Talita Rojas Cunha Sanches

Vias intracelulares da ação do Sildenafil no diabetes
insipidus induzido pelo lítio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Lúcia da Conceição
Andrade

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sanches, Talita Rojas Cunha

Vias intracelulares da ação do sildenafil no diabetes insípido induzido pelo
lítio / Talita Rojas Cunha Sanches. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Lítio/efeitos adversos 2.Diabetes insípido nefrogênico
3.Inibidores de fosfodiesterase 4.Nucleotídeos cíclicos 5.Aquaporina 2 6.Proteína
de ligação ao elementos de resposta ao AMP cíclico

USP/FM/DBD-139/12

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 admirável e importante da minha vida.

Agradecimentos

Quando era pequena e minha mãe perguntava o que eu queria de ser quando crescesse eu respondia que seria cientista. À princípio iria ser astrônoma, eu queria descobrir novos planetas, novas estrelas e entender como um buraco negro funcionava. Depois queria entender como os vulcões e os gêiseres funcionavam. O tempo foi passando e começou-se a falar muito sobre genética, iria então ser geneticista e fazer um clone. Resolvi então fazer biologia e me encantei pela fisiologia. No terceiro ano de faculdade fui procurar um estágio e acabei entrando para a equipe de pesquisa do LIM12 e, afinal, realizei meu sonho, virei cientista. Só consegui realizar esse sonho com ajuda e dedicação da minha mãe, que sempre me perguntava o que eu queria ser, me incentivava a ler e estudar, me levava em exposições que ficaram marcadas na minha memória (a do vulcão que entrava em erupção de hora em hora e que tinham balanças para sabermos quanto pesávamos em outros planetas). Apesar de todas as dificuldades da vida, minha mãe nunca abandonou meu sonho e fez de tudo para que ele se realizasse e por isso ela é a pessoa que eu mais agradeço. Agradeço por todo o amor, carinho, apoio que ela dedicou e dedica a mim desde que eu nasci... Foi por tudo isso que eu me tornei a pessoa que sou hoje. Te amo mami!

Cheguei então no LIM 12. O Nivaldo, secretário do laboratório e amigo da minha mãe, comentou que uma pesquisadora precisava de um estagiário. Fui então conversar com a Profa. Dra. Lúcia Andrade. Acho que conversamos por meia hora ou menos e no final ela disse: "Tudo certo, você pode começar segunda!". Eu comecei morrendo de medo, de quebrar as

coisas, de fazer tudo errado e fiquei me sentindo a pessoa mais burra do universo vendo tudo o que faziam aqui e eu não entendia nada. Mas com muito carinho e dedicação a Dra. Lúcia foi me ensinando tudo, me mostrando que com paciência e estudo as coisas começam a se encaixar. Ela foi minha orientadora de iniciação científica, de mestrado e de doutorado. E, mais do que isso, ela foi e é minha orientadora da vida profissional e pessoal, sempre passando seus valores, bom humor, positividade, alegria, bondade e amor pela ciência. Incentivando a mim e a todos seus alunos a serem independentes e ao mesmo tempo a trabalhem como um grupo unido. Tenho muito orgulho de ter sido guiada por essa grande pesquisadora, excelente médica e acima de tudo uma pessoa com coração enorme! Dra. Lúcia, muito obrigada por todos esses anos de ensinamentos, conversas, conselhos, ajuda e confiança. Espero um dia poder retribuir toda sua ajuda!!

Nivaldo, se você não tivesse se lembrado de mim aquele dia, nada disso teria acontecido! Muito obrigada por tudo, você é uma pessoa muito especial.

E quando falamos do LIM 12 é impossível não falarmos do Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro, supervisor do laboratório. Agradeço muitíssimo a esse grande homem da ciência que com sua paixão pela pesquisa e pela medicina nos transmite dia-dia no laboratório a experiência, sabedoria e amor pelos estudos científicos.

Aproveito ainda para agradecer os pesquisadores Prof. Dr. Antonio José Barros Magaldi e Profa. Dra. Claudia Maria de Barros Helou, também responsáveis pelo LIM 12, pelos ensinamentos transmitidos.

