

T.D.
A/25



UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE MEDICINA
CATEDRA DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS II

EFFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE GLUCOCORTICOIDES
SOBRE EL C& DE LOS TUBULOS MEDULARES REN-
LES AISLADOS DE LA RATA.

ENRIQUE AZNAR MARTIN.



A los Dres. Massry y Kurokawa,
bajo cuya dirección realicé -
este Trabajo.



CATEDRA DE PATOLOGIA MEDICA
DE SEVILLA
PROF. A. AZNAR REIG.

D. ANTONIO AZNAR REIG, CATEDRATICO NUMERARIO DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS II DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA,

CERTIFICA: que D. ENRIQUE AZNAR MARTIN, ha estado desarrollando el siguiente Trabajo: "Efectos de la deficiencia de glucocorticoides sobre el cAMP de los túbulos medulares renales aislados de la rata", para poder acceder al grado de Doctor.

Y para que conste, y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Sevilla, a 1 de Diciembre de 1.978.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Antonio Aznar Reig", with a long horizontal line underneath.



DIVISION OF NEPHROLOGY
SHAUL G. MASSRY, M.D.
PROFESSOR AND CHIEF
(213) 226-7337

October 4, 1977

TO WHOM IT MAY CONCERN:

This is to certify that Dr. Enrique Aznar was a Research Fellow in the Division of Nephrology at the University of Southern California for a period of two years (1975-1977). He spent most of his time in the Research Laboratory and was involved in various research projects.

His major research endeavor was to study the "Mechanism of Impaired Water Excretion in Glucocorticoid Deficiency". He did his work in an exemplary manner and wrote his data by himself. It was really a pleasure to have him with us and he performed to our expectations.

I am confident that his work here promoted his skills and helped him to develop his investigative ability.

Sincerely,

Shaul G. Massry, M.D.

SGM/jj

RESUMEN

La clínica conocía, que en la insuficiencia suprarrenal (enfermedad de Addison), había impedimento en eliminar el agua ingerida; y sobre este hecho, se idearon pruebas clínicas que la demostraban, y servían para el diagnóstico.

Y puesto que la hormona antidiurética es un factor decisivo en la eliminación de agua por su acción sobre los "receptores" de los túbulos colectores renales; y en la insuficiencia suprarrenal, la clínica es consecuencia fundamentalmente del déficit de cortisol; se revisan todos los factores que modulan la permeabilidad al agua de la célula, además de los citados: activación de la + fosfodiesterasa, calcio, prostaglandina E, y aldosterona; centrándose la atención en la intimidad celular de la acción de ADH sobre el "receptor" de los túbulos colectores renales; que al impactar, activa el sistema adenilciclase, generando 3'5' cAMP, el cual inicia y modula una serie de acontecimientos celulares (que todavía se ignoran) y que tienen como resultado la modulación de la permeabilidad al agua de la célula del túbulo medular renal. En la revisión efectuada de trabajos clínicos y experimentales, se llegaba a la conclusión de que no estaba alterada la secreción, cantidad ni destrucción de la hormona antidiurética en la insuficiencia suprarrenal, y por tanto la impedida eliminación de agua en la misma sería la consecuencia del déficit de glucocorticoides (cortisol). Y al revisar la acción de las células diana: activación de una RNA-polimerasa, "de-represión" de genes, bloqueo de la transcripción de mRNA sin tampoco conocerse exactamente su lugar exacto; y se conoce y acepta, el "efecto permisivo" de los glucocorticoides sobre acciones -

"metabólicas" inducidas por otras hormonas (que involucran en su acción la génesis de 3'5' cAMP), y sin que tampoco se sepa en la actualidad, en que consiste este mecanismo.

Como la ADH induce en el "receptor" de los túbulos medulares renales, la activación del sistema adenilciclasa, con generación de 3'5' cAMP, la hipótesis de trabajo - que nos hemos planteado, fué la determinación "in vitro" de la concentración de 3'5' cAMP en túbulos medulares renales de ratas normales y adrenalectomizadas.

Para lo cual se obtuvieron éstos, de ratas WISTAR normales, adrenalectomizadas, y se incubaron "in vitro" en medios adecuados, con y sin teofilina; con y sin hormona antidiurética; y asimismo se obtuvieron túbulos medulares de ratas adrenalectomizadas a los que se había administrado durante cuatro días antes de su sacrificio, dexametasona. Además de 3'5' cAMP, se determinaron actividad de la adenilciclasa y de la fosfodiesterasa "in vitro".

A los resultados obtenidos se aplicaron los métodos estadísticos con cálculo de la T de Student y el Test de la T pareada.

Se encontró que el contenido de 3'5' cAMP en los túbulos medulares aislados, incubados con teofilina, fué significativamente más elevada en las ratas adrenalectomizadas que en las normales.

Este incremento de la concentración de 3'5' cAMP de las ratas adrenalectomizadas, se manifestaba lo mismo en los

túbulos medulares renales incubados sin ADH, que en presencia de una dosis submáximal (3,3, U/I); y tanto unos como otros respondían semejantemente a ADH.

Esta diferencia entre ratas adrenalectomizadas y normales desaparece; cuando cuatro días antes de su sacrificio, las ratas adrenalectomizadas reciben dexametasona (200 μ gr/k de peso corporal).

La adición "*in vitro*" de dexametasona (10 mlgr/l) incubados durante 60 minutos, no indujo ningún efecto sobre las concentraciones de cAMP.

La concentración de 3'5' cAMP de los túbulos medulares renales incubados sin teofilina, fueron mucho más bajos que cuando se incubaron con teofilina, tanto en las ratas adrenalectomizadas como normales.

Como otros investigadores, no hemos encontrado alteraciones de la actividad de la adenilciclase y fosfodiesterasa, a pesar de incrementarse la concentración de 3'5' cAMP.

Se considera que este incremento de la concentración de 3'5' cAMP en los túbulos medulares renales, es el resultado de la adrenalectomía; y sugerimos que quizá ésta incrementada concentración de 3'5' cAMP de la insuficiencia suprarrenal, juegue un papel en el aumento de la permeabilidad celular de los túbulos renales medulares y por tanto en la retención (o impedida eliminación) de líquidos, cuya intimidad molecular se nos escapa; y tampoco podemos referirla a cambios modulatorios fisiológicos.

cos de la permeabilidad, porque se ignoran. Es posible que éste, sea el "*efecto permisivo*" de los glucocorticoides, sobre las hormonas en cuyo mecanismo efector - se involucra la producción de 3'5' cAMP.

INDICE

CAPITULO I:		
Abreviaturas empleadas	...	<u>Pág.</u> 12
CAPITULO II:		
Introducción:		
a) Pruebas clásicas de retención de agua en la enfermedad de Addison.	...	15
b) Revisión de ADH.	...	20
c) Revisión de acción de los glucocor- ticoides.	...	36
d) Antecedentes que relacionan ADH y - glucocorticoides en la impedida eli- minación de agua en la insuficiencia adrenal.	...	49
e) ¿Cuál es la relación entre ADH y cor- tisol en la diuresis acuosa?.	...	55
f) Hipótesis de trabajo.	...	58
CAPITULO III:		
Material y Métodos:		
a) Material.	...	60
b) Métodos.	...	64
CAPITULO IV:		
Protocolos	...	77
CAPITULO V:		
Resultados obtenidos	...	87
CAPITULO VI:		
Comentarios a los resultados obte- nidos	...	90
CAPITULO VII:		
Conclusiones	...	101
CAPITULO VIII:		
Bibliografía	...	109

Nota: Por error mecanográfico se han omitido los números de páginas:
43, 85, 86, 87, 103, 104, y 105.

CAPITULO I

Abreviaturas empleadas.

ADH	Hormona antidiurética.
AMP	Monofosfato adenosina.
5' AMP	5' Monofosfato de adenosina.
3'5' AMP	3'5' Monofosfato de adenosina cíclico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CBG	Corticosteroid binding globulin (Globulina que une corticoides).
CTS	Sistema de túbulo colectores.
DCA	Deoxicorticosterona.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
GFR	Filtrado glomerular.
HTC	Células cultivadas de hepatoma de rata.
Lp	Conductividad hidraulica.
M	mol.
mRNA	Acido ribonucleico mensajero.
PGE	Prostaglandina E.
3'5' cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico.
p gr	Pico gramo.
RNA	Acido ribonucleico.
TF/p	Líquido tubular / plasma.

CAPITULO II.
Introducción.

Los clínicos conocían ya, que en la enfermedad de ADDISON o insuficiencia suprarrenal crónica, había una dificultad para la eliminación de agua; que podía llegar al extremo de la "intoxicación por agua".

a) PRUEBAS CLASICAS DE RETENCIÓN DE AGUA EN LA ENFERMEDAD DE ADDISON.

Y para evidenciar ésta, y además como prueba diagnóstica, se utilizaba la propuesta por ROBINSON, POWER Y KEPLER - (121), que era relativamente complicada.

Se basaba en la eliminación retardada del agua, la fijeza de la cloruria y tendencia a la retención úrica en sangre. Consistía en dos partes:

A) En la primera:

1) Se recogía la orina de toda la noche (desde las once - a las ocho de la mañana), y se medía su volumen.

2) Luego se administraba al sujeto 20 cc de té o de agua - por kilogramo de peso, lo cual había de beber en una hora; luego el sujeto orinaba en las cuatro horas siguientes, y se recogía por separado el volumen de orina de cada hora.

El volumen de orina de toda la noche, se comparaba con el volumen mayor de orina de una de las muestras de la mañana. Si la cantidad de orina nocturna era menor que cualquiera muestra horaria, se descartaba la insuficiencia su prarrenal? y por el contrario, si ninguna de las muestras horarias de orina matutina, rebasan el volumen de toda la noche, podía tratarse de una enfermedad de ADDISON.

B) En la segunda:

Entonces se pasaba a la segunda parte de la prueba, que - consistía en aplicar y resolver la siguiente fórmula:

$$A: \frac{\text{Urea mlgr\% en orina}}{\text{Urea mlgr\% en plasma}} \times \frac{\text{Cloruros mlgr\% en plasma}}{\text{Cloruros mlgr\% en orina}} \times$$

$$\frac{\text{Mayor volumen de orina matutina, en cc.}}{\text{Volumen total de orina nocturna, en cc.}}$$

Si A era mayor de 25, se trataba de una enfermedad de - ADDISON; si A era mayor de 35, se excluía la insuficiencia suprarrenal.

Y que más tarde, y después de los estudios de MOSES, GA-

BRILLOVE Y SUFFER (102), quedó simplificada, en una prueba que ha tenido una amplia difusión, y que se conoce con los nombres de "prueba del agua" ó "prueba de la tolerancia del agua", y que se basa en la imposibilidad de excretar una orina abundante y diluída -como hace el sujeto normal-, después de una sobrecarga de agua, en el sujeto que tiene deficiencia o carencia de glucocorticoides.

Esta prueba consiste en administrar, por vía oral, después de una noche en ayunas, y en un periodo entre quince y cuarenta y cinco minutos 1.500 cc. de agua del grifo; y recoger la orina en las cinco horas siguientes. Durante este tiempo el sujeto está acostado o sentado, y sólo se levanta para orinar.

El sujeto normal, elimina el 80% de la sobrecarga, con un "píco" de la diuresis que cae dentro de las dos primeras horas; y luego más tarde, alcanza una meseta ("plateau").

En la enfermedad de ADDISON o insuficiencia suprarrenal crónica, existe un marcado retraso a la salida o eliminación de agua, hasta el punto, de que en las cinco horas siguientes, la cantidad de orina recogida es menor a 1.000 cc.

Si la interpretación del resultado, ofreciera dudas, -y esto demuestra el papel protagonista de los glucocorticoides-, se repite la prueba al día siguiente; pero se le dan 100 mlgr. de cortisol o análogo, cuatro horas antes de la ingestión de agua; y entonces si había una hipoeeliminación de orina por insuficiencia suprarrenal,

se normaliza la diuresis; a no ser, claro es, que el -
sujeto padezca: insuficiencia renal, insuficiencia -
cardiaca congestiva, deshidratación (vómitos, diarrea),
ni cirrosis hepática.

En la corteza suprarrenal se han podido aislar hasta -
40 esteroides, pero las principales hormonas son: corti-
sol (cuya producción diaria es de unos 20 mlgr.), corti-
costerona (2 mlgr./24 h.), aldosterona (200 mlgr./24h),
androstenediona y 11-hidroxiandrostenediona; y son agru-
pados según su actividad metabólica en glucocorticoides
(cortisol), mineralocorticoides (corticosterona y aldos-
terona), y andrógenos. Pues bien, la eliminación de agua,
tan solo es inducida por el cortisol; ya que ni la deso-
xicorticosterona (DOC) ni la aldosterona mejoran la eli-
minación de orina.

Asímismo, se ha demostrado esta retención de agua, en la
insuficiencia secundaria suprarrenal por hipopituitaris-
mo (CHALMERS Y LEWIS) (25), (SLESSOR) (133), (GARROD Y
BURSTON) (44), (OLEESKY Y STANBURY) (109), (AGUS Y GOLD-
BERG) (3), (QUINTANILLA, DELGADO-BUTRON Y ZEBALLOS) --
(117), y confirmado en el animal adrenalectomizado --
(GARROD, DAVIES Y CAHILL) (45).

La incapacidad de eliminar la sobrecarga de agua, hace
que el enfermo de ADDISON desarrolle una hiponatremia;

y aún cuando hay dificultades para separar los efectos de las diferentes hormonas, hay una copiosa experiencia animal acumulada, que indica que la capacidad diluidora está limitada por: a) el déficit de mineralocorticoides, b) la deplección de sodio, y c) su disminuída aportación al túbulo distal; y que la reabsorción de agua en el túbulo distal es sobre la que actúan los glucocorticoides, y cuyo mecanismo todavía no está dilucidado.

Por otro lado DIRKS, SEELY Y LEVY (32), estudian la clasificación de los estados hipo-natrémicos ó hipo-osmolares, y señalan que el incremento de la reabsorción de agua en el túbulo renal distal, en ausencia de hormona antidiurética (ADH), se ha descrito tan sólo en la deficiencia de glucocorticoides.

En definitiva, el volumen total y la composición de la orina, estan determinados por el sistema de los túbulos colectores. Sin embargo, todavía no está absolutamente concretado, si el patrón de reabsorción de solutos y de agua, a lo largo del sistema de los túbulos colectores está influenciado tan sólo por ADH; si juega también un papel otro factor: el volumen y la composición del líquido, que llega al túbulo contorneado distal; por la diferente permeabilidad característica de los distintos segmentos anteriores y por la osmolalidad del intersticio medular.

El efecto de todas estas influencias dice JAMISON (67), y añadimos nosotros, de los glucocorticoides; es hacer al sistema de los tubulos colectores, el sitio principal de la regulación de la excreción urinaria de agua.

El efecto directo de ADH, es una disminución de la permeabilidad del epitelio del sistema de los túbulos colectores, e indirectamente una disminución de la permeabilidad de este sistema a la urea. En ausencia de ADH, poca o ninguna urea es reabsorbida por este sistema; en presencia de ADH, cuando es reabsorbida más agua por los túbulos distales y colectores, la concentración intraluminal de urea se aumenta progresivamente, hasta que el líquido alcanza los túbulos más internos del sistema colector. Entonces por la diferencia transtubular de concentración de urea, y el incremento de la permeabilidad de este segmento a la urea, la urea difunde en el intersticio medular. Con una mayor concentración urinaria y de urea, es reabsorbida más urea, y la concentración de urea en la médula externa y especialmente en la más interna, se eleva aún más.

b) REVISION DE ADH Y SU ACCION.

La ADH una vez liberada de las células nerviosas que la producen, pasa al espacio vascular, y allí tiene una vida media muy corta, de 5-6 minutos en el hombre adulto (LAUSON) (83); en el plasma no se sabe, si circula unida a proteínas, -quizá una pequeña fracción sí lo haga, menos de un tercio-, y tiene un triple destino: el órgano efector, o sea las células del túbulo colector, el hígado y el riñón; y éstos son los encargados de la mayoría del aclaramiento metabólico de la hormona circulante (LAUSON) (83), y tan sólo un 10% de la misma, se elimina por la orina en forma activa.

En riñón aislado y perfundido de rata, WALTER Y BOWMAN - (147), comprueban que la excisión ("cleavage") de la glicinamida terminal de la ADH, tiene lugar por la acción de un enzima localizado en la porción distal de la nefrona.

La ADH se una a los "receptores" de la superficie basomedial (nutritiva) de los túbulos colectores y de ductos colectores, e inicia una serie de pasos, que incrementan la permeabilidad de la superficie opuesta (urinaria) al agua; cuya magnitud, es de siete veces más, en el túbulo colector de la rata (MORGAN Y BERLINER) (99); y en un análogo a éste, la vejiga urinaria del sapo, hasta 50 veces (HAYS Y LEAF) (62).

La unión de la ADH al "receptor" y la activación de la adenilciclase, con formación de 3'5' cAMP, se ha visto que se puede considerar como en casos análogos por uniones de puentes bisulfuro, RUDINGER Y JUST (125), SCHWARTZ, RASSMUSEN Y RUDINGER (130); y parece ser, que la especificidad de la "unión" depende del adecuado y exacto "ajuste" tridimensional de la molécula, que está fuertemente plegada en el sitio del receptor (URRY Y WALTER) (141).

Durante la antidiuresis, cuando el nivel circulante de ADH es elevado, la ocupación del "receptor" es alta; cuando el nivel de ADH cae, durante la diuresis acuosa, el ADH deja libres los lugares del "receptor" renal.

La unión de ADH al receptor, activa la adenilciclase que genera 3'5' cAMP, y a partir de esto una serie de acontecimientos que producen los cambios de permeabilidad. Esta formación de 3'5' cAMP no sólo está regulado por la fosfodiesterasa, sino por calcio, prostaglandinas, agen-

tes α adrenérgicos, y aldosterona (HANDLER Y ORLOFF) - (59), (HAYS Y LEVINE) (63).

Como indicábamos hay diferentes factores que intervienen, así CAMPBELL, WOODWARD Y BORBERG (19), comprueban que el calcio inhibe la unión de ADH tritiada a sus receptores; y puesto que, el calcio también inhibe la adenilciclase, esto sugiere que hay al menos dos pasos: receptor y el núcleo enzimático ("core") que están influenciados por los niveles de calcio en plasma.

EPSTEIN (35), comprueba que la hipercalcemia inhibe el efecto de la ADH, sobre el paso de la corriente de agua a través del túbulo renal.

Se ha visto por BENTLEY (11), PETERSON Y EDELMAN (114), en la vejiga del sapo, que el transporte activo de sodio estimulado por ADH, no es inhibido por el calcio; y sugieren, que pueden haber dos adenilciclasas distintas, un calcio-sensible, y otra, calcio-insensible, y que los "pool" de cAMP que generen sean distintos; o bien, puede haber dos receptores diferentes para ADH; y de los cuales, uno es bloqueado por calcio.

GRANTHAM Y ORLOFF (54), demuestran en el túbulo excretor aislado, que la prostaglandina E (PGE) inhibe el efecto antidiurético de ADH; y se precisa por experiencias en homogenados medulares (MARUMO Y EDELMAN) (94), y en cortes medulares, BECK, KANEKO, ZOR, FIELD Y DAVIS (10); y piensan ORLOFF, HANDLER Y BERGSTROM (112), que la producción de pequeñas cantidades de PGE en la médula renal, sirvan de prevención de inapropiadas respuestas del túbulo a las pequeñas cantidades de ADH - circulante.

Asímismo los estímulos β adrenérgicos producen un efecto antidiurético y los estímulos α adrenérgicos un efecto diurético; pero estos efectos, son a nivel de liberación de ADH ya que no se presentan en animales hipofisectomizados.

En cuanto a los efectos directos (HANDLER, PRESTON Y ORLOFF) (58), sobre la célula receptora, han demostrado en la vejiga del sapo una inhibición de cAMP por agentes α adrenérgicos, y proponen que éstos agentes inhiben la adenilciclasa; parece ser, que los β adrenérgicos estimulan la adenil-ciclasa, pero no está claramente demostrado.

La activación de la adenil-ciclasa por ADH acelera la producción de ATP, en la parte más interna de la médula de rata, y el incremento es de diez veces más, BECK, KANEKO, ZOR, FIELD Y DAVIS (10).

GANOTE, GRANTHAM, MOSES Y ORLOFF (43), demostraron en fragmentos de tubos colectores de conejo aislados y perfundidos "*in vitro*", con una solución hipoosmótica en el baño, que el volumen de corriente acuosa inducido por la ADH a través del epitelio tubular, estaba asociado con una hinchazón general de las células y dilatación de los espacios intercelulares, lateral y basilar. Estos cambios morfológicos, se habían observado previamente en otros epitelios, en asociación con un incremento de la transferencia transepitelial de líquido. WHEELER, ROS, Y KING (148), en la vesícula biliar aislada del conejo, Y TORMEY Y DIAMOND (140), describieron la morfología ultraestructural de la misma. GRANTHAM (50), aisla túbulos colectores corticales individualmente de 1-5 mm de largo,

que fueron disecados con forceps de la corteza renal del conejo; y entonces, estudia el comportamiento de un sólo túbulo, en una cámara que contiene una solución isotónica de RINGER; y lo observa directamente a través de una cubierta en el fondo de la cámara, a un aumento de 1.000 X. Para perfundir el túbulo, inserta una micropipeta en uno de los extremos, y le inyecta líquidos hipo ó isotónicos en su luz. Al otro extremo del túbulo se recoge el perfundido en una segunda micropipeta, y calculan la absorción neta, por la diferencia entre lo perfundido y lo recogido. En ausencia de ADH en el medio externo, la absorción neta de líquido era sólo discretamente superior a cero, durante el periodo de observación. Sin embargo, en otro túbulo, la adición de ADH a una concentración hormonal fisiológica, inducía un rápido incremento de la tasa de la absorción neta de líquido. Cuando el líquido perfundido era isotónico con el baño externo, la absorción neta del líquido no era diferentemente apreciable de los valores basales; durante la perfusión con líquido hipotónico y la hormona ADH, no inducía efecto sobre la absorción. Con estos estudios demuestra que la ADH acelera la neta absorción de líquido, por incremento de la permeabilidad al agua; y en esta porción del tubo colector cortical el efecto de la ADH, es altamente selectivo para el agua. BURG, HELMAN, GRANTHAM Y ORLOFF (16), estudian y miden la permeabilidad a urea, tiourea y acetamida, comparándola con la del agua, y encuentran que la ADH no tiene ningún efecto sobre la permeabilidad de compuestos nitrogenados; y aunque no se ha estudiado directamente el efecto de la ADH sobre la permeabilidad a los electrolitos, la hormona no modifica la resistencia eléctrica transtubular de este tejido, a pesar de un pronunciado efecto sobre el potencial eléctrico; y

de ello, concluye GRANTHAM (50), que la permeabilidad transepitelial de los iones, no es afectada por la ADH; por tanto el efecto de la hormona parece ser predominantemente el incrementar la permeabilidad al agua; por ello, resulta un incremento de la absorción pasiva de agua, con retención de solutos dentro de la luz tubular.

