Talita Rojas Cunha Sanches

Estudo da ação do inibidor de fosfodiesterase (sildenafil)
no diabetes insipidus induzido pelo lítio

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Nefrologia

Orientadora: Dra Lúcia da Conceição Andrade

São Paulo

2008

Esse trabalho foi realizado no LIM 12 da Faculdade de Medicina da USP, com auxílio CNPq e FAPESP.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha
mãe, Jane, a pessoa mais
importante da minha vida.

Agradecimentos

Tive muita sorte em conhecer o LIM12 e trabalhar aqui. Desde o primeiro dia me senti em casa e conheci grandes pessoas. Uma delas foi a Dra. Lúcia Andrade, minha orientadora. Minha mãe diz que Dra. Lúcia é minha mãe profissional, e eu concordo. Além de grande médica e pesquisadora, Dra. Lúcia é muito mais que uma orientadora, ela é uma orientadora “super legal”. Digo isso porque ela realmente orienta, ensina, discute as idéias, coloca a mão na massa e está sempre disposta a ouvir apesar da correria do dia-a-dia. Agradeço muito pela oportunidade que ela me deu de entrar no mundo da pesquisa científica, pela confiança que teve em mim, desde minha iniciação científica até agora, e por tudo o que ela me ensinou e ainda vai ensinar.

Outra grande pessoa que tive oportunidade de conhecer aqui foi o Dr. Antonio Carlos Seguro, chefe do laboratório LIM12. Dr. Seguro contagia o laboratório inteiro com sua paixão pela pesquisa, pela descoberta. Agradeço a ele pela oportunidade de vivenciar essa paixão pela ciência e por todos os ensinamentos que ele nos passa.

Foi através do Nivaldo, secretário do laboratório, que fiquei sabendo da oportunidade de estágio no LIM12 quando ainda estava começando o terceiro ano da graduação. Agradeço muito a ele por ter pensado em mim nessa hora, além de agradecer por todo o trabalho que ele faz pelo laboratório, sempre com bom humor e espírito leve e amável. Agradeço também a Eloá, secretária, por todo o trabalho, pelas conversas e pela ajuda.

Outra pessoa fundamental no laboratório é a Ciça, bioterista. Agradeço a ela pelo imenso cuidado com nossos animais, pela ajuda em todos os projetos, pelo bom humor e pelas bolachinhas de chocolate!

Fiz grandes amigos aqui e quero agradecer a todos. A Cristianne que agora está longe, mas sempre me ajudou muito durante sua passagem pelo laboratório, por seu enorme coração, cheio de bondade e alegria. Ao Alexandre que apesar de ter me deixado maluca algumas vezes se tornou um grande amigo. A Ana Carolina Pessoa engraçada e maluquinha que nos diverte bastante. A Helô por me ensinar milhões de técnicas e dosagens, pela amizade e bom humor e me ajudar muito na última fase desse trabalho. A Fabíola pelas conversas engraçadíssimas e pela ajuda. A Ana Carolina de Bragança, grande amiga, uma pessoa maravilhosa, sempre disposta a ajudar e a compartilhar. Ao Rildo que foi o último a chegar, mas se tornou outro grande amigo e conquistou a todos com sua alegria e inteligência. Enfim, agradeço a todos que fazem do LIM12 um excelente centro de pesquisa e um delicioso lugar para se vir todos os dias.

Agradeço também aos funcionários das câmeras escuras do INRAD e da Ortopedia, que sempre nos ajudaram a revelar os intermináveis filmes, sempre com muita disposição, bom humor e alegria.

Quero agradecer as minhas amigas e irmãs de alma que sempre me apoiaram, me animaram, ajudaram e simplesmente porque elas existem e são muito importantes pra mim: Bruna, Paula, Stephanie, Danielle, Letícia, amo muito vocês.

Agradeço a toda minha família pela confiança, pelo apoio. Especialmente as minhas avós Euza e Edelina, meu avô Domingos e Benê e a minha mãe, Jane, que eu não tenho nem palavras para explicar o quanto eu admiro e amo e pra quem eu dedico esse trabalho. Obrigada!!

Agradeço a disciplina de Nefrologia pela oportunidade de realizar minha pós-graduação. Apoio financeiro CNPq (134318/2006-4) e FAPESP.

E agradeço a Deus por permitir que tudo isso acontecesse na minha vida.

"A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvar diante da divindade." Voltaire

If you point your questions
The fog will surely chew you up
But if you want the answers
You better get ready for the fire

Suggestions – S.O.A.D.

Resumo

Summary

Introdução 1

Objetivos 10

Materiais e Métodos 12

Resultados 20

Discussão 35

Conclusão 41

Referências 43

Resumo

Os pacientes que usam lítio (Li) para tratamento do transtorno bipolar freqüentemente apresentam poliúria e deficiência de concentração urinária, sintomas do Diabetes Insipidus Nefrogênico (DIN). Animais tratados com Li apresentam baixos níveis de produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) em resposta ao hormônio antidiurético (HAD). O Sildenafil (Sil), um inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5), eleva os níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), levando a inserção de aquaporina 2 (AQP2) na membrana plasmática das células do ducto coletor. Portanto, inibidores de PDE podem promover a inserção de AQP2 na membrana plasmática mesmo sem a ativação do receptor de HAD, indicando a participação de uma via alternativa mediada pelo GMPc. Nós investigamos o efeito do Sil na expressão renal das proteínas de membrana AQP2, UT-A1, NKCC2, NHE3, α -ENaC em ratos com DIN induzido pelo Li. Ratos *Wistar* foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle, recebendo dieta alimentar normal durante quatro semanas; grupo Li, recebendo dieta alimentar normal com 40 mmol Li por quilo de dieta durante quatro semanas; grupo Li + Sil, recebendo dieta alimentar normal com 40 mmol Li por quilo de dieta durante quatro semanas e 200 mg por quilo de dieta de Sil a partir da segunda semana; grupo Sil, recebendo dieta alimentar normal durante a primeira semana e a partir da segunda semana recebendo dieta normal com 200 mg de Sil por quilo de dieta. Os animais do grupo Li desenvolveram poliúria, diminuição da osmolalidade urinária e diminuição

da expressão da AQP2. No grupo Li+Sil, o Sil foi capaz de reverter parcialmente a poliúria, diminuir o clearance de água livre, aumentar a osmolalidade urinária e aumentar a expressão da AQP2. A expressão de UT-A1 foi completamente normalizada com o tratamento com Sil. A expressão das proteínas NKCC2 e NHE3 apresentaram-se aumentadas no grupo tratado com Li, e o Sil não foi capaz de reverter tal alteração. Além disso, o tratamento com Sil reverteu completamente o aumento da resistência vascular renal. Assim, concluímos que o tratamento com Sil em ratos com DIN melhora a poliúria, aumenta a osmolalidade urinária e diminui o clearance de água livre pelo aumento da expressão de AQP2 e UT-A1. O tratamento com Sil pode ser benéfico para pacientes que sofrem com DIN induzida pelo Li.

Descritores: Lítio/efeitos adversos, Diabetes insípido nefrogênico, inibidores de fosfodiesterase, nucleotídeos cíclicos, Aquaporina 2.

Summary

Patients taking lithium to treat bipolar disorder often present polyuria and urinary concentrating defect. In addition, lithium-treated animals present lower cyclic adenosine monophosphate production in response to vasopressin. Sildenafil (Sil), a phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor, elevates intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels, leading to plasma membrane accumulation of aquaporin 2 (AQP2). Therefore, PDE inhibitors might induce AQP2 membrane insertion even without vasopressin receptor activation by activating a parallel cGMP-mediated signal transduction pathway. We investigated the effect of sildenafil on renal expression of AQP2, UT-A1, sodium/hydrogen exchanger (NHE3), type 1 bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2), and the epithelial sodium channel alpha subunit (α -ENaC). Wistar rats received lithium (40 mmol/kg food) or not for 4 weeks (Li or control), some rats also receiving sildenafil (200 mg/kg food) in weeks 2-4, with or without lithium (Li+Sil or Sil). In Li+Sil rats, urine output was markedly lower, as was water free clearance, whereas urine osmolality was higher. Semiquantitative immunoblotting revealed the following: AQP2 expression was partially normalized; UT-A1 expression was completely normalized; expression of NKCC2 and NHE3 was significantly higher in Li rats (although not significantly different between Li+Sil rats and Li rats); and α -ENaC protein expression was unaltered in all groups. Sildenafil treatment completely reversed the lithium-induced increase in renal vascular resistance. In

conclusion, sildenafil treatment of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus (NDI) improves polyuria, increases urinary osmolality, and decreases free water clearance via upregulation of renal AQP2 and UT-A1. Sildenafil treatment could be beneficial in patients with lithium-induced NDI.

Descriptors: Lithium/adverse effects, Diabetes insipidus nephrogenic, phosphodiesterase inhibitors, cyclic nucleotides, aquaporin 2.

Introdução

O sal de lítio (Li) foi introduzido na medicina psiquiátrica em 1949 para o tratamento da mania¹. Desde então, esta substância vem sendo usada principalmente no tratamento e profilaxia do transtorno bipolar do humor, doença caracterizada pela alternância de episódios depressivos com maníacos^{2,3}. O transtorno bipolar do humor é uma das doenças psiquiátricas mais comuns e a sua prevalência é de aproximadamente 3% a 5% na população mundial¹. O Li é a primeira opção para o tratamento de episódios leves e moderados do transtorno bipolar². Apresenta a maior eficácia entre os estabilizadores de humor clássicos, principalmente na prevenção de recidivas da doença^{1,2}. Além disso, diferente de outros agentes psicotrópicos, o Li não possui efeito sedativo, estimulante ou depressivo¹. O índice de sucesso do tratamento com Li é de 70% a 80%, diminuindo tanto os episódios depressivos como os episódios maníacos⁴. É, portanto uma droga indispensável no tratamento psiquiátrico moderno⁴.

1.1 O Lítio e o rim

O Li é um cátion monovalente que compartilha algumas características com os sais de sódio⁴. A via de administração preferencial é a oral na forma de carbonato de lítio (Li_2CO_3), sendo que a absorção ocorre inteiramente no trato digestivo e a principal via de excreção é a renal⁴.

O Li é tão bem reabsorvido pelas células renais principalmente pela sua similaridade química com o sódio e com o potássio⁴. Ele é, portanto, livremente filtrado pelos glomérulos, e reabsorvido em substituição aos íons sódio⁴. Cerca de 60% do Li filtrado é reabsorvido no túbulo proximal através do trocador sódio-hidrogênio tipo 3 (NHE3), sendo que o transporte de sódio é duas vezes maior que o de Li nesse trocador^{4,5}. Vinte por cento do Li filtrado é reabsorvido na alça de Henle e no ducto coletor, através do cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) e do canal de sódio amiloride sensível (ENaC), respectivamente^{4,5}. O ENaC tem aproximadamente a mesma permeabilidade ao Li e ao sódio⁴. É através dessa passagem que o Li se acumula nas células do ducto coletor⁴. Estudos em ratos, porém, já demonstraram que o transporte de Li por esses transportadores é mais acentuado quando há contração do volume extracelular do organismo⁴.

1.2 Efeitos colaterais do uso do Li

Um dos efeitos colaterais do Li é sua toxicidade nefrológica⁴. Esse efeito apresenta correlação com os níveis séricos da droga, sendo geralmente descrito aumento de toxicidade com concentrações séricas acima de 1,5 mEq/L, o que impõe a necessidade de monitorização dos níveis séricos

durante o tratamento⁴. Normalmente a concentração de Li nos fluidos corporais é menor que 0,2 mEq/L⁴. A faixa terapêutica para pacientes em tratamento de manutenção é de 0,6 mEq/L a 1,2 mEq/L, enquanto para pacientes em crise é de 0,8 mEq/L e 1,5 mEq/L⁴.

Os sintomas característicos de intoxicação por Li são náusea, vômito, diarreia e convulsão, entre outros¹. A intoxicação aguda leva também a defeitos na habilidade de concentrar urina e cronicamente, pode levar ao desenvolvimento de nefrite intersticial e insuficiência renal^{1,4}.

Outro efeito colateral, e um dos mais importantes, é o Diabetes insipidus nefrogênico (DIN)^{1,5}. Estima-se que 20% a 70% dos pacientes que fazem tratamento crônico com Li desenvolvem DIN¹. Os sintomas incluem poliúria, polidipsia e diminuição da capacidade de concentração urinária³.

