

# Efeito do extrato aquoso de sete – sangrias [*Cuphea mesostemon* (Koehne) Lourt] sobre o fluxo de água, medido em bexiga urinária de sapo *in vitro*.

Otake, A. H.<sup>1</sup>; Alves, M. J. Q. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia/IB/Unesp/Botucatu, Cx. P. 510, CEP 18618-000 Botucatu, SP. E-mail: zeze@ibb.unesp.br

**RESUMO:** A espécie *Cuphea mesostemon*, conhecida como sete-sangrias, é muito usada na medicina caseira como diurético. A bexiga urinária de sapo é um epitélio análogo ao nefro distal de mamífero, bastante utilizada para estudar transporte de água e eletrólitos. A preparação sacular de bexiga de sapo permite avaliar o fluxo de água (JH<sub>2</sub>O) da luz da bexiga para o meio externo ou seroso (reabsorção de água), por medidas gravimétricas. Nesse trabalho foi estudado o efeito hidrosmótico do extrato aquoso (EA) das folhas de sete-sangrias a 20 %, aplicado no banho seroso (S) da preparação sacular, onde o fluxo de água era medido de 15 em 15 minutos. Os resultados mostraram que após a aplicação de 0,4 mL do EA no banho S, o JH<sub>2</sub>O aumentou acentuada (160%) e significativamente (p<0,05). Esse efeito foi dose resposta quando se testou 0,2 mL (0,04 mg/mL), 0,4mL (0,08 g/mL) e 0,8 mL (0,16 g/mL) do EA no banho S. Além disso, foi estudado o efeito hidrosmótico do hormônio antidiurético (ADH), na dose de 10 um/mL, o qual estimulou significativamente (p<0,05) o JH<sub>2</sub>O em 150%. O efeito do EA foi semelhante ao do ADH e não foi antagonizado por esse hormônio. Conclui-se que a *Cuphea* possui atividade antidiurética, semelhante à do ADH, em bexiga urinária de sapo *in vitro*.

**Palavras-chave:** Fluxo de água, bexiga urinária de sapo, *cuphea mesostemon*, sete-sangrias e hormônio antidiurético.

**ABSTRACT:** Effect of aqueous extract of "sete - sangrias" (*Cuphea mesostemon* (Koehne) Lourt) on the water flow, measured in toad urinary bladder *in vitro*. The *Cuphea mesostemon* specie, known as "sete-sangrias", is widely used as a diuretic substance in popular medicine. As the toad urinary bladder is an epithelium analogous to the distal nephron of mammals, it is used in order to study the transport water and electrolytes in many laboratories. This preparation permits excellent observation in water flow, from the urinary bladder lumen to the external side or the serosal one (water re-absorption), by means of gravimetric measures. In the present work the hydrosmotic effect of aqueous extract (AE) of "sete-sangrias" leaf was studied. A 20% solution was added to the serosal side (S) of the bladder preparation, and the water flow was measured every 15 minutes after that. The results showed that 4mL of AE in the S side, increased the JH<sub>2</sub>O in a significant manner (p<0,05). This effect had a dose - response shape, with the volumes of 0,2mL, 0,4mL and 0,8mL of AE in the S bath. The hydro-osmotic effect of the anti-diuretic hormone (ADH) was studied as well and a significant stimulation (p<0,05) in the JH<sub>2</sub>O was observed with the magnitude of 150%. The AE effect was similar to the ADH one, and was not antagonized by this hormone. We concluded that *Cuphea* possesses an anti-diuretic activity similar to that presented by ADH, in toad urinary bladder, *in vitro*.