O LIM 12 é uma grande família, que apesar de passar por momentos de tensão, normais como em qualquer relação entre pessoas, é uma família unida. Aqui conheci amigos muito importantes e que com certeza levarei comigo para sempre: A pesquisadora Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu, uma mãe para todos nós! Grande pesquisadora e biomédica que sempre nos ensina muito! Sobre tudo!! O pesquisador Dr. Rildo Volpini, amigo que sempre ajuda a todos com seus conselhos de vida e profissionais, que mesmo sendo “coração gelado” de vez enquanto é no fundo um homem de grande coração! A bióloga e doutoranda Ana Carolina de Bragança, grande amiga, sempre muito carinhosa e solícita, que com sua doçura me ajuda em todos os momentos da vida. A bióloga e doutoranda Daniele Canale, amiga de canetas coloridas, muito bom humor que sempre nos alegra com sua felicidade. A bióloga e mestranda Letícia Urbano Cardoso de Castro, minha irmã de coração, profissional de grande potencial e que eu espero seja tão feliz nesta nova etapa de sua vida como eu fui e sou. E por último a bióloga e futura matemática, Fabíola Oshiro Monreal, que não é mais do LIM 12, mas sempre estará presente em novas vidas. Obrigada por todos os ensinamentos e risadas! Agradeço muitíssimo todos vocês pela imensa ajuda, sem a qual este trabalho nunca teria sido realizado. Agradeço pelos momentos de alegria, risadas, comilanças, conversas e por todo o tempo que vocês

dedicaram a esse trabalho! Sempre estarei aqui para o que vocês precisarem no laboratório ou fora dele!

Agradeço ainda: a médica e doutoranda Camila Eleutério Rodrigues mulher de grande inteligência e bondade, sempre muito prestativa e alegre, pela grande ajuda e amizade; as médicas e doutorandas Fernanda Coelho e Leticia Jorge pela ajuda e risadas; a médica e mestranda Janaina Garcia Gonçalves pelo bom humor e chocolates; ao enfermeiro e mestrando Roberto de Souza Moreira pela positividade e incentivo; a bioterista e futura bióloga Denise Ariane de Jesus pela amizade. Espero que você seja muito feliz em sua nova profissão, sempre que precisar estarei aqui para te ajudar; a secretária Eloá Neves por toda ajuda e amizade. Agradeço a todos vocês do fundo do meu coração!

Mesmo pessoas que não estão envolvidas diretamente nas nossas vidas profissionais são de suma importância para a nossa felicidade profissional. Agradeço então meu namorado, Johnny Torres, por esses anos de incentivo e ajuda, me dizendo sempre que tudo daria certo (e deu!) pelo companheirismo e amor. Sem você as outras partes da minha vida não teriam sentido. Te amo!

Agradeço muitíssimas as minhas grandes amigas Bruna de Souza Quevedo, Danielle Borim, Paula Baltazar Bambino e Stephanie Moreta pela amizade e incentivo em todos esses anos de biologia. Mesmo distantes ou perto, mesmo nos encontrando uma vez por ano ou todos os dias, vocês estarão para sempre no meu coração! Obrigada por tudo! Eu amo vocês!

Agradeço a meus avós Euza, Domingos, Edelina e Benedicto e a meus tios, primos por todo o incentivo e amor!

Agradeço a disciplina de Nefrologia, em especial ao Prof. Dr. Rui Toledo Barros, por todo incentivo e ajuda. Agradeço ainda ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

E agradeço a Deus por permitir que meus sonhos se realizem!

...when you lose small mind,

you free your life

Aerials – S.O.A.D.

Resumo

Summary

Introdução 1

Objetivos 14

Materiais e Métodos 16

Resultados 28

Discussão 52

Conclusão 61

Referências 63

Resumo

Sanches TRC. Vias intracelulares da ação do Sildenafil no diabetes insipidus induzido pelo lítio [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Os pacientes que usam lítio (Li) para tratamento do transtorno bipolar frequentemente 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 as vias de ação do Sil no tratamento da DIN induzida 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 tanto na fração citoplasmática como de membrana celular e o Sil reverteu essas alterações. Demonstramos ainda que a concentração de GMPc intracelular estava aumentada nos túbulos papilares tratados com Sil. Observamos que a provável via de fosforilação da AQP2 induzida pelo GMPc é pela PKA. Além disso, o tratamento com Sil aumenta a expressão de pCreb, fator de transcrição para ativação do gene da AQP2. Observamos ainda que o Li diminui a expressão de eNOS e o tratamento com Sil normaliza essa diminuição. Assim, concluímos que o tratamento com Sil em ratos com DIN melhora a poliúria aumentando a produção e a inserção de AQP2. O tratamento com Sil pode ser benéfico para pacientes que sofrem com DIN induzido pelo Li.

Descritores: Lítio/efeitos adversos, Diabetes insípido nefrogênico, inibidores de fosfodiesterase, nucleotídeos cíclicos, Aquaporina 2, Proteína da ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico.