1.3 O DIN induzido pelo Li

Um dos fatores que auxilia na regulação da concentração urinária e, portanto, ajuda na manutenção do volume hídrico corporal é o hormônio antidiurético (HAD) ou vasopressina⁶. Quando a osmolalidade dos fluidos corporais aumenta, ou seja, quando se tornam mais concentrados, a hipófise posterior secreta HAD⁶.

Christensen *et al*, em 1985, observaram que animais tratados com Li (60 mMol/kg/dieta) por 24 dias apresentavam osmolalidade urinária média de 254 mOsm, enquanto que os animais controles apresentavam osmolalidade urinária média de 905 mOsm⁸. Esse mesmo trabalho demonstrou que o AMPc intracelular estava diminuído nos animais tratados cronicamente com Li⁸. Marples *et al*, observaram que, além da osmolalidade urinária baixa e aumento da diurese, animais tratados cronicamente com Li apresentavam uma menor expressão de AQP2⁹.

A maneira pela qual o Li inibe a ação do HAD é muito discutida. Diversos estudos indicam uma diminuição na geração de AMPc em ratos tratados com Li^{8,10,11}. De alguma maneira, ainda desconhecida, o Li interferiria na transformação de ATP em AMPc. Uma das sugestões para essa teoria seria que o Li competisse com o magnésio na ativação da proteína G estimuladora. Dessa forma, a queda de AMPc livre no citoplasma reduziria a inserção de AQP2 na membrana celular, diminuindo assim a reabsorção de água e provocando a poliúria¹².

Além de promover alteração na expressão de AQP2, o Li também altera a expressão de outras proteínas de membrana¹³. Foi demonstrada uma importante diminuição das subunidades β e γ ENaC nas células do ducto coletor¹³. A subunidade α , entretanto, encontra-se normalmente expressa nos animais tratados com Li¹³. Sugere-se que o ENaC apresente uma resposta diminuída a estimulação por aldosterona nos animais tratados com Li¹⁴. A

proteína do cotransportador Na-Cl (NCC) também está diminuída nesses animais ¹⁴. A diminuição do ENaC e do NCC poderia explicar a grande excreção urinária de sódio observada nos animais¹⁴. Porém, curiosamente outros transportadores de sódio estão normalmente expressos (NHE3 e NKCC2)¹³.

Kim *et al*, demonstraram que a expressão das proteínas de membrana responsáveis pela regulação ácido-base também são modificadas pelo uso de Li¹⁴. Em animais tratados com Li, a H-ATPase e a NBC1 encontram-se aumentadas em relação aos animais controles¹⁴. Essa resposta é provavelmente uma adaptação do organismo à acidose tubular distal encontrada em animais e pacientes tratados com Li¹⁴.

Foi demonstrado que animais tratados com Li apresentam diminuição da expressão do transportador de uréia A1 (UT-A1)¹⁵. Demonstrou-se também existir um bloqueio da ação do HAD na fosforilação desse mesmo transportador nos animais tratados com Li¹⁵.

Estudos recentes demonstraram que ratos tratados com Li apresentavam diminuição das concentrações de ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1, COX-2) e de prostaglandina 2 sintase (mPGEs)¹⁶. Sabe-se que as prostaglandinas e suas enzimas catalíticas têm efeito na reabsorção de água¹⁶.

Alguns tratamentos já foram sugeridos para o controle do DIN induzido pelo Li. O uso de hidroclorotiazida para o tratamento do DIN já foi estabelecido¹⁷. Recentemente, demonstrou-se que a hidroclorotiazida,

aumenta a expressão da AQP2 e portanto aumenta a reabsorção de água no ducto coletor¹⁸. Apesar de contraditório, essa droga diurética tem um efeito antidiurético em pacientes e animais tratados com Li⁺, diminuindo a poliúria e aumentando a concentração urinária¹⁸.

O uso do diurético amiloride também se mostrou benéfico no controle do DIN¹⁹. Demonstrou-se que animais com DIN induzido pelo Li e tratados com amiloride apresentam aumento na expressão protéica de AQP2 e do transportador de uréia UT-A1, diminuindo a diurese dos animais¹⁹.

Outros estudos mostram ainda que inibidores da COX-2 também reverterem a poliúria observada nos animais tratados com Li²⁰.

Bouley *et al*, em 2000, demonstraram outra via de inserção de AQP2 na membrana celular²¹. Substâncias como o óxido nítrico, a L-arginina, o peptídeo atrial natriurético aumentam a concentração intracelular de (guanosina monofosfato cíclico) GMPc, que estimula a PKG e/ou a PKA numa via independente de HAD, e ativa o tráfego de AQP2 do citoplasma para a membrana plasmática (Figura 2)²¹.

A concentração celular dos nucleotídeos cíclicos, como o GMPc e o AMPc, é controlada pelas fosfodiesterases (PDE), isoenzimas que hidrolizam os nucleotídeos cíclicos, controlando assim as ações mediadas por eles³. Estudos já identificaram alguns tipos de PDE diferentes, PDE1 e PDE2 que hidrolisam tanto o AMPc como o GMPc; PDE3 e PDE4 que são específicas para AMPc; e PDE5, específica para GMPc²². Estudos anteriores já demonstraram a expressão de PDE5 e PDE4 nos ductos coletores dos rins²³.

Figura 2: Mecanismo de inserção de AQP2 na membrana apical pela via do GMPc. Bouley R, et al. J Clin Invest. 2000;106(9):1115-26.

Em 2005, pesquisadores estudaram os efeitos intracelulares do Sildenafil (Viagra®), inibidor específico da PDE5, em culturas de células LLC-AQP2²⁴. Esse estudo demonstrou que o tratamento com sildenafil (Sil) promove aumento da inserção de AQP2 na membrana apical dessas células mesmo sem aumento de AMPc intracelular²⁴. Foi evidenciado portanto que os inibidores de fosfodiesterase elevam a concentração de GMPc intracelular aumentando a capacidade de inserção de AQP2 na membrana celular de células renais²⁴.

Considerando as evidências de que o Li altera a reabsorção de água e promove alteração na expressão de outros transportadores de membrana das células renais, nos propusemos a estudar o efeito do tratamento com Sil em animais com DIN induzida pela Li.

Objetivos

Estudar a ação do SiI na expressão das proteínas de membrana AQP2, transportadores de sódio e uréia em ratos com DIN pelo Li.

Materiais e Métodos

Triagem dos animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) cedidos pelo Biotério da FMUSP foram submetidos à dosagem de uréia plasmática após jejum de 24 horas através de método espectrofotométrico, sendo aproveitados apenas aqueles com dosagem de uréia abaixo de 50 mg %.

Dieta alimentar

Os animais receberam dieta sólida em pó preparada no próprio laboratório. A concentração de sódio desta dieta é de 160 mEq/kg.

Grupos

Os animais foram divididos em 4 grupos e tratados durante 4 semanas.

Grupo 1 - Controle (C): Os animais receberam dieta alimentar normal durante as quatro semanas de experimento.

Grupo 2 - Li (Li): Os animais receberam dieta alimentar suplementada com 40 mmol de Li por quilo de dieta durante as quatro semanas de experimento.

Grupo 3 - Li + Sil (Li+Sil): Os animais receberam dieta alimentar suplementada com 40 mmol de Li por quilo de dieta durante as quatro semanas de experimento. Além disso

receberam 200 mg de Sil por quilo de dieta a partir da segunda semana.

Grupo 4 - Sil (Sil): Os animais receberam dieta alimentar normal durante a primeira semana de experimento e a partir da segunda semana passou a receber dieta suplementada com 200 mg de Sil por quilo de dieta.

Para a suplementação das dietas foram utilizados: cloreto de lítio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) e comprimidos de citrato de sildenafil (Viagra® - Pfizer).

Durante as quatro semanas todos os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais com livre acesso a água.

Estudos de gaiola metabólica e estudos bioquímicos

Ao fim da primeira semana e após as quatro semanas os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas. Antes e após o período de permanência em gaiola os animais foram pesados e a ingesta hídrica foi medida após as 24h de permanência do animal na gaiola.

O volume urinário coletado durante a permanência dos animais em gaiola foi medido e a urina utilizada para dosagens bioquímicas de sódio e potássio usando fotômetro de chama (Instrumentation Laboratory, modelo 143). Além disso, a osmolalidade urinária também foi medida através de osmômetro (Advanced Osmometer, modelo 3D3).

No último dia de experimento os animais foram sacrificados e os rins extraídos. Foram separados córtex e medula e colocados imediatamente no nitrogênio líquido e a seguir armazenados em freezer -70°C. O sangue foi coletado para dosagem de sódio e potássio plasmático usando fotômetro de chama e dosagem de creatinina plasmática através de método colorimétrico (Labtest Diagnóstica).

Determinação do Clearance de água livre

O clearance de água livre foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$C_{H_2O} = U_{volume/1440 \text{ min}} - C_{osm}$$

onde C_{H_2O} é o clearance de água livre, $U_{volume/1440 \text{ min}}$ é o volume urinário em microlitros dividido por 1440 minutos (correspondente a 24 horas), e C_{osm} é o clearance osmolar.

O clearance osmolar foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$C_{osm} = (U_{osmolalidade} \times U_{volume/1440 \text{ min}}) / P_{osmolalidade}$$

onde C_{osm} é o clearance osmolar, $U_{osmolalidade}$ é a osmolalidade urinária, $U_{volume/1440 \text{ min}}$ é o volume urinário em microlitros dividido por 1440 minutos, e $P_{osmolalidade}$ é a osmolalidade plasmática.

Determinação da pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com tiopental sódico (50 mg/kg), colocados em mesa cirúrgica aquecida e submetidos a traqueostomia, utilizando catéter de polietileno PE-240. A artéria carótida foi canulada com catéter PE-60 para coleta de sangue e controle da pressão arterial por manômetro de mercúrio e a veia jugular foi canulada para infusão de inulina e outros fluidos. Em seguida, foi feita uma incisão mediana para medida do fluxo renal plasmático. O pedículo renal esquerdo foi dissecado cuidadosamente e a artéria renal foi isolada. Uma sonda de fluxo eletromagnética (Transonic Systems) foi colocada ao redor da artéria renal exposta e o fluxo sanguíneo renal foi aferido através de um medidor de fluxo eletromagnético (T 106 XM, Transonic Systems). Para coleta de amostras de urina a bexiga urinária foi canulada com catéter PE-240. Inicialmente foi infundido uma dose *priming* de inulina (100 mg/kg) diluída em solução de NaCl 0,9%. Em seguida, foi infundido inulina (10 mg/kg) diluída em solução de NaCl 0,9% através de uma bomba peristáltica com fluxo de 0,04 ml/minuto. Ao total, foram coletadas três amostras de urina a cada intervalo de 30 minutos. As amostras de sangue foram coletadas no início e ao final do experimento. As concentrações de inulina nas amostras de sangue e urina foram determinadas de acordo com método descrito por Führ e cols., utilizando a antrona como reagente.

Estudo da expressão de transportadores de membrana

Extração de proteínas de membrana - os rins congelados dos animais foram homogeneizados em uma solução de K-Hepes (200 mM Mannitol, 80 mM Hepes, 41 mM KOH; pH 7,5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) usando um pistilo de teflon (Schmidt and Co., Frankfurt/M, Germany). Todo o procedimento foi feito no gelo, com uso de nitrogênio líquido quando necessário. O homogenato foi então centrifugado (2000 g) por 15 min a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi centrifugado novamente em ultracentrífuga por 1 hora a 4°C, 45000 rpm. O *pellet* (proteínas de membrana) obtido com essa centrifugação foi resuspenso em K-Hepes e congelado. A medida da concentração da proteína foi feita pelo método de Bradford (Bioagency).

Western blot - As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em PBS-T (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,5) por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em PBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-*conjugated secondary antibody* (*anti-rabbit* 1:2000, *anti-*

goat 1:5000, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) usando sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi feita com nova hibridização das membranas com o anticorpo para actina (Santa Cruz Biotechnology).

Semi-quantificação das proteínas - As bandas obtidas nos filmes foram analisadas (Image Master VDS Pharmacia Biotech), e realizada a densitometria. As bandas foram normatizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina.