**Key words:** water flow, toad urinary bladder, *cuphea mesostemon*, "sete - sangrias and antidiuretic hormone.

## INTRODUÇÃO

A *Cuphea mesostemon* (Koehne) Lourt, conhecida vulgarmente como sete-sangrias, é uma planta da família Litaceae (Reitz, 1969), perene, herbácea, com pouca inflorescência de flores, de coloração rósea a lilás-clara (Aranha *et al.*, 1982). A *Cuphea mesostemon* é mais freqüentemente encontrada em áreas úmidas de solos arenosos. É reputada sete vezes melhor do que uma sangria, daí a origem do nome sete-sangrias (Lorenzi, 1982). Segundo os herbanários, a *Cuphea* é um diurético natural (Pio Corrêa, 1984), e esse efeito diurético tem sido relatado na literatura (Ribeiro *et al.*, 1988, Basualdo *et al.*, 1991 e Lorenzi, 1982), assim como o seu

efeito hipotensor (Lorenzi, 1982 e Silva *et al.*, 1995).

A pele e a bexiga urinária de sapo são epitélios amplamente utilizados para estudar transporte de água e eletrólitos. A bexiga urinária de anfíbios, além de armazenar urina, complementa funcionalmente o rim e constitui uma estrutura importante para a homeostase do meio interno destes animais. Esse epitélio urinário desempenha papel semelhante ao nefro distal de mamífero: reabsorve sódio (Leaf *et al.*, 1958), responde à vasopressina (Civan & Frazier, 1968; Grosso *et al.*, 1990; Boom *et al.*, 1995) e acidifica a urina (Ludens & Fanestil, 1972). Em condições normais, a bexiga de sapo apresenta uma baixa permeabilidade à água, apesar do gradiente osmótico existente entre o meio interno (luz vesical)

e o meio externo (sangue). A bexiga é uma estrutura histologicamente simples, podendo ser usada por muitas horas em estudos *in vitro*.

Sendo a bexiga urinária de sapo um análogo funcional do nefro distal de mamífero, o objetivo desse trabalho foi verificar se o extrato aquoso (EA) das folhas da planta sete-sangrias (*Cuphea mesostemoni*) tem efeito sobre o fluxo de água, medido *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados sapos *Bufo marinus paracnemis* de ambos os sexos e adultos. Esses animais eram criados em cativeiro, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, e foram gentilmente cedidos para a realização desse trabalho.

Os sapos foram espinhalados e descerebrados pela introdução de um estilete na altura da articulação atlo-occipital. Em seguida, suas hemibexigas foram isoladas, expostas e canuladas *in situ* - preparação sacular (Bentley, 1958) constituindo saquinhos na extremidade do tubo. O interior desses saquinhos constituía a face mucosa ou luminal (M) e o exterior, a face serosa ou sangüínea (S).

A luz da bexiga foi lavada e preenchida com 2 mL de solução de Ringer diluído (1:5) e a preparação foi mergulhada em um béquer contendo 10 mL de Ringer normal. Dessa forma criou-se um gradiente osmótico favorável ao fluxo de água do lado M para o S (reabsorção). Durante todo o experimento manteve-se aeração na face S da preparação, com a finalidade de oxigenar o tecido e agitar a solução, dissipando assim camadas estacionárias que podem formar no epitélio vesical.

O fluxo de água (M → S), foi medido gravimetricamente de 15 em 15 minutos. Os resultados obtidos com variações de peso da preparação, foram expressos em  $\mu\text{L}/15\text{minutos}$  (variação do volume), facilitando a compreensão dos mesmos.

Procedimento experimental: o período de estabilização da preparação foi de 2 horas. Após esse período iniciou-se o experimento propriamente: determinações do  $\text{JH}_2\text{O}$  de 15 em 15 minutos. Após o período controle (3 determinações), aplicou-se no banho S o extrato aquoso da planta sete-sangrias. O hormônio antidiurético (vasopressina) também foi testado, na dose de 10 mU/mL.