Para pasar de la luz tubular al baño, el agua debe cruzar a través de dos membranas en serie, o posiblemente a través de un canal extracelular entre las células; y por tanto, al acelerar el ADH el paso del agua, será por incrementar la permeabilidad del agua en uno de estos dos lugares. Morfológicamente la relativamente alta permeabilidad al agua de la superficie peritubular o sanguínea de los túbulos, se traduce por un rápido incremento de la hinchazón visible de los túbulos, bañados en soluciones hipotónicas (GRANTHAM, GANOTE, BURG Y ORLOFF) (53). Por el contrario, y en contraste, cuando el líquido hipotónico baña el lado de la luz del túbulo, las células no se hinchan, a no ser que esté presente la ADH; y señalan, que en ausencia de una diferencia de osmolalidad transtubular, la ADH no tiene efecto sobre el tamaño de las células; así pues, la conclusión es, que las células se hinchan en respuesta a ADH sólo cuando los líquidos de la luz tubular son hipotónicos; y este fenómeno es interpretado por GRANTHAM, como indicio de que la barrera de la permeabilidad que responde a ADH, está localizada en el lado luminal de la célula receptora.

GRANTHAM (51), estudia por medio del microscopio electrónico las diferentes vías de la corriente transtubular de agua, y comprueba, que los espacios intercelulares están ensanchados, después de la administración

de ADH, en túbulo perfundidos con soluciones hipotónicas, y los compara con túbulo colectores en ausencia de flujo de agua.

Cuando están bañados en solución hipotónica sin ADH, las células están aplanadas, y las células adyacentes están apretadas unas contra otras, sin indicación de ensanchamiento de canales intercelulares, y un círculo de membrana basal rodeándolas. Cuando se añade al baño ADH, 30 minutos antes de microscopía electrónica, las células se redondean en la cara luminal y se ensanchan los espacios intercelulares; pero sólo, cuando la luz del túbulo está bañada por soluciones hipotónicas; esto es, cuando el flujo transtubular de agua procede de la luz del túbulo al baño exterior, y este ensanchamiento de los espacios intercelulares no es consecuencia de una hinchazón osmótica de un compartimento intercelular cerrado conteniendo solutos atrapados, sino debido al flujo de la solución a través del canal. Si ponen ouabaina en los tubos colectores -que es un inhibidor del transporte activo de sodio y de potasio-, no se influye el flujo hidrosmótico ni se previene el agrandamiento del espacio intercelular a la ADH. De lo cual deducen, que no es necesario el transporte activo de solutos para la dilatación de los espacios intercelulares, e indican que el agua fluye por ósmosis continuamente en los canales laterales desde las células, y los solutos deben difundir dentro del canal, presumiblemente del baño exterior, con el microscopio electrónico confirma la presencia de un canal estrecho aproximadamente de 70-300 μ de ancho, en la unión basilar de los espacios intercelulares en los túbulo colectores, entre las células adyacen-

tes, en la base del interespacio. Además en el final apical del espacio intercelular, parece como si, las capas más externas de la mitad de la membrana de las células adyacentes, estuvieran fusionadas.

Por ello, desde el punto de vista morfológico, parece evidente que los solutos difunden rápidamente en los espacios intercelulares laterales, desde el baño, pasando a través de la membrana basal y el canal estrecho de la base de las células, y aquel del espacio intercelular; y están aislados del líquido de la luz tubular, por una apretada unión de las células en el ápice. Considerado así el espacio intercelular, pasaría a ser una parte del gran compartimento del líquido extracelular.

Así pues, el agua entra directamente a través de la membrana apical de la luz del túbulo; y luego, secundariamente el agua pasa libremente a los espacios intercelulares - por ósmosis, a través de las membranas laterales. Y todo ello, lo confirma con cuidadosos e ingeniosos experimentos.

Asímismo comprueba, cuales factores pueden influir en la cuantía del ensanchamiento físico de los canales intercelulares, durante el flujo de agua; y esto depende: 1) de la magnitud de la presión hidrostática local entre las células, 2) y ésta, a su vez de la rigidez o resistencia de la deformidad de las membranas laterales que lo circundan, y miden directamente la deformabilidad de las superficies luminal y basilar de los túbulos colectores; y - aprecian que la membrana basal de la superficie basilar del túbulo, era mucho más rígida que la superficie luminal. Las membranas laterales, tienen aproximadamente la

misma respuesta a la deformación que la superficie luminal, y por ello pueden calcular la presión en el interior de un espacio intercelular dilatado considerando idealmente de forma elíptica, y así en un espacio de 1μ de ancho como máximo, la deformación de la membrana lateral podría ser de $0,5 \mu$ correspondiendo a una presión aproximadamente de $10.000 \text{ dinas/cm}^2$ ó $10 \text{ cm H}_2\text{O}$; o sea, que puede desarrollarse una tensión considerable por estiramiento de la membrana. Sugieren que este tejido elástico distendido, - puede proveer las fuerzas expulsoras, para expeler el agua de los canales intercelulares. Además comprueban que la presión en el interior de los canales intercelulares es importante para su vaciamiento, así el tiempo de desaparición de espacios dilatados en túbulos no perfundidos es aproximadamente de 200 segundos. Y como la membrana basal que los rodea es relativamente rígida, cuando por una distensión brusca de la luz tubular por perfusión, inmediatamente después de que los canales estén dilatados, es posible forzar por presión, las paredes menos rígidas contra la membrana basal, como cuando se comprime una pelota de goma sobre una mesa con la mano. Así pues al distender la luz de los túbulos, la presión en los espacios intercelulares podría incrementarse.

Cuando la luz es distendida bruscamente con líquido, a una presión de tan sólo $5 \text{ cm H}_2\text{O}$, entonces los espacios intercelulares tardan en desaparecer sólo 10-30 segundos; en contraste con los 200 segundos que tardan, cuando no se les aplica esta presión. Esto lo interpretan, indicando que la incrementada presión en el canal intercelular, acelera el flujo hidráulico del líquido a través del poro basilar en el baño exterior. Así pues, la diferencia de presión transtubular, puede de hecho, ejercer profundas influencias en la integridad estructural y funcional de -

de este tejido.

En la fig. n°1, tomada de GRANTHAM (50), se puede apreciar las vías del movimiento de agua inducida osmóticamente en túbulos renales tratados con ADH; las flechas indican las vías del flujo neto de agua en los túbulos colectores.

El flujo de agua pasivo a través de los túbulos colectores es acelerado por la ADH, y se piensa que su acción principal es incrementar la permeabilidad al agua de la membrana luminal de la célula. Una vez entrada el agua en el citoplasma, entonces el agua fluye osmóticamente a través de las superficies laterales, - así como por la superficie basilar de la célula en el compartimiento intersticial. Como consecuencia del - flujo de agua, los espacios intercelulares se agrandan. Algunos de los factores que influyen en el "steady-state" de volumen del espacio intercelular, durante el paso neto del flujo de agua inducido por la hormona anti diurética, son: 1) la cantidad de líquido que fluye a - través del canal, 2) la resistencia hidráulica al flujo en la base del canal, 3) la deformabilidad y elasticidad de las membranas laterales plasmáticas, 4) la diferencia de presión hidrostática transtubular.

Se han comprobado vías independientes para agua y solutos. El efecto de "arrastre" de los solutos y urea por el - agua, apoyan la idea de que los canales acuosos sean lo suficiente grandes para admitirlos; así se han realizado estudios para concretar la cuantía del efecto de "arrastre" del solvente, y donde sería el sitio de la interacción del soluto-solvente en los tejidos vasopresin-sensibles. En el túbulo colector cortical aislado de con

jo, parece haber una disociación completa entre los movimientos de agua y urea; los movimientos de agua se incrementan sorprendentemente después de la vasopresina, pero no se altera el movimiento de urea (BURG Y ORLOFF) (17). En la vejiga del sapo, está acelerado el movimiento de urea en la dirección del neto flujo de agua, cuando se realizan los experimentos en cámaras de difusión convencionales, donde el burbujeo es el agitador de las soluciones (LEAF Y HAYS) (84), pero este efecto de arrastre no es aparente en cámaras agitadas mecánicamente con la acetamida, que está íntimamente relacionada con la urea (HAYS) (61), lo cual sugiere que el aparente "efecto de arrastre" en epitelios relativamente simples tales como la vejiga del sapo, puede ser el resultado del acúmulo de solutos -marcados isotópicamente-, en capas estancadas cerca de la membrana luminal, cuando el agua fluye de la luz a la serosa. La dilución del soluto, puede tener lugar cerca de la membrana serosa. Esta asimetría de la concentración de solutos, puede producir una simetría de las tasas de flujo en dos dimensiones: la agitación mecánica tiende a reducir la simetría de solutos y de ahí la reducción del aparente efecto de arrastre. USSING (142), ha comunicado que la gran molécula de sucrosa, cuyas vías de difusión a través de la piel del sapo, puede ser entre células, muestra un pronunciado efecto de arrastre, en tanto que el glicerol, una pequeña molécula, que probablemente penetra en la membrana celular, muestra poco o ningún efecto de arrastre tras la vasopresina. El piensa, que las vías largas intercelulares permiten una máxima oportunidad al efecto de arrastre; mientras que el efecto de arrastre a través de la membrana celular puede ser pequeño por la corta vía involucrada. Y parece razonable, que el acoplamiento solvente-soluto, pueda ser importante en los canales in-

tercelulares, y cuya existencia en la célula, todavía está en duda.

Por otra parte MACEY Y FARMER (91), encuentran que la floretina, la aglucona y floricina, bloquean el movimiento de urea en el hematíe, pero no el efecto de entrada de agua. Lo mismo sucede en la vejiga del sapo (LEVINE, FRANKI Y HAYS) (86), la cual en presencia de floretina a 10^{-4} M en el medio que baña la luz, inhibe marcadamente el movimiento antes y después de la vasopresina; la floretina inhibe el movimiento de todos los amidas testadas y ciertas noamidas (tiourea, formaldehído) también.

Estos hallazgos indican, que muchos solutos, notablemente las amidas, se mueven a través de la membrana luminal de la vejiga por una vía, la cual puede ser separada experimentalmente de la del flujo osmótico de agua. LEVINE, FRANKI Y HAYS (86), demuestran que esta vía tiene una de las propiedades para facilitar difusión: se satura a estos niveles de sustrato. En presencia de acetamida 125 y 150 mM en ambos lados de la vejiga, por ej.: el movimiento de la acetamida parte significativamente de la linealidad, indicando que en algún punto de la membrana hay un limitado número de sitios de unión o sitios de reconocimiento para la acetamida, los cuales llegan a estar saturados a elevadas concentraciones de sustrato. Otras amidas, tales metilurea, exhibe este tipo de auto-saturación mucho más marcado. Y asimismo hay competición entre diferentes amidas por los puntos de unión, así propionamida y metilurea, ambas inhiben el movimiento de urea a través de la vejiga.

En resumen, el agua y los solutos se mueven a través de la membrana en respuesta a la vasopresina, con estas características:

- 1) el movimiento de agua a través de la membrana luminal tiene lugar grandemente, sino completamente, por un proceso de difusión.
- 2) el movimiento de agua, puede disociarse experimentalmente de los muchos solutos, tales amidas.
- 3) el efecto de arrastre del solvente puede tener lugar - también en los canales intercelulares.
- 4) el movimiento de las amidas, y posiblemente de otros solutos parece ser facilitado por difusión y exhiben saturación; y agentes tales como: floretina, y cromato, bloquean esta "vía de las amidas". HAYS, LEVINE proponen este esquema. Fig. n°

Alteraciones en la membrana luminal. Asimismo se han observado alteraciones en la membrana luminal inducidas por la vasopresina. GRANTHAM (50), ha demostrado la deformabilidad física de la superficie urinaria de las células del túbulo colector del conejo, y la mide determinando la presión negativa requerida para chupar un abombamiento hemisférico de la superficie celular urinaria en el pico de una micropipeta, y esta reducción era aproximadamente de un 25% en la presión registrada en los túbulos tratados con vasopresina. MASUR, HOLTZMAN Y WALTER (95), han comunicado que los gránulos secretores que yacen debajo de la superficie luminal, se llegan a hacer continuos con la superficie de la membrana, después de vasopresina, permitiendo a los gránulos descargar su contenido, con el cual pueden revestir la superficie de la célula. Este tipo de exocitosis tiene lugar, dos horas después de la adición de vasopresina; lo cual pone en duda, su relación con la -

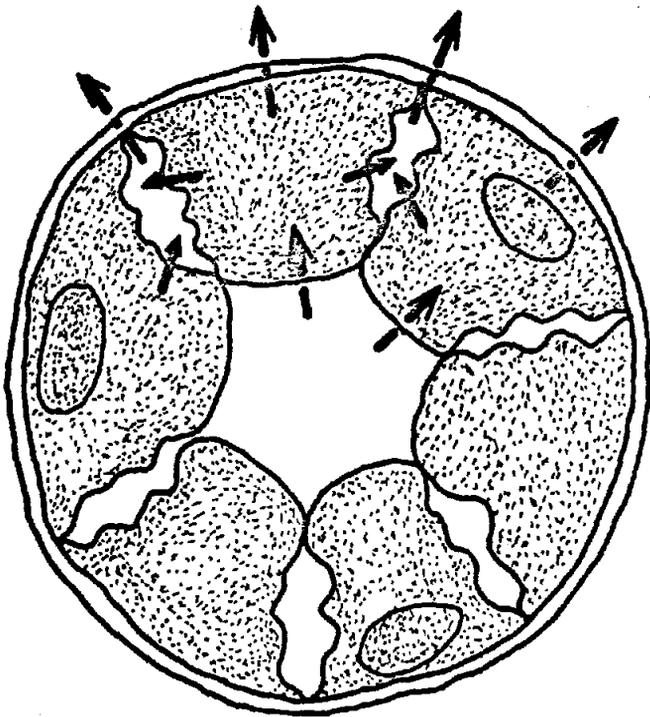


FIGURA 1.

Vías propuestas para el movimiento de agua neta inducida osmóticamente en túbulos colectores tratados con vasopresina.

Las flechas indican las vías de flujo de agua neta (según GRANTHAM).

hormona, habida cuenta de la rapidez de la acción fisiológica.

TAYLOR, MAMELOK, REAVEN Y MAFFLY (137), llaman la atención sobre el posible papel de los microtúbulos y microfilamentos en la acción de la vasopresina, pues cuando estos se interrumpen por colchicina, vinblastina y citochalasin B, inhiben el efecto de la vasopresina y cAMP sobre el flujo osmótico de agua a través de la vejiga del sapo; es posible, que los microtúbulos y microfilamentos, que se han observado en los microvillo y región subplasmalemal de la superficie apical, ejerzan sus efectos por liberación de gránulos de secreción, por su involucración en la corriente del citoplasma o de alguna otra manera.

Perfundiendo fragmentos de túbulos colectores de la cortical, en ausencia de ADH tienen una muy baja conductividad hidráulica (Lp) y una muy baja permeabilidad a la urea; y cuando se añade ADH la Lp se incrementa tanto como diez veces o más, pero la permeabilidad a la urea no se modifica (GRANTHAM Y BURG) (52), (BURG, HELMAN, GRANTHAM Y ORLOFF) (16), (SCHAFFER Y ANDREOLI) (128). El túbulo colector de la parte más interna médulo-papilar en ausencia de ADH, también tiene una baja Lp, pero su permeabilidad a la urea es más alta que la permeabilidad a la urea de la porción cortical y más externa de la medular; en presencia de ADH, la Lp de los túbulos colectores papilares se incrementa en un más elevado valor que aquel del segmento cortical, y la permeabilidad a la urea también está significativamente incrementada (MORGAN Y BERLINER) (99), (MORGAN, SAKAI Y BERLINER) (100), (MORGAN) (98).

Con técnicas de microcateterización "in vivo" (SONNENBERG) (135), y recogida de muestra de líquido, a distintos si-

tios a lo largo del sistema de túbulos colectores (CTS); la osmolalidad se incrementa en la antidiuresis, con el máximo incremento en los dos últimos tercios de la zona medular, que corresponde a la parte más interna medular del sistema de túbulos colectores y en la diuresis acuosa el líquido del túbulo llega a ser más diluido a medida que pasa a través de los túbulos colectores. Cuando estudian la proporción de inulina de TF/p (líquido tubular/plasma) revela que no hay un cambio tajante en la tendencia de la diuresis acuosa. Sin embargo en la antidiuresis, la principal proporción inulina TF/p alcanza de - 20 (equivalente al 5% de la carga de agua filtrada que permanece al comienzo del túbulo colector) a aproximadamente 100, en la punta del túbulo colector, indicando - que la excreción del procentaje del filtrado glomerular (GFR) y la neta reabsorción a lo largo de CTS medular, es de 4% del GFR.

JAMISON, BUERKERT Y LACY (68), estudian muestras de líquido de túbulos colectores papilares de ratas con diabetes insípida hereditaria, en la punta y a 1 mm, antes de la punta. En diuresis acuosa la osmolalidad TF/p era más baja en la punta que la osmolalidad TF/p en el sitio de la muestra proximal; demostrando que el túbulo colector participaba en la dilución de la orina. La osmolalidad del líquido y a través del túbulo colector era substancialmente menor que aquella del intersticio papilar circulante, como se deducía de la osmolalidad TF/p del asa. En antidiuresis (producida por ADH) la osmolalidad del líquido en todos los lugares (túbulo colector proximal, punta del túbulo colector y asa) se incrementaba con la osmolalidad del líquido de la punta, igual a la del asa. Sin embargo la cantidad -

de agua reabsorbida por los túbulos colectores papilares, era actualmente más grande en la diuresis que en la antidiuresis. Se reabsorbía más agua en los segmentos terminales de los túbulos colectores en la diuresis acuosa, porque la permeabilidad hidráulica, aunque muy baja, era aún finita, y la diferencia de osmolalidad entre líquido terminal e intersticio llegaba a ser muy grande, - aproximadamente de 350 mosm/kg H₂O, puesto que la papila permanecía hipertónica. El volumen de líquido remanente al final del túbulo colector cortical en la antidiuresis, estaba reducido en cuantía, aún cuando la permeabilidad del agua de los túbulos colectores medulares estaba incrementada, la cantidad absoluta de agua reabsorbida por la parte más interna medular y tubos colectores papilares era menor.

TISHER, BULGER Y VALTIN (139), encuentran los mismos cambios "*in vivo*" en la médula interna y en los túbulos colectores en la cortical ("*la última parte*" del túbulo distal) de ratas Brattleboro (ratas con diabetes insípida - hipotalámica transmitidas por herencia recesiva (cuyas células supraópticas producen oxitocina, pero no vasopresina), antes y después de la administración de ADH.

c) REVISION DE ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

En la revisión que hacen THOMPSON Y APPLEMAN (138), de la acción de los glucocorticoides, se esbozan dos tipos de las mismas:

a) uno simple, directo, que se traduce por la "*inducción de enzimas*", esta acción depende del impacto del esteroide sobre los receptores citoplasmáticos, y este complejo

receptor-esteroide entra en el núcleo celular modificando o nó, y allí se intercambia con un receptor nuclear, que actúa sobre el DNA. El resultado de esta acción, es una alteración de la cuantía de síntesis de ciertas especies de mRNA y supresión de la síntesis de proteínas enzimáticas o estructurales, en el mismo o en otro tejido. Todo ello explicaría la "inducción (o supresión) enzimática", que se traduciría en efectos anabólicos y catabólicos o inhibidores; y en otros efectos observados, consecuencias de aquellos, tales los efectos de los corticosteroides sobre el crecimiento, diferenciación y procesos inflamatorios.

b) y otro, que se ha dado en llamar "acción permisiva" para ciertas hormonas-péptidas y catecolaminas, que se traducen en múltiples efectos; mejor comprendidos en la: lipólisis, glucogenolisis y gluconeogénesis.

Esta frase de "acción permisiva" de los glucocorticoides fué primeramente utilizada por INGLE (), en 1.951, para indicar "que los glucocorticoides a concentración fisiológica son necesarios para un número de efectos metabólicos mediados por otras hormonas".

Una vez liberado el cortisol, de la corteza adrenal, ha de ser transportado a los receptores citoplásmicos de los órganos efectores, para lo cual pasa al plasma, donde se une ampliamente a una α globulina específica, llamada transcortina o globulina que une corticosteroides (*corticosteroid binding globulin*", CBG), que está aislada y purificada aunque esta globulina tiene una alta afinidad por el cortisol, tiene una relativa baja capacidad de -

unión, su concentración en el hombre es de 7×10^{-7} M, lo que la sitúa en el límite superior de su capacidad de unión (ROSENTHAL, SLAUNWHITE Y SANDBERG) (124). Otra cantidad variable de cortisol, se une a la albúmina, con una baja afinidad, y aproximadamente menos de un 10% de cortisol queda no unido o libre; y se acepta unánimemente, que esta pequeña cantidad libre fisiológicamente, es la que actúa en circunstancias fisiológicas con el tejido efector, SLAUNWHITE, LOCKIE Y BACH (132). SLAUNWHITE, LOCKIE Y BACH (132), encuentran en el ratón, que fracasa en responder a una dosis de cortisol en un ensayo standard de mantenimiento de glucógeno, cuando es tratado con cortisol-transcortina, en tanto que responde en iguales cantidades de cortisol libre.