Foram estudadas as respectivas proteínas:

Aquaporina 2: anticorpo anti-aquaporina 2 (Santa Cruz Biotechnology);

NKCC2: anticorpo anti-NKCC2 gentilmente cedido por Mark A. Knepper (NIH, Bethesda, EUA)

ENaC: anticorpo anti-ENaC (Santa Cruz Biotechnology);

NHE3: anticorpo anti-NHE3 (Santa Cruz Biotechnology);

UT-A1: anticorpo anti-UT-A1 gentilmente cedido por Jeff Sands (Emory University, Atlanta, GA)

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA (*one-way analysis of variance*) utilizando o programa de análise estatística Graph-Pad Prism. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

Li induz DIN

Os animais do grupo Li e Li+Sil já apresentavam sintomas de DIN após uma semana de alimentação com 40mMol de Li. O volume urinário desses animais apresentava aumento significativo em relação aos grupos controle e Sil (Figura 3), enquanto que a osmolalidade urinária apresentava diminuição significativa nos grupos Li e Li+Sil em relação aos grupos controle e Sil (Figura 4). Os sintomas de DIN continuaram por todo período do experimento nos animais que receberam apenas Li (Figura 3, 4 e Tabela 1).

Figura 3: Avaliação do volume urinário observado ao longo de quatro semanas de experimento. **a** $p < 0,01$ (vs. controle); **b** $p < 0,001$ (vs. Sil); **c** $p < 0,001$ (vs. controle); **d** $p < 0,05$ (vs. controle); **e** $p < 0,01$ (vs. Sil); **f** $p < 0,001$ (vs. Li).

Figura 4. Osmolalidade urinária inicial (Day 0), uma semana após a introdução do Li (1st week), e após três semanas de tratamento com Sil (4th week).

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos. Os dados são expressos como média±EPM

	Controle	Sil	Li	Li+Sil
Volume Urinário (ml/dia)	9.4 ± 1.8	10.4 ± 1.7	60 ± 5.7 ^{b,c,d}	28.3 ± 3.4 ^{e,f}
U _{osm} (mOsm/kg)	1098 ± 212	893 ± 107.5	212 ± 13.4 ^{b,c}	301 ± 9.5 ^{b,c}
C _{H2O} (µl/min)	-15 ± 1.4	-14.6 ± 2.9	9.1 ± 3.1 ^{b,c,g}	-0.7 ± 0.7 ^{c,h}
UVNa (mEq/dia)	0.37 ± 0.04	0.9 ± 0.2	0.75 ± 0.15	0.38 ± 0.09
UVK (mEq/dia)	1.14 ± 0.13	1.0 ± 0.17	0.71 ± 0.11	0.6 ± 0.13
Creatinina plasmática (mg/dl)	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Lítio plasmático (mEq/L)	não detectável	não detectável	0.3 ± 0.05	0.26 ± 0.04
Sódio plasmático (mEq/L)	144 ± 2.0	142 ± 2.8	149 ± 2.7	146 ± 1.0
Potássio plasmático (mEq/L)	3.6 ± 0.11	3.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Clearance inulina (ml/min)	2.15±0.06	2.36±0,09	2.37±0,06	2.16±0.17
PAM (mmHg)	126 ± 6.7	132 ± 8.4	127 ± 6.7	113 ± 4.4
RVR (mmHg/ml/min)	20 ± 0.85	19.5 ± 0.55	23.5 ± 0.64 ^{e,g,h}	19 ± 0.94

^aUVNa, excreção urinária de sódio 24h; UVK, excreção urinária de potássio 24h; PAM, pressão arterial média; RVR, resistência vascular renal.

^bp < 0,001 (vs. controle), ^cp < 0,001 (vs. Sil), ^dp < 0,001 (vs. Li+Sil), ^ep < 0,01 (vs. Sil), ^fp < 0,05 (vs. controle), ^gp < 0,01 (vs. Li+Sil), ^hp < 0,01 (vs. controle).

Tratamento com Sil diminui o volume urinário e o clearance de água livre nos animais com DIN induzido pelo Li

No final da quarta semana de experimento avaliamos o efeito do tratamento com Sil nos ratos com DIN induzido pelo Li.

O volume urinário apresentava diminuição significativa nos animais que receberam Li+Sil em relação aos animais que receberam apenas Li (Figura 3; Tabela 1). Apesar do volume urinário estar cerca de 50% diminuído no grupo Li+Sil em relação ao grupo Li, foi observado aumento significativo no grupo Li+Sil em relação aos grupos controle e Sil (Tabela 1).

O grupo que recebeu apenas Li apresentou clearance de água livre enquanto que o grupo com DIN induzido pelo Li e tratado com Sil o clearance de água livre apresentava diminuição significativa (Figura 5). Os animais controle e Sil estavam em TC de água (Figura 5). O aumento do volume urinário nos animais que receberam Li foi acompanhado da diminuição significativa da osmolalidade urinária em relação a osmolalidade urinária dos grupos controle e Sil ao final da primeira semana de experimento (Figura 4; Tabela 1). O tratamento com Sil no grupo Li+Sil aumentou a osmolalidade urinária na quarta semana em relação a primeira semana (220 ± 25 mOsm/kg vs. $301 \pm 9,5$ mOsm/kg; $p = 0.013$, *paired t-test*). A osmolalidade urinária do grupo Li+Sil apresentava aumento significativo em relação ao grupo Li ($p = 0,0002$, *Mann Whitney test*), contudo essa diferença não foi significativa. (Figura 4; Tabela 1).

Figura 5: Clearance de água livre na última semana.

Tratamento com Sil não altera o clearance renal do Li

O nível sérico de Li foi dosado nos grupos Li e Li+Sil para avaliar uma possível influência do tratamento com Sil no clearance renal do Li. Não foi observada diferença significativa no nível sérico de Li entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tratamento com Sil não altera os níveis urinários e plasmáticos de sódio e potássio

Em relação às concentrações urinárias e plasmáticas de sódio e potássio, não foi observada diferença entre os grupos (Tabela 1).

Tratamento com Sil não altera o clearance de inulina

Não foi observada diferença significativa no clearance de inulina entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tratamento com Sil reverte completamente o aumento da resistência vascular renal observada nos animais tratados com Li

Observamos que a resistência vascular renal estava aumentada no grupo Li em relação a todos os outros grupos. O tratamento com Sil no grupo Li+Sil normalizou a resistência vascular renal (Tabela 1).

A função renal, medida pela creatinina plasmática, não foi diferente entre os grupos (Tabela 1).

Não foi observada diferença na pressão arterial média entre os grupos. (Tabela 1).

Tratamento com Sil aumenta a expressão da proteína AQP2 nos animais com DIN induzido pelo Li

A expressão da proteína AQP2 do grupo Li+Sil estava aumentada em relação ao grupo Li ($60 \pm 2,9\%$ vs. $26,5 \pm 2,4\%$; $p < 0,001$) e diminuída em relação aos grupos controle e Sil ($60 \pm 2,9\%$ vs. $106 \pm 2,8\%$; $p < 0,001$). Além disso, a expressão de AQP2 apresentava aumento significativo no grupo Sil em relação ao grupo controle ($121 \pm 3,1\%$ vs. $106 \pm 2,8\%$; $p < 0,01$) (Figura 6).

• $P < 0.001$ vs. Control, Li+Sil and Sil

× $P < 0.001$ vs. Control and Sil

+ $P < 0.01$ vs. Control

Figura 6: Expressão protéica de AQP2 na medula renal. Análise da densidade das bandas. Observar que a expressão de AQP2 é parcialmente restabelecida nos animais tratados com Sil. Bandas de 29-kDa, 35-50 kDa.

Tratamento com Sil não altera a expressão da proteína NKCC2 nos animais com DIN induzido pelo Li

Não foi observada diferença na expressão da proteína NKCC2 entre os grupos Li e Li+Sil ($163 \pm 3,3\%$ vs. $151 \pm 4,3\%$; NS). A expressão de NKCC2 apresentava aumento significativo nos grupos Li e Li+Sil em relação aos grupos controle e Sil ($163 \pm 3,3\%$ and $151 \pm 4,3\%$ vs. $100 \pm 0,88\%$ and $93 \pm 3,3\%$, respectivamente; $p < 0,001$). Não foi observada diferença entre o grupo Sil e o grupo controle (Figura 7).

Figura 7: Expressão protéica de NKCC2 na medula renal. Análise da densidade das bandas. Observar que os grupos Li e Li+Sil apresentam aumento na expressão de NKCC2 em relação ao controle. Bandas de 161 kDa.

Tratamento com Sil reverte a diminuição da expressão da proteína transportadora de uréia UT-A1 induzida pelo Li

No grupo Li+Sil a expressão da proteína UT-A1 estava aumentada em relação ao grupo Li ($93 \pm 3,5$ vs. $51 \pm 2,7$; $p < 0,001$), e não apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle ($99 \pm 0,7\%$; NS), apesar disso a expressão de UT-A1 estava discretamente menor que no grupo Sil

($108 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos Sil e controle (Figura 8).

Figura 8: Expressão protéica de UT-A1 na medula renal. Análise da densidade das bandas. Observar que o grupo Li apresenta diminuição na expressão do UT-A1 e o tratamento com Sil reverte totalmente essa alteração. Bandas de 117 e 97 kDa.

Tratamento com Sil não reverteu as alterações ocorridas na proteína NHE3 induzidas pelo Li

A expressão da proteína NHE3 apresentava aumento significativo no grupo Li em relação ao grupo controle ($134 \pm 5,5\%$ vs. $99,3 \pm 0,7\%$; $p < 0,001$). Além disso, a expressão de NHE3 apresentava aumento significativo no grupo Li em relação ao grupo Sil ($134 \pm 5,5\%$ vs. $98 \pm 4,2\%$; $p < 0,001$), e não observamos diferença significativa entre os grupos Li e Li+Sil ($138 \pm 1,4$ vs. $134 \pm 5,5$; NS). A expressão de NHE3 apresentava aumento significativo no grupo Li+Sil em relação aos grupos controle e Sil ($p < 0,001$), e não observamos diferença significativa entre os grupos Sil e controle ($98 \pm 4,2\%$ vs. $99,3 \pm 0,7\%$; NS) (Figura 9).

Figura 9: Expressão protéica de NHE3 no córtex renal. Análise da densidade das bandas. Observar que os grupos Li e Li+Sil apresentam aumento na expressão de NHE3 em relação ao controle. Bandas de 84-kDa.

Tratamento com Sil não altera a expressão da proteína α -ENaC nos animais com DIN induzido pelo Li

Não houve diferença na expressão de α -ENaC entre os grupos estudados (Figura 10).

Figura 10: Expressão protéica de α -ENaC na medula renal. Análise da densidade das bandas. Bandas de 86-kDa.

Discussão

Sabe-se que o tratamento crônico com Li é uma das maiores causas de DIN⁴, e já foi demonstrado que nessa condição há diminuição na expressão protéica de AQP2 associada ao desenvolvimento de poliúria severa ^{8,9}. Em nosso estudo demonstramos que em ratos com DIN induzido pelo Li, o tratamento crônico com Sil aumenta a expressão protéica de AQP2 e UT-A1. Esses resultados estão de acordo com outros estudos mostrando que a ativação farmacológica da via do GMPc (vasopressina-independente) pode ser benéfica para o tratamento de algumas formas de DIN.

O ducto coletor é o principal sítio da regulação fina da reabsorção de água²⁵. A permeabilidade do ducto coletor a água é regulada pelo HAD e sua presença promove grande aumento da reabsorção de água do fluido tubular²⁶. O HAD se liga ao receptor tipo 2 presente na membrana basolateral das células do ducto coletor ativando a via do AMPc, que através de uma série de reações irá fosforilar as AQP2 presentes no citoplasma, promovendo a inserção das mesmas na membrana celular, aumentando a permeabilidade a água^{11,27,28}. Já foi demonstrado que o Li inibe a atividade da adenilciclase e diminui os níveis de AMPc intracelular do ducto coletor medular⁸ e essa inibição é a causa aparente da redução da expressão protéica de AQP2²⁹. A diminuição da permeabilidade à água no ducto coletor é o principal evento responsável pela poliúria.

Em 2000, Bouley *et al* identificaram uma via alternativa para a inserção de AQP2 na membrana plasmática²¹. Os autores descreveram uma via

dependente de GMPc para a inserção de AQP2 na membrana celular do epitélio renal²¹. Esses resultados sugerem que o óxido nítrico pode iniciar uma cadeia similar de eventos da via do AMPc mesmo na ausência desse mediador²¹. Semelhante ao processo de estímulo mediado pelo HAD, na via do GMPc, o tráfego de AQP2 para a superfície celular é dependente da fosforilação do sítio S256 na cauda citoplasmática da AQP2²¹. Isso sugere que a fosforilação da AQP2 no sítio S256 é necessária para o tráfego da proteína estimulado pelo GMPc. Ainda é incerto se o passo final desta fosforilação ocorre via proteína quinase A ou G^{21,30}.