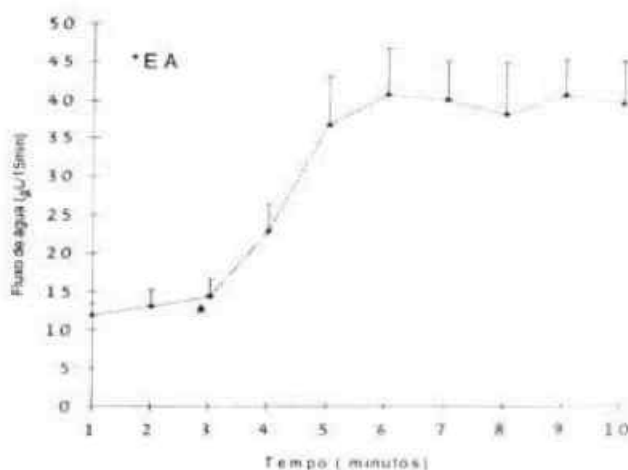
O extrato aquoso foi preparado mediante informações etnofarmacológicas (Silva, *et al.*, 1995, Lainetti & Brito, 1979), na proporção de 20g de folhas para 100 mL de água (20%), pelo método de infusão. Utilizou-se folhas de sete-sangrias coletadas no campus de Rubião Jr, Botucatu,

classificada pelo Prof. Dr. Ayrton Amaral Júnior, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, e encontra-se depositada no herbário BOTU (excicata n° 23409).

Foi utilizada a estatística não paramétrica (Siegel, 1975) com aplicação do teste de Friedman no nível de 5% de significância para comparação do fluxo de água mediano considerando-se os tratamentos: controle, doses de EA em mL e utilização do hormônio antidiurético (ADH). Para efeito de análise foi considerada para cada tratamento a média do fluxo observadas nos vários momentos.

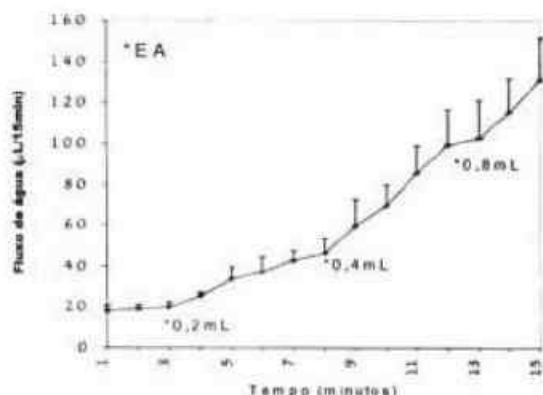
## RESULTADO

A Figura 1 mostra a variação das médias do fluxo de água ( $\text{JH}_2\text{O}$ ), em bexigas de sapo incubadas em Ringer normal. Nota-se, através desta figura, que a aplicação de 0,4mL do EA da planta sete-sangrias, no banho S da preparação, deslocou o  $\text{JH}_2\text{O}$  de 15  $\mu\text{L}$  para 40,5  $\mu\text{L}/15\text{min}$ , isto é, a reabsorção de água aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em 160%.



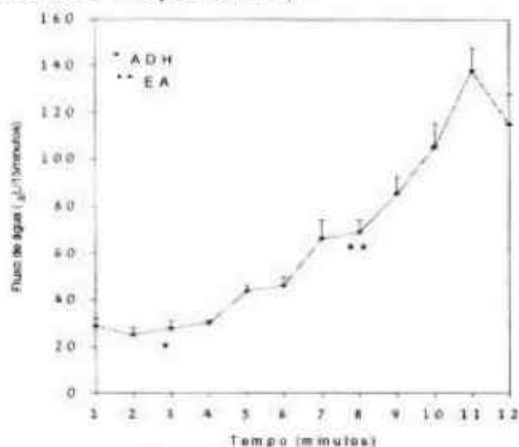
**FIGURA 1-** Valores médios do fluxo de água, mais ou menos padrão, antes e após a aplicação de 0,4 mL de extrato aquoso de sete-sangrias (\*EA)