MATSUI Y PLAGER (96), encuentran que el cortisol induce inhibición de la oxidación de glucosa a CO₂ en tiras de oreja de ratón "*in vitro*"; y se correlaciona con la concentración de cortisol no unido a proteínas, y con la cuantía de cortisol total. La potencia incrementada biológica de los análogos sintéticos de los glucocorticoides, se explica por su disminuída unión a transcortina.

Por otro lado, y en afirmación de los anterior, se han descrito familias con cantidad disminuída de CBG y con ello del cortisol plasmático total, y a pesar de este descenso de las cifras de cortisol, esto sujetos no muestran signos de insuficiencia suprarrenal, DE MOOR, HENDRIKX Y STEEN (28), DOE, LOHRENZ Y SEAL (33).

A) La más aceptada y fácil explicación de acción de los glucocorticoides, se basa en el modelo de alteración de la expresión-genética (Altered-gene-expression model); y la cual precisa la existencia de receptores de glucocorticoides en el citosol (BAXTER Y TOMKINS) (9), que serían pro-

teínas de alta afinidad y alta especificidad para los glucocorticoides, que se han demostrado en los timocitos, - MUNCK, Y WIRA (104), en linfoblastos leucémicos, LIPPMAN, HALTERMAN Y LEVENTHAL (88), en fibroblastos, HACKNEY Y - PRATT) (56), PRATT E ISHII (115); y en linfosarcomas - HOLLANDER Y CHIU (64). Estos receptores, son termolábiles y aunque es extraordinariamente fácil extraerlos de la célula, no han sido todavía completamente purificados, y se calcula que cada célula posee de 10^4 a 10^5 receptores; y en tejidos, en los cuales se ha inducido una resistencia a los esteroides (usualmente por crecimiento de varias generaciones de células en presencia de glucocorticoides y selección de los supervivientes) (ARONOW Y GABOUREL) - (5), es frecuente comprobar una gran disminución en el número de receptores (HACKNEY, GROSS Y ARONOW) (56), - (KIRKPATRICK, MILHOLLAND Y ROSEN) (72), (BAXTER, HARRIS, Y TOMKINS) (8).

El siguiente paso a la formación del complejo esteroide-receptor, es su transferencia al núcleo o la transferencia del esteroide a un receptor semejante del núcleo - (ISHII, PRATT, Y ARONOW) (66). Este transporte es termosoluble, así si después de que el esteroide está unido al receptor, se mantienen las células a 2°C no se produce la asociación del esteroide con el núcleo (MUNCK, WIRA Y YOUNG) (105), y por estudios "in vitro" posteriores, se ha comprobado que la temperatura induce una transformación en el receptor citoplásmico.

Y puesto que ahora hay evidencia de que toda la célula - incluido el núcleo, es permeable libremente a los glucocorticoides, se ha sugerido por MUNCK, que sería más adecuado decir que es el receptor citoplásmico el que necesita un transportador ("carrier") a fin de entrar en el

núcleo, más bien que el receptor transporte al esteroide.

No está todavía claro, si hay independientemente, o no, receptores nucleares para los glucocorticoides: así VAN DER MEULEM, MARX, SEKERIS, ABRAHAM Y SEKERIS (144), demuestran que los glucocorticoides pueden ejercer efectos específicos sobre la polimerasa RNA nuclear del hígado - y del timo, cuando son incubados núcleos aislados con el esteroide, en ausencia del citosol. Más recientemente se ha aislado, parcialmente purificado el receptor glucocorticoide de núcleos lavados de triton, VAN DER MEULEN, - ABRAHAM Y SEKERIS) (143); y cuando este receptor es eliminado del núcleo, no se puede conseguir ningún efecto por los glucocorticoides; ni añadiendo esteroides y receptor citosólico, pero la respuesta se obtiene, si se añade también receptor nuclear.

Cuando todo lo anterior sucede, se produce una serie de acontecimientos que traducen el efecto de los glucocorticoides por la síntesis de nuevas clases de m RNA. La evidencia se ha obtenido en: células grasas (CZECH Y FAIN) (24), timocitos (MUNCK) (103), linfosarcoma - (ROSEN, FINA Y MILL HOLLAND) (122), y músculo (KOSTYO Y REDMOND) (76); basados en el uso de actinomicina D; cuando ésta se añade, antes o junto con el glucocorticoide, la respuesta es bloqueada. KIDSON (70), ha estudiado la acción del cortisol en la cinética de la síntesis de RNA en ganglios linfáticos del conejo, y comunica una parcial inhibición de la síntesis de RNA; que es detectada 1 minuto después de la adición de cortisol, seguido de un periodo de detención, en el cual - se notan efectos sobre la síntesis de proteínas, y - entonces, tiene lugar un brote breve de síntesis de - proteínas, seguida de una inhibición final de la sín-

tesis de proteínas.

El cómo del punto final de acción de los glucocorticoides: la actividad de la RNA polimerasa, todavía está oscuro. Así BAXTER Y FORSHAM (7), comprueban que los glucocorticoides incrementan en el hígado; la toma de precursores de RNA, la actividad de RNA polimerasa, y la capacidad de m RNA, y los tres efectos ocurren independientemente uno de otro. El efecto más marcado, se nota sobre la RNA polimerasa (YU Y FIEGELSON) (150), en los timocitos de rata encuentran que los glucocorticoides provocan un descenso en la actividad de la RNA polimerasa dentro de los 30 minutos siguientes, por un proceso que no requiere la síntesis de proteínas. NAKAGAWA Y WHITE, sin sugerir que uno de los receptores de glucocorticoides del núcleo pudiera ser la RNA polimerasa, demuestran en el útero, que el complejo receptor-estrógeno, puede interactuar con la RNA polimerasa nucleolar con un marcado incremento de la actividad de la misma. Asimismo todo ello estaba de acuerdo con la observación de que se requiere un receptor glucocorticoide, localizado en el núcleo, para inducir los efectos del esteroide en la RNA polimerasa en los timocitos (VAN DER MEULEN, ABRAHAM Y SEKERIS) (143).

FOX Y GABOUREL, (41), encuentran que el cortisol inhibe primariamente la RNA polimerasa DNA dependiente, sin embargo otros (VAN DER MEULEN, MARX Y SEKERIS) (144), encuentran estimulación de la fracción extranuclear de la RNA polimerasa, mientras que la síntesis de RNA estaba disminuida. SADJEL Y JACOB (126), han sugerido que los glucocorticoides provocan una alteración alostérica en la RNA polimerasa nucleolar, resultado un incremento de su actividad.

La objeción general, para invocar una alterada actividad de la RNA polimerasa como explicación de la acción de los esteroides, reside en la inespecificidad de esta respuesta. Aún en las células en las que la respuesta a los glucocorticoides es una disminución de la actividad de la RNA polimerasa, a pesar de ello, hay incremento de la síntesis de algunas proteínas (ROSEN, ROBERTS, BUNDNICK) (123).

Se ha indicado por otra parte, que los esteroides pueden alterar la capacidad de ciertos genes para la transcripción (de-represión). La mayoría del genoma de los mamíferos, está en "reposo" para la transcripción; y ésta se transcribe, cuando es necesario, por la síntesis de mRNA y consecuente síntesis de proteínas; cualquiera alteración de este mensaje, puede controlar la síntesis de estas proteínas. Y aún cuando se ha demostrado, que los esteroides se pueden unir directamente a las histonas que enfundan el DNA, este hecho no explica las alteraciones en la transcripción, (por otra parte la hidrocortisona se ha demostrado no tiene ningún efecto sobre la síntesis de las histonas); por otra parte, el complejo receptor-esteroide se unía de una manera saturable al DNA (KING Y GORDON) (71); y se precisa que todo el juego: esteroide, receptor citoplasmático, receptor nuclear y DNA deben ser modulados aún, por otras moléculas, quizás proteínas ácidas nucleares.

Una tercera alternativa en la interacción esteroide-gene, sería que el complejo corticosteroide-receptor actuara bloqueando la transcripción de RNAs, responsables del control de expresión de otros RNAs. Este modelo post-transcripcional se ha basado en observaciones sobre la inducción por glucocorticoides de tirosina aminotransferasa.

B) Otra acción de los glucocorticoides es el llamado efecto "*permisivo*". Con ello se requiere significar, que los glucocorticoides a concentración fisiológica son necesarios para un número de efectos metabólicos mediados por otras hormonas. Los procesos en los cuales están involucrados el cAMP están íntimamente implicados en estas respuestas.

Donde se han estudiado más intensamente el efecto "*permisivo*" de los glucocorticoides es en la regulación hormonal del metabolismo de la glucosa, en especial en la neoglucogenolisis en músculo e hígado; lipolisis en grasa y músculo; y el metabolismo de la glucosa en los timocitos.

En animales adrenalectomizados está impedida la estimulación de la neoglucogénesis en el hígado por el glucagón - o epinefrina, lo cual se corrige y normaliza cuando se administra glucocorticoides SAYER (127), EXTON, JEFFERSON Y BUTCHER (36); y esto no es debido a una disminución de la cuantía de cAMP, o a una disminución de la sensibilidad FRIEDMAN, EXTON Y PARK (42); y en estudios de glucogenolisis en hígado perfundido de ratas adrenalectomizadas EXTON, MALLATE Y JEFFERSON (37), no encuentran incremento de la glucogenolisis, en respuesta a cAMP ó epinefrina; y MILLER, EXTON Y PARK (97), en corazón aislado y perfundido de ratas adrenalectomizadas, encuentran una respuesta disminuída a dosis subóptimas de epinefrina, lo cual es normalizado por tratamiento con cortisol. Estos autores demuestran que el efecto de los animales adrenalectomizados, reside en la incapacidad de la epinefrina en activar la fosforilasa. Y estos datos sugieren que en estas circunstancias los glucocorticoides son necesarios para mantener la actividad de la fosforilasa o kinasa; y comprueban que en el

corazón de las ratas adrenalectomizadas, no está deprimida las actividades de la fosforilasa total ni de la fosforilasa β kinasa, y puesto que añadiendo glucocorticoides y elevando la concentración de calcio del perfundido, también se restaura la actividad de la fosforilasa β kinasa, sugieren estos autores que alguno de los efectos "permissivos" - de los glucocorticoides, pueden ser debidos a las alteraciones que inducen en el transporte de calcio.

SCHAEFFER, CHENOWETH Y DUNN (129), han comprobado también en ratas adrenalectomizadas, un descenso en la neoglucogénesis e hiperglucemia inducidas por epinefrina y cAMP; estos animales tenían disminuidos grandemente los niveles de glucógeno fosforilasa inactiva en el hígado, sin estar alterados los niveles activos. Esta reducida cuantía de fosforilasa inactiva, no era activada por epinefrina ni por cAMP, - hechos semejantes a los obtenidos por EXTON, MALLETE Y JEFFERSON (37), que hemos comentado en párrafos anteriores. La proporción de AMP a cAMP no estaban alterados en los animales adrenalectomizados, sugiriendo que la deficiencia de glucocorticoides no afectaba a la actividad fosfodiesterásica. Ambos niveles de fosforilasa activa e inactiva, se incrementaban después de hidrocortisona; lo que les sugiere, que el efecto de los glucocorticoides sería por la síntesis de enzimas.

Asímismo se ha investigado la glucogenolisis en el músculo de ratas adrenalectomizadas, y SCHAEFFER, CHENOWETH Y DUNN (129), no encuentran alteraciones en el nivel de glucógeno fosforilasa activa e inactiva, y asímismo la epinefrina y cAMP fracasan en activar la forma inactiva de fosforilasa, y esto se corrige con glucocorticoides.

Por otra parte, los glucocorticoides pueden también inter-

actuar con el sistema cAMP alterando los niveles de fosfodiesterasa. En células cultivadas de hepatoma (HTC) MANGANIELLO Y VAUGHN (93), encuentran que la adición de 1 m M dexametasona induce un descenso de la actividad fosfodiesterásica con un discreto aumento de los niveles de cAMP. Sin embargo, el pretratamiento de estas células con dexametasona, aumenta marcadamente el incremento de cAMP de estas células después de la administración de epinefrina. Asimismo SCHAEFFER, CHENOWETH Y DUNN (129), encuentran alteraciones en la actividad fosfodiesterásica por la adrenalina que se modifica al administrar glucocorticoides.

Otro ejemplo de acción "permissiva" de los glucocorticoides se puede comprobar en el tejido adiposo. Los glucocorticoides incrementan la lipólisis "in vivo"; y son necesarios para que la lipólisis inducida por la epinefrina tenga lugar; en su ausencia, se bloquea el efecto de la misma, que se recupera en presencia de cantidades fisiológicas de glucocorticoides, GOODMAN Y KNOBIL (49), RESHEF Y SHAPIRO (120). Cuando se induce "in vitro" lipólisis por glucocorticoides, esta tiene lugar después de un lapso de dos horas y a concentraciones tan pequeñas como 10^{-8} M de dexametasona; y la insulina es capaz de invertir por completo los efectos del esteroide, tanto en la toma de glucosa como en la liberación de ácidos grasos (FAIN, SCOW, CHERNICK) (40), SENFT, SCHULTZ Y MUNSME (131), comprueban que los glucocorticoides disminuyen la actividad de la fosfodiesterasa en los adipocitos; y por el contrario, la actividad fosfodiesterásica está aumentada en los animales adrenalectomizados; la insulina antagoniza los efectos de los glucocorticoides reduciendo la concentración intracelular de cAMP. Asimismo es conocido, que también está aumentada la actividad fosfodiesterásica en el hígado, músculo y riñón de ratas adrenalectomizadas, FAIN (38) comprueba "in vitro" que la fosfodiesterasa cardiaca era inhibida competi-

tivamente por los glucocorticoides, pero sólo en concentraciones no fisiológicas (más de 1 mM). "In vivo" la actividad de la fosfodiesterasa cae después de haber sido tratada con 1 mlgr./kg de 6-metilprednisolona, pero sólo después de un periodo de 2 horas, lo cual sugiere la síntesis de proteínas.

En favor de lo anterior, están las investigaciones de que los inhibidores de RNA y de la síntesis de proteínas tales como Actinomicina D, Puromicina y Cicloheximida, pueden bloquear la acción lipolítica de los glucocorticoides (FAIN) (38); asimismo ha demostrado este autor, que los glucocorticoides producen un incremento de la sensibilidad de los adipocitos de 5 a 10 veces, a la teofilina o nor-epinefrina sin afectar a la respuesta máxima de estos agentes. Y mientras que la cicloheximida bloquea este efecto "permissivo" de los glucocorticoides; los glucocorticoides bloquean la acción lipolítica del dibutiril cAMP, sugiriendo que los esteroides estimulan la síntesis de proteínas involucrados en la formación, pero no es la acción de cAMP. FAIN (38), explica estos hallazgos, indicando que un pequeño incremento en la síntesis de cAMP por glucocorticoides podría incrementar la lipólisis sólo si la neta degradación de cAMP por la fosfodiesterasa fuera disminuida por la teofilina. La máxima estimulación de la lipasa por teofilina o nor-epinefrina, pudiera sólo estar limitada por la cantidad de lipasa inactiva. Esto podría explicar el fracaso de los esteroides en incrementar la máxima cuantía de lipólisis inducida en este sistema.

Asimismo los glucocorticoides pueden inhibir el metabolismo de la glucosa en el adipocito (FAIN) (38) así como en el tejido linfoide; BUYETT Y HOFERT (14), encuentran que epinefrina a 10^{-8} M disminuye significativamente la

toma de glucosa y producción de lactato en células del timo, sólo en presencia de cortisol, mientras que se produce una inhibición con la adición de las dos.

Estas observaciones podrían explicarse de la siguiente manera, o bien el cortisol induce un descenso en la actividad fosfodiesterásica, o bien produce un incremento en la síntesis del substrato para cAMP; ambos mecanismos se han sugerido en otros sistemas, en los cuales los glucocorticoides tienen un efecto "permisivo".

Otros sistemas estudiados en los cuales los glucocorticoides tienen un efecto "permisivo" serían:

a) la secreción de hormonas tiroideas en explantes de tiroides de ratón, por estímulo de la tirotropina, que están grandemente incrementados por los glucocorticoides, COLLE-VANDEVELDE Y ELEWAUT.

b) en cultivos fibroblastos humanos, los glucocorticoides que tienen muy poco efecto sobre los niveles de cAMP, incrementan grandemente la actividad de la prostaglandina E y catecolaminas, MANGANIELLO, BRESLOW Y VAUGHN (93).

c) el cortisol en muy baja concentración (10^{-9} - 10^{-8} M) estimula la proliferación de los timocitos de rata a través de un proceso, que involucra cAMP (WHITFIELD, MAC MANUS Y RIXON) (149), y a su vez 10^{-9} cAMP en presencia de $2,5 \times 10^{-10}$ M cortisol (ninguno de los dos por separado son capaces de estimular estas células) estimulan fuertemente la mitosis de estas células.

Aunque en general cAMP y glucocorticoides inducen señales metabólicas que "mueven" a la célula en direcciones paralelas, sus modos de acción parecen ser diferentes, pero no siempre es así. Asimismo, para todos los efectos "permisi-

vos" de los glucocorticoides, es necesario un periodo de tiempo característico (hemos visto en varias experiencias unas 2 horas), para que su efecto se produzca, lo cual - sugiere la síntesis de proteínas.

d) ANTECEDENTES QUE RELACIONAN ADH Y GLUCOCORTICOIDES EN LA IMPEDIDA ELIMINACION DE AGUA EN LA INSUFICIENCIA SUPRARRENAL.

Muchos han sido los trabajos realizados para concretar la causa de la incapacidad de excretar una sobrecarga de agua oral o parenteral, por las personas afectadas de insuficiencia primaria o insuficiencia hipofisaria (insuficiencia suprarrenal secundaria), y en los animales adrenalectomizados y los hipofisectomizados. Esta deficiencia se corrige con la administración de glucocorticoides (GARROD Y BURSTON) (44), (GARROD, DAVIES Y CAHILL) (45), (SLESSOR) (133) (PEARSON, MENDELSON Y WEST) (113), pero no con deoxicorticosterona (DCA), (GARROD Y BURSTON) (44), (GARROD, DAVIES Y CAHILL) (45), no con aldosterona (KEKWICK Y PAWAN) (69), (PRUNTY, MC SWINEY, MILLS Y SMITH) (116).

GAUNT, BIRNIE Y EVERSOLE (46), SLESSOR (133), LLOYD Y LOBOTSY (90) sugirieron la posible existencia de un "equilibrio" homeostático entre ADH de la neurohipófisis y los corticoides suprarrenales 11, 17 hidroxilados; e indicaron que en ausencia de estos últimos, debía existir un exceso relativo o absoluto de ADH en plasma, e incluso con técnicas de bioensayo se habían logrado detectar - en estas circunstancias, altos niveles de ADH circulante (SLESSOR) (133), (LLOYD Y LOBOTSKY) (90); AHMED, GEORGE GONZALEZ-AUVERT Y DINGMAN, (4), encuentran elevados niveles de ADH en el plasma de sujetos insuficientes supra

renales a pesar de hidratación suficiente, y comprueban - que los glucocorticoides lo vuelven a la normalidad; sin - embargo con técnicas más específicas y viables no se ha - conseguido detectar (VAN DYKE, AMES Y PLOUGH) (145), - (STRAUSS) (136), (CHALMERS Y LEWIS) (35), y además el insu - ficiente adrenal primario ó secundario , inactiva normalmen - te la ADH exógena ("*pitressin*"), y no es hipersensible a - ella (CHALMERS Y LEWIS) (25).

Lo anterior, unido a los trabajo de KLEEMAN, MAXWELL Y ROCK - NEY (75), KLEEMAN, KOPLOWITZ, MAXWELL Y CUTLER (74), indi - can que la corrección de la diuresis por los glucocorticoi - des no se debe a la corrección de la hemodinámica renal, - ni a la alteración de la reabsorción de solutos; y que la - formación, liberación e inactivación de ADH son normales - en la insuficiencia suprarrenal, aunque existían estudios, - la mayoría practicados en ratas normales o adrenalectomiza - das, en los que se sugería que un exceso de glucocorticoi - des parecía bloquear la liberación de ADH de la neurohipó - fisis (DINGMAN Y THORN) (31), (DIGMAN Y DESPOINTES) (30) (DIGMAN) (29) (GAUNT, LLOYD Y CHART) (47); en tanto que - otros admitían, que la deficiencia de glucocorticoides in - crementaba su liberación (GAUNT, BIRNIE Y EVERSOLE) (46), (GAUNT, LLOYD Y CHART) (47), (SLESSOR) (133); retrasaban su inactivación (GAUNT, BIRNIE Y EVERSOLE) (45), o incre - mentaba la sensibilidad del túbulo renal a su acción -- (GAUNT, LLOYD Y CHART) (47).

A su vez, se ha sugerido que los glucocorticoides pueden - ser antagonistas, de ADH (LLOYD Y LOBOTSKY) (90), (GAUNT BIRNIE Y EVERSOLE) (46).

KLEEMAN, CZACZKES Y CUTLER (73), miden con técnicas preci - sas la ADH circulante, y encuentran que en el plasma de -

hombre con insuficiencia suprarrenal oscilaba entre 3,5 y 4,0 μ U/ml plasma después de 11 á 12 horas de restricción de líquido que son semejantes a los del hombre normal en idénticas circunstancias. Cuando se dá una sobrecarga de agua, la actividad antidiurética del plasma desaparece, lo mismo que en el sujeto normal (CZACZKES, KLEEMAN Y KOENING) (23). En perros, miden antes y después de la adrenalectomía, y los niveles de prehidratación de ADH antes y después de la adrenalectomía eran 6,0 μ U/ml, comparados a 4,0 μ U/ml y 5,0 μ U/ml respectivamente. En ratas adrenalectomizadas no fué posible detectar en el plasma ADH durante una diuresis sostenida y anestesia por etanol; hecho semejante se observó en ratas normales, en circunstancias semejantes no se pudo detectar actividad antidiurética en plasma, a pesar de la dificultada diuresis.