Foi demonstrado também que há acúmulo de AQP2 na membrana plasmática das células do ducto coletor e de células LLC-AQP2 quando expostas ao SIL, inibidor específico de PDE5, que inibe a degradação de GMPc ²⁴. Em culturas de células isso ocorre sem aumento detectável de AMPc ²⁴. Não se sabe se o efeito do SIL está ligado ao aumento da exocitose e/ou na diminuição da endocitose da AQP2²⁴. Em nosso estudo, o tratamento com SIL diminuiu o volume urinário, aumentou a osmolalidade urinária e aumentou a expressão protéica de AQP2 nos animais com DIN induzido pelo Li.

Investigamos também como o transportador de uréia é afetado pelo tratamento com Sil nos animais com DIN induzido pelo Li. No modelo de DIN induzido pelo Li, a expressão de UT-A1 está diminuída¹⁵ e tal constatação também foi confirmada em nossos estudos. Já foi demonstrado que o HAD aumenta a permeabilidade do ducto coletor a uréia por uma via

AMPC dependente^{31,32}. Em estudos anteriores foi evidenciado que o HAD, através da proteína quinase A, induz a fosforilação do transportador UT-A1 em suspensões de células de ductos coletores da medula interna^{31,33}. Foi demonstrado que houve diminuição da sensibilidade do transportador UT-A1 à fosforilação induzida pelo HAD em ratos tratados com Li³¹. Em nossos resultados foi verificado que tratamento com Sil aumentou de forma significativa a expressão do UT-A1 na medula renal mesmo com o uso do Li. O aumento da reabsorção de água no ducto coletor após o tratamento com Sil poderia aumentar a concentração de uréia no fluído do ducto coletor medular interno, onde a permeabilidade a uréia é notavelmente alta³⁴. Isto poderia explicar o aumento da expressão de UT-A1 nos ratos que receberam a combinação de Li e Sil em nosso trabalho. Estudos futuros serão necessários para identificar o mecanismo exato pelo qual o Sil aumenta a expressão da proteína UT-A1 em ratos com DIN induzido pelo Li.

O tratamento crônico com Li está associado a um aumento significativo da excreção urinária de sódio em ratos^{18,19,35}, principalmente nos modelos de alta dose de Li (60 mmol/kg dieta)¹⁰. Mesmo em modelos de baixa dose de Li (40 mmol/kg dieta), foi observado aumento na excreção urinária de sódio, apesar desse aumento não ser tão pronunciado como é no modelo de alta dose¹⁰. Em nosso estudo houve aumento na natriurese, mas a diferença entre os grupos tratados e o grupo controle não foi significativa.

Testamos também se a expressão dos principais transportadores renais de sódio é afetada pelo tratamento com Sil nos animais com DIN induzida pelo Li. Foi demonstrado em outros estudos que o tratamento crônico com Li aumenta a expressão das proteínas NHE3 e NKCC2¹⁰, e tal alteração foi confirmada por nossos resultados. A expressão do trocador NHE3 estava aumentada nos animais que receberam apenas Li e também no grupo que recebeu a combinação de Li+Sil. O mesmo ocorreu com a expressão do cotransportador NKCC2. O mecanismo pelo qual ocorre o aumento de expressão tanto de NKCC2 como de NHE3 em ratos tratados com Li ainda não está totalmente esclarecido. Uma das vias conhecidas de regulação do NKCC2 é mediada pelo AMPc e pelo HAD, porém como no modelo de DIN induzida pelo Li ocorre inibição dessa via é provável que o aumento de expressão de NKCC2 esteja ligado a outro mecanismo molecular¹⁰. Da mesma forma, o aumento de expressão de NHE3 pode estar ligado à deficiência da acidificação urinária relacionada ao uso de Li ou ao aumento de fluxo tubular nos túbulos proximais¹⁰. A expressão do transportador α -ENaC não foi afetada pelo uso do Li puro ou em conjunto com o Sil. Houve uma tendência a diminuição na excreção urinária de sódio nos animais tratados com a combinação Li+Sil, mas a diferença entre os grupos não foi significativa.

A resistência vascular renal estava aumentada no grupo que recebeu Li e foi completamente normalizada pelo tratamento com Sil. Tanto no tecido como na vasculatura renal, a presença de PDE5 é abundante^{37,38,39}. Em alguns

tipos de doença renal como na Síndrome Nefrótica já foi demonstrado que a PDE5 reduz a sensibilidade ao peptídeo atrial natriurético⁴⁰. O Sil é usado clinicamente na disfunção erétil e na hipertensão pulmonar^{41,42,43}. Tem sido demonstrado que o tratamento com Sil melhora a filtração glomerular e a resposta natriurética ao peptídeo atrial natriurético em modelo experimental de insuficiência cardíaca⁴⁴. Rostaing *et al*, demonstraram que, em rins transplantados, a taxa de filtração glomerular (determinada pelo clearance de inulina) aumenta após 120 min da administração de Sil⁴⁵. Esses autores não observaram alterações significativas no fluxo sanguíneo renal, fluxo urinário e na excreção urinária de sódio⁴⁵. Além disso, Rodriguez-Iturbe *et al*, demonstraram que o tratamento precoce com Sil atenuou a progressão da lesão renal em animais submetidos a ablação renal, assim como preveniu a hipertensão e a deterioração da função renal, reduziu o dano histológico, a inflamação e a apoptose; atrasou o aparecimento de proteinúria e preservou a integridade dos capilares renais⁴⁶.

No presente estudo observamos presença de poliúria, diminuição da osmolalidade urinária e da expressão de AQP2 e aumento da resistência vascular renal nos animais com DIN induzido pelo Li. O tratamento com Sil melhorou a poliúria, restaurou parcialmente osmolalidade urinária, aumentou a expressão de AQP2 e restaurou a resistência vascular renal nesses animais.

Conclusão

- ✓ O uso do Sildenafil no tratamento de ratos com DIN induzido pelo Li diminui a poliúria, aumenta a osmolalidade urinária e diminui o clearance de água livre devido ao aumento da expressão de AQP2 e do transportador UT-A1;
- ✓ Além disso, o Sildenafil normaliza a resistência vascular renal nos ratos com DIN induzido pelo Li;
- ✓ Uma abordagem terapêutica que inclua o uso de Sildenafil pode ter implicações clínicas positivas para pacientes que sofram de DIN induzido pelo Li.

Referências

1. Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders – Depression and mania. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE, editors. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York : McGraw-Hill, Health Professions Division, 1996. p. 431-459.
2. Loosen PT. Transtornos do humor. In: Ebert MH, Loosen PT, Nurcombe B, Fillmann A, Porto L, Monteiro MC, editores. Psiquiatria – Diagnóstico e tratamento. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 288-324.
3. Riella MC, Pachaly MA. Metabolismo da água. In: Riella MC, editor. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ed., 2003. p. 100-131.
4. Timmer RC, Sands JM. Lithium intoxication. J Am Soc Nephrol. 1999;10(3):666-74.
5. Nielsen J, Kwon TH, Christensen BM, Frøkiær J, Nielsen S. Dysregulation of Renal Aquaporins and Epithelial Sodium Channel in Lithium-Induced Nephrogenic Diabetes Insipidus. Semin Nephrol. 2008;28(3):227-244.
6. Guyton AC, Hall JE. Os líquidos corporais e os rins. In: Guyton AC, Hall JE, editors. Fisiologia Humana e Mecanismo das Doenças. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 181-229.
7. Brown D, Nielsen S. Cell biology of vasopressin action. In: Brenner BM, editor. Brenner and Rector's The kidney. 8th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders, 2008. p. 280-307.

8. Christensen S, Kusano E, Yusufi AN, Murayama N, Dousa TP. Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium in rats. *J Clin Invest.* 1985;75(6):1869-79.
9. Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1838-45.
10. Kwon TH, Laursen UH, Marples D, Maunsbach AB, Knepper MA, Frøkier J, Nielsen S. Altered expression of renal AQP2 and Na⁺ transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(3):552-64.
11. Nielsen S, Frøkier J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 2002;82(1):205-44.
12. Yamaki M, Kusano E, Tetsuka T, Takeda S, Homma S, Murayama N, et al. Cellular mechanism of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus in rats. *Am J Physiol.* 1991;261(3 Pt 2):505-11.
13. Nielsen J, Kwon TH, Praetorius J, Kim YH, Frøkier J, Knepper MA, et al. Segment-specific ENaC downregulation in kidney of rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(6):1198-209.
14. Kim YH, Kwon TH, Christensen BM, Nielsen J, Wall SM, Madsen KM, et al. Altered expression of renal acid-base transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(6):1244-57.

15. Klein JD, Gunn RB, Roberts BR, Sands JM. Down-regulation of urea transporters in the renal inner medulla of lithium-fed rats. *Kidney Int.* 2002;61(3):995-1002.
16. Kotnik P, Nielsen J, Kwon TH, Krzisnik C, Frøkiaer J, Nielsen S. Altered expression of COX-1, COX-2, and mPGES in rats with nephrogenic and central diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(5):1053-68.
17. Verbalis JG, Berl T. Disorders of water balance. In: Brenner BM, editor. *Brenner and Rector's The kidney.* 8th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders, 2008. p.459-504.
18. Kim GH, Lee JW, Oh YK, Chang HR, Joo KW, Na KY, et al. Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(11):2836-43.
19. Bedford JJ, Leader JP, Jing R, Walker LJ, Klein JD, Sands JM, et al. Amiloride restores renal medullary osmolytes in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):F812-20.
20. Kim GH, Choi NW, Jung JY, Song JH, Lee CH, Kang CM, et al. Treating lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus with a COX-2 inhibitor improves polyuria via upregulation of AQP2 and NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):702-9.

21. Bouley R, Breton S, Sun T, McLaughlin M, Nsumu NN, Lin HY, et al. Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *J Clin Invest.* 2000;106(9):1115-26.
22. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, et al. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1996;8(2):47-52.
23. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 1999;55(1):29-62.
24. Bouley R, Pastor-Soler N, Cohen O, McLaughlin M, Breton S, Brown D. Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(6):F1103-12.
25. Schrier RW. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1820-32.
26. Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11663-7.

27. Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S. Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(1):F29-42.
28. Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(4):1013-7.
29. Bichet DG. Lithium, cyclic AMP signaling, A-kinase anchoring proteins, and aquaporin-2. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4):920-2.
30. Brown D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(5):F893-901.
31. Zhang C, Sands JM, Klein JD. Vasopressin rapidly increases phosphorylation of UT-A1 urea transporter in rat IMCDs through PKA. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(1):85-90.
32. Sands JM. Regulation of renal urea transporters. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(3):635-46.
33. Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA. Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *Am J Physiol.* 1987;253(5 Pt 2):823-32.
34. Sands JM, Knepper MA. Urea permeability of mammalian inner medullary collecting duct system and papillary surface epithelium. *J Clin Invest.* 1987;79(1):138-47.

35. Nielsen J, Kwon TH, Frøkiaer J, Knepper MA, Nielsen S. Lithium-induced NDI in rats is associated with loss of alpha-ENaC regulation by aldosterone in CCD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(5):1222-33.
36. Yusufi AN, Christensen S, Dousa TP. Effect of chronic lithium treatment upon the Na(+)-coupled cotransporters in renal brush border membranes. *Kidney Int.* 1993;43(5):1074-80.
37. Mundel P, Gambaryan S, Bachmann S, Koesling D, Kriz W. Immunolocalization of soluble guanylyl cyclase subunits in rat kidney. *Histochem Cell Biol.* 1995;103(1):75-9.
38. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 1999;55(1):29-62.
39. Kotera J, Fujishige K, Omori K. Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(5):685-93.
40. Valentin JP, Ying WZ, Sechi LA, Ling KT, Qiu C, Couser WG, et al. Phosphodiesterase inhibitors correct resistance to natriuretic peptides in rats with Heymann Nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(4):582-93.
41. Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA, Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1998;10(2):69-73; discussion 73-4.