Summary

Sanches TRC. Sildenafil action in lithium-induced NDI: intracellular pathway [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

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 Sil pathways of action in rats with lithium-induced nephrogenic Diabetes Insipidus (NDI). 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). Animals in Li group developed polyuria, decreased urinary osmolality and decreased expression of AQP2 in both the cytoplasmic fraction and the cell membrane and Sil reversed these changes. We also demonstrated that intracellular cGMP concentration was increased in papillary tubules treated with Sil. We found that PKA may be involved in the pathway of cGMP induced AQP2 phosphorylation. In addition, Sil treatment increases Creb phosphorylation. Creb phosphorylation, acts as AQP2 gene

transcription factor. We also observed that Li decreases eNOS expression and treatment with Sil normalizes this alteration. We conclude that Sil treatment improves polyuria by increasing production and insertion of AQP2. Sil treatment may be beneficial to patients suffering from induced DIN Li.

Descriptors: Lithium/adverse effects, nephrogenic Diabetes Insipidus, phosphodiesterase inhibitors, cyclic nucleotides, aquaporin 2, Cyclic AMP response element-binding protein.

Introdução

O sal de lítio (Li) vem sendo usado na medicina psiquiátrica a mais de cinquenta anos, principalmente no tratamento e profilaxia do transtorno bipolar do humor, doença caracterizada pela alternância de episódios depressivos e maníacos^{1,2}. O transtorno bipolar do humor é uma doença psiquiátrica relativamente comum e a sua prevalência é de aproximadamente 1% a 3% na população mundial^{1,2,3,4}. O Li é a primeira opção para o tratamento de episódios leves e moderados do transtorno bipolar³. Apresenta a maior eficácia entre os estabilizadores de humor clássicos, principalmente na prevenção de recidivas da doença^{3,4}. Além disso, diferente de outros agentes psicotrópicos, o Li não possui efeito sedativo, estimulante ou depressivo⁴. O índice de sucesso do tratamento com Li é de 70% a 80%, diminuindo tanto os episódios depressivos como os episódios maníacos⁶. É, portanto uma droga indispensável no tratamento psiquiátrico moderno⁶.

O Lítio

Em condições normais a presença de Li nos fluidos corporais é menor que 0,2 mEq/l e ele não tem nenhum papel fisiológico no organismo, por isso a ação pela qual o Li exerce sua ação estabilizadora de humor ainda é muito discutida^{3,5}. Sabe-se que o raio atômico do Li é semelhante ao do magnésio (Mg) e isso faz com que o Li iniba algumas enzimas que utilizam o Mg como

cofator³. Acredita-se que o Li diminua a resposta neuronal de neurotransmissores inibindo mensageiros secundários das vias de sinalização intracelular⁵. O Li inibe enzimas como a inositol monofosfato fosfatase (IMPase), o que leva a diminuição da concentração de inositol, substância importante na via de sinalização do fosfoinositol, responsável por modular uma série de eventos intracelulares³. A enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), participante de diversas vias de sinalização relacionadas à plasticidade sináptica e apoptose, também é inibida pelo Li³.

A via de administração preferencial é a oral na forma de carbonato de lítio (Li_2Ca), sendo que a absorção ocorre inteiramente no trato digestivo em até 8 horas e o pico de Li sérico é atingido entre 1 e 6 horas após a administração da droga^{5,6}. Durante o tratamento, as maiores concentrações de Li são encontradas no rim e no cérebro⁵.

A principal via de excreção é renal⁷. O Li não se liga as proteínas séricas e por isso é livremente filtrado pelos glomérulos⁵. Aproximadamente 60%-80% é reabsorvido no túbulo proximal e 20% é reabsorvido entre a alça de Henle e o ducto coletor⁵. O Li é tão bem reabsorvido pelas células renais principalmente pela sua similaridade química com o sódio e com o potássio⁵. No túbulo proximal o Li é reabsorvido pelo trocador sódio-hidrogênio tipo 3 (NHE3), sendo que o transporte de sódio é duas vezes mais rápido que o de Li nesse trocador^{5,6,7}. O Li é reabsorvido através do cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) na porção ascendente espessa da alça de Henle também em substituição ao sódio⁸. Além disso, outros cotransportadores sódio-

dependente transportam Li para dentro da célula⁶. Já no ducto coletor o Li é transportado para dentro da célula pelo canal de sódio amiloride sensível (ENaC)^{7,8,9}. O ENaC é mais permeável ao Li do que ao sódio^{7,10,11} e é através dessa passagem que o Li se acumula nas células do ducto coletor⁵.