Tanto en el hombre con insuficiencia suprarrenal, como en el perro y rata adrenalectomizados, la diuresis acuosa estaba significativamente impedida, a pesar de tener niveles circulantes de ADH de menos de 0,25 μ U/ml. Tan bajas concentraciones de ADH están siempre asociadas en el animal normal, con una diuresis acuosa máxima o casi máxima, y en la insuficiencia suprarrenal no se incrementa la sensibilidad de la nefrona. Así pues, esta cantidad residual de ADH circulante, durante una carga de agua sostenida, no es responsable de la diuresis acuosa dificultada de la insuficiencia suprarrenal; confirmando directamente, lo que ya indirectamente habían afirmado, que la eliminación dificultada de agua de la insuficiencia suprarrenal que se corrige con los glucocorticoides, no es debida a ninguna alteración de la liberación, metabolismo o acción de la ADH.

KLEEMAN, KOPLOWITZ, MAXWELL, CUTLER Y DOWLING (74), estudian la interrelación entre los esteroides adrenales (ad-

ministrados aguda y crónicamente) y la ADH, en sujetos normales y en sujetos con diabetes insípida, y no pueden demostrar en los sujetos normales, ningún antagonismo entre ADH y glucocorticoides; tampoco pueden demostrar ninguna alteración en la liberación, inactivación de ADH ni que la acción tubular renal de la ADH estuviera alterada, antes de la administración de glucocorticoides. La administración crónica de glucocorticoides, aumenta significativamente la máxima diuresis acuosa en los sujetos normales y en los que tienen una diabetes insípida. Aunque este aumento se acompañaba frecuentemente de un incremento de la hemodinámica renal y/o en la excreción de solutos, pero que puede ocurrir sin cambios significativos en estos parámetros; y confirma las anteriores observaciones de RAISZ, MCNEELY, SAXON Y ROSENBAUM (118), y los de VESIN (146).

Se había demostrado que una contracción o redistribución de los volúmenes vascular y extracelular, podían causar una continuada secreción de ADH (STRAUSS, (136), SMITH, (134), y parecía razonable pensar, que en la insuficiencia suprarrenal una distorsionada relación entre ambos volúmenes, pudiera contribuir a la diuresis reducida; y si esto fuera así, sería posible mejorar la diuresis por una apropiada expansión de los compartimentos extracelulares o vasculares, antes o durante una sobrecarga de agua, y esto es lo que realizan CUTLER, KLEEMAN, KOPLAWITZ, MAXWELL Y DOWLING (22), infundiendo suero salino o albúmina a 13 sujetos con insuficiencia adrenal o hipofisaria, que tenían diuresis reducida, y comparan los resultados obtenidos con los efectos de la administración de esteroides. Encuentran una moderada mejoría de la diuresis causada por la expansión de volumen, debida probablemente al incremento concomitante de la hemodinámica renal o la ex-

creción de solutos o de ambos. Después de la administración de esteroides, hubo una más grande diuresis, debido probablemente a un efecto directo o precario sobre el túbulo renal, así como un incremento de la hemodinámica renal o eliminación de solutos o ambos; y concluyen que este incremento de la diuresis no es causado por un "*estímulo aberrante de volumen*" y liberación de ADH.

ACKERMAN Y MILLER (2), comprueban en sujetos con insuficiencia suprarrenal la eliminación disminuída de agua; y que ésta es rápidamente corregida tras la administración de glucocorticoides; y recogen la sugerencia clínica de que ésto es debido a la hipovolemia consecutiva al déficit de sodio; y para comprobar si ésto era cierto, provocan hipovolemia por deplección de sodio en sujetos normales y comparan los patrones diuréticos, y asimismo, comparan estos con aquellos sujetos con insuficiencia suprarrenal mantenidos con mineralocorticoides, pero sin glucocorticoides. Efectivamente comprueban que la hipovolemia impedía significativamente la diuresis acuosa en sujetos normales, pero que los glucocorticoides no tenían ninguna influencia sobre este efecto de la hipovolemia. La diuresis reducida acuosa de la insuficiencia suprarrenal difiere de la inducida en el sujeto normal por hipovolemia, la mayor diferencia consistía en una incrementada reabsorción de agua en el túbulo proximal. En tanto que en la insuficiencia suprarrenal, el impedimento mayor de la diuresis acuosa era la reabsorción del líquido en el túbulo distal y por consiguiente la excreción de una orina concentrada. En estos enfermos, la administración de glucocorticoides eran más potentes en restaurar la diuresis normal que la expansión de volumen.

En el sujeto normal, RAISZ, MC NEELY, SAYON Y ROSENBAUM -

(118), comprobaron la influencia sobre la diuresis de cortisona e hidrocortisona después de una sobrecarga de agua, y vieron que se incrementaba regularmente tras la administración de esteroides cualquiera que fueran los cambios en la - toma dietética y eliminación urinaria de sales de sodio; si la dieta era pobre en sal comprobaban un incremento del flujo máximo de orina y del aclaramiento de agua libre. La incrementada excreción de agua era usualmente acompañada, pero no invariablemente, de un pequeño incremento en la excreción de sodio, ganaba peso y algunas veces un incremento de la excreción de solutos. La simple inyección intravenosa de hidrocortisona, produce regularmente un incremento en la - cuantía de la filtración glomerular, pero sin un consistente incremento en la respuesta diurética a la sobrecarga de agua.

La continuada administración de esteroides en grandes dosis influía en la reabsorción tubular de agua, y sugerían que - una mayor cantidad de agua libre, es debido ó 1°) a redistribución de la reabsorción de los solutos entre los túbulos - proximal y distal, ó 2°) una alteración en la permeabilidad del epitelio del túbulo renal al agua.

LINDEMAN, VAN BUREN Y RAISZ (87), comparan los efectos de la misma dosis de cortisol, progesterona, andrógenos y aldosterona, sobre el pico máximo de agua libre y diuresis acuosa en el hombre normal. Y encuentran que tan solo el - cortisol tiene efecto específico, y como se había indicado que este antagonizaba a ADH para comprobarlo administran - dosis submáximas de vasopresina y ven su efecto sobre la - diuresis acuosa antes y después del tratamiento de cortisol y otros esteroides. Ninguno de los esteroides incluido el cortisol parece alterar la relación.

c) ¿CUAL ES LA RELACION ENTRE ADH Y CORTISOL EN LA DIURESIS ACUOSA?

En 1.964, KLEEMAN, CZACZKES Y CUTLER (73), en sus trabajos - encuentran que parece "necesario una cantidad normal de este esteroide, para el desarrollo de la máxima impermeabilidad de la nefrona distal al agua en ausencia de ADH circulante. Esto podía representar una acción permisiva de los esteroides "cortisol-like". Las dosis farmacológicas de glucocorticoides pueden incrementar frecuentemente la diuresis máxima de agua de los sujetos normales y pacientes con diabetes in sípida vasopresin-sensible y vasopresin-resistente, sin un cambio significativo en la hemodinámica renal o excreción - de solutos.

Esto sugiere una exageración del efecto fisiológico de estos esteroides en el transporte de agua. Es necesario ahora determinar la naturaleza del efecto directo de los glucocorticoides sobre la permeabilidad de ciertas membranas al agua.

A su vez, GREEN, HARRINGTON Y VALTIN (55), estudiaron el pa pel de ADH en la inhibición de la diuresis de agua, en un intento para resolver la controversia entre dos grupos: el de KLEEMAN (73), que encontró que la concentración plasmá tica de ADH no era absolutamente alta en seres humanos, perros y ratas con insuficiencia suprarrenal; y el grupo de AHMED (4), que encontraron lo contrario. En su experimento, GREEN, HARRINGTON Y VALTIN (55), compararon las respuestas diuréticas después de una terapia sustitutiva, con las res puestas en los mismos animales antes de la adrenalectomía; utilizaron ratas Brattleboro con diabetes insípida hipotálámica hereditaria (estos animales tienen un defecto para - elaborar ADH biológicamente activa) y ratas "hooded" Long-Evans normales de la misma cepa. Se les adrenalectomizó y se dividieron en cuatro grupos:

Grupo I Control (mitad ratas normales, mitad ratas diabéticas insípidas).

Grupo II ADX + prednisolona

Grupo III ADX + prednisolona + aldosterona

Grupo IV ADX + aldosterona

(los tres últimos grupos eran todas ratas diabéticas).

Observaron lo siguiente:

Las ratas diabéticas mostraron una inhibición marcada de la diuresis de agua, concluyendo, que la ADH no era suficiente para explicar este fenómeno, (había una disminución de la permabilidad del túbulo distal, al agua).

La inyección subcutánea de prednisolona, antes de la sobrecarga acuosa, casi volvía el flujo urinario a los niveles observados en las mismas ratas normales y diabéticas, antes de la adrenalectomía; pero la osmolalidad urinaria permanecía significativamente más alta que antes de la adrenalectomía en los mismos animales. No hubo grandes cambios en el flujo urinario o en la osmolalidad, después de un tratamiento prolongado con prednisolona (la filtración glomerular volvió a la normalidad así como la permeabilidad del túbulo distal).

Administrados juntos, el glucocorticoide, junto con el mineralocorticoide, aumentaban tanto la osmolalidad, como los aclaramientos de agua sobre aquellos vistos en estadios adrenalectomizados no tratados (eran casi idénticos a aquellos vistos en los mismos animales antes de la adrenalectomía).

Administrada aldosterona sola a ratas adrenalectomizadas restauraba la osmolalidad urinaria a los niveles iguales a los del estado normal, pero no su respuesta al flujo urinario

(la reabsorción de Na^+ vuelve a la normalidad).

Basados en estos datos, GREEN, HARRINGTON Y VALTIN (55), - postularon que una filtración glomerular disminuída, emparejada con una permeabilidad osmótica aumentada de agua - de la nefrona distal, originaba un aumento de la reabsorción de agua; este efecto emparejado con el descenso del - flujo urinario. Juzgando por el hecho de que, bién los glucocorticoides o mineralocorticoides solos, no podían neutra lizar los efectos de la insuficiencia adrenal, concluyeron afirmando que ambos eran necesarios para llevarlo a cabo.

Asímismo ACKERMAN Y MILLER (2), apoyan esta acción permisi va de los glucocorticoides, expuesta por KLEEMAN, CZACZKES, Y CUTLER (73).

Indirectamente AGUS Y GOLDBERG (3), lo confirman señalando que los glucocorticoides parecen ser necesarios para una - respuesta normal de la neurohipófisis a estímulos inhibido res deducido de sus observaciones de los efectos de hidrocortisona y etanol sobre la dilución urinaria durante una sobrecarga sostenida de agua en pacientes con hipopituitarismo anterior. Por los resultados, separa dos grupos: en el grupo I (4 enfermos), son incapaces de excretar una orina hipotónica al plasma y grupo II (3 enfermos), que pueden diluir la orina. Las dosis fisiológicas de hidrocortisona mejoran la - dilución en todos los pacientes. El etanol (que inhibe la - secreción de ADH) no tiene efecto sobre el grupo I. Ellos - deducen que inapropiados elevados niveles de ADH pueden jugar un papel en el defecto de excreción de agua en la insuficiencia hipofisaria anterior.

f) HIPOTESIS DE TRABAJO.

De la unión de ADH al "receptor" renal, se produce la activación del sistema adenilciclasa con generación de 3'5' - cAMP; y a partir de éste, se producen una serie de acontecimientos celulares, que modulan la permeabilidad al agua de la célula del túbulo colector renal.

Aún cuando en diferentes experimentos se han correlacionado los glucocorticoides con la retención de agua y su posible interrelación con la ADH, a nivel celular no había experiencias que nos señalasen la influencia de los glucocorticoides sobre el sistema adenilciclasa de las células de los túbulos colectores. Era cierto, que en la formación de - 3'5' cAMP intervienen diversos factores: fosfodiesterasa, - calcio (que también inhibe la adenilciclasa), prostaglandina E (PGE) y aldosterona, pero se ignora el papel de los - glucocorticoides. Asimismo en las diferentes teorías expuestas sobre la acción nuclear de los mismos: inhibición de la actividad de una RNA polimerasa, "de-represiones" de genes, bloqueo de transcripción de mRNA, y el llamado "efecto permisivo" para diferentes efectos metabólicos mediados por - otras hormonas (y en los cuales está involucrado el cAMP), no se había contemplado su efecto a nivel celular, y se ignora en que consiste molecularmente.

Así, nos planteamos la determinación "*in vitro*" de 3'5' - cAMP en túbulos medulares renales aislados de ratas adrenalectomizadas, así como de la adenil-ciclasa y fosfodiesterasa, comparándolos con ratas normales: y su dependencia con ADH, en ratas control y adrenalectomizadas.

CAPITULO III
Material y
Métodos.

A) MATERIAL:

1) ANIMALES:

- a) Ratas WISTAR, machos, con peso 150-200 grs., a temperatura de 20-25 °C. Dieta normal "ab libitum" ("Purina - Chow").

2) HORMONAS:

- a) Dexametasona.
b) Hormona antidiurética (ADH) "Pitressin", de Parke Davis and Co.

3) ANTICUERPOS Y PROTEINAS:

- a) "Binding protein" de hígado de rata, obtenido por nosotros.
b) Seroalbúmina bovina. Fracción V (Sigma).

4) REACTIVOS:

- a) Solución de HANK:

80 g. ClNa (Baker)
4,0 g. ClK (Metheson, Coleman a Bell).
2,0 g. $SO_4Mg + 7 H_2O$ (Mallinkrodt)
1,4 g. Cl_2Ca (Mallinkrodt)
0,6 g. PO_4KH_2 (Sigma).
0,6 g. $PO_4HNa_2 + 2 H_2O$ (Sigma).
10,0 g. Glucosa (Mallinkrodt).

- b) Solución enzimática:

(+) Colagenasa (Sigma)
(+) Hialuronidasa (Sigma)
(+) Sulfato de estreptomina.
(+) Penicilina.

- c) Buffer T M G

- (+) Tris ClH 10 mM, pH 7,5 (Mallinkrodt)
- (+) Glicerol 10% (Mallinkrodt)
- (+) Mercaptoetanol 6 mM (Mallinkrodt).

d) Buffer bicarbonatado de KREBS-RINGER.

- 12 mM ClNa (Mallinkrodt)
- 5 mM ClK "
- 1 mM SO₄ Mg "
- 1,2 mM Cl₂ Ca "
- 25 mM CO₃ HNa "

e) Líquido de centelleo:

- (+) Tolueno (Baker Chemical Co.)
- (+) Liquifluor (New England Nuclear).
- (+) Metil Cell Solve (New England Nuclear).

f) Sucrosa 0,25 M (Sigma).

g) Glucosa "

h) Acetona "

i) Cloruro amónico 3,3 mM (Sigma).

j) Sulfato amónico 3,3, mM "

k) Acido perclórico al 6%.

l) Fosfato potásico 0,2 M (Mallinkrodt).

m) Acetato sódico 50 mM (Buffer).

n) Acido tricloroacético 5% (Mallinkrodt).

- ñ) Acido tricloroacético al 13%. (Mallinkrodt)
- o) Acido tricloroacético al 7,5%. "
- p) Teofilina 10 mM (Sigma).
- q) Solventes: éter, saturado con agua.
- r) Creatin fosfato 10 mM (Sigma Chemical Co.).
- s) Creatin fosfoquinasa 0,1 mgr/ml. (Sigma Chemical Co.)
- t) EDTA 1 mM.
- u) ATP 1,5 mM.
- v) ClH 0,1 N.
- x) Acido acético 2 mM (Mallinkrodt).
- y) Deoxicolato sódico al 0,5%.
- z) Reactivo A: $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ al 2% en NaOH 0,1 N.
- 1) " B: $\text{SO}_4 \text{Ca}$ al 0,5%.
- 2) " C: Tartrato Na^+ ó K al 1%.
- 3) " fenol (Phenol Color Reagent).

5) MATERIAL RADIOACTIVO:

- a) cAMP 15000-25000 mc/m mol. (Schwarz-Mann Radiochemical
ó Rangeburg, N.Y.).
- b) cAMP standard (Sigma Chemical Co.).

- c) C^{14} inuline.
- d) H^3 adenosine.

6) ANESTESICOS:

- a) Eter anhídrido.

7) GASES:

- a) Oxígeno O_2
- b) Anhídrido carbónico.

8) RESINAS INTERCAMBIADORAS DE IONES:

- a) Bio-Rad AG 50 W- X_2 , 200-400 mesh, H^+ form.
- b) Bio-Rad AG I- X_2 , 200-400 mesh.

9) OTROS:

- a) Veneno de serpiente ("*Crotalus Atrox*"). (Sigma Chemical
Co. St. Louis.
MO. U.S.A.).

B) METODOS:

Se utilizaron 41 ratas machos, de raza Wistar, pesando entre 150-200 grs.

Se les practicó adrenalectomía (ADX), bajo una ligera anestesia, con éter, haciendo una incisión cutánea dorsal, en la línea media.

Posteriormente las ratas fueron mantenidas durante 7 á 14 días con agua normal y con una solución de ClNa al 0,9% - como líquido para beber; y "Purina Chow" como alimento - hasta el día del sacrificio.

Algunas de las ratas recibieron inyecciones subcutáneas - de dexametasona (200 µg/kg/día) durante cuatro días previos al sacrificio.

Las ratas fueron divididas en tres grupos:

- Ratas adrenalectomizadas (ADX).
- Ratas adrenalectomizadas tratadas con glucocorticoides (dexametasona).
- Ratas normales.

a) Obtención de túbulos medulares aislados.

Las ratas fueron decapitadas, y se prepararon los túbulos medulares renales aislados, según el método descrito por KUROKAWA Y MASSRY (80). Una vez decapitadas las ratas, se extrajeron los riñones rápidamente, se dividieron en dos porciones que fueron transferidas a una solución de HANK libre de Calcio, y enfriadas en una cubeta con hielo - (ClNa, ClK, $\text{PO}_4\text{HNa}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, $\text{SO}_4\text{Mg} - 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cl}_2\text{Mg} - 6\text{H}_2\text{O}$, CO_3HNa).

La médula fué separada de la corteza, triturada finamente con una prensa de tejido (Johnson Foundation, University of Pennsylvania); y luego incubada a 37°C en 5 ml. de una solución enzimática, con aire durante la fase gaseosa, en un agitador magnético oscilante, a una velocidad de 70 - 90 oscilaciones/minuto durante 60 minutos. La solución enzimática contenía: 40 mg/100 ml. de colagenasa, 100 mg/100 ml. de hialuronidasa (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri), 25 mg/100 ml. de sulfato de estreptomicina, 10 mg/100 ml. de penicilina y 100 mg/100 ml. de glucosa, disuelta en la solución de HANK con 1 mM de cloruro cálcico. La osmolalidad del medio era de 298 mOsm/kg de agua.

Al final del proceso digestivo, los túbulos renales fueron dispersados, soplando suavemente con una pipeta serológica de 5 ml. de boca ancha.

El contenido del frasco fué filtrado a través de una media de Nylon de dos capas.

Este filtrado fué posteriormente centrifugado a 50 r.p.m. durante dos minutos a temperatura ambiente.

Después de desechar el sobrenadante, el sedimento fué suspendido en 10 ml. de una solución de HANK libre de calcio, y la mezcla se centrifugó de nuevo; este proceso de lavado se repitió dos veces.

El "pellet" fué suspendido en una solución tampón de Krebs-Ringer-Tris ClH (114 mM ClNa, 5 mM ClK, 1,2 mM $\text{PO}_4\text{-H}_2\text{K}$, 1,2 mM SO_4Mg ; 17 mM CO_3HNa y 16 mM Tris ClH, pH 7,4) y centrifugado otra vez. En cada experimento, los túbulos aislados de 2-3 ratas de cada grupo fueron juntados e in

cubados por triplicado.

Se incubó la preparación tubular renal, conteniendo 150-400 μ gr. de proteína, a 37°C, durante 10 minutos, 200 μ l de Krebs-Ringer-Tris buffer, pH 7,4 , conteniendo albúmina sérica bovina al 2%, 1 mg/ml de glucosa y teofilina 10 mM; hormona antidiurética (ADH Pitressin, Parke Davis and Co.) o vehículo, fué luego añadida en un volumen de 10 ml., al medio de incubación; las incubaciones fueron continuada, por unos tres minutos adicionales, y luego terminada con la adición de 400 μ l. de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Estos medios de incubación fueron luego extraído tres veces, con éter saturado con agua, y se ensayó para el cAMP por el método de "competición proteíca" de GILMAN, que describiremos más adelante.

Experimentos similares fueron llevados a cabo también, - sin la adición de teofilina al medio de incubación. En - estos experimentos, la incubación se terminó, un minuto después de la adición de ADH o vehículo.

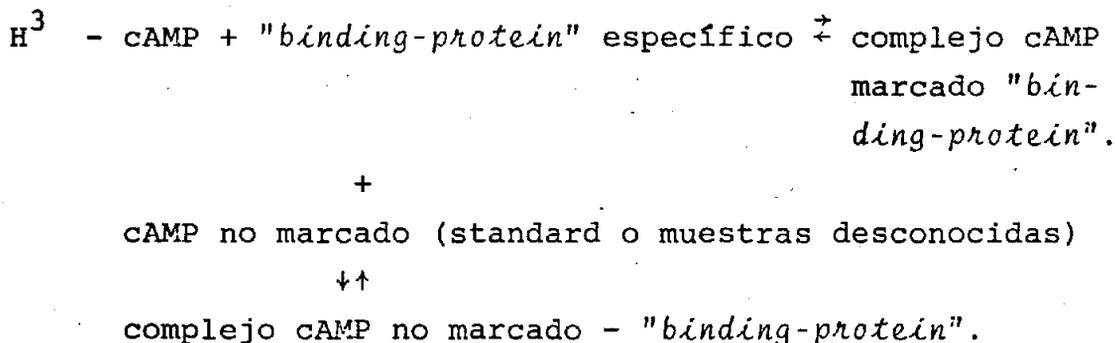
En experimentos separados, se midieron separadamente, el contenido de cAMP en el medio de incubación y en el celular. El medio de incubación conteniendo túbulos fué centrifugado al final de la incubación, luego se añadió un volumen apropiado de TCA al 10% a una porción del sobrenadante, y al medio de incubación restante (medio más células); y ambos fueron ensayados para el cAMP.