A Figura 2 mostra que o efeito do EA guardou uma relação dose-resposta. Após o período controle, aplicou-se 0,2 mL do EA e a resposta hidrosmótica foi de aproximadamente 130%, ou seja, o  $\text{JH}_2\text{O}$  basal variou de 20 para 46  $\mu\text{L}/15\text{min}$ . Em seguida, aplicou-se mais 0,2 mL de EA, e o fluxo de água passou de 46 para 99  $\mu\text{L}/15\text{min}$ , isto é, a dose de 0,4mL foi capaz de aumentar o  $\text{JH}_2\text{O}$  em mais 120%. Na sequência, era aplicado mais 0,4mL de EA e o fluxo elevou-se de 99 para 120  $\mu\text{L}/15\text{min}$ , o aumento foi discreto e da ordem de 20%. Todas as alterações no fluxo de água, após a aplicação das doses do EA, foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 2** - Variação do fluxo de água (valores médios), mais ou menos erro padrão, medido em bexigas de sapo tratadas com extrato aquoso de sete sangrias (curva desse resposta).

A Figura 3 mostra a variação do  $\text{JH}_2\text{O}$  antes e após a aplicação de uma única dose do hormônio antidiurético (10 mU/mL). Este hormônio aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o fluxo de água de 27 para 69  $\mu\text{L}/15\text{min}$ . Em seguida ao efeito do ADH, testou-se 0,4 mL do EA de sete-sangrias, no banho S da mesma preparação e o efeito registrado, nestas condições, foi da ordem de 120% (o  $\text{JH}_2\text{O}$  aumentou significativamente de 69 para 148  $\mu\text{L}/15\text{min}$ ).



**FIGURA 3:** Variação do fluxo de água (valores médios) mais ou menos erro padrão, medido em bexigas de sapo tratadas com extrato aquoso de sete-sangrias, após o tratamento com hormônio antidiurético (ADH)

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A *Cuphea mesostemon* (Koehne) Lourt, planta conhecida como sete-sangrias, é utilizada na medicina popular pelas suas propriedades medicinais, dentre elas a ação diurética é bastante relatada (Lainetti & Brito, 1979; Ribeiro *et al.*, 1988; Basualdo *et al.*, 1991).

A metodologia sacular permite avaliar o fluxo de água do lado mucoso para o seroso da preparação, sendo este análogo ao processo de

reabsorção de água no nefro distal de mamífero.

Nessa preparação, o EA de sete-sangrias aumentou a reabsorção de água, isto é, o seu efeito hidrosmótico foi antidiurético e não diurético, como era esperado. O EA era sempre testado no banho seroso, e isto faz pensar que a bexiga de sapo possui receptores sensíveis ao EA na membrana basolateral do epitélio.

Os hormônios só reproduzem seus efeitos característicos quando em contato com a célula alvo, a qual possui receptores para tais hormônios. Sabe-se que a vasopressina (ADH) induz aumento na permeabilidade à água em epitélios de alta resistências tais como o nefro distal de mamífero (Barreto-Chaves & Mello-Aires, 1997) e bexiga de anfíbios (Marple *et al.*, 1994; Harris, 1992). O efeito hidrosmótico do ADH já está bem estabelecido na literatura e envolve receptores localizados na membrana basolateral (Grantham & Burg, 1966 e Candia *et al.*, 1997), os quais ativam a enzima adenil ciclase tendo como mensageiro intracelular o AMPc (Natochin *et al.*, 1992; Handler *et al.*, 1965; De Souza & Grosso, 1981; Hawk *et al.*, 1993 e Yu *et al.*, 1993). Os resultados com o ADH (Figura 3) estão de acordo com os da literatura, ou seja, esse hormônio aumentou a reabsorção de água em bexiga urinária de sapo.