42. Ghiadoni L, Versari D, Taddei S. Phosphodiesterase 5 inhibition in essential hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10(1):52-7.
43. Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circ Res.* 2007;101(11):1084-95.
44. Chen HH, Huntley BK, Schirger JA, Cataliotti A, Burnett JC Jr. Maximizing the renal cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate system with type V phosphodiesterase inhibition and exogenous natriuretic peptide: a novel strategy to improve renal function in experimental overt heart failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(10):2742-7.
45. Rostaing L, Tran-Van T, Ader JL. Increased glomerular filtration rate in kidney-transplant recipients who take sildenafil. *N Engl J Med.* 2000;342(22):1679-80.
46. Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, et al. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int.* 2005;68(5):2131-42.

Trabalho submetido

Treating Lithium-Induced Nephrogenic Diabetes Insipidus with Sildenafil Improves Polyuria via Upregulation of AQP2

Talita Rojas Sanches, Antonio Carlos Seguro, and Lúcia Andrade

Departamento de Nefrologia, Universidade de São Paulo Faculdade de
Medicina, São Paulo, Brasil/Nephrology Department, University of São Paulo
School of Medicine, São Paulo, Brazil

Running title: Li-induced NDI and Sildenafil

Word counts:

Abstract - 245

Text - 2797

Corresponding author: Lúcia Andrade

Nephrology Department

University of São Paulo School of Medicine

Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3310

CEP 01246-903 - São Paulo, SP, Brazil

tel: +55 11 3061-7281 / +55 11 3061-7343

FAX number: +55 11 30882267

e-mail: luciacan@usp.br

ABSTRACT

Patients taking lithium to treat bipolar disorder often present polyuria and urinary concentrating defect. In addition, lithium-treated animals present lower cyclic adenosine monophosphate production in response to vasopressin. Sildenafil (Viagra), a phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor, elevates intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels, leading to plasma membrane accumulation of aquaporin 2 (AQP2). Therefore, PDE inhibitors might induce AQP2 membrane insertion even without vasopressin receptor activation by activating a parallel cGMP-mediated signal transduction pathway. We investigated the effect of sildenafil on renal expression of AQP2, UT-A1, sodium/hydrogen exchanger (NHE3), type 1 bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2), and the epithelial sodium channel alpha subunit (α -ENaC). Wistar rats received lithium (40 mmol/kg food) or not for 4 weeks (Li or control), some rats also receiving sildenafil (200 mg/kg food) in weeks 2-4, with or without lithium (Li+Sil or Sil). In Li+Sil rats, urine output was markedly lower, as was water free clearance, whereas urine osmolality was higher. Semiquantitative immunoblotting revealed the following: AQP2 expression was partially normalized; UT-A1 expression was completely normalized; expression of NKCC2 and NHE3 was significantly higher in Li rats (although not significantly different between Li+Sil rats and Li rats); and α -ENaC protein expression was unaltered in all groups. Sildenafil treatment completely reversed the lithium-induced increase in renal vascular resistance. In

conclusion, sildenafil treatment of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus (NDI) improves polyuria, increases urinary osmolality, and decreases free water clearance via upregulation of renal AQP2 and UT-A1. Sildenafil treatment could be beneficial in patients with lithium-induced NDI.

Lithium has been widely used as a pharmacological agent in psychiatric therapy and is the established drug of choice for treating bipolar affective disorders.^{1,2} Lithium is eliminated primarily through renal excretion.³ Lithium competes with sodium for reabsorption by the sodium/hydrogen exchanger (NHE3), the type 1 bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2), and the epithelial sodium channel (ENaC).^{3,4,5} Approximately 60% of the filtered load of lithium is reabsorbed in the proximal tubule, an additional 20% being reabsorbed in the thick ascending limb, connecting tubule, and cortical collecting duct.^{3,4,5} However, lithium treatment has been associated with a variety of renal side effects, including nephrogenic diabetes insipidus (NDI), increased urinary sodium excretion, and distal renal tubular acidosis.^{3,6,7,8} In particular, lithium-induced NDI is associated with dysregulation of the aquaporin 2 (AQP2) water channel, as well as of ENaC, in the collecting duct.^{6,9,10} In addition, it has been demonstrated that decreased expression of the inner medullary urea transporter UT-A1 is associated with reduced urine concentrating ability in lithium-treated rats.¹¹

The most widely understood pathway leading to AQP2 membrane accumulation is via vasopressin type 2 receptor stimulation of adenylyl cyclase, cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-mediated activation of protein kinase A, and phosphorylation of AQP2.^{12,13} This phosphorylation event is necessary for vasopressin-stimulated membrane accumulation of AQP2.^{12,13} Bouley *et al.* showed that acute elevation of intracellular levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) induced by nitric oxide, L-arginine, or atrial natriuretic peptide also leads to AQP2 membrane insertion, in

transfected epithelial cells as well as in principal cells in some regions of the renal collecting duct.¹⁴ This effect probably occurs via protein kinase G-mediated phosphorylation of serine 256 at the AQP2 COOH terminus.¹⁴ In another study, Bouley *et al.* showed that this cGMP-mediated AQP2 trafficking can occur even in the absence of elevated levels of intracellular cAMP and is therefore independent of stimulation of the vasopressin type 2 receptor signaling pathway.¹⁵ Using immunofluorescence microscopy, together with western blotting of plasma membrane fractions, the authors demonstrated LLC-AQP2 cells exposed to sildenafil citrate (Viagra), an inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5), present elevated levels of intracellular cGMP and greater plasma membrane accumulation of AQP2.¹⁵ The authors also showed that sildenafil induces apical accumulation of AQP2 in renal medullary collecting duct principal cells, *in vitro* as well as *in vivo*. These data suggest that cGMP-specific PDE inhibitors induce activation of a parallel cGMP-mediated signal transduction pathway, thereby allowing AQP2 membrane insertion to occur without activation of the vasopressin type 2 receptor.¹⁵ This provides proof of principle that pharmacological activation of vasopressin-independent cGMP signaling pathways can aid in the treatment of some forms of NDI.

We hypothesized that sildenafil would increase AQP2 protein expression by activating a parallel cGMP-mediated signal transduction pathway and would therefore be useful in treating lithium-induced NDI. To test this hypothesis, we investigated the effects of sildenafil on the renal expression of

UT-A1, AQP2, NHE3, NKCC2, and the ENaC alpha subunit (α -ENaC) in rats with lithium-induced NDI.

RESULTS

Lithium Administration Induces NDI

During the four-week study period, all of the animals evaluated received standard rat chow with a fixed concentration of sodium chloride and were given *ad libitum* access to tap water. The rats were divided into four groups:

- Control, consisting of rats fed standard rat chow for four weeks
- Sil, consisting of rats fed standard rat chow for a period of four weeks but also receiving sildenafil (200 mg/kg food) for the last three weeks of that period
- Li, consisting of rats fed standard rat chow plus lithium (40 mmol/kg food) for four weeks
- Li+Sil, consisting of rats fed standard rat chow plus lithium (40 mmol/kg food) for a period of four weeks but also receiving sildenafil (200 mg/kg food) for the last three weeks of that period

Animals receiving lithium presented NDI within one week after its introduction. At that point (end of week 1), urine output was significantly higher in the Li and Li+Sil groups than in the control and Sil groups (Figure 1), whereas urine osmolality was significantly lower in the Li and Li+Sil groups than in the control and Sil groups (Figure 2). The NDI phenomenon continued throughout the entire study period in the Li group (Table 1).

Sildenafil Treatment Markedly Decreases Urine Output and Free Water Clearance in Lithium-Treated Rats

In the rats with NDI (lithium-treated rats), the effects of chronic sildenafil treatment were evaluated at the end of the study period. Urine output was significantly lower in Li+Sil rats than in Li rats (Figure 1; Table 1). Although urine output was 50% lower in the Li+Sil group than in the Li group, it was significantly higher in the Li+Sil group than in the control group and the Sil group. As expected, polyuria was increased in the rats treated with lithium alone, and the difference was significant in comparison with the degree of polyuria seen in control group rats and Li+Sil group rats (Figure 1; Table 1). Rats treated with sildenafil alone presented markedly lower free water clearance than did those treated with lithium alone (Table 1; Figure 3). Although free water clearance decreased significantly in the Li+Sil group, it remained significantly higher than that seen in the control and Sil groups, which presented free water reabsorption (Table 1; Figure 3). The marked increase in urine output in the Li group was also accompanied by a decrease in urine osmolality, which was significantly lower in the Li group than in the control and Sil groups. In the Li+Sil group, urine osmolality increased from week 1 to week 4 (220 ± 25 mOsm/kg vs. 301 ± 9.5 mOsm/kg; $P = 0.013$, paired t-test). Urine osmolality was also significantly higher in the Li+Sil group than in the Li group ($P = 0.0002$, Mann Whitney test), although the difference was not statistically significant in the ANOVA (Table 1).

Sildenafil treatment has no effect on renal lithium clearance

In order to rule out any influence of sildenafil treatment on renal lithium clearance, we measured serum lithium levels; we found no significant difference between the Li group and the Li+Sil group (Table 1).

Sildenafil Treatment Does not Alter Plasma or Urinary Levels of Sodium and Potassium

In contrast to the marked alterations in urine output, free water clearance, and urine osmolality, no significant difference were observed among the groups in terms of urinary excretion of sodium or potassium (Table 1).

Sildenafil Treatment Completely Reverses the Lithium-Induced increase in Renal Vascular Resistance

Although renal vascular resistance was higher in the Li group than in any of the other groups, it was completely normalized by sildenafil treatment (Table 1). Renal function, which was assessed by measuring serum levels of creatinine, was comparable among the groups. In addition, there were no differences in terms of mean arterial pressure (Table 1).

Treatment with a combination of Lithium and Sildenafil Increases AQP2 Protein Expression

Figure 4 shows that AQP2 expression was higher in Li+Sil rats than in Li rats ($60 \pm 2.9\%$ vs. $26.5 \pm 2.4\%$; $P < 0.001$). Nevertheless, AQP2 expression was

lower in Li+Sil rats than in control rats ($60 \pm 2.9\%$ vs. $106 \pm 2.8\%$; $P < 0.001$). In addition, AQP2 expression was higher in the Sil rats than in the control rats ($121 \pm 3.1\%$ vs. $106 \pm 2.8\%$; $P < 0.01$). Furthermore, there was a significant difference between the Sil group and the Li+Sil group in terms of AQP2 expression, which was higher in the Sil group ($P < 0.001$).

Treatment with Lithium Alone or with a Combination of Lithium and Sildenafil Increases NKCC2 Protein Expression

Figure 5 shows that Li+Sil rats presented levels of NKCC2 expression comparable to those seen in Li rats ($163 \pm 3.3\%$ vs. $151 \pm 4.3\%$; NS). Expression of NKCC2 was significantly higher in the Li rats and Li+Sil rats than in the control rats and Sil rats ($163 \pm 3.3\%$ and $151 \pm 4.3\%$ vs. $100 \pm 0.88\%$ and $93 \pm 3.3\%$, respectively; $P < 0.001$ for both). In the Sil group, NKCC2 expression did not differ significantly from that observed for the controls.

Sil Reverses Lithium-Induced Downregulation of UT-A1

In the Li+Sil rats, UT-A1 protein expression was higher than that seen in the Li rats (93 ± 3.5 vs. 51 ± 2.7 ; $P < 0.001$), and UT-A1 protein expression was comparable to that observed in control rats ($99 \pm 0.7\%$; NS), albeit different from that observed in the Sil rats ($108 \pm 4.4\%$; $P < 0.05$). There was no significant difference between the Sil group and the control group in terms of UT-A1 expression (Figure 6).

Sildenafil Does not Reverse Lithium-Induced Changes in NHE3 Abundance in the Renal Cortex

We examine the changes in expression of the major renal sodium transporter in lithium-treated rats. Semiquantitative immunoblotting revealed that NHE3 expression in the renal cortex was significantly higher in lithium-treated rats than in control rats ($134 \pm 5.5\%$ vs. $99.3 \pm 0.7\%$; $P < 0.001$). In addition, NHE3 protein expression was higher in the Li group than in the Sil group ($134 \pm 5.5\%$ vs. $98 \pm 4.2\%$; $P < 0.001$), although there was no significant difference between the Li+Sil group and the Li group (138 ± 1.4 vs. 134 ± 5.5 ; NS). However, NHE3 protein expression was significantly higher in the Li+Sil group than in the control group and the Sil group ($P < 0.001$), although there was no significant difference between the Sil group and the control group ($98 \pm 4.2\%$ vs. $99.3 \pm 0.7\%$; NS, Figure 7).