El contenido intracelular de cAMP se calculó, como la diferencia entre contenido de cAMP en las células más medio; y el del medio sólo. En algunos experimentos se añadió la dexametasona (10 μ g/ml) durante el proceso de digestión del tejido medular obtenido de ratas adrenalecto

mizadas: y los túbulo permanecieron bajo el efecto de esta hormona, por al menos 60 minutos.

b) Método de GILMAN (48), para medir cAMP ("competitive - binding-protein assay") AZNAR MARTIN (6).

Principio del método:



a) Preparación de la "proteína que se une" ("binding - protein"):

Todas las manipulaciones se llevan a cabo en una temperatura, que oscila entre 0°- 4°C.

Se toma el hígado de 3 ó 4 ratas, de peso entre 150-200 gr., que son homogeneizadas en 10 volúmenes de una solución de sucrosa 0,25 M con Cl_2Ca 3,3, mM y es centrifugado a 5.000 r.p.m. durante quince minutos. Se separa el sobrenadante, que posteriormente se centrifuga a 100.000 r.p.m. durante 120 minutos.

Al sobrenadante resultante, se le añade lentamente sulfato amónico ($\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$) 32,5 gr/100ml. y al mismo tiempo que se vá mezclando la solución con la ayuda de un agitador magnético, durante 30'.

Luego es centrifugado a 16.000 r.p.m. durante 20 minutos.

Después de decantar el sobrenadante, se toma el precipitado, que se disuelve en 30-40 ml de TMG tampón (10 mM Tris - ClH, pH: 7,5, glicerol al 10%, mercaptoetanol 6 mM), y es dializado durante toda la noche contra una solución - tampón (TMG), 2-4 litros.

La solución dializada de proteína, es centrifugada a - 16.000 r.p.m. durante 10 minutos. Al sobrenadante, se le añade 3-4 gr. de hidroxapatita, suspendida en 50-70 ml. de TMG tampón; se mezcla suavemente durante 30 minutos - y se centrifuga a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos. El - precipitado es lavado 2 veces con 50 ml. de solución tampón (TGM). Este precipitado lavado, se resuspende y se - mezcla durante 30 minutos con 50 -60 ml. de una solución tampón de fosfato potásico 0,2 M, pH 8,1; glicerol al 10%, mercaptoetanol 6 mM, y es centrifugado a 5.000 r.p.m. du - rante 10 minutos. Esta solución es dializada durante toda la noche, contra 4 l. de solución tampón TGM.

La solución de la proteína dializada es centrifugada a - 16.000 r.p.m. durante 20 minutos y el sobrenadante, es - usado como preparación de proteína unidora ("*binding pro- tein*"), la cual se guarda en el refrigerador hasta que se utilice, en porciones de 0,7-1 ml.

b) "*Modus faciendi*" de la terminación:

1.- REACTIVOS:

- H^3 - cAMP 10.000 cpm/ 50 ml.
- cAMP "*standard*" 0,5, 1,25, 2,5, 5,0 25 pmol/ 50 ml.
- Acetato sódico 50 mM, pH: 4.

2.- INCUBACION:

En tubos de plástico o cristal (17 x 100 mm) se añaden las siguientes sustancias:

50 μ l. H^3 -cAMP

50 μ l. cAMP "standard" ó muestra-problema. (la muestra debe ser diluida con acetato sódico de 50 mM, pH:4, conteniendo aproximadamente 1-70 pmol de cAMP).

100 μ l. acetato sódico 50 mM, tampón, pH: 4.

100 μ l. "proteína que se une", diluida aproximadamente 5-7 veces con tampón TMG, para proveer 30-50 % del total - "binding" de H^3 -cAMP en ausencia del cAMP no marcado.

La incubación se inicia con la adición de la "proteína que se une", y es llevada a cabo en hielo, durante 60-120 minutos.

Después de la incubación, se añaden 5 ml. de fosfato potásico de 20 mM, pH: 6,2, al tubo; y se filtra el contenido con filtro millipore (0,45 μ) bajo vacío. El tubo es enjuagado dos veces con 5 ml. de la solución tampón lavadora y filtrado de nuevo. El H^3 -cAMP atrapado en el filtro, es contado con centello líquido (New England Nuclear) con "methyl cell solve" (10:6).

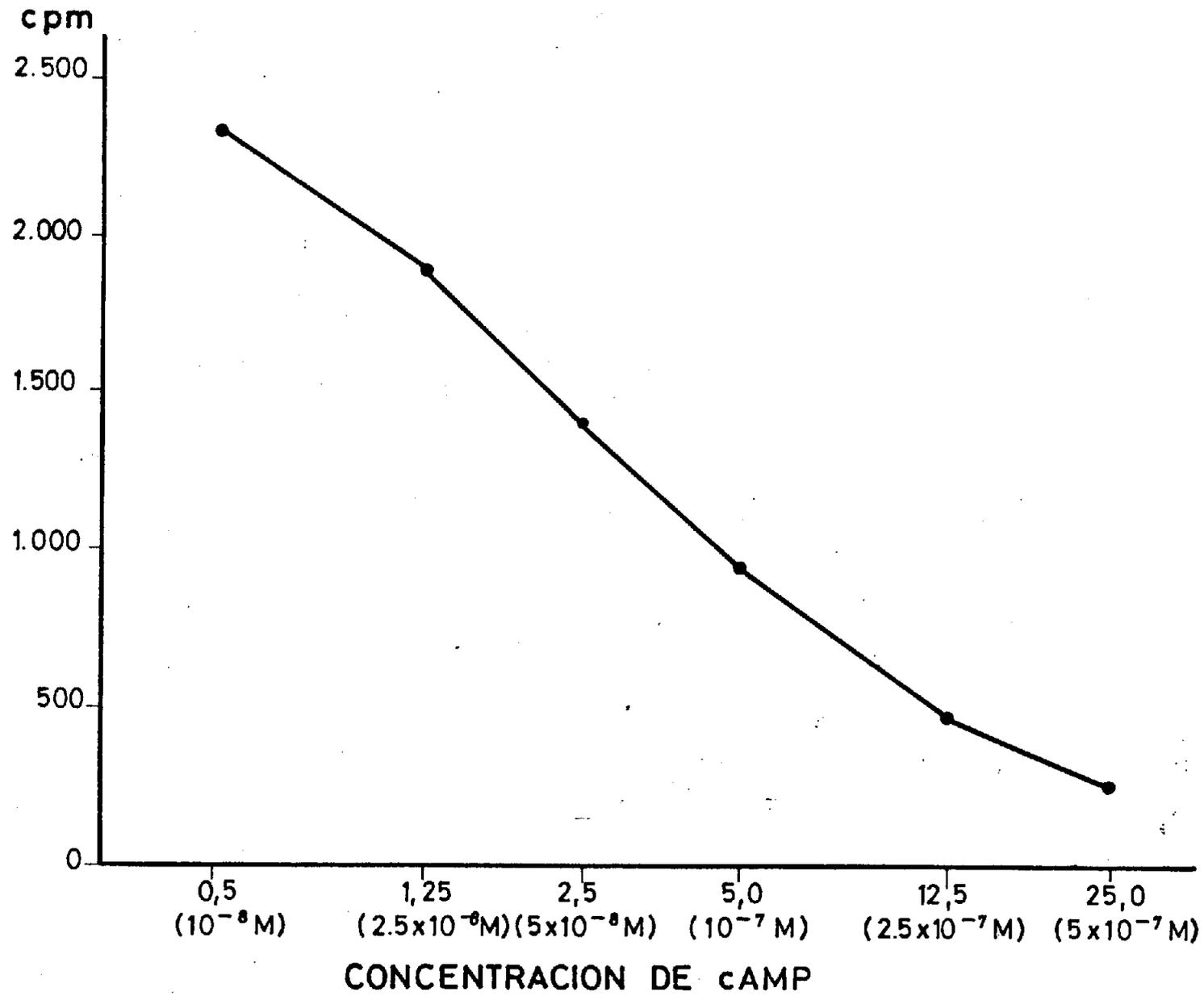
El contenido de cAMP de las muestras es comparado con una curva "standard" hecha en paralelo. (fig. 2).

Este método lo utilizamos para la determinación de cAMP en hueso, riñón, túbulos medulares renales aislados y orina.

c) Medición de adenil-ciclasa.

La actividad de la adenil-ciclasa, se midió por métodos descritos por KUROKAWA, FRIEDLER Y MASSRY (78), una vez aislados los túbulos medulares renales, como se ha descri-

CURVA STANDARD PARA CAMP.
(METODO DE "COMPETICION -
PROTEICA").



to anteriormente, estos son suspendidos en 5 ml. de 50 mM Tris-ClH, pH 7,5, con 1 mM EGTA y homogeneizados con un homogenizador (Pother-Elvenhjem) utilizado un motor de marca Teflon. Los Homogeneizados fueron a su vez centrifugados a 2.200 r.p.m. durante 10 minutos a 40°C. El sobrenadante fué desechado y los "pellets" fueron suspendidos en 10 ml de 50 mM Tris-ClH, pH 7,5, con 1 mM EDTA y centrifugado otra vez a 2.200 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.

Este procedimiento de lavado fué repetido otra vez. Luego los pellets fueron suspendidos en 10 ml de 50 mM Tris-ClH pH 7,5: 30 mM ClK; 5 mM Cl₂ Mg, 1 mM EGTA y 10 mM de teofilina, y centrifugados a 2.000 r.p.m., durante 10 minutos a 4°C. A estos "pellets" finales, se les añadió una cantidad apropiada del mismo "buffer" utilizado en el procedimiento final de lavado, para dar una concentración de proteínas de 4 á 6 mg/ml. Esta suspensión se utilizó como una preparación de enzima adenil-ciclasa: una porción (50-150 µg proteína) de una fracción del homogeneizado medular lavado fué incubado á 37°C durante 10 minutos con o sin ADH. Un volumen total del medio de incubación de 55 µl consistente en 50 mM Tris-ClH, pH 7,5; 5 mM Cl₂ Mg; 15 mM ClK, teofilina 10 mM, EGTA 1 mM, BSA (Albúmina sérica bovina) al 0,05%; ATP, 1,5 mM creatin-fosfato 10 mM y 0,1 mg/ml creatin-fosfokinasa (Sigma Chemical Co.) como un sistema regenerador de ATP. Al final de la incubación, se añadió 100 µl de ClH 0,1 N, al medio de incubación, y el tubo de incubación se situó en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos. Luego, se añadió 0,4 ml de acetato sódico "buffer" 50 mM, pH 4,0, al medio de incubación, y una parte fué ensayada para cAMP por el método de GILMANN ("competitive binding protein assay") (48), después de separar la proteína desnaturizada,

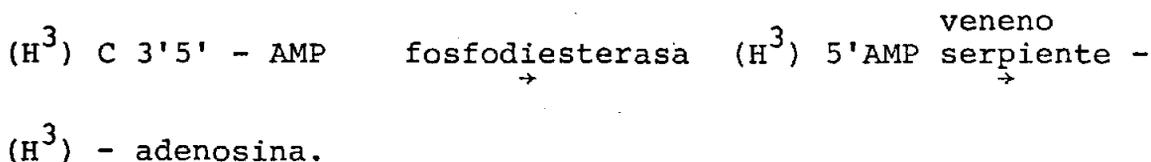
por centrifugación.

La actividad enzimática fué expresada como picomoles de -cAMP producido por mg. de proteína por minuto, sobre valores obtenidos en incubaciones "blanco" apropiadas.

d) Medición de fosfodiesterasa.

La actividad de cAMP-fosfodiesterasa se determinó por el método descrito por THOMPSON Y APPLEMAN (138) con la modificación de BOUDREAU Y DRUMMOND (12). Una vez obtenidos y preparados los túbulos medulares renales como se ha descrito anteriormente; se homogeneizaron y el homogeneizado fué a su vez sonicado y centrifugado a 20.000 g durante - 20 minutos. Este sobrenadante sonicado (preparación standard de fosfodiesterasa), es el que se va a utilizar para medir la actividad de la fosfodiesterasa; proceso que se lleva a cabo en dos partes: un primer paso, en el que -cAMP marcado con tritio (H^3) c 3'5' AMP es hidrolizado a (H^3) 5' -AMP por la fosfodiesterasa; y un segundo paso, en el que el (H^3) 5' -AMP es a su vez hidrolizado a adenosina, por la nucleotidasa contenida en veneno de serpiente (Crotalux Atrox).

Esquema:



Todo este proceso se realizó de la siguiente manera: el sobrenadante del homogeneizado sonicado y centrifugado de túbulos medulares renales, se incubó en 0,4 ml de solución "buffer", consistente en Tris ClH 10 mM, pH 7,5, Cl_2 Mg - 1 mM H^3 -cAMP (aproxidamente 200.000 cpm) con 10^{-4} M (alta

Km enzimática) ó 10^{-7} M (baja Km enzimática) de cAMP. - Después de 10 minutos de incubación a 30°C se detuvo la reacción, situando el tubo de incubación en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos. La segunda incubación fué iniciada con la adición de 0,1 mg. de veneno de serpiente (Crotalux Atrox) en 100 μ l y se mantuvo durante 10 minutos a 30°C. La reacción se terminó al añadir 1 ml de 1:3 resina húmeda intercambiadora de iones (Bio Rad. AGI-X2, 200-400 mesh) suspendida en una solución de 2 mM de ácido acético. Esta suspensión ácida de resina, asegura la recuperación de la H^3 - adenosina, de la resina. Una porción del sobrenadante fué utilizada para "contar" H^3 -adenosina, con una corrección apropiada; y la afinidad enzimática se expresó como cAMP hidrolizado por mgr. de proteína por minuto, después de substraer el "blanco" - que fué incubado en paralelo, sin una preparación enzimática. En ambos ensayos enzimáticos, la linealidad de la reacción, en términos de tiempo de incubación y las concentraciones, proteínicas enzimáticas fueron predeterminadas. El contenido de proteínas fué medido por triplicado por el método de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR Y RANDALL (89).

La técnica que es colorimétrica y de gran sensibilidad, - tiene dos pasos: a) Reacción de la proteína con cobre en solución alcalina, que dá un color azul, y b) Este color se intensifica grándemente, por la reducción del reactivo fosfomolibdenico-fosfotungstico de la proteína tratada con cobre-alcalino (la intensidad máxima de color aparece a pH \approx 10).

Reactivos:

- 1.- Reactivo A: $Co_3 Na_2$ al 2% en NaOH 0,1 N; 1.000 ml.
(20 g. $Co_3 Na_2$, 4 g. NaOH, agua hasta 1 L).

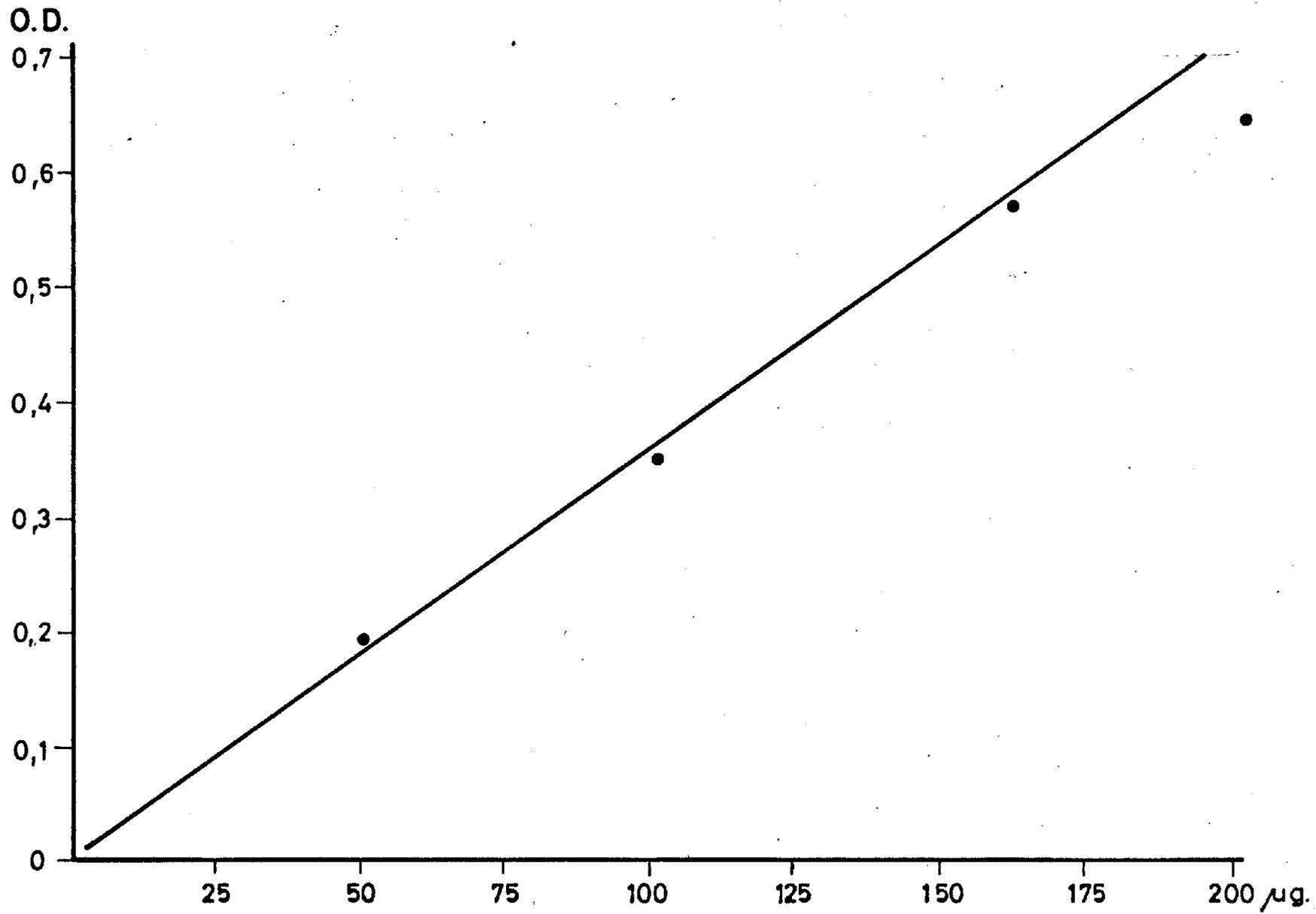
- 2.- Reactivo B: SO_4Cu al 0,5% . 5 H_2O - 100 ml.
- 3.- Reactivo C: Tartrato Na ó K al 1% - 100 ml.
- 4.- Reactivo D: Mezclar los tres anteriores reactivos de la siguiente manera A + C + B (proporción: A:48; C:1; B:1). Se utiliza una bureta graduada de 50 ml., se vierte cuidadosamente 1 ml. del reactivo C, y luego 1 ml. del reactivo C, luego 1 ml. del reactivo B, sobre 48 ml. de reactivo A. Se mezcla bien y puede conservarse tan sólo 3 - 4 días.
- 5.- Reactivo E: Reactivo fenol (antes de utilizarlo hay que disolverlo 3:3) "Phenol Color Reagent".
- 6.- Deoxicolato al 0,5%.
- 7.- BSA (Albúmina sérica bovina) 0,5 mg/ml.
- 8.- Agua.

Preparación de los "Standards".

Standards	1 (0)	2 (50 $\mu\text{g.}$)	3 (100 $\mu\text{g.}$)	4 (200 $\mu\text{g.}$)
0,5 Deoxicolato ó H_2O^-	0,5 ml.	0,4 ml.	0,3 ml.	0,1 ml.
BSA (0,5 $\mu\text{g/ml}$)	-	0,1	0,2	0,4
Reactivo D	5	5	5	5
Reactivo E	0,5	0,5	0,5	0,5
TOTAL	6 ml.	6 ml.	6 ml.	6 ml.

Figura n°3.

CURVA STANDARD PARA LA MEDICION
DE PROTEINAS, POR EL METODO DE
LOWRY.



Muestra problema:

0,5 - Deoxicolato ó H ₂ O	0,5 ml.	(o sea 0,5 - x,
Reactivo D	5 ml.	siendo x el vo-
Reactivo E	<u>0,5 ml.</u>	lumen de la -
Total	6 ml.	muestra).

CAPITULO IV

Protocolos.

TABLA I

Cantidades de monofosfato cíclico de adenosina en suspensiones de túbulos renales medulares y la respuesta a hormona antidiurética (ADH) en ratas normales y adrenalectomizadas.

Son las medias \pm SD de los resultados obtenidos en diez experimentos por separado. El medio de incubación contiene teofilina. La media de los valores obtenidos por triplicado en cada experiencia, fué tomada como un valor.

Ratas	<u>cAMP (p.mol/mlgr de proteína)</u>	
	sin ADH	con ADH
normales	90 \pm 18	193 \pm 31
adrenalectomizadas	114 \pm 19	243 \pm 39
	p < 0,002	p < 0,01
Análisis pareado de la diferencia	-24,1 \pm 15,7 p < 0,01	-495 \pm 17,7 p < 0,01

TABLA II

Distribución del monofosfato de adenosina cíclico en el medio de incubación y túbulos medulares de ratas normales y adrenalectomizadas.

Las concentraciones de cAMP fueron medidas en el medio + células y en el medio, en incubación conteniendo teofilina.

El cAMP intracelular fué calculado de los dos anteriores medidas.

Los valores son la media \pm SD de cuatro experimentos por separado.

La significancia (normal versus adrenalectomizados):
p < 0,002.

ADH = hormona antidiurética.