Efeitos colaterais do uso do Li

Um dos efeitos colaterais do Li é sua toxicidade nefrológica⁵. 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 tratamento⁵. 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/l⁵.

Os sintomas característicos de intoxicações por Li são náusea, vômito, diarreia, convulsão, entre outros⁴. A intoxicação aguda leva também a defeitos na habilidade de concentrar urina e cronicamente, pode levar ao desenvolvimento de nefrite intersticial e insuficiência renal^{4,5}.

Outro efeito colateral, e um dos mais importantes, é o Diabetes insipidus nefrogênico (DIN)^{4,8}. Estima-se que 20% a 70% dos pacientes que

fazem tratamento crônico com Li desenvolvem DIN⁴. Os sintomas incluem poliúria, polidipsia e diminuição da capacidade de concentração urinária⁶.

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 vasopressina¹². Quando a osmolalidade dos fluidos corporais aumenta, ou seja, quando se tornam muito concentrados, a hipófise posterior secreta HAD¹².

O HAD atua como o primeiro mensageiro de uma série de reações nas células do ducto coletor¹³. Ele liga-se ao receptor V-2 promovendo um estímulo do complexo-proteína G que forma um complexo proteína-G estimuladora¹³. Esse complexo se liga a guanidina trifosfato (GTP) e estimula a enzima adenilciclase¹³. Esta, por sua vez, catalisa a transformação da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc)¹³. O AMPc estimula a proteína quinase A (PKA) que irá fosforilar o sítio serina 256 na cauda citoplasmática das proteínas AQP2 que se encontram na superfície de microvesículas livres no citoplasma¹³. Essas microvesículas são então transportadas e inseridas na membrana apical, expondo as AQP2 e aumentando a permeabilidade da célula à água (Figura 1)¹³. Estudos indicam

que a fosforilação das proteínas de AQP2 no sítio S256 é essencial para a regulação do movimento das vesículas do citoplasma para a membrana plasmática^{14,15,16}. Além disso, o AMPc aumenta também a transcrição de AQP2 através da fosforilação da proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (*cAMP responsive element binding protein* – CREB), a qual se liga e ativa o *promoter* do gene da AQP2 (Figura 1)¹⁷.

Figura 1: Mecanismo de ação do AMPc. Nielsen S, et al. J Am Soc Nephrol. 1999;10(3):647-63.

Christensen *et al*, em 1985, observaram que animais tratados com Li (60mMol/kg/dieta) por 24 dias apresentavam osmolalidade urinária média de 254 mOsm, enquanto que os animais controles apresentavam osmolalidade urinária média de 905 mOsm¹³. Esse mesmo trabalho demonstrou que o AMPc intracelular estava diminuído nos animais tratados

cronicamente com Li¹³. Marples *et al*, observaram que, além da osmolalidade urinária baixa e aumento da diurese, animais tratados cronicamente com Li apresentavam uma menor expressão de AQP2¹².

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^{17,18}. De alguma maneira o Li interfere na transformação de ATP em AMPc¹⁸. Uma das sugestões para essa teoria seria que o Li competisse com o magnésio na ativação da proteína G estimuladora¹⁹. Dessa forma, com pouco AMPc livre no citoplasma diminuiria a inserção de AQP2 na membrana celular, diminuindo assim a reabsorção de água e provocando a poliúria¹⁹.

Li Y *et al*, por outro lado, demonstraram em cultura de células e *in vivo* que o Li não diminui a atividade da adenilciclase, não interferindo portanto na acumulação de AMPc intracelular. Eles relacionaram o DIN induzido pelo Li a diminuição do mRNA da AQP2¹⁷.

O Li não altera apenas a expressão da AQP2²⁰. Outras proteínas de membrana também estão alteradas em animais tratados com Li²⁰. Kwon TH e colaboradores demonstraram que além da AQP2, a AQP3 e os cotransportadores NHE3, NKCC2 e Na-K-ATPase $\alpha 1$ estão mais expressos em animais recebendo 60 mEq/kg de Li na dieta¹⁸. Enquanto que os cotransportadores Na-Pi tipo 2 (NaPi2) e NCC estão diminuídos¹⁸. O mesmo

grupo observou ainda que uma concentração mais baixa de Li (40 mEq/kg) na dieta não provocou as mesmas alterações¹⁸.

