.
- Yunge L., M. Ballak, J. Beuzeron, J. Lacasse & M. Cantin: Ultrastructural cytochemistry of atrial and ventricular cardiocytes of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). Relationship of specific granules with renin-like activity of the myocardium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 1463, 1980.
- Zambrano D. & E. de Robertis: Ultrastructure of the peptidergic and monoaminergic neurons in the hypothalamic neurosecretory system of anurans batracians. *Z. Zellforsch.* 90: 230-244, 1968.
- Zotterman Y.: The response of the frog's taste fibres to the application of pure water. *Acta Physiol. Scand.* 18: 181-189, 1949.

Zug G.R. & P.B. Zug: The marine toad, *Bufo marinus*: a natural history resume of native populations. Smithsonian Contr. Zool. 284: 1-58, 1979.

Comunicaciones de los resultados presentados en esta tesis:

a) Publicaciones:

1) Reboreda J.C. and E.T. Segura: Electrolyte sensitivity of the skin in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Acta physiol. pharmacol. latinoam.* 34: 37-43, 1984.

2) Segura E.T., J.C. Reboreda, A. Skorka, M.E. Cuello and S. Petriella: Role of the CNS in the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. III Skin permeability increases to raised osmotic pressure of the external "milieu". *J. Comp. Physiology B* 154: 573-578, 1984.

3) Reboreda J.C., S. Petriella and E.T. Segura: Short-time changes in natriferic and hydrosmotic fluxes of water and in the urine production due to an increase of the osmolarity of the external bath in the toad, *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa).

4) Reboreda J.C. y E.T. Segura: Control endocrino y nervioso del balance acuoso en el anfibio anuro, *Bufo arenarum*. I Congreso Argentino y I Congreso Latinoamericano de Herpetología. 21-23 de septiembre de 1987, Tucuman, Republica Argentina. *Acta Zoologica Lilloana* (en prensa).

b) Reuniones científicas:

1) Reboreda J.C., S. Petriella, A.P. Lemoine, M.S. Otero y E.T. Segura: Flujo natriférico de agua asociado a cambios del gradiente osmótico a través de la piel en el sapo (*Bufo arenarum*). XXX Reunion Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 24-28 de noviembre de 1985, Mar del Plata, Republica Argentina. Medicina 45 (4): pp 351.

2) Segura E.T, J.C. Reboreda, S. Petriella and M. Brennan: Feedforward control of water uptake and urine production in the toad *Bufo arenarum* Hensel. IXth International Conference on the Physiology of Food and Fluid Intake, July 7-11, 1986, Seattle, Washington, Estados Unidos.

3) Segura E.T., J.C. Reboreda, S. Petriella, M. Brennan and A.P. Lemoine: Adaptative control of the water balance in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. XXX Congress of International Union of Physiological Sciences, July 13-19, 1986, Vancouver, Canada.

4) Reboreda J.C. y E.T. Segura: Antealimentación y realimentación negativa de la ingesta de agua en anfibios. V Congreso Argentino de Bioingeniería y II Encuentro Latinoamericano de Ingeniería Biomedica. 16-19 de Septiembre de 1986, Paraná, Republica Argentina.