Ratas	<u>cAMP (p.mol/mlgr de proteina)</u>		
	células tubulares	Medio	Total (medio + células)
normales -ADH	55 \pm 5	41 \pm 7	94 \pm 9
Adrenalec- tomizadas -ADH	76 \pm 8 ⁺	52 \pm 5	128 \pm 13 ⁺
Normales + ADH	136 \pm 10	50 \pm 9	185 \pm 13
Adrenalec- tomizadas + ADH	181 \pm 18	58 \pm 10	239 \pm 28 ⁺

TABLA III

Efectos de la administración de dexametasona "in vivo" a ratas adrenalectomizadas, sobre el monofosfato de adenosina cíclico de los túbulos medulares.

Los valores en cada experimento, son la media \pm de tres incubaciones en presencia de teofilina.

A.- Ratas adrenalectomizadas.

B.- Ratas adrenalectomizadas a las que se dió dexametasona.

Significancia de la diferencia de los valores en túbulos de animales normales : $p < 0,05$.

ADH: hormona antidiurética.

cAMP (p.mol/mlgr proteína)

Ratas de la experiencia.	Sin ADH	Con ADH
(1) Normal	82 \pm 2 ⁺	219 \pm 10
A	140 \pm 11 ⁺	261 \pm 11 ⁺
B	86 \pm 8 ⁺	182 \pm 21 ⁺
(2) Normal	98 \pm 8	198 \pm 16
A	120 \pm 6 ⁺	277 \pm 21 ⁺
B	97 \pm 2	209 \pm 18
(3) Normal	73 \pm 5	160 ⁺ \pm 6
A	91 \pm 8 ⁺	198 \pm 12 ⁺
B	78 \pm 7	156 \pm 12

TABLA IV

Cantidades de monofosfato cíclico de adenosina en suspensiones de túbulos medulares renales aislados de ratas normales y adrenalectomizadas, en ausencia de teofilina.

Cada valor es la media \pm SD de incubaciones por triplicado.

Significatividad (Normalv. Adrenalectomizadas).

p < 0,05

ADH = Hormona antidiurética.

Experiencia ratas	<u>cAMP (p.mol/mlgr proteína)</u>	
	Sin ADH	Con ADH
(1) Normal	17,9 \pm 2,0	20,4 \pm 2,0
Adrenalectomizadas	18,8 \pm 0,9	21,8 \pm 2,8
(2) Normal	14,5 \pm 1,2	15,6 \pm 1,2
Adrenalectomizadas	17,1 \pm 1,0 ⁺	19,6 \pm 1,4 ⁺
(3) Normal	15,1 \pm 1,5	16,7 \pm 1,0
Adrenalectomizadas	18,1 \pm 0,8	19,2 \pm 0,9 ⁺

FIGURA 4

Relación dosis-respuesta entre concentración de hormona antidiurética en el medio de incubación y concentración de cAMP de túbulo medulares aislados de ratas adrenalectomizadas (O) y ratas control ()

La media \pm SD de incubaciones por triplicado.

Los valores de P indican la significatividad de las diferencias entre concentraciones de cAMP de los túbulo de ratas adrenalectomizadas y ratas normales.

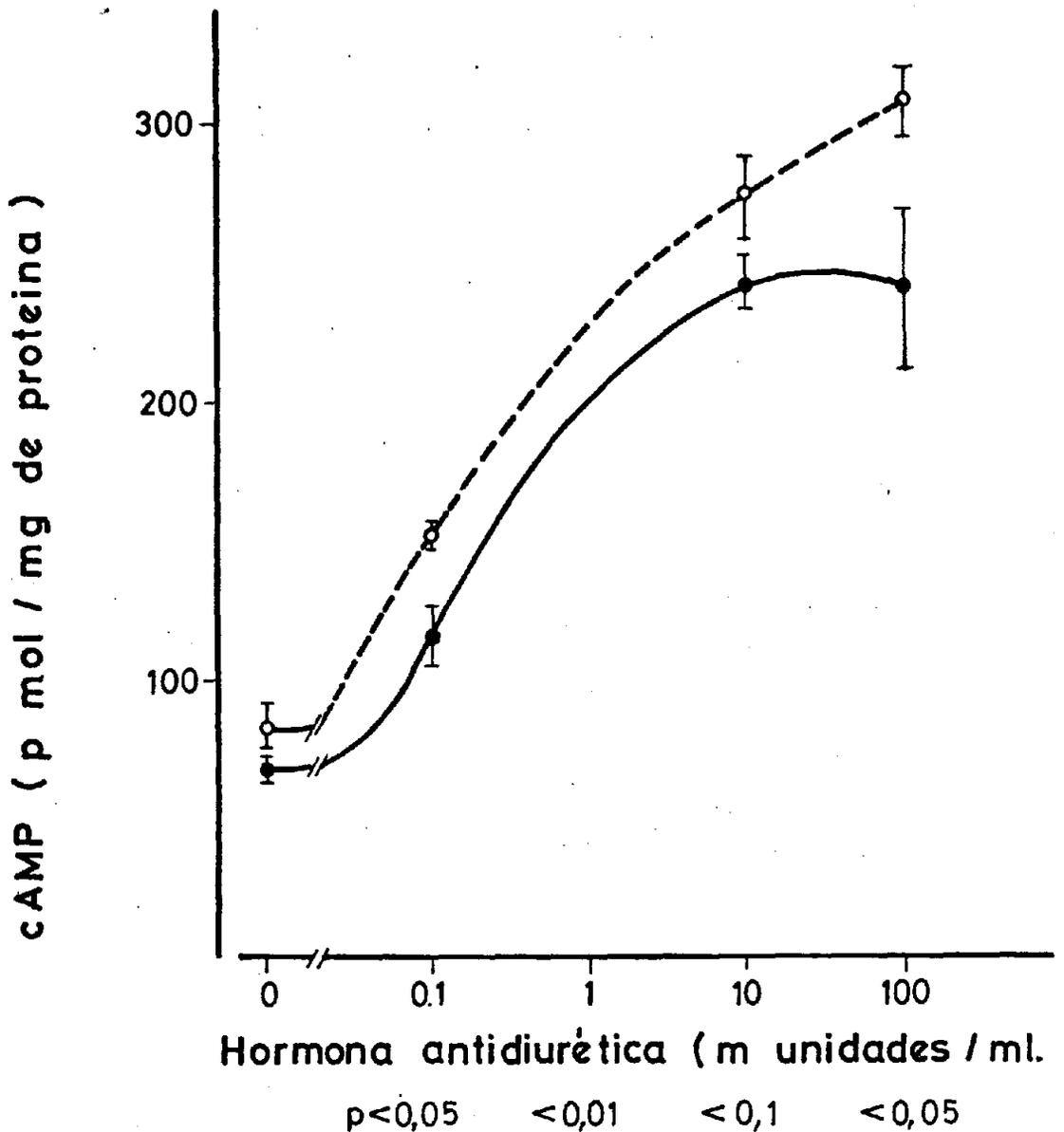


Figura 4.
 Relación dosis-respuesta entre concentración de hormona antidiurética en el medio de incubación y concentración de cAMP de túbulos medulares aislados de ratas adrenalectomizadas (o) y control (o). Medias \pm SD de incubaciones triplicadas. Valores de P indican la significatividad de las diferencias entre concentraciones de cAMP de túbulos de ratas adrenalectomizadas y normales.

CAPITULO V

Resultados obtenidos.

Como se puede apreciar en las tablas I y II, construídas con las medias \pm SD de diez experiencias por separado, y cada valor obtenido por triplicado, conteniendo el medio de incubación teofilina; la concentración de cAMP en los túbulos medulares renales (media más células ó células solas) de ratas normales y adrenalectomizadas, era significativamente más elevado en éstas que en las ratas control.

Lo mismo en presencia de una dosis submáxima de ADH (3,3 - U/l), que en ausencia de ADH.

Así pues, como los cambios en la concentración de cAMP encontrados en las medidas realizadas en el medio más células, corresponde a la concentración de cAMP de las células tubulares renales, al aumentar la cantidad de ADH del medio de incubación de túbulos medulares aislados de ratas control y adrenalectomizadas, la curva de dosis-respuesta construída con datos obtenidos por las medias \pm SD de determinaciones por triplicado, demuestran que la concentración (Fig. 1) de cAMP es más elevada en las ratas adrenalectomizadas.

Esta diferencia entre ratas normales y adrenalectomizadas (con mayor concentración de cAMP) desaparece cuando las ratas adrenalectomizadas reciben subcutáneamente inyecciones de dexametasona (200 μ g/k de peso corporal) durante los cuatro días antes de ser sacrificadas. Sin embargo y puestos en incubadoras, si les añadimos, "*in vitro*" dexametasona (10 mlg/l), ésta no tenía ningún efecto sobre las concentraciones de cAMP (no se reseñan los datos obtenidos).

Asímismo la presencia de teofilina influye en la concentración de cAMP y así los valores de cAMP tubulares medulares eran mucho más bajos cuando fueron incubados sin -

teofilina, que los obtenidos cuando se adicionó el medio teofilina (Tabla I y Tabla IV) tanto en ratas normales como en adrenalectomizadas.

Otro hecho que registramos, fué el escaso efecto estimulante sobre la concentración de cAMP en los túbulos medulares renales, incubados sin teofilina, inducido por la adición de ADH (Tabla II y Tabla IV).

Aún sin teofilina, la concentración basal de cAMP en los túbulos medulares renales de ratas adrenalectomizadas, fueron significativamente ($p < 0,05$) más elevados, que en los obtenidos en los animales control en dos, de tres experiencias.

En cuanto a la adenil-ciclasa de los túbulos medulares, no se encontraron diferencias significativas entre ambos.

Asímismo, utilizando cAMP-fosfodiesterasa de elevada y baja km; se encontraron diferencias en la concentración de cAMP de la médula renal de las ratas control y de las ratas adrenalectomizadas (estos datos tampoco se consignan).

El contenido de proteínas de la médula de las ratas, fué $8,24 \pm 0,67$ ($n=8$) y de $8,54 \pm 0,57$ ($n=8$) mlg/100 de peso húmedo, en ratas adrenalectomizadas, valores que no resultaron significativamente diferentes. El contenido de proteína -fué calculado después de corregir el espacio extracelular medido en "slices" medulares con C^{14} insulina.

CAPITULO VI

Comentarios a los
resultados obtenidos
dos.

El resultado obtenido más demostrativo, ha sido que la concentración de 3'5' cAMP en los túbulos medulares aislados de rata adrenalectomizada es significativamente más elevado que en las ratas control; y además este resultado se obtiene en las otras circunstancias del experimento (con y sin teofilina; con y sin ADH). Y que este incremento de 3'5' cAMP había que atribuirlo a la adrenalectomía se confirmó cuando en un grupo de ratas adrenalectomizadas que fueron tratadas en los cuatro días previos a su sacrificio, con dexametasona (200 µg/kg peso húmedo), no presentaron diferencias en cuanto a la concentración de 3'5' cAMP con las ratas control normales. En contraste con LANG Y EDELMAN (82), los cuales encontraron que la adrenalectomía no tenía ningún efecto sobre la actividad de la adenilciclase renal, ni en la corteza ni en la médula renal; pero RAJERISON, MARCHETTI, RUY, BOCKAERT Y JARD (119) demostraron que la actividad de la adenilciclase, inducida por la vasopresina de la médula renal, disminuía después de la adrenalectomía; pero no modificaba la actividad enzimática basal, o su concentración por la hormona paratiroidea y el fluoruro sódico. La pequeña reducción inducida en la vasopresina, no puede ser atribuida a la reducción de la actividad del enzima, sino a una dificultad en la eficacia del acoplamiento receptor-enzima. La dexametasona incrementa la eficacia del acoplamiento receptor-enzima en las ratas adrenalectomizadas; y en una menor cuantía en los animales control, y sugieren que los corticoides ejercen una acción doble sobre la adenil-ciclase vasopresin-sensible del riñón: a) modulación del número de sitios de los receptores y b) control de la síntesis de un componente, que incrementa la eficacia del acoplamiento del receptor-enzima. En ninguno de los casos, miden la cuantía del cAMP producido extracelularmente.

Por el contrario, la adición de dexametasona "*in vitro*" - (10 mg/l) en el medio de incubación de túbulos renales - medulares de ratas adrenalectomizadas y en contacto con las mismas durante 60 minutos (los túbulos mantienen estable - las concentraciones de trifosfato de adenosina hasta el final de 90 minutos de incubación a 37°C,) KUROKAWA, FRIEDLER Y MASSRY (78), no indujo ningún cambio en la concentración de 3'5' cAMP, debido quizá al escaso tiempo de incubación, o a factores que pudieron intervenir en la incubación - "*in vitro*" y afectar al sistema adenil-ciclasa.

Las diferencias de concentración encontradas de 3'5' cAMP entre ratas adrenalectomizadas y normales, no pudo ser - atribuido al contenido de proteínas de la médula renal, - ya que el contenido de proteína por 100 mlgr. de peso húmedo de tejido, fué semejante en las ratas adrenalectomizadas y en las ratas control. Tampoco hubo alteraciones - en el espacio extracelular medido en cortes renales medulares con 14 C-inulina.

La adición de ADH (Tabla I) al medio de incubación incrementa la producción de 3'5' cAMP de una forma pareja tanto en las ratas adrenalectomizadas como en las normales, pero cuando se comparan los porcentos de 3'5' cAMP producidos, son ligeramente elevados en las ratas normales. La dosis - de administración de ADH fué submaximal de 3'3 unidades / litro. Así la adición de ADH a la suspensión de túbulos renales medulares normales incubados con teofilina, incrementa la concentración de 3'5' cAMP (p. mol/mlg proteína) de 90 ± 18 á 193 ± 31 , lo cual representa un incremento de un 114%; y en las ratas adrenalectomizadas, pasó de 114 ± 19 á 243 ± 39 , lo que significa un 113%, practicamente igual. En otra experiencia en que se determinó por separado el contenido en 3'5' cAMP (p. mol/mlgr proteína) en las células

tubulares, los resultados obtenidos fueron: que la adición de ADH en los procedentes de ratas normales, la concentración de 3'5' cAMP pasó de 55 ± 5 a 136 ± 10 , lo que representa un incremento de 147%; y en las adrenalectomizadas de 76 ± 8 a 181 ± 18 que representa un 138%. Cuando se consideró el total (medium más células tubulares renales), los incrementos inducidos por ADH, pasan en los normales de 90 ± 9 a 185 ± 13 que representa un 96%; y en las ratas adrenalectomizadas de 128 ± 13 a 239 ± 28 , que resulta un incremento de un 86%. Esta experiencia viene a confirmar en parte los hallazgos de RAJERISON, MARCHETTI, ROY, BOCKAERT Y JARD (119) de que la sensibilidad del sistema adenilciclase a la ADH, disminuía algo después de la adrenalectomía (Tabla II).

Sin embargo esta diferencia desaparece, cuando contemplamos la relación dosis-respuesta entre la concentración de ADH de los túbulos medulares renales aislados de ratas adrenalectomizadas y normales. Se demuestra en ella que para una dosis dada de ADH, el 3'5' cAMP medular es más elevado en la rata adrenalectomizada que en los controles (Fig. 1).

Estas diferencias en la concentración y respuesta a la ADH, desaparecen, si previamente y durante cuatro días se administra dexametasona a las ratas adrenalectomizadas (Tabla II).

Por otra parte, el contenido en 3'5' cAMP de los túbulos medulares renales aislados, cuando fueron incubados sin teofilina eran mucho más bajos que cuando fueron incubados con teofilina; y asimismo en estas circunstancias en las ratas adrenalectomizadas, la concentración de 3'5' cAMP era más elevada (184 p. mol/mgr' proteínas) que en los normales (15,6 p. mol/mg de proteínas). El nucleótido 3'5' -

cAMP es degradado enzimáticamente a 5' AMP -un agente fisiológicamente inactivo- por el nucleótido cíclico fosfodiesterasa. Se sabe que este proceso, es inhibido por varias metilxantinas, entre ellas la teofilina (BUTCHER Y SUTHERLAND) (18). La teofilina mimetiza la acción de la vasopresina y cAMP por interferir la degradación intracelular del nucleótido; y así comprueban GRANTHAM Y ORLOFF (54), que la teofilina incrementa la neta absorción de agua. Y así cuando la adicionan a un túbulo impermeable, la reabsorción de agua se incrementa. Y se sorprenden cuando añaden a la solución que contiene teofilina, PGE, que incrementa más la reabsorción de agua, más del 55% del previsto por el efecto activo de los dos (parece ser que PGE, ejerce su efecto inhibitorio sobre la acción de la vasopresina, por disminuir la actividad de la adenilciclase, que sería el convertidor de ATP a cAMP, quizá por competir ambas; vasopresina y PGE por un mismo receptor). El que se produzcan pequeñas elevaciones de la concentración de 3'5' cAMP sin teofilina en los túbulos medulares renales, tanto en ratas adrenalectomizadas como normales, no excluye el posible papel de 3'5' cAMP como mediador intracelular de la ADH, ya que para inducir respuestas fisiológicas celulares, son suficientes muy pequeñas elevaciones de 3'5' cAMP (KUO Y DE RENZO) (77), (NAGATA, SASAKI, KIMURA Y NAKANE) (106); y así la máxima concentración de ADH necesaria para inducir un efecto biológico sobre la permeabilidad acuosa causa tan solo una mínima estimulación sobre la adenilciclase de los túbulos colectores (IMBERT, CHABARDES, MONTEGUT, CLIQUE Y MOREL) (65). La concentración basal es de aproximadamente 10^{-7} ; y la adición de ADH la puede elevar de un 24 á 97%, ORLOFF Y HANDLER (110).

Y así para demostrar una clara estimulación del sistema adenilciclase-cAMP de los túbulos medulares renales, se nece-

sita una concentración de ADH, de 10 á 100 veces más elevada que la que se necesita para inducir la máxima permeabilidad de los túbulos colectores (GRANTHAM Y ORLOFF) (54) - (KUROKAWA Y MASSRY) (80), (RAJERISON, MARCHETTI, ROY, BOCKAERT Y JARD) (65).

La respuesta de los túbulos medulares renales a la ADH, - sin teofilina, era muy pequeña; así después de la adición de ADH a túbulos renales medulares de ratas adrenalectomizadas, pasa la concentración de 18 á 22 p. mol/mlgr. de proteínas, que representa un incremento del 11,5%; y en las ratas normales de 11,5 á 17,8 p. mol/mlgr. de proteínas, que representan un incremento de un 11%.

Estos hallazgos se correlacionan con los obtenidos en túbulos renales medulares de ratas aisladas sometidas a los efectos de catecolaminas (KUROKAWA Y MASSRY) (80), hormona paratiroidea (KUROKAWA, LENCHNER Y MASSRY) (79), calcitonina (KUROKAWA, NAGATA, SASAKI Y NAKANE) (81) ó tóxima del cólera (KUROKAWA, FRIEDLAR Y MASSRY) (78), cuando miden el cAMP en ausencia de teofilina, y encuentran tan solo mínimos o transitorios incrementos de cAMP sin la teofilina.

Ya sabemos que la ADH incrementa la permeabilidad de los túbulos colectores renales, y que esta acción está mediatizada fisiológicamente por 3'5' cAMP, lo cual fué sugerido primeramente por ORLOFF Y HANDLER (110), al comprobar que cAMP mimetizaba la acción de la vasopresina sobre el transporte de agua y sodio en la vejiga de la rana. Esto fué confirmado por GRANTHAM Y BURG (52) utilizando fragmentos de túbulos colectores renales de conejo blanco de Nueva Zelanda, - disecados y perfundidos, y comprueban que la vasopresina y cAMP cuando se añaden a la solución que baña la parte exter

na del túbulo, incrementan tanto la absorción neta de agua a lo largo de un gradiente osmótico, como la permeabilidad difusional al agua, medida con THO en ausencia de un gradiente osmótico (cuando la vasopresina o cAMP, se ponen en la solución que baña la cara luminal de las células son ineficaces).

La adenilciclase vasopresin-sensible, que es el enzima responsable para catalizar la formación de cAMP de ATP, se ha encontrado en la médula renal de gran número de mamíferos - (BROWN, CLARKE, ROUX Y SHERMAN) (15), (MARUMO Y EDELMAN) - (94), (DOUSA, SANDS Y HECHTER) (34). (NEER) (108), mide su actividad en fracciones de membranas plasmáticas de células de médula renal vasopresin-estimuladas, y encuentran que el Km para la vasopresina es de $4 \times 15 \times 10^{-9} M$, ó sea que es sensible a muy bajos niveles(fué medida claro es, valorando la actividad enzimática después de la dilución de la ADH). La disminución por bajo de aquellos niveles, induce un descenso en la tasa de formación de cAMP, lo cual lo interpretan como que la hormona está en equilibrio con los receptores, y que la unión de hormona-receptor es rápidamente reversible.

KLEEMAN, CZACKES Y CUTLER (73), encontraron en perros, que la adrenalectomía dificultaba la diuresis, pero que no había ninguna elevación de la ADH; Y KLEEMAN, KOPLOWINTZ, - MAXWEL, CUTLER Y DOWLING (74), tanto en sujetos normales - como en diabéticos insípidos, demostraron que la administración aguda ó crónica de esteroides adrenales, aumentaba en sujetos normales la máxima diuresis significativamente, y en diabéticos insípidos no inducía ninguna alteración en la liberación, inactivación ni en la acción tubular renal de la ADH, y afirman que parecía necesaria una cantidad normal

de esteroides adrenales, para el desarrollo de la máxima - impermeabilidad de la nefrona distal al agua, incluso en - ausencia de ADH circulante; y a esto se podía considerar - como una acción "*permissiva*" de los esteroides cortisol-li- ke. GREEN, HARRISON Y VALTIN (55), utilizaron ratas diabé- ticas insípidas hipotalámicas hereditarias (ratas Brattlebu- ro), las adrenalectomizaron, y trataron a unas con predniso- lona y otras con aldosterona, y a otras con prednisolona - más aldosterona; y al comprobar que los glucocorticoides o mineralocorticoides sólo, no podían neutralizar los efec- tos de la insuficiencia adrenal, indicaron que ambos eran necesarios, sin que ninguno de ellos indague en la intimi- dad de los aconteceres celulares del túbulo renal medular. La elevación de la concentración de 3'5' cAMP encontrada en los túbulos medulares renales aislados de rata, los hacía mucho más permeable al agua, tanto con y sin hormona antidiu- rética añadida (si bien en ausencia total de ADH los túbu- los renales colectores son impermeables al agua). No sabe- mos cual es el mecanismo, pero también es cierto que todavía ignoramos la penetración y alcance de los acontecimientos - puestos en marcha por el impacto ADH-receptor, e ignoramos - asimismo el sitio o sitios, donde este agente específico ini- cia los aconteceres que se traducen en los cambios fisiológi- cos de la permeabilidad al agua.