Treatment with Lithium alone or with a Combination of Lithium and Sildenafil Has no Effect on α -ENaC Abundance in the Renal Cortex

In the Li group, α -ENaC expression in the renal cortex remained stable ($105 \pm 2.0\%$) and was comparable to that observed for the control, Sil, and Li+Sil groups ($100 \pm 0.9\%$, $102 \pm 4.0\%$, and $105 \pm 3.0\%$; NS, Figure 8).

DISCUSSION

Chronic lithium treatment is known to be a major cause of NDI³, and downregulation of AQP2 has been shown to be associated with the development of severe polyuria.^{6,7} In the present study, we have demonstrated that, in rats with lithium-induced NDI, chronic sildenafil treatment upregulates expression of AQP2 and UT-A1. These results are in agreement with those of other studies showing that pharmacological activation of vasopressin-independent cGMP signaling pathways can be beneficial in the treatment of some forms of NDI.

The collecting duct is the site of final renal water excretion.¹⁶ Water permeability of the collecting duct is tightly regulated by vasopressin, the elevation of which causes a dramatic increase in that permeability, allowing reabsorption of water from the tubular fluid down an osmotic gradient.¹⁷ Vasopressin binds to the vasopressin type 2 receptors present in the basolateral membrane of collecting duct principal cells.^{12,13} Acting through the guanosine 5'-triphosphate-binding protein Gs, the interaction between vasopressin and the vasopressin type 2 receptor activates adenylyl cyclase, which accelerates the production of cAMP by adenosine 5'-triphosphate.¹⁸ Subsequently, cAMP binds to the regulatory subunit of protein kinase A, resulting in dissociation of the regulatory subunit from the catalytic subunit. This activates the catalytic subunit, phosphorylating AQP2,¹⁹ which is then translocated from intracellular vesicles to the plasma membrane,^{20,21} thereby increasing the water permeability of the apical plasma membrane. When vasopressin is removed, water permeability returns to basal levels, reflecting

retrieval of AQP2 by endocytosis,¹⁹ potentially making those channels available for reuse.²² Lithium has been shown to inhibit vasopressin-induced adenylyl cyclase activity and cAMP levels in the medullary collecting duct,⁷ and this inhibition is likely to be the cause of the reduced expression of vasopressin-regulated AQP2.²³ The resulting decreased osmotic water permeability of the collecting duct is a key factor in the etiology of massive diuresis.

In 2000, Bouley *et al* identified another pathway of AQP2 plasma membrane insertion.¹⁴ The authors described a cAMP-independent, cGMP-dependent pathway for AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells. Their data suggest that nitric oxide can initiate a similar chain of events in the absence of any detectable increase in cytoplasmic cAMP levels.¹⁴ Similar to the vasopressin-stimulated process, cGMP-stimulated AQP2 trafficking to the cell surface is dependent upon the presence of the S256 phosphorylation consensus site in the cytoplasmic tail of AQP2.¹⁴ Sodium nitroprusside has no effect on the intracellular localization of AQP2 in S256A-AQP2-transfected cells. This suggests that AQP2 phosphorylation at S256 is required for cGMP-stimulated AQP2 trafficking, although whether the final phosphorylation step is through protein kinase A or through the cGMP-activated protein kinase G remains unknown.^{14, 24}

It has also been shown that AQP2 accumulates in the plasma membrane of collecting duct principal cells and LLC-AQP2 cells upon exposure to the selective PDE5 inhibitor sildenafil, which inhibits the degradation of cGMP. In cultured cells, this occurs with no detectable increase in cAMP¹⁵ It is not

known whether the sildenafil effect is due to an increase in AQP2 exocytosis, a decrease in AQP2 endocytosis, or both.¹⁵ In our study, sildenafil treatment decreased urine volume, increased urine osmolality, and increased AQP2 expression in lithium-treated rats. Therefore, treatment with sildenafil might represent a novel therapeutic approach for patients suffering from lithium-induced NDI.

We also investigated the question of whether UT-A1 expression is affected by sildenafil treatment in lithium-induced NDI. Chronic lithium administration is a model of NDI in which UT-A1 protein expression decreases,¹¹ as was confirmed in the present study. It has been shown that vasopressin increases urea permeability in rat collecting duct by a cAMP-dependent pathway.^{25,26} Vasopressin, acting through protein kinase A, increases the phosphorylation of UT-A1 protein in inner medullary collecting duct suspensions.^{25,27} It has been demonstrated that there is a decrease in UT-A1 sensitivity to vasopressin-induced phosphorylation in lithium-treated rats²⁵, and that treatment with sildenafil significantly increases expression of UT-A1 in the medulla despite ongoing lithium therapy. The increased water reabsorption in the collecting duct after sildenafil treatment would increase urea concentration in the inner medullary collecting duct, where urea permeability is remarkably high,²⁸ which would explain the increased UT-A1 expression in the rats treated with the lithium-sildenafil combination in the present study. Further studies are needed in order to identify the exactly mechanism by which sildenafil increases UT-A1 protein expression in lithium-treated rats.

Chronic lithium treatment is associated with a significant increase in urinary sodium excretion in rats^{29, 30, 31}, mainly in a model of high-dose lithium treatment (60 mmol/kg food).¹⁰ Even in models of low-dose lithium treatment (40 mmol/kg food) in rats, urinary sodium excretion has been shown to increase, although the increase is not nearly as pronounced as that observed in the high-dose model.¹⁰ In our study, there was an increase in natriuresis, although the difference was not significant in comparison with the controls. We also tested whether the expression of major renal sodium transporters are affected by sildenafil treatment in lithium-induced NDI. The expression of NHE3, the major apical sodium transporter in the proximal tubule³², was increased by treatment with lithium alone and by treatment with the lithium-sildenafil combination, as was expression of NKCC2, the major apical sodium transporter in the thick ascending limb¹⁰. The expression of α -ENaC was not affected by lithium treatment, with or without sildenafil. Although there was a tendency toward a decrease in urinary sodium excretion in rats treated with the lithium-sildenafil combination, the difference was not significant.

Renal vascular resistance was increased in lithium-treated rats and completely normalized by subsequent treatment with sildenafil. In the kidney and renal vasculature, PDE5, which metabolizes cGMP, is abundant.^{33, 34, 35} In renal disease states such as nephrotic syndrome, it has been shown that PDE5 contributes to renal impairment and reduced sensitivity to natriuretic peptide.³⁶ Sildenafil is a PDE5 inhibitor that has been used clinically for erectile dysfunction and is currently also used for the management of pulmonary hypertension.^{37, 38, 39} It is of note that sildenafil has been shown to

improve the glomerular filtration rate and the natriuretic response to exogenous B-type natriuretic peptide in an experimental model of chronic heart failure.⁴⁰ Rostaing *et al.* showed that, in kidney transplant recipients, the glomerular filtration rate (determined on the basis of inulin clearance) increased within 120 min after the administration of sildenafil. Simultaneous alterations in effective renal blood flow (RBF), urinary flow and urinary sodium excretion were not significant. In contrast, there was an increase in the filtration fraction.⁴¹ Rodriguez-Iturbe *et al.* demonstrated that early treatment with sildenafil ameliorates the progression of renal damage.⁴² In their study, sildenafil treatment prevented hypertension and deterioration of renal function, reduced histologic damage, inflammation, and apoptosis, delayed the onset of proteinuria, and preserved renal capillary integrity. It remains to be established whether sildenafil therapy can also reduce the chronic interstitial fibrosis associated with long-term lithium treatment.⁴²

In conclusion, using sildenafil to treat lithium-induced NDI improves polyuria, increases urine osmolality and decreases free water clearance via upregulation of renal AQP2 and UT-A1. In addition, sildenafil normalizes renal vascular resistance in lithium-treated rats. A therapeutic approach that includes sildenafil could have positive clinical implications in patients suffering from lithium-induced NDI.

CONCISE METHODS

Animals and Experimental Protocols

Male Wistar rats weighing 150–250g were obtained from the animal facility of the University of São Paulo School of Medicine. Experimental NDI was induced in by administration of lithium, and the rats were then treated or not with sildenafil. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the University of São Paulo School of Medicine. During the four-week study period, all animals were fed standard rat chow with a fixed concentration of sodium chloride (0.5%) and given *ad libitum* access to tap water. The rats were divided into four groups: control ($n = 5$), consisting of rats fed standard rat chow for four weeks; Sil ($n = 5$), consisting of rats fed standard rat chow for a period of four weeks but also receiving sildenafil (200 mg/kg food) for the last three weeks of that period; Li ($n = 9$), consisting of rats fed standard rat chow plus lithium (40 mmol/kg food) for four weeks; and Li+Sil ($n = 8$), consisting of rats fed standard rat chow plus lithium (40 mmol/kg food) for a period of four weeks but also receiving sildenafil (200 mg/kg food) for the last three weeks of that period.

Metabolic cage studies

The rats were housed one per cage and maintained on a 12-h dark/12-h light cycle. The animals were acclimated to the housing conditions for two days prior to the experimental procedures. Baseline urine samples were collected over a period of 24 h by placing the animals in individual cages (Day 0). On

day 1, subject rats were allocated to the groups. At the end of week 1 and again at the end of week 4, the animals were placed in metabolic cages to collect 24-h urine samples. At the end of week 4, the animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg BW). To measure mean arterial pressure, the right or left carotid artery was catheterized with a PE-50 catheter. A median incision was made in order to measure RBF; the left renal pedicle was carefully dissected, and the renal artery was isolated with care in order to avoid disturbing the renal nerves. An electromagnetic flow probe (Transonic Systems, Bethesda, MD) was placed around the exposed renal artery, and RBF was measured with an electromagnetic flow meter (Transonic Systems, T 106 XM). After measuring the mean arterial pressure and RBF, whole blood was collected from the carotid artery. Kidneys were immediately removed. The animals were then killed with an overdose of anesthesia. Kidneys were dissected to obtain cortex and medulla samples. Cortex and medulla tissue samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Renal vascular resistance was calculated by dividing blood pressure by RBF and is expressed as mmHg/ml/min.

Analysis of blood and urine

The volume of each 24-h urine sample was measured gravimetrically. Urine samples were centrifuged in aliquots to remove suspended material, and the supernatants were analyzed. Urine and plasma osmolality was measured using a freezing point osmometer (3D3; Advanced Instruments, Norwood,

MA). Plasma and urine levels of sodium and potassium were measured by flame photometry, whereas plasma levels of creatinine were measured using kinetic technique. Levels of serum lithium were measured by ion-selective electrode.

Free water clearance was calculated using the following formula:

$$C_{H_2O} = U_{volume/1440 \text{ min}} - C_{osm}$$

where C_{H_2O} is free water clearance, $U_{volume/1440 \text{ min}}$ is urine volume in microliters divided by 1440 min, and C_{osm} is osmolar clearance.

Osmolar clearance was calculated using the following formula:

$$C_{osm} = (U_{osmolality} \times U_{volume/1440 \text{ min}}) / P_{osmolality}$$

where C_{osm} is osmolar clearance, $U_{osmolality}$ is urine osmolality, $U_{volume/1440 \text{ min}}$ is urine volume in microliters divided by 1440 min, and $P_{osmolality}$ is plasma osmolality.

AQP2-, urea-, and sodium transporter-specific antibodies

The peptide-derived polyclonal antibodies specific to NKCC2, α -ENaC, and NHE3 were kindly supplied by Dr. Mark Knepper (NHLBI, NIH, Bethesda, MD). The peptide-derived polyclonal antibody specific to UT-A1 was kindly supplied by Dr. Jeff Sands (Emory University, Atlanta, GA). The peptide-derived polyclonal antibodies specific to AQP2 and actin were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Preparation of membrane fractions

Samples of cortices and medullae were homogenized in ice-cold isolation solution (200 mM Mannitol, 80 mM Hepes, and 41 mM KOH, pH 7.5) containing protease inhibitors (protease inhibitor cocktail; Sigma, St. Louis, MO) using a Teflon pestle glass homogenizer (Schmidt and Co., Frankfurt am Main, Germany). The homogenates were centrifuged at low speed (2000 *g*) for 15 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. Subsequently, the supernatants were spun at 100,000 *g* for 1 h at 4°C (70 Ti rotor; Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA), producing pellets containing membrane fractions enriched with plasma membranes and with intracellular vesicles. The pellets were suspended in isolation solution with protease inhibitors.