Quando se compara os resultados das figuras 1 e 3, fica evidente que o efeito do EA sobre o  $\text{JH}_2\text{O}$  foi semelhante ao do ADH, isto é, ambos foram capazes de causar antidiurese na mesma proporção: efeito hidrosmótico da ordem de 150%. Além disso, analisando as figuras 1 e 3, nota-se que o efeito do EA, não foi antagonizado pelo ADH. Esses dados sugerem que os receptores para o EA, na bexiga de sapo, devem ser diferentes daqueles sensíveis ao ADH. Mas, como o perfil de resposta do EA foi parecido ao do ADH, pode ser que os mecanismos de ação sejam semelhantes, ou seja, o EA de sete-sangrias deve atuar através do mensageiro intracelular, AMPc. Entretanto, medidas diretas do conteúdo de AMPc não foram realizadas e são necessárias para substantiar essa hipótese.

Por outro lado, os dados obtidos em preparação sacular de bexiga de sapo mostram que o EA de *Cuphea mesostemon* tem efeito antidiurético e não diurético como era o esperado, contradizendo o seu uso na medicina popular. A eficácia de uma droga diurética no rim de mamífero (*in vivo*), está relacionada com vários fatores: sítio e a duração de ação, sua taxa de excreção, a dose empregada e a sua atividade nos mecanismos que tendem a reter sódio (Rose, 1991). Além disso, do ponto de vista teleológico, todo aumento da filtração glomerular ou todo bloqueio da reabsorção renal de sódio deveria aumentar a eliminação deste íon na urina, causando assim um efeito natriurético (Malnic & Marcondes, 1986). Sendo a bexiga urinária de sapo um análogo funcional apenas ao nefro distal de mamíferos, e além disso, trata-se

de um epitélio isolado (*in vitro*), esses fatores poderiam estar justificando, pelo menos em parte, o efeito antidiurético encontrado nessa preparação.