COBB Y MACMANUS (20), observaron que el ácido etacrínico in- terfiere con la respuesta de permeabilidad de ADH, en la ve- jiga de la rana, sin afectar a la teofilina ó 3'5' cAMP, po- siblemente por inhibir la actividad de la adenilciclase; la cual, aunque limita la respuesta de ADH y a teofilina no al- tera el 3'5' cAMP.

Otro hecho que se nos escapa; es, porqué produce la adrena- lectomía un incremento en la concentración de 3'5' cAMP res-

pecto a las ratas normales. Nosotros hemos encontrado que las actividades de la adenilciclase, que cataboliza la formación de cAMP de ATP, en las células en nuestras mediciones "*in vitro*" no estaba afectada por la adrenalectomía. - Tampoco encontramos alteraciones en las dosificaciones "*in vitro*" de la fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis de 3'5' cAMP a 5' AMP. No sabemos (y esto no excluye lo que pueda pasar en las células tubulares renales "*in vivo*") si las circunstancias "*in vitro*", afectan a estas enzimas, que precisan un complejo entorno, así la fosfodiesterasa está inactiva y precisa de un activador (CHEUNG) (27), que incrementa la afinidad del enzima (no la cuantía de ésta) por el sustrato, y parece ser que el activador no estimula la actividad de la fosfodiesterasa a través de una unión directa del sustrato, sino más bien se cree, que el activador induce un cambio conformacional del enzima, del cual resulta una incrementada afinidad para el sustrato.

El papel de 3'5' cAMP como mediador intracelular o "*segundo mensajero*" de un gran número de hormonas en los tejidos - "*targett*", requiere algunos ajustes en nuestros puntos de vistas relativo a que un solo agente 3'5' cAMP que además es ubicuo en su distribución, pueda específicamente responder a una determinada hormona. Esta respuesta depende del entorno intracelular, sobre el cual actúe el cAMP. Así podría suceder que el incremento inducido por la adrenalectomía, se debiera a una sensibilización de los esteroides cortisol-like por los mismos receptores que ADH, pero la respuesta a ADH viene a ser semejante en las normales que en los adrenalectomizados (aunque RAJERISON, MARCHETTI, ROY, BOCKAERT Y JARD) (119), encuentran un mínimo descenso, por competición por los receptores); o que la ausencia de estos esteroides incrementa la actividad de la adenilciclase -que "*in vitro*" no pudimos evidenciar-, sin modificar la cuantía del en-

zima, pero por cambio conformacional incrementase la afinidad por el substrato y/o que la fosfodiesterasa no fuera activada (por su activador específico), y se disminuyese por eso, la catabolización de CAMP a 5 AMP.

O, que hubiera receptores ocupados e inhibidos por los corticoesteroides, y que en su ausencia; podrían ser estimulados esporádicamente, pero diferentes de los receptores ADH, puesto que ésta, en normales y adrenalectomizados, induce un incremento en la concentración de 3'5' CAMP.

Es cierto, que las células renales corticales, producen 3'5' CAMP pero no a la vasopresina, sino a la hormona paratiroidea (CHASE Y AURBACH) (26) ; y por otra parte BOURGUET Y MAETZ (13), encuentran en las células epiteliales de la vejiga de la rana dos receptores separados, para hormonas neurohipofisarias, y encuentran una disociación de efectos de los análogos de la vasopresina: oxitocina y arginina-vasotocina, sobre el transporte de agua y sodio; en cada uno de los cuales involucra la producción de 3'5' CAMP en un sitio independiente. PETERSON Y EDELMAN (114) separan dos sitios de producción de 3'5' CAMP en la vejiga del sapo; el formado en un sitio, es responsable del efecto estimulador en la reabsorción de sodio, y el otro, en el aumento del flujo neto de agua. Con anterioridad BENTLEY (11), encontró que el incremento en la concentración de calcio del baño, disminuye el efecto hidrosmótico de ADH, sin alterar su capacidad de estimular el transporte de sodio; e indicaron que el 3'5' CAMP se forma en dos sitios distintos de la célula, ambos vasopresin-sensibles pero sólo es uno, el que controla el movimiento de agua, y es calcio-sensible.

ORLOFF Y HANDLER, especulan que hay dos sitios independientes de generarse 3'5' CAMP presentes en la membrana basal; el -

3'5' cAMP presentes en la membrana basal; el 3'5' cAMP - relacionado con el movimiento del agua, está relacionado - con productos específicos metabólicos, que difieren de los formados en el sitio en el que 3'5' cAMP controla el movimiento de sodio. O bien, proponen otra variante: la producción de uno de los 3'5' cAMP es sensible al calcio; y el - otro no, éste 3'5' cAMP podría alterar específicamente la permeabilidad de la superficie apical al agua, y otro, por ej. el 3'5' GMP la permeabilidad al sodio.

En un paso más, por alcanzar la intimidad de los acontecimientos metabólicos intracelulares, HANDLER, PRESTON Y ORLOFF (58) encuentran que ciertos inhibidores metabólicos: dinitrofenol, nitrógeno, azida y ácido iodoacético interfieren la respuesta a la ADH. ORLOFF Y HANDLER (110), examinan los pasos de la glucogenolisis, midiendo sus intermediarios, y encuentran cambios en la concentración de compuestos fosforados de alta energía, tales como creatin-fosfato, ADP ó ATP; el incremento de ciertos intermediarios de la glucogenolisis, indican una incrementada actividad "*in situ*" de las enzimas: fosfofructokinasa, piruvato-kinasa y fosforilasa; y su mecanismo es desconocido. Y se ignora la relación de estos, sobre los efectos de permeabilidad inducidos por ADH.

CAPITULO VII
Conclusiones.

- 1° Revisamos el clásico concepto clínico de impedida eliminación de agua en la insuficiencia suprarrenal (enfermedad de Addison), y las pruebas clínicas que la evidencian, y orientaban al diagnóstico.
- 2° Se revisa el efecto de la ADH sobre los túbulos colectores renales; así como la acción metabólica de los glucocorticoides; valorando, los argumentos del papel de la ADH y del cortisol (o sustancias "cortisol-like") sobre la diuresis acuosa.
- 3° El impacto de ADH sobre el "receptor" de los túbulos colectores renales activa el sistema adenilciclasa, con generación de 3'5' cAMP; lo cual, se estima induce una serie de acontecimientos celulares (que todavía se ignoran), que modulan la permeabilidad al agua de la célula. En esta activación, se ha considerado que intervienen diversos factores, y se han contemplado: activación de la fosfodiesterasa, calcio, PGE, y aldosterona, pero no la acción de los glucocorticoides a este nivel. Aún cuando estos impactan en el núcleo (activación de una RNA-polimerasa; "de-represión" de genes en el núcleo; bloqueo de la transcripción de mRNA), y se conocía el "efecto permisivo" de los mismos sobre acciones "metabólicas" inducidos por otras hormonas (que involucraban la génesis de 3'5' cAMP) no sabemos en que consiste este mecanismo.

La hipótesis de trabajo que nos planteamos fué, la determinación "in vitro" de la concentración de 3'5' cAMP en túbulos medulares renales aislados de ratas adrenalectomizadas y normales.

- 4° Se utiliza ratas Wistar, normales y adrenalectomizadas, de las que se obtuvieron túbulos medulares renales aislados

dos; que se incubaron en medios adecuados, con y sin teofilina, así como con y sin ADH; por otro lado a ratas adrenalectomizadas se administró cuatro días antes del sacrificio dexametasona, y se determinó la concentración de 3'5' cAMP.

Se hicieron asimismo determinaciones de la actividad de la adenilciclase y de la fosfodiesterasa "*in vitro*".

Se aplicaron los métodos estadísticos, la T de Student y el Test de T pareada.

- 5° La concentración de 3'5' cAMP en los túbulos medulares aislados de ratas, incubadas con teofilina, fué significativamente más elevada en las ratas adrenalectomizadas que en las normales.
- 6° Este incremento de la concentración de 3'5' cAMP, en las ratas adrenalectomizadas; se manifestaba, lo mismo en los túbulos renales incubados sin ADH, que en presencia de una dosis submaximal de ADH (3,3, U/l); y tanto unos como otros, respondían semejantemente a ADH.
- 7° La curva de dosis-respuesta a ADH, era ligeramente superior en las ratas adrenalectomizadas.
- 8° Esta diferencia de concentración de 3'5' cAMP entre ratas adrenalectomizadas y normales, desaparece cuando las ratas adrenalectomizadas reciben subcutáneamente inyecciones de dexametasona (200 μ gr/k de peso corporal) durante los cuatro días antes de su sacrificio.

La adición "*in vitro*" de dexametasona (10 mgr/l), incubados durante 60 minutos, no indujo ningún efecto sobre las concentraciones de cAMP.

- 9° Cuando fueron incubados en ausencia de teofilina, la con-

centración obtenida de 3'5' cAMP en los túbulos medulares renales aislados de rata, fueron mucho más bajos, - que los obtenidos cuando se incubaron con teofilina y - tanto en las ratas adrenalectomizadas como en las normales. Cuando se incubaron sin teofilina y se adicionó - ADH, las respuestas fueron escasas tanto en las adrenalectomizadas como en las normales. Sin embargo las concentraciones de 3'5' cAMP conseguidas en estas condiciones, fueron dentro de la escasa magnitud, más elevadas en los adrenalectomizados que en los normales.

- 10° Tanto en la determinación de la actividad de la adenilciclase como en la de fosfodiesterasa, no encontramos - alteraciones, a pesar de incrementarse la concentración de 3'5' cAMP. Como otros observadores, han obtenido en otras circunstancias experimentales.
- 11° El contenido de proteínas de la médula de ratas adrenalectomizadas y las controles, fué semejante ; y por tanto, no puede atribuirse las concentraciones de 3'5' cAMP a alteraciones en la cuantía de proteínas. El espacio - extracelular medido con 14 C-inulina en cortes renales, fué semejante en ambas series.
- 12° Consideramos que el incremento de la concentración de - 3'5' cAMP, es el resultado de la adrenalectomía, y quizá juegue un papel esta incrementada concentración de 3'5' cAMP en la insuficiencia suprarrenal, en el aumento de la permeabilidad tubular renal y retención (o impedida eliminación) de líquidos en la misma, cuya intimidad molecular se nos escapa; y tampoco podemos referirla a los cambios modulatorios fisiológicos de la permeabilidad, por que se ignoran. Es posible, que este mecanismo sea el - "*efecto permisivo*" de los glucocorticoides, en hormonas en cuyo mecanismo efector se involucra la producción de -

3'5' CAMP.

CAPITULO VIII

Bibliografia.

- 1.- ABRAHAM, A.D. y SEKERIS, L.E.
"Inhibitory action of steroid hormones on RNA synthesis of isolated thymus nuclei".
Biochim. Biophys. Acta. 247-562. 1.971.
- 2.- ACKERMAN, G.L. y MILLER, C.L.
"Role of hypovolemia in the impaired water diuresis - of adrenal insufficiency".
J. Clin. Endocr. 30-252. 1.970.
- 3.- AGUS, Z.S. y GOLDBERG, M.
"Role of antidiuretic hormone in the abnormal water diuresis of anterior hypopituitarism in man".
J. Clin. Investig. 50-1478. 1.971.
- 4.- AHMED, A.B., GEORGE, B.C., GONZALEZ-AUVERT, C. y DINGMAN, J.F.
"Increased plasma arginine vasopressin in clinical - adrenocortical insufficiency and its inhibition by - glucosteroids".
J. Clin. Invest. 4-111. 1.967.
- 5.- ARONOW, L. y GABOUREL, J.D.
"Development of a hydrocortisone-resistant sub-line of mouse lymphoma in vitro".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111-348. 1.962.
- 6.- AZNAR MARTIN, E.
"Determinación del monofosfato de adenosina cíclico - (cAMP) y sus aplicaciones experimentales".
Sevilla, 1.977.

- 7.- BAXTER, J.D. y FORSHAM, P.H.
"Tissue effects of glucocorticoids".
Am. J. Med. 53-573. 1.972.
- 8.- BAXTER, J.D., HARRIS, A.W. y TOMKINS, G.M.
"Glucocorticoids receptors in lymphoma cells in culture relationship to glucocorticoid killing activity".
Science 171-189. 1.971.
- 9.- BAXTER, J.D. y TOMKIMS, G.M.
"Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors"
Proc. Natl. Acad. Sci. 68-932. 1.971.
- 10.- BACK, N.P. KANEKO, T., ZOR, U., FIELD, J.B., y DAVIS, B.
"Effect of vasopressin and prostaglandin E₁ on the adenyl cyclase cyclic 3'5' adenosine monophosphate system of the renal medulla of the rat".
J. Clin. Invest. 50-2461. 1.971.
- 11.- BENTLEY, P.J.
"The effects of vasopressin on the short-circuit current across the wall of the isolated bladder of the toad Bufo Marinus".
J. Endocrinol. 21-161. 1.960.
- 12.- BOUDREAU, R.J. y DRUMMOND, G.I.
"A modified assay of 3'5' cyclic AMP phosphodiesterase".
Analytical Biochemistry. 63-388. 1.975.

- 13.- BOURGUET, J., y MAETZ, J.
"Evidence of independent action of neurohypophyseal peptides on osmotic water flow and active sodium transport in the same target organ -Studies on Rana -escularita skin and bladder".
Biochim. Biophys. Acta. 52-552. 1.961.
- 14.- BUYETT, J.D., y HOFERT, J.F.
"Studies concerning the inhibition of glucose metabolism in the thymus lymphocytes by cortisol and epinephrine".
Endocrinology 91-233. 1.972.
- 15.- BROWN, E., CLARKE, D.L., ROUX, V. y SHERMAN, G.H.
"The stimulation of adenosine 3'5' monophosphate production by antidiuretic factors".
J. Biol. Chem. 238-PC 852. 1.963.
- 16.- BURG, M., HELMAN, S., GRANTHAM, J. y ORLOFF, J.
"Effect of vasopressin on the permeability of isolated rabbit cortical collecting tubules to urea, acetamide and thiourea".
Pag. 193, en Schmidt-Nielsen (Ed.) : "Urea and the kidney". Excerpta Medica Foundation. Publ. Amsterdam, 1.970.
- 17.- BURG, M., y ORLOFF, J.
"Perfusion of isolated tubules".
En: "Handbook of Physiology" Section 8.
Renal Physiology. Pag. 145. Ed. por ORLOFF, J. BERLINER R.W.. Washington.
Am. Physiol. Soc. 1.973.

- 18.- BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W.
"Adenosin 3'5' phosphate in biological materials. I.-
Purification and properties of cyclic 3'5' nucleotide
phosphodiesterase and use of this enzyme to characte-
rize adenosine 3'5' monophosphate in human urine.
J. Biol. Chem 237-1244. 1.962.
- 19.- CAMPBELL, B.J., WOODWARD, G. y BORBERG, V.
"Calcium-mediated interactions between the antidiure-
tic hormone and renal plasma membranes".
J. Biol. Chem 247-6167. 1.972.
- 20.- COBB, F.R., McMANUS, T.F.
"Inhibition of neurohypophyseal hormone action by etha-
crynic acid".
(Abstract).
Proc. of Third International Congress of Nephrology.
1.966.
- 21.- COLLE-VANDEVELDE, A. y ELEWAUT, A.
"Hormone secretion by mouse thyroid fragments in vi-
tro. Effect of hydrocortisone".
C.R. Acad. Sci. 273-894. 1.971.
- 22.- CUTLER, R.E., KLEEMAN, C.R. KOLOWITZ, J., MAXWELL,
M.H. y DOWLING, J.T.
"Mechanisms of impaired water excretion in adrenal and
pituitary insufficiency. III.- The effect of extrace-
llular or plasma volume expansion or both on the impai-
red diuresis".
J. Clin. Invest. 41-1524. 1.962.

- 23.- CZACZKES, J.W., KLEEMAN, C.R. y KOENIG, H.
"Physiologic studies of antidiuretic hormone by its direct measurements in human plasma".
J. Clin. Invest. 43-1625. 1.964.
- 24.- CZECH, M.P. y FAIN, J.N.
"D-actinomycin inhibition of dexamethasone action on glucose metabolism in white fat cells".
Biochim. Biophys. Acta. 230-185. 1.971.
- 25.- CHALMERS, T.M. y LEWIS, A.G.
"The effect of adrenocorticotrophic hormone on the diuretic response to water in panhypopituitarism".
Lancet 2-1158. 1.951.
- 26.- CHASE, L.W. y AURBACH, G.D.
"Renal Adenyl Cyclase: Anatomically separate sites for Parathyroid hormone and vasopressin".
Science 159-545. 1.968.
- 27.- CHEUNG, W.Y.
"Cyclic 3'5' Nucleotide Phosphodiesterase".
J. Biol. Chem. 246-2859. 1.971.
- 28.- De MOOR, P., HENDRIKX, A. y STEEN, O.
"Idiopathic lowering of cortisol binding capacity of human plasma transcortin".
Ann. Andocrinol. 26-488. 1.965.
- 29.- DINGMAN, J.F.
"Hypothalamus and the endocrine control of sodium and water metabolism in man".
Am J. Med. Sci. 235-70. 1.958.

- 30.- DINGMAN, J.F. y DESPOINTES, R.H.
"Hypothalamic action of adrenal steroids".
(Abstract).
J. Clin. Endocr. 16-936. 1.956.
- 31.- DINGMAN, J.F. y THORN, G.W.
"Cortisone inhibition of ADH secretion from the neurohypophysis".
(Abstract).
J. Clin. Endocr. 15-871. 1.955.
- 32.- DIRKS, J.H., SEELY, J.F., y LEY, M.
"Control of extracellular Fluid Volume and the pathophysiology of edema formation".
Chapter 14. Pag. 495.
The kidney. Vol. I. Ed. B.H. BRENNER y F.C. RECTOR.
W.B. SAUNDRES Co. -Philadelphia. 1.976.
- 33.- DOE, R.P. LOHRENZ, F.N. y SEAL, U.S.
"Familiar decrease in corticosteroid binding globulin".
Metabolism. 14-940. 1.965.
- 34.- DOUSA, T.P., SANDS, H. y HECHTER, O.
"Cyclic AMP-dependent reversible phosphorylation of renal medullary plasma membrane proteins".
Endocrinology 91-757. 1.972.
- 35.- EPSTEIN, F.H.
"Calcium and the kidney".
Am J. Med. 45-700. 1.968.

- 36.- EXTON, J.H., JEFFERSON, L. S., y BUTCHER, R.W.
"Gluconeogenesis in the perfused liver. The effect of -
fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, ade-
nosine 3'5' monophosphate".
Am. J. Med. 40-709. 1.966.
- 37.- EXTON, J.H., MALLETE, L.E., JEFFERSON, L.S.
"The hormonal control of hepatic gluconeogenesis".
Recent Prog. Horm. Res. 26-411. 1.970.
- 38.- FAIN, J.N.
"Effects of dexametasone and 2-deoxy-D-glucose on fruc-
tose and glucose metabolism by incubated adipose tissue".
J. Biol. Chem. 239-958. 1.964.
- 39.- FAIN, J.N.
"Effect of dibutyryl 3'5' AMP theophylline and nore-
pinephrine on lipolytic action of growth hormone and
glucocorticoids in white fat cells".
Endocrinology 82-825. 1.968.
- 40.- FAIN, J.N., SCOW, R.V. y CHERNICK, S.S.
"Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose
tissue in vitro".
J. Biol. Chem. 238-54. 1.963.
- 41.- FOX, K.E., y GABOUREL, J.D.
"Effect of cortisol on the activity and distribution
of two DNA-dependent RNA polumerases extractable from
rat thymus".
Endocrinology 90-1388. 1.972.

- 42.- FRIEDMANN, N. EXTON, J.H. y PARK, C.R.
"Interaction of adrenal steroids and glucagon on gluco
neogenesis in perfused rat liver".
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29-113. 1.967.
- 43.- GANOTE, C.F., GRANTHAM, J.J., MOSES, H.L. y ORLOFF, J.
"Ultrastructural studies of vasopressin effect on iso-
lated perfused renal collecting tubules of rabbit".
J. Cell. Biol. 36-355. 1.968.
- 44.- GARROD, O. y BURSTON, R.A.
"The diuretic response to ingested water in Addison's
disease and panhypopituitarism and the effect of corti
sone there on".
Clin. Sci. 11-113. 1.952.
- 45.- GARROD, O. DAVIES, S.A. y CAHILL, G.
"The action of cortisone and desoxycortisone acetate
on glomerular filtration rate and sodium and water ex
change in the adrenalectomized dog".
J. Clin. Invest. 34-761. 1.955.
- 46.- GAUNT, R., BIRNIE, J.H. y EVERSOLE, W.J.
"Adrenal cortex and water metabolism"
Physiol. Rev. 29-281. 1.949.
- 47.- GAUNT, R., LLOYD, C.W. y CHART, J.J.
"The adrenal-neurohypophyseal interrelationship in -
the neurohypophysis"
Proc. of 8th Symp. of Colston Res. Soc. H. Heller Ed.
New York, Academic Press. 1.957. Pag. 223.