Electrophoresis and Immunoblotting

Samples of membrane fractions were run either on 12.5% polyacrylamide minigels (for AQP2), on 10% polyacrylamide minigels (for α -ENaC, NHE3, and UT-A1) or on 8% polyacrylamide minigels (for NKCC2). After transfer by electroelution to nitrocellulose membranes (PolyScreen, PVDF Transfer; Life Science Products, Boston, MA), blots were blocked with 5% milk and 0.1% Tween 20 in PBS (sodium chloride 8.7 g/L, dibasic phosphate 7.2 mM, and monobasic phosphate 2.8 mM) for 1 h. Blots were then incubated with one of the following: anti-AQP2 antibody (1:2000), NKCC2 antibody (0.12 μ g/ml); α -ENaC antibody (1:500); NHE3 antibody (1:500); UT-A1 antibody (1:500). The labeling was visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG, diluted 1:2000, or anti-goat IgG, diluted 1:10000;

Sigma) using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Quantification of Renal Levels of AQP2, UT-A1 and Sodium Transporters

The ECL films presenting bands within the linear range were scanned using Image Master VDS software (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Quantitative analysis of antibodies was performed using densitometry. These bands were normalized to actin protein expression.

Statistical Analysis

All quantitative data are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences among the means of multiple parameters were analyzed by ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. Differences between two parameters were analyzed either by unpaired *t*-test or by nonparametric methods (Mann-Whitney test). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Acknowledgments

Financial support for this study was provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo) and by the Laboratórios de Investigação Médica (LIMs, Medical Investigation Laboratories) of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP, University of São Paulo School of Medicine) Hospital das Clínicas.

T. R. Sanches and A.C. Seguro, are recipients of grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development; grant nos. 134318/2006-4 and 309430/2006-7, respectively). This paper was presented in part at the Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, California, 2006.

References

1. Lenox RH, McNamara RK, Papke RL, Manji HK: Neurobiology of lithium: an update. *J Clin Psychiatry* 59: 37-47, 1998.
2. Quiroz JA, Gould TD, Manji HK: Molecular effects of lithium. *Mol Interv* 4: 259-272, 2004.
3. Timmer RT, Sands JM: Lithium intoxication. *J Am Soc Nephrol* 10: 666-674, 1999.
4. Holstein-Rathlou NH: Lithium transport across biological membranes. *Kidney Int* 28: S4-S9, 1990.
5. Greger R: Possible sites of lithium transport in the nephron. *Kidney Int* 28: S26-S30.
6. Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S: Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 95: 1838-1845, 1995.
7. Christensen S, Kusano E, Yusufi AN, Murayama N, Dousa TP: Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium in rats. *J Clin Invest* 75: 1869-1879, 1985.
8. Kim YH, Kwon TH, Christensen BM, Nielsen J, Wall SM, Madsen KM, Frøkiaer J, Nielsen S: Altered expression of renal acid-base transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1244-57, 2003.

9. Nielsen J, Kwon TH, Frøkiaer J, Knepper MA, Nielsen S: Lithium-induced NDI in rats is associated with loss of α -ENaC regulation by aldosterone in CCD. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290: 1222-1233, 2006.
10. Kwon TH, Laursen UH, Marples D, Maunsbach AB, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S: Altered expression of renal AQPs and Na(+) transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: 552-564, 2000.
11. Klein JD, Gunn RB, Roberts BR, Sands JM: Down-regulation of urea transporters in the renal inner medulla of lithium-fed rats. *Kidney Int* 61: 995-1002, 2002.
12. Fenton RA, Knepper MA: Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev* 87: 1083-1112, 2007.
13. Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA: Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82: 205-244, 2002.
14. Bouley R, Breton S, Sun T, McLaughlin M, Nsumu NN, Lin HY, Ausiello DA, Brown D: Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *J Clin Invest* 106:1115-1126, 2000.
15. Bouley R, Pastor-Soler N, Cohen O, McLaughlin M, Breton S, Brown D: Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). *Am J Physiol Renal Physiol* 288: 1103-1112, 2005.

16. Schrier RW: Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol* 17: 1820-1832, 2006.
17. Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW: Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11663-11667, 1993.
18. Knepper MA, Nielsen S, Chou CL, DiGiovanni SR. Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct. *Semin Nephrol* 14: 302-321, 1994.
19. Fushimi K, Sasaki S, Marumo F: Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 272: 14800-14804, 1997.
20. Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S: Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: 29-42, 2000.
21. Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA: Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1013-1017, 1995.
22. Katsura T, Ausiello DA, Brown D: Direct demonstration of aquaporin-2 water channel recycling in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. *Am J Physiol* 270: 548-553, 1996.
23. Bichet DG: Lithium, cyclic AMP signaling, A-kinase anchoring proteins, and aquaporin-2. *J Am Soc Nephrol* 17: 920-922, 2006.

24. Brown D: The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 893-901, 2003.
25. Zhang C, Sands JM, Klein JD: Vasopressin rapidly increases phosphorylation of UT-A1 urea transporter in rat IMCDs through PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: 85-90, 2002
26. Sands JM: Regulation of renal urea transporters. *J Am Soc Nephrol* 10: 635-646, 1999.
27. Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA: Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *Am J Physiol* 253: 823-832, 1987.
28. Sands JM, Knepper MA: Urea permeability of mammalian inner medullary collecting duct system and papillary surface epithelium. *J Clin Invest* 79:138-147, 1987.
29. Kim GH, Lee JW, Oh YK, Chang HR, Joo KW, Na KY, Earm JH, Knepper MA, Han JS: Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 15: 2836-2843, 2004.
30. Nielsen J, Kwon TH, Frøkiaer J, Knepper MA, Nielsen S: Lithium-induced NDI in rats is associated with loss of alpha-ENaC regulation by aldosterone in CCD. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: 1222-1233, 2006.
31. Bedford JJ, Leader JP, Jing R, Walker LJ, Klein JD, Sands JM, Walker RJ: Amiloride restores renal medullary osmolytes in lithium-induced

nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: 812-820, 2008.

32. Yusufi AN, Christensen S, Dousa TP. Effect of chronic lithium treatment upon the Na(+)-coupled cotransporters in renal brush border membranes. *Kidney Int* 43:1074-1080, 1993.

33. Mundel P, Gambaryan S, Bachmann S, Koesling D, Kriz W: Immunolocalization of soluble guanylyl cyclase subunits in rat kidney. *Histochem Cell Biol* 103:75-79, 1995.

34. Dousa TP: Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 55: 29-62, 1999.

35. Kotera J, Fujishige K, Omori K: Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 48:685-693, 2000.

36. Valentin JP, Ying WZ, Sechi LA, Ling KT, Qiu C, Couser WG, Humphreys MH: Phosphodiesterase inhibitors correct resistance to natriuretic peptides in rats with Heymann Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 7:582-593, 1996.

37. Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA, Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 10:69-73; discussion 73-74, 1998.

38. Ghiadoni L, Versari D, Taddei S: Phosphodiesterase 5 inhibition in essential hypertension. *Curr Hypertens Rep* 10: 52-57, 2008.

39. Kass DA, Champion HC, Beavo JA: Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circ Res* 101: 1084-1095, 2007.

40. Chen HH, Huntley BK, Schirger JA, Cataliotti A, Burnett JC Jr: Maximizing the renal cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate system with type V phosphodiesterase inhibition and exogenous natriuretic peptide: a novel strategy to improve renal function in experimental overt heart failure. *J Am Soc Nephrol* 17: 2742-1747, 2006.
41. Rostaing L, Tran-Van T, Ader JL: Increased glomerular filtration rate in kidney-transplant recipients who take sildenafil. *N Engl J Med* 342: 1679-1680, 2000.
42. Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, Vaziri ND: Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int* 68: 2131-2142, 2005.

Table 1. Physiological parameters^a

	Control	Sil	Li	Li+Sil
Urine volume (ml/day)	9.4 ± 1.8	10.4 ± 1.7	60 ± 5.7 ^{b,c,d}	28.3 ± 3.4 ^{e,f}
U_{osm} (mOsm/kg)	1098 ± 212	893 ± 107.5	212 ± 13.4 ^{b,c}	301 ± 9.5 ^{b,c}
C_{H₂O} (μl/min)	-15 ± 1.4	-14.6 ± 2.9	9.1 ± 3.1 ^{b,c,g}	-0.7 ± 0.7 ^{c,h}
UVNa (mEq/day)	0.37 ± 0.04	0.9 ± 0.2	0.75 ± 0.15	0.38 ± 0.09
UVK (mEq/day)	1.14 ± 0.13	1.0 ± 0.17	0.71 ± 0.11	0.6 ± 0.13
Serum Creatinine (mg/dl)	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Serum Lithium (mEq/L)			0.3 ± 0.05	0.26 ± 0.04
Serum Sodium (mEq/L)	144 ± 2.0	142 ± 2.8	149 ± 2.7	146 ± 1.0
Serum Potassium (mEq/L)	3.6 ± 0.11	3.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1
MAP (mmHg)	126 ± 6.7	132 ± 8.4	127 ± 6.7	113 ± 4.4
RVR (mmHg/ml/min)	20 ± 0.85	19.5 ± 0.55	23.5 ± 0.64 ^{e,g,h}	19 ± 0.94

^aUVNa, 24-h urinary excretion of sodium; UVK, 24-h urinary excretion of potassium; MAP, mean arterial pressure; RVR, renal vascular resistance.

^b*P* < 0.001 vs. control, ^c*P* < 0.001 vs. Sil, ^d*P* < 0.001 vs. Li+Sil, ^e*P* < 0.01 vs. Sil, ^f*P* < 0.05 vs. control,

^g*P* < 0.01 vs. Li+Sil, ^h*P* < 0.01 vs. control.

Figure 1. Time course of changes in urine output. Rats developed NDI within one week after the introduction of lithium. Among the rats with lithium-induced NDI, those also receiving sildenafil presented significantly lower urine output than did those receiving lithium only. Data are means $\pm$ SEM. ^a*P* < 0.01 vs. control; ^b*P* < 0.001 vs. Sil; ^c*P* < 0.001 vs. control; ^d*P* < 0.05 vs. control; ^e*P* < 0.01 vs. Sil; ^f*P* < 0.001 vs. Li.

Figure 2. Urine osmolality at baseline (Day 0), one week after lithium introduction (week 1), and after three weeks of sildenafil treatment (week 4). Data are means $\pm$ SEM.

Figure 3. Free water clearance at week 4.

Figure 4. Semiquantitative immunoblotting of membrane fractions prepared from kidney medulla samples. (A) Densitometric analysis of all samples from control, Li, Li+Sil, and Sil rats. Levels of AQP2 expression were partially restored in response to Sil. (B) Immunoblots reacted with anti-AQP2 revealing 29-kDa, 35-50 kDa AQP2 bands.

Figure 5. Semiquantitative immunoblotting of membrane fractions prepared from kidney medulla samples. (A) Densitometric analysis of all samples from control, Li, Li+Sil, and Sil rats. The Li and Li+Sil rats presented increased expression of NKCC2 in relation to controls. (B) Immunoblots reacted with anti-NKCC2 revealing a band of 146–176 kDa (centered at 161 kDa).

Figure 6. Semiquantitative immunoblotting of membrane fractions prepared from kidney medulla samples. (A) Densitometric analysis of all samples from control, Li, Li+Sil, and Sil rats. The Li rats presented decreased expression of UT-A1. Levels of UT-A1 expression were completely restored in response to sildenafil treatment. (B) Immunoblots reacted with anti-UT-A1 revealing a 117 and 97 kDa band.

Figure 7. Semiquantitative immunoblotting of membrane fractions prepared from renal cortex samples. (A) Densitometric analysis of all samples from control, Li, Li+Sil, and Sil rats. The Li and Li+Sil rats presented increased expression of the NHE3. (B) Immunoblots reacted with anti-NHE3 revealing an 84-kDa band.

Figure 8. Semiquantitative immunoblotting of membrane fractions prepared from renal cortices. Densitometric analysis of all samples from control, Li, Li+Sil, and Sil rats. The Li rats presented normal expression of α -ENaC. (B) Immunoblots reacted with anti- α -ENaC, revealing an 86-kDa band.