Portanto, conclui-se que o extrato aquoso de cuphea possui efeito hidrosmótico, em bexiga urinária de sapo e esse efeito foi dose resposta. Além disso, o efeito antidiurético do EA de sete-sangrias foi semelhante ao do ADH, contradizendo o seu uso na medicina popular como diurético.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Profa. Dra. Maria Ines Sogayar, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pelo fornecimento dos sapos, os quais foram criados em cativeiro do referido Departamento. Agradece também, o Prof. Dr. Adalberto José Crocci, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pela realização da análise estatística e aos Funcionários Hidelbrando Luiz da Silva e Antônio Carlos de Barros Tardivo pelo apoio técnico durante a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARANHA, C., BACCHI, O., LEITÃO FILHO, F.H. **Plantas invasoras de cultura**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1982. v.2.
- BARRETO-CHAVES, M.L.M., MELLO-AIRES, M. Luminal arginine vasopressin stimulates  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange and  $\text{H}^+$ -ATPase in cortical distal tubule via V1 receptor. **Kidney International**, v.52, p.1035-41, 1997.
- BASUALDO, I., ZARDINI, E., ORTIZ, M. Medicinal plants of Paraguay: underground organs. **Economic Botany**, v.45 n.1, p.86-96, 1991.
- BENTLEY, P.J. J. The effects of neurohypophysial extracts on water transport across the wall of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*. **Endocrinology**, v.17, p.201-9, 1958.
- BOOM, A., FLAMION, B., ABRAMOW, M. et al. Drugs activating G proteins disturb cycling of ADH-dependent water channels in toad urinary bladder. **American Journal of Physiology**, v.269, n.2, pt. 1, p.C424-34, 1995.
- CANDIA, O. A., MIA, A., YORIO, T. Evidence of basolateral water permeability regulation in amphibian urinary bladder. **Cell**, v.5-6, p.331-9, 1997.
- CIVAN, M.M., FRAZIER, H.S. The site of the stimulation action of vasopressin on sodium transport in toad bladder. **Journal of Genetic Physiology**, v. 51, p.589-605, 1968.
- ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p.235-9, 1991.
- GRANTHAN, J.J., BURG, M.B. Effect of vasopressin and cyclic AMPc on permeability for isolated collection tubules. **American Journal of Physiology**, v. 211, p. 255-9, 1966.
- GROSSO, A., CROGOE JR., E., SOUSA, R.C. Amiloride inhibits the vasopressin-induced increase in epithelial water permeability. **Fplurgers Archiv**, v.417 n.2, p.200-6, 1990.
- HANDLER, J.S., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, A. et al. The effect of vasopressin and of theophylline on the concentration of adenosine 3'- 5'-monophosphate in the urinary bladder of the toad. **Journal of Biological Chemistry**, v.240, p.4524-36, 1965.
- HARRIS JR., H.W. Antidiuretic hormone modulates membrane phosphoproteins in toad urinary bladder and retrieved water channel containing apical membrane vesicles. **Journal of American Society of Nephrology**, v.1, n.9, p.1114-22, 1992.
- HAYS, R.M.; LEAF, A. Studies on the movement of water through the isolated toad bladders and its modification by vasopressin. **Journal of Genetic Physiology**, v.45, n.5, p.905-19, 1962.
- HAWK, C.T., KUDO, L.H., ROUCH, A.J. et al. Inhibition by epinephrine of AVP- and cAMP- stimulated  $\text{Na}^+$  and water transport in Dahl rat CCD. **American Journal of Physiology**, v.265, n. 3, p. F449-60, 1993.
- LEAF, A., ADERSON, J., PAGE, B. Active sodium transport by the isolated toad bladder. **Journal of Genetic Physiology**, v.41, p. 657-68, 1958.
- LAINETTI, R., BRITO, N.R.S. **A cura pelas plantas medicinais brasileiras**. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1979. p.158.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: H. Lorenzi, 1982. p.158.
- LUDENS, J.H., FANESTIL, D.D. Acidification of urine by the isolated urinary bladder of the toad. **American Journal of Physiology**, v.223, p. 1338-44, 1972.
- MALNIC, G., MARCONDES, M. Diuréticos. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia renal**. 3.ed. São Paulo: E.P.U, 1986. p.337.
- MARPLES, D., BOURGUET, J., TAYLOR, A. Activation of the vasopressin-sensitive water permeability pathway in the toad bladder by N-ethyl maleimide. **Experimental Physiology**, v.79, n.5, p.775-95, 1994.
- NATOCHIN, Yu V., SHAKHMATOVA, E.I., FIRSOV, D.L. et al. Does the gradual hydroosmotic response to antidiuretic hormone depend on intracellular cAMP accumulation or on the formation of intramembrane particle aggregates? **Fpflugers Archiv**, v.422, n.1, p. 3-8, 1992.
- PIO CÔRREA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v.6, p.116 - 9.
- REITZ, P.R. Litráceas. In: \_\_\_\_\_. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1969. p. 27-8.
- RIBEIRO, R.A., BARROS, E., MELO, M.M.R.F. et al. Acute diuretic effect in conscious rat produced by some medicinal plants used in the of São Paulo, Brazil. **Ethnopharmacology**, v.24, n.1, p.19-29, 1988.
- ROSE, B. D. Diuretics. **Kidney International**, v.39, p. 336-52, 1991.

- SCHULDT, E.Z., RIBAS DE PAULO, A., PETERS, R.R. et al. Avaliação da atividade anti-hipertensiva da *Cuphea carthagenensis* (sete-sangrias) pela pressão arterial (PA) em ratos anestesiados. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14, 1997, Caxambú. *Anais...* Caxambú, 1997. v.1, p.282.
- SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica, para ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 345p.
- SILVA, I., FRANCO, S.L., CONEGERO, C.I. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 2.ed. Cascavel: Assoeste, 1995. p.182-3.
- SOUSA, R.C., GROSSO, A. The model of action of vasopressin: membrane microstructure and biological transport. *Journal of Physiology*, v.77, n. 4-5, p. 643-69, 1981.
- YU, L., TOLVO, A.J., SCOTT, W.N. Atrial natriuretic factor enhances the hydrosmotic response of toad bladder to sumaximal doses of vasopressin. *Life Science* v, 53, n. 7, p. 541-6, 1993.