- 48.- GILMAN, A.G.
"A protein binding assay for adenosine 3'5' cyclic mo
nophosphate".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 65-368. 1.970.
- 49.- GOODMAN, H.M. y KNOBIL, J.E.
"Some endocrine factors in regulation of fatty acid -
mobilization during fasting".
Am. J. Physiol. 201-1. 1.961.
- 50.- GRANTHAM, J.J.
"Vasopressin: Effect on deformability of urinary sur-
face of collecting duct cells".
Science, 168-1093. 1.970.
- 51.- GRANTHAM, J.J.
"Mode of water transport in mammalian renal collecting
tubules".
Fed. Proc. 30-14. 1.971.
- 52.- GRANTHAM, J.J. y BURG, B.
"Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability
of isolated collecting tubules".
Am J. Physiol. 211-255. 1.966.
- 53.- GRANTHAM, J.J., GANOTE, C.F., BURG, B. y ORLOFF, J.
"Paths of transtubular water flow in isolated renal co
llecting tubules".
J. Cell. Biol. 41-562. 1.969.

- 54.- GRANTHAM, J.J. y ORLOFF, J.
"Effect of prostaglandin E₁ on the permeability response of the isolated collecting tubule to vasopressin, -adenosine 3'5' -monophosphate and theophylline".
J. Clin. Invest. 47-1154. 1.968.
- 55.- GREEN, H.H. HARRINGTON, A.R. y VALTIN, H.
"On the role of antidiuretic hormone in the inhibition of acute water diuresis in adrenal insufficiency and the effects of gluco- and mineralocorticoids in reversing the inhibition".
J. Clin. Invest. 49-1724. 1.970.
- 56.- HACKNEY, J.F., GROSS, S.R., y ARONOW, L.
"Specific glucocorticoid binding macromolecules from mouse fibroblasts growing in vitro".
Mol. Pharmacol. 6-500. 1.970.
- 57.- HACKNEY, J.F., y PRATT, W.P.
"Characteristics and partial purification of the specific glucocorticoid binding component from mouse fibroblast".
Biochemistry 18-3002. 1.971.
- 58.- HANDLER, J.S., PRESTON, A.S., y ORLOFF, J.
"Effect of adrenal steroid hormones on the response of the toad's urinary bladder to vasopressin".
J. Clin. Invest. 48-823. 1.969.

- 59.- HANDLER, J.S. y ORLOFF, J.
 "The mechanism of action of antidiuretic hormone".
 En "Handbook of Physiology". Section 8. Renal Physiology. Ed. Orloff y Berliner. Washington Am. Physiol. Soc. Pag. 791-814. 1.973.

- 60.- HANDLER, J.S., PETERSEN, M., y ORLOFF, J.
 "Effect of metabolic inhibitors on the response of the toad bladder to vasopressin".
 Am. J. Physiol. 211-1175. 1.966.

- 61.- HAYS, R.M.
 "A new proposal for action of vasopressin based on - studies of a complex synthetic membrane".
 J. Gen. Physiol. 51-385. 1.968.

- 62.- HAYS, R.M., y LEAF, A.
 "Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin".
 J. Gen. Physiol. 45-905. 1.962.

- 63.- HAYS, R.M. y LEVINE, S.D.
 "Vasopressin".
 Kidney Inter. 20-30. 1.974.

- 64.- HOLLANDER, N. y CHIU, Y.W.
 "In vitro binding of cortisol-1-2 ³H by a substance in the supernatant fraction of P1978 mouse lymphosarcoma"
 Biochem. Biophys. Rev. Commun. 25-291. 1.966.

- 65.- IMBERT, M., CHABARDES, D., MONTEGUT, M., GLIQUE, A.,
y MOREL, F.
"Vasopressin dependent adenylate cyclase in single -
segments of rabbit kidney tubules".
Pflugers Archiv. European J. Physiol. 357-173, 1.975.
- 66.- ISIHII, D.N., PRATT, W.B., y ARNOW, L.
"Steady-state level of the specific glucocorticoid
binding component in mouse fibroblasts".
Biochemistry 11-3896. 1.972.
- 67.- JAMISON, R.L.
"Urinary concentration and dilution". The role of -
antidiuretic hormone and the role of urea".
Chepter 11, pag. 391.
En "The Kidney". Vol. 1. B.M. Brenner y F.C. Rector.
Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1.976.
- 68.- JAMISON, R.L., BUERKET y LACY, F.B.
"A micropuncture study of collecting tubule function
in rats with hereditary diabetes insipidus".
J. Clin. Invest. 50-244. 1.971.
- 69.- KEKWICK, A. y PAWAN, G.L.
"Oral aldosterone effect in a case of Addison's -
disease".
Lancet 2-162. 1.954.
- 70.- KIDSON, C.
"Cortisol in the regulation of RNA and protein synthe
sis".
Nature 213-779. 1.967.

- 71.- KING, R.J.B. y GORDON, J.
"Involvement of DNA in the acceptor mechanism for uterine oestradiol receptor".
Nature 240-185. 1.972.
- 72.- KIRKPATRICK, A.F., MILHOLLAND, R.J. y ROSEN, F.
"Sterospecific glucocorticoid binding to subcellular fractions of the sensitive and resistant lympho sarcoma. P 1978".
Nature (new Biol.) 232-216. 1.971.
- 73.- KLEEMAN, C.R., CZACZKES, J.W. y CUTLER, R.
"Mechanisms of IMPAIRED WATER Excretion in Adrenal and Pituitary Insufficiency IV Antidiuretic Hormone in Primary and Secondary Adrenal Insufficiency".
J. Clin. Invest. 43-1641. 1.964.
- 74.- KLEEMAN, C.R., KOPLOWITZ, J., MAXWELL, M.H. CUTLER, R., y DOWLING, J.T.
"Mechanisms of impaired water excretion in adrenal and pituitary insufficiency. II Interrelationships of adrenal cortical steroids and antidiuretic hormone subjects and in Diabetes insipidus".
J. Clin. Invest. 39-1472. 1.960.
- 75.- KLEEMAN, Ch. R., MAXWELL, M.H. y ROCKNEY, R.E.
"Mechanisms of impaired water excretion in adrenal and pituitary insufficiency. I The role of altered glomerular filtration rate and solute excretion".
J. Clin. Invest. 1958-37. 1.977.

- 76.- KOSTYO, J.L. y REDMOND, A.F.
"Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on aminoacid transport by muscle".
Endocrinology 79-531. 1.966.
- 77.- KUO, J.F. y De RENZO, E.C.
"A comparison of the effects of lipolytic and anti-lipolytic agents on adenosine 3'5' monophosphate - levels in adipose cells as determined by prior labeling with adenine-8¹⁴ C".
J. Biol. Chem. 244-2252. 1.969.
- 78.- KUROKAWA, K., FRIEDLER, R.M., y MASSRY, S.G.
"Renal action of cholera toxin. II Effects on adenylylate cyclase-cyclic AMP system".
Kidney Intern. 7-137. 1.975.
- 79.- KUROKAWA, K., LENCHNER, G., y MASSRY, S.G.
"Interaction between catecholamines and parathyroid hormone on renal cortical cyclic AMP".
Nephron 18-60. 1.977.
- 80.- KUROKAWA, K., y MASSRY, S.G.
"Interaction between catecholamines and vasopressin on renal medullary cyclic AMP of rat".
Am. J. Physiol. 225-825. 1.973.

- 81.- KUROKAWA, K., NAGATA, N., SASAKI, M., y NAKANE, K.
"Effect of calcitonin on the concentration of adenosine 3'5' cyclic monophosphate in rat kidney in vi-
vo and in vitro".
Endocrinology 94-1514. 1.974.
- 82.- LANG, M.L., y EDELMAN, L.S.
"Effects of aldosterone and vasopresin on adenyl cyclase activity of rat kidney".
Am. J. Physiol. 222-21. 1.971.
- 83.- LAUSON, H.D.
"Metabolism of the neurohypophysial hormones".
En:"Handbook of Physiology". Section 7. Endocrinology.
Washington. Am. Physiol. Soc. 1.974.
- 84.- LEAF, A., y HAYS, R.M.
"Permeability of the isolated toad bladder to solutes
and its modification by vasopressin".
J. Gen. Physiol. 45-921. 1.962.
- 85.- LEVINE, S.H., FRANKI, N., y HAYS, R.M.
"Effect of phlorelin on water and solute morement
in the toad bladder"
J. Clin. Invest. 52-1435. 1.973.
- 86.- LEVINE, S., FRANKI, N., y HAYS, R.M.
" A saturable vasopressin sensitive carrier for
urea and acetamide in the toad bladder epithelial
cell".
J. Clin. Invest. 52-2083. 1.973.

- 87.- LINDERMAN, R.D. y RAISZ, L.
"Effect of steroids on water diuresis and vasopressin sensitivity".
Am J. Physiol. 1961-166. 416.
- 88.- LIPPMANN, E., HALTERMAN, R.H. y LEVENTHAL, B.
"Glucocorticoid binding proteins in human leukemic blast cells".
Nature 242-157. 1.973.
- 89.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., y RANDALL, R.J.
"Protein measurement with the folin-phenol reagent".
J. Biol. Chem. 193-265. 1.951.
- 90.- LLOYD, C.W., y LOBOTSKY, J.
"Serum antidiuretic substances and urinary corticosteroid in the human".
J. Clin. Endocr. 10-318. 1.950.
- 91.- MACEY, R.I. y FARMER, R.E.L.
"Inhibition of water and solute permeability in human red cells".
Biochem. Biophys. Acta. 211-104. 1.970.
- 92.- MANGANIELLO, V., BRESLOW, J. y WAUGHIN, M.
"An effect of dexamethasone on the cyclic AMP content of human fibroblast stimulated by catecholamines and prostaglandin E".
J. Clin. Invest. 51-60A. 1.972.

- 93.- MANGANIELLO, V. y VAUGHIN, M.
"An effect of dexamethasone on adenosine 3'5' mono-phosphate content and adenosine 3'5' monophosphate diesterase activity of cultured hepatoma cells".
J. Clin. Invest. 51-2763. 1.972.
- 94.- MARUMO, F., y EDELMAN, I.S.
"Effect of Ca^{++} and prostaglandin E_1 on vasopressin activation of renal adenylyl-cyclase".
J. Clin. Invest. 50-1613. 1.971.
- 95.- MASUR, S.K. HOLTZMAN, E. y WALTER, R.
"Hormone-stimulated exocytosis in the toad urinary bladder: Some possible implications for turnover - of surface membranes".
J. Cell. Biol. 52-211. 1.972.
- 96.- MATSUI, N., y PLAGER, J.E.
"An "in vitro" physiological activity of protein - bound and unbound cortisol".
Endocrinology 78-1159. 1.966.
- 97.- MILLER, T.B., EXTON, J.H. y PARK, C.R.
"A block in epinephrine induced glycogenolysis in hearts from adrenalectomized rats".
J. Biol. Chem. 246-3672. 1.971.
- 98.- MORGAN, T.
"Permeability of the limbs of the loop of Henle".
Pag. 105. En: Villareal (ed.) Proceeding of Fifth International Congress of Nephrology (México, 1.972)
Vol. 2. Physiology 1.974.

- 99.- MORGAN, T. y BERLINER, R.W.
"Permeability of the loop of Henle vasa recta, and collecting duct to water, urea and sodium".
Am. J. Physiol. 215-108. 1.968.
- 100.- MORGAN, T., SAKAI, F., y BERLINER, R.W.
"In vitro permeability of medullary collecting ducts to water and urea".
Am. J. Physiol. 214-574. 1.968.
- 101.- MORITA, Y., y MUNCK, A.
"Effect of glucocorticoids in vitro and in vivo on net glucose uptake and amino acid incorporation by rat thymus cells".
Biochem. Biophys. Acta. 93-150. 1.964.
- 102.- MOSES, A.M., GABRILOVE, J.L. y SUFFER, L.J.
"Simplified water loading test in hypoadenocorticism and hypothyroidism".
J. Clin. Endocr. 18-1413. 1.958.
- 103.- MUNCK, A.
"Glucocorticoid inhibition of glucosa uptake by peripheral tissues. Old and new evidence molecular mechanisms and physiological significance".
Perspect. Biol. Med. 14-265. 1.971.
- 104.- MUNCK, A., WIRAI, C.
"Glucocorticoid receptors in rat thymus cells".
En: Advances in Biosciences. Pag. 301. Ed. por -
RASPE, G. -7 Schering Workshop of Steroid Hormone Receptors. Oxford. Pergamon. 1.971.

- 105.- MUNCK, A., WIRA, C. y YOUNG, D.A.
"Glucocorticoid receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids on thymus - cells".
J. Steroid Biochem. 3-567. 1.972.
- 106.- NAGATA, N., SASAKI, M., KIMURA, N., y NAKANE, K.
"The hypercalcemic effect of parathyroid hormone - and skeletal cyclic AMP".
Endocrinology 96-725. 1.975.
- 107.- NAKAGAWA, S., y WHITE, A.
"Properties of an aggregate ribonucleic acid polymerase from rat thymus and its response to cortisol injection".
J. Biol. Chem. 245-1448. 1.970.
- 108.- NEER, E.J.
"The vasopressin-sensitive adenylate cyclase of the rat renal medulla".
J. Biol. Chem 245-115. 1.973.
- 109.- OLEESKY, S. y STANBURY, S.N.
"The effect of oral cortisone on water diuresis in Addison's disease and hypopituitarism".
Lancet 2-664. 1.951.
- 110.- ORLOFF, J. y HANDLER, J.S.
"Vasopressin-like effects of adenosine 3'5' phosphate (cyclic 3'5' AMP) and theophylline in the toad bladder".
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5-63. 1.961.

- 111.- ORLOFF, J., y HANDLER, J.
"The role of adenosine 3'5' Phosphate in the action of antidiuretic hormone".
Am J. Medicine. 42-757. 1.967.
- 112.- ORLOFF, J., HANDLER, J.S. y BERGSTROM, S.
"Effect of prostaglandin (PGP), on the permeability response of toad bladder to vasopressin, theophylline and adenosine 3'5' monophosphate".
Nature 205-397. 1.965.
- 113.- PEARSON, O.H., MENDELSON, M.L. y WEST, C.D.
"Water and salt metabolism during acute adrenal insufficiency in man".
J. Clin. Endocr. 13-841. 1.953.
- 114.- PETERSON, M.J. y EDELMAN, I.S.
"Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the toad".
J. Clin. Invest. 43-583. 1.964.
- 115.- PRATT, W.B. y ISHII, D.N.
"Specific binding of glucocorticoids in vitro in the soluble fraction of mouse fibroblast".
Biochemistry 11-1401. 1.972.
- 116.- PRUNTY, F.T.G., McSWINEY, R.R. MILLS, H. y SMITH, M.A.
"The effects of aldosterone in Addison's disease and adrenal pseudohermafroditism".
Lancet 2-620. 1.954.

- 117.- QUINTANILLA, A.P. DELGADO-BUTRON, C., y ZEBALLOS, J.
"Renal hemodinamics and water Excretion in Addison's disease".
Metabolism. 25-419. 1.976.
- 118.- RAISZ, L.Y., McNEELY, W.F., SAXON, L., y ROSENBAUM, J.D.
"The effects of cortisone and hydrocortisone on water diuresis and renal function in man".
J. Clin. Invest. 36-767. 1.957.
- 119.- RAJERISON, R., MARCHETTI, J. ROY, C. BOCKAERT, J. y JARD, S.
"The vasopressin-sensitive adenylate cyclase of rat kidney. Effect of adrenalectomy and corticosteroids on hormonal receptor-enzyme coupling".
J. Biol. Chem. 249-6390. 1.974.
- 120.- RESHEF, L., y SHAPIRO, B.
"Effect of epinephrine cortisone and growth hormone on release of unesterified fatty acids by adipose tissue in vitro".
Metabolism. 9-551. 1.961.
- 121.- ROBISON, J.F., POWER, M.H. y KEPLER, E.J.
"Two new procedures to assist in the recognition and exclusion of Addison's disease: A preliminary report".
Proc. Mayo Clinic. 16-577. 1.941.

- 122.- ROSEN, J.M. FINA, J.J. y MILL HOLLAND, R.J.
"Inhibitory effect of cortisol in vitro on 2-deoxy
glucose uptake and RNA and protein metabolism lumpho
sarcoma P1798".
Cancer Res. 32-350. 1.972.
- 123.- ROSEN, F., ROBERTS, N.R. y BUDNICK, A.
"Corticosteroids and transaminase activity: The -
specificity of the glutamic-piruvic transaminase res-
ponse".
Endocrinology 65-256. 1.959.
- 124.- ROSENTHAL, H.E. SLAUNWHITE, W.R. y SANDBERG, A.A.
"Transcortin: A corticosteroid-binding protein of
plasma X. Cortisol and progesterone interplay and
unbound levels of theses steroids in pregnancy".
J. Clin. Endocrinol. 29-352. 1.969.
- 125.- RUDINGER, J. y JUST, K.
"A biologically active analogue of oxytocin not -
containing a disulfide group".
Experientia 20-570. 1.964.
- 126.- SADJEL, E.M. y JACOB, S.T.
"Mechanism of early effect of hydrocortisone on the
transcriptional process: Stimulation of the activi-
ties of purified rat liver nucleolar RNA polymerases".
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45-707. 1.971.
- 127.- SAYER, G.
"The adrenal cortex and homeostasis".
Physiol. Rev. 30-241. 1.950.

- 128.- SCHAFER, J.A., y ANDREOLI, T.E.
"Cellular constraints to diffusion: The effect of antidiuretic hormone on water flows in isolated mammalian collecting tubules".
J. Clin. Invest. 51-1264. 1.972.
- 129.- SCHAEFFER, L.D., CHENOWETH, D. y DUNN, A.
"Adrenal corticosteroid involvement in the control of liver glycogen phosphorylase activity".
Bioch. Miophys. Acta. 192-292. 1.969.
- 130.- SCHWARTZ, I.L. RASSMUSSEN, H., y RUDINGER, J.
"Activity of neuro hypophysial analogues lacking a disulfide bridge".
Prof. Nat. Acad. Sci. 52-1044. 1.964.
- 131.- SENFT, G., SCHULTZ, G., y MUNSME, K.
"Effects of glucocorticoids and insulin on 3'5' AMP phosphocorticoids and activity in adrenalectomized rats".
Diabetologia 4-330. 1.968.
- 132.- SLAUNWHITE, W.R., LOCKIE, G.N., y BACH, N.
"Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol".
Science 135-1062. 1.962.
- 133.- SLESSOR, A.
"Studies concerning the mechanism of water retention in Addison disease and in hypopituitarism".
J. Clin. Endocr. 11-700. 1.951.

- 134.- SMITH, H.W.
"Salt and water volumen receptors: an exercise in physiologic apologetics".
Am. J. Med. 23-623. 1.957.
- 135.- SONNERNBERG, H.
"Medullary collecting-duct function in antidiuretic and in salt-or water- diuretic rats".
Am J. Physiol. 226-501. 1.974.
- 136.- STRAUSS, M.B.
"Body water in man".
Boston Little, Brown and Co. 1.957.
- 137.- TAYLOR, A., MAMELOK, M. REAVEN, E. y MAFFLY, R.
"Vasopressin: Possible role of microtubules and microfilaments in its action".
Science 181-347. 1.973.
- 138.- THOMPSON, W.J. y APPLEMAN, M.M.
"Multiple cyclic nucleotic phosphodiesterase activities from rat brain".
Biochemistry 10-311. 1.971.
- 139.- TISHER, C.C. BULGER, R.E. y VALTIN, H.
"Morphology of renal medulla in water diuresis and vasopressin-induced antidiuresis".
Am J. Physiol. 220-87. 1.971.

- 140.- TORMEY, J.M. y DIAMOND, J.M.
"The structural route of fluid transport in rabbit gall bladder".
J. Gen. Physiol. 50-2031. 1.969.
- 141.- URRY, D.W., y WALTER, R.
"Proposed conformation of oxytocin in solution".
Proc. Nat. Acad. Sci. 68-956. 1.971.
- 142.- USSING, H.H.
"Effect of ADH in transport paths in toad skin".
Pag. 11. En: Alfred Beuzon Symposium. V. Transport Mechanisms in Epithelial". Ed. por Ussing H.H., Thorn, N,A. Copenhagen. Munksgaard, 1.973.
- 143.- Van Der MEULEN, N. ABRAHAM, A.D. y SEKERIS, C. E.
"Role of the nuclear cortisol binding protein in the control of transcription of thymocyte nuclei by cortisol".
Febs. Letters 25-116. 1.972.
- 144.- Van der MEULEN, N., MARX, R. y SEKERIS, C.E.
"Differential effects of cortisone on nucleolar and extranucleolar RNA synthesis of rat thymocytes".
Exp. Cell Res. 74-606. 1.972.
- 145.- Van DYKE, H.B. AMES, R.G., y PLOUGH, I.C.
"The excretion of antidiuretic hormone in the urine of patients with cirrhosis of the liver".
Trans. Ass. Amer. Phys. 63-35. 1.950.

- 146.- VESIN, P.
"Etude critique de certains aspects de la physiologie renale".
Prssem. Med. 67-2095. 1.959.
- 147.- WALTER, R. y BOWMAN, R.H.
"mechanism of inactivation of vasopressin and oxytocin by the isolated perfused rat kidney".
Endocrinology 92-189. 1.975.
- 148.- WHEELER, H.O. ROSS, E.D. y KING, K.
"Effect of carbonic anhydrase inhibitors on isolated rabbit".
Am. J. Physiol. 216-175. 1.969.
- 149.- WHITFIELD, J.F., Mac HANUS, J.P. y RIXON, R.H.
"Cyclic AMP mediated stimulation of thymocyte proliferation by low concentrations of cortisol".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134-1170. 1.970.
- 150.- YU, F.L., FEIGELSON, N.P.
"Cortisone stimulation of nucleolar RNA polymerase activity".
Proc. Nat. Acad. Sci. 68-2177. 1.971.
- 151.- TOUNG, D.A.
"Glucocorticoid action on rat thymus cells. II Internationship between ribonucleic acid and protein metabolisms and between cortisol and substrate effects on the metabolic parameters in vitro".
J. Biol. Chem. 245-2747. 1.970.