Figure 1

FIGURE 2

FIGURE 3

• $P < 0.001$ vs. Control and Sil

X $P < 0.01$ vs. Control and Li

α $P < 0.001$ vs. Sil

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

• $P < 0.001$ vs. Control, Li+Sil and Sil

× $P < 0.05$ vs. Sil

FIGURE 7

* $P < 0.001$ vs. Control and Sil

FIGURE 8

Resposta dos revisores

Decision Letter (JASN-2008-06-0603)**From:** jasn.editor@vanderbilt.edu**To:** luciacan@usp.br**Cc:** jasn.editor@vanderbilt.edu,bonnie@acceleration.net**Subject:** Re: JASN-2008-06-0603**Body:** Dear Dr. Andrade,

The review of your manuscript that was submitted to the JASN is complete and the Associate Editors and referees have provided us with an assessment of the paper.

Your manuscript has been reviewed by three experts in the field of vasopressin action and urinary concentrating mechanisms. All felt that the studies were potentially important because they provide a possible novel clinical therapy for patients with NDI. However, several significant concerns were raised that would need to be addressed. These are well outlined in the three reviews, but focus on the question of whether the decreased urine output observed in the Lithium+Sildenafil group of rats is due to a direct effect on the collecting duct cells or a decrease in water ingestion and/or GFR due to the systemic vascular effects. If you feel that you can address these concerns, as well as the other comments of the reviewers, we would welcome a revised manuscript.

Please let me know how you choose to proceed. If you choose to resubmit, we request that the revised manuscript be submitted electronically according to the "Instructions for Authors" available on our web site (www.jasn.org). The revised manuscript must be submitted within three months of receipt of this letter. If we do not receive the revision by that time, you will need to submit the paper as a new submission. In addition to new or revised figures, tables, and text, a detailed response to all issues raised by the editors and referees should be included. The revised text submitted should have changes from the original highlighted in red font to facilitate rapid review of the revisions.

Checklist:

REGULAR ARTICLES HAVE A PAGE LIMIT OF 3,000 WORDS (EXCLUDING TITLE PAGE, METHODS, FIGURE LEGENDS, TABLES, AND REFERENCES).

THE ORDER OF THE SUBMITTED MANUSCRIPT SHOULD BE: TITLE PAGE, ABSTRACT (250 WORDS), INTRODUCTION, RESULTS, DISCUSSION, CONCISE METHODS, ACKNOWLEDGMENTS, STATEMENT OF COMPETING FINANCIAL INTERESTS, REFERENCES, FIGURE LEGENDS, AND TABLES. (SUPPLEMENTAL INFORMATION REGARDING METHODS OR FIGURES AND LEGENDS REQUESTED BY REVIEWERS MAY BE SUBMITTED WITH THE MANUSCRIPT); THIS SUPPLEMENTAL MATERIAL WILL NOT BE PUBLISHED, BUT PLACED IN THE ARCHIVE AS AN ONLINE FILE WITH THE MANUSCRIPT AT THE TIME OF PUBLICATION.

THE TITLE PAGE SHOULD INCLUDE: TITLE, AUTHORS AND AFFILIATIONS, RUNNING TITLE (NO MORE THAN 30 CHARACTERS), SEPARATE WORD COUNT FOR ABSTRACT AND TEXT, AND THE CONTRIBUTING AUTHOR'S ADDRESS, PHONE, FAX AND EMAIL. ABSTRACTS SHOULD BE WRITTEN FOR EASY READING WITH NO ABBREVIATIONS, BUT TELL A COMPLETE STORY INCLUDING RELEVANT BACKGROUND, MAJOR METHODOLOGY, MAJOR RESULTS AND IMPLICATIONS, USING DATA AS NEEDED.

PLEASE REVISE YOUR TITLE TO KEEP IT UNDER 10 WORDS. REMOVE COLONS IF YOU HAVE USED THEM; WE RESERVE THE OPTION OF MAKING ADDITIONAL MODIFICATIONS.

PLEASE REMOVE ABBREVIATIONS FROM YOUR ABSTRACT AND CHECK IT

CAREFULLY FOR GENERAL READABILITY; WE RESERVE THE OPTION OF MAKING ADDITIONAL MODIFICATIONS.

PLEASE NOTE THAT THE CONCISE METHODS FOR ALL RESEARCH MANUSCRIPTS SHOULD BE MOVED TO FOLLOW THE DISCUSSION SECTION, AND YOU LIKELY WILL NEED TO RENUMBER THE REFERENCES TO ACCOMMODATE THIS. ALSO, AS OF (DATE), REFERENCES WILL BE DEMARCATED BY SUPERSCRIPTS RATHER THAN PARENTHESES IN THE TEXT.

CITED REFERENCES SHOULD BE SUPERSCRIPTED WITHOUT PARENTHESES IMMEDIATELY AFTER A COMMA OR A PERIOD.

EACH FIGURE NEEDS TO BE SUBMITTED AS A SEPARATE TIFF OR EPS FILE.

PLEASE SUBMIT YOUR REVISION AS A WORD DOCUMENT.

The Editorial Team of the Journal of the American Society of Nephrology thanks you very much for the opportunity to review this interesting work. Please contact me if you have any questions, or wish to discuss timing of the resubmission.

Sincerely,

Vivian Siegel, PhD
Executive Editor
JASN

Comments for Authors:

Referee: 1

Comments to the Author

This is an interesting study focusing on a scientific question with potential importance for treatment of polyuric disorders including acquired and inherited NDI. The conclusions are bound to be controversial, so that the evidence and logic must be airtight. In general, the expression of PDE5 in collecting duct cells has not been clearly established and it would help a lot to address this question head on with some immunocytochemistry and RT-PCR experiments. The Bouley data in kidneys seem to suggest that cGMP actions might only apply to part of the collecting duct (the OMCD) and this point is crucial to work out the physiological importance. In the same vein, it will be important to extend the studies to find out if the demonstrated effects of sildenafil are due to effects on the vasculature or direct effects on the collecting duct. Obviously gene expression is strongly effected by flow and therefore by changes in GFR. GFR changes themselves can impact strongly on urine flow rate without changes in aquaporin-2 expression. Therefore, direct measurements of GFR are critical to working out whether changes in water excretion and AQP2 expression are due to changes in GFR or cGMP changes in the collecting duct. See comments below for specific suggestions. Overall the results presented a very intriguing but fall short of being convincing for the reasons mentioned above and described in detail below.

Major:

1. What is the rationale for the choice of the dose of sildenafil? How can it be assured that the dose used does not decrease GFR which would be a potential reason why it decreased urine output. It would be nice to try some different doses to find one that did not have the demonstrated effects on vascular resistance. This would help with the question of whether changes in urine flow were due to direct effects on the collecting ducts or elsewhere.
2. Plasma creatinine is not an adequate means for assessment of GFR, particularly in rodents where non-creatinine chromagens may account for a major fraction of the measurement. It would be crucial to measure GFR in these studies by methods that do not utilize plasma creatinine measurements by the Jaffe method. A method that has worked well was described by Breyer's group: *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Mar;286(3):F590-6.
3. A major difficulty is that PDE5 is apparently not expressed in collecting duct cells, suggesting that effects of sildenafil are indirect, e.g. through vascular effects

that are well documented and confirmed in this study. Microarray studies from Cowley's laboratory (Uawithya et al. *Physiol Genomics*. 2008;32:229-53) demonstrated large amounts PDE1 and PDE4 mRNA, smaller amounts of PDE3, but zero PDE5. To claim a direct effect, some convincing evidence for PDE5 expression in collecting duct is needed. If an antibody is available, immunocytochemistry could be done or this task could conceivably be addressed with RT-PCR. There was a study from Japan a number of years ago that reported PDE5 in collecting tubules, but these data were not very persuasive.

4. In profiling the major renal Na transporters along the nephron, what about the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter? It should be straightforward to add these data either on new immunoblots or by reprobing the original blots.

5. Page 9. Immunoblotting of NHE3. NHE3 is expressed in both the proximal tubule and the cortical thick ascending limb. Immunocytochemistry or a similar technique would be helpful to find out where the changes are occurring.

6. The immunoblotting shows only two control lanes. Why? Were there additional immunoblotting data that are not shown? Please add the number of animals (n) for each of the bars in the immunoblotting bar graphs. Also the captions need to report the method of contrasts for all data. Parametric or nonparametric?

7. For immunoblotting of urea transporters: It is not clear whether kidney medulla samples were whole medulla or just inner medulla. Please clarify in methods and captions. It is difficult to get a signal for UT-A1 (kDa, 97 kDa) in whole medulla since it is only present in the IM. Usually, in whole medulla samples, only UT-A2 is seen with a MW of about 55 kDa. So it would be important to add MW markers to see what isoform this is.

8. Since AQP2 and UT-A1 seem to be the major focus of this paper, it would be helpful to confirm the conclusions about sildenafil effects with an independent method such as immunocytochemistry.

Minor:

1. The title should indicate that the study was done in rats.
2. Introduction: Aside from the transporters mentioned, lithium also is transported by the Na-K-ATPase according to the original studies of Skou, who later got the Nobel Prize for his work.
3. On the immunoblotting figures, please show the MW markers.
4. According to the methods, "the ECL films presenting bands within the linear range were scanned." Please include details on how was linearity ascertained? Many people believe that light sensitive film does not have a linear range. It would be good to add a serial dilution of an appropriate sample to test this.
5. In detailing the contrasts in the statistical comparisons, it is important to specify which contrasts were carried out. What was compared to what? This could be represented more directly on the bar graphs.

Referee: 2

Comments to the Author

General Comment: This is an interesting study showing that Viagra improves urine concentrating ability in lithium-treated rats

Major Comments:

1. It appears that only a single cohort of rats was studied. Although the N's are adequate and the results are statistically significant, this reviewer believes that it is important to show that the results are reproducible in a second cohort of rats. The authors may have done this, and if so, should mention this in the paper.

2. Did the authors measure cAMP in the rats? While the effects of Viagra are likely to be via cGMP, it would be interesting to know if the effect is direct or by indirectly increasing cAMP.

Minor Comment: page 12, line 50/51: it appears that reference 11, in addition to reference 25, should be cited here.

Referee: 3

Comments to the Author

This study shows that administration of sildenafil to rats with lithium induced NDI causes a reduction of urinary output and increase in osmolality. The work follows on logically from previous work by other groups in this area.

I have several concerns about the specificity of the effect that need to be answered before this manuscript can be considered further.

- 1) One obvious explanation for these data is that the Li + Sil treated rats are drinking less. What was the volume of water taken in by the rats on the different regimes? Did they eat and drink similar quantities of food and water?
- 2) Related to point 1, does long term lithium treatment have an effect on vasopressin secretion? Can an effect of vasopressin on AQP2 expression be ruled out if the Sil + Li treated rats are a little volume depleted? Ideally the experiments should be carried out using Brattleboro rats to avoid the confounding effects of vasopressin levels. In the absence of this, the effects of administering vasopressin for 4 weeks should be compared with the effects of sildenafil.
- 3) A usual treatment for NDI is thiazide therapy to cause mild volume contraction. Does treatment with thiazides also reduce urine output in Li-treated rats – in other words, is the observed effect specific to sildenafil?
- 4) It has been shown by Deen and colleagues that lithium causes a reduction in AQP2 levels without any significant change in cAMP concentration both in vivo and in vitro (Li et al., JASN, 17:1063, 2006). Therefore, the hypothesis that reduced cyclase activity and reduced cAMP levels cause the reduction in AQP2, although logical, seems not to be correct. The mode of action of Li on AQP2 expression remains unknown. Whether or not cGMP can affect AQP2 levels is unclear.
- 5) Some immunocytochemical data showing the distribution of AQP2 and some of the other transporters under the different conditions should be shown. Is the additional AQP2 in the apical membrane of principal cells – it could all be cytoplasmic without morphological further conformation, in which case the increase in urinary osms and reduction in volume could be unrelated to AQP2 levels, but due to a change in other parameters such as the medullary interstitial gradient, filtration fraction or reduced distal delivery due to increased proximal reabsorption. Is the renin-angiotensin system activated in these rats, for example, to counteract the predicted effect of sildenafil on vasodilatation?

Other points

- 1) Where was the sildenafil obtained from, and in what form was it administered. Was it the pure substance?
- 2) What is the explanation for the markedly delayed action of sildenafil on urinary volume? There is a large gap in data acquisition between weeks 1 and 4 – do the authors have any other time points to show?
- 3) The decrease in urine volume is about 50% yet the increase urine osmolality after Li + Sil is only about 25-30%. What is the explanation for this and where are the missing osmoles?
- 4) The fourth sentence stating that "Therefore PDE inhibitors MIGHT induce AQP2 membrane insertion ..." should be modified, since it has been shown already that they DO induce membrane insertion, in refs that are cited in the main text.

Date Sent: 15-Jul-2008