A expressão da proteína do transportador de ureia UT-A1 diminui em animais tratados com Li²¹. Além disso, há uma diminuição na sensibilidade do transportador a fosforilação pelo HAD, o que pode contribuir para a redução da habilidade de concentrar urina encontrada nesses animais²¹.

Kim YH *et al*, demonstraram que a expressão das proteínas de membrana responsáveis pela regulação ácido-base também são modificadas pelo uso de Li²². Em animais tratados, a H-ATPase e o cotransportador sódio bicarbonato tipo 1 (NBC1) encontram-se aumentados em relação aos animais controles²². Essa resposta é provavelmente uma adaptação do organismo à acidose tubular distal encontrada em animais e pacientes tratados com Li²².

O canal ENaC também é afetado pelo tratamento com Li²³. Foi demonstrado que tanto no córtex como na porção medular externa há uma diminuição das subunidades β e γ ENaC, enquanto a subunidade α encontra-se normalmente expressa²³. Já na medula interna é encontrado o contrário; as subunidades β e γ ENaC estão normalmente expressas enquanto a subunidade α está aumentada²³. Sugere-se que o ENaC apresente uma resposta diminuída a estimulação por aldosterona nos animais tratados com Li²⁴. A diminuição do ENaC e do NCC poderia explicar a grande excreção urinária de sódio observada nos animais²³. Porém, curiosamente outros transportadores de sódio estão normalmente expressos (NHE3 e NKCC2)²³.

Estudos recentes demonstraram que ratos tratados com Li apresentavam aumento das concentrações de ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1, COX-2)²⁵. Sabe-se que as prostaglandinas e suas enzimas catalíticas têm efeito na reabsorção de água²⁵. Rao R e colaboradores observaram que o aumento da Cox 2 está relacionado com a diminuição da atividade da GSK3 β , que é inibida pelo Li²⁶. Estudos recentes indicam que a enzima quinase glicogênio sintetase 3 β (GSK3 β) esta envolvida no processo de reabsorção de água no ducto coletor modulando a ação do HAD. A deleção ou inibição dessa enzima reduz a atividade da adenilciclase induzida pelo HAD, diminuindo a geração de AMPc e consequentemente a inserção de AQP2 no ducto coletor. Sabe-se ainda que o Li inibi a atividade dessa enzima aumentando sua fosforilação, o que a torna inativa^{26,27}.

É sabido ainda que o DIN induzido pelo Li não é um diabetes insipidus puro, pois apresenta também aumento da natriurese^{7,8,18}. Apesar do mecanismo de natriurese no DIN induzido pelo Li ainda não estar totalmente esclarecido, supõe-se que uma das causas da natriurese seja competição do Li com o sódio na reabsorção tubular^{7,8}. Isso porque o sódio pode ser substituído pelo Li durante o transporte tubular, o que irá aumentar a concentração de sódio no fluido tubular e consequentemente aumentar a excreção de sódio na urina^{7,8}. Outros estudos indicam que o tratamento com Li leva a uma diminuição da resposta à aldosterona²⁴. O ENaC é provavelmente o principal canal para a reabsorção de lítio^{7,8,24}.

Tratamentos

Alguns tratamentos já foram sugeridos para o controle do DIN induzido pelo Li.

Estudos mostram que inibidores de COX-2 reverterem a poliúria observada nos animais tratados com Li²⁸. O uso de hidroclorotiazida para o tratamento do DIN já foi estabelecido²⁹. Recentemente foi demonstrado que a hidroclorotiazida aumenta a expressão da AQP2 e, portanto aumenta a reabsorção de água no ducto coletor³⁰. Apesar de contraditório, essa droga diurética tem um efeito antidiurético em pacientes e animais tratados com Li, diminuindo a poliúria e aumentando a concentração urinária³⁰.

O uso do diurético amiloride também se mostrou benéfico no controle do DIN¹⁰. Demonstrou-se que animais com DIN induzido pelo Li e tratados com amiloride apresentam aumento na expressão protéica de AQP2 e do transportador de ureia UT-A1, diminuindo a diurese dos animais¹⁰. Em trabalho recente, Deen e colaboradores mostraram que o efeito do amiloride se dá por que ele bloqueia o canal ENaC e portanto impede que o Li entre na célula e se acumule em seu interior⁹. Além disso, foi visto que animais *knockout* para α ENaC são resistentes a indução de DIN pelo Li¹¹.

Além da via clássica de inserção de AQP2 na membrana celular, foi observado que substâncias como o óxido nítrico, a l-arginina, o peptídeo atrial natriurético e inibidores de fosfodiesterase 5 aumentam a concentração

intracelular de 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)^{31,32}.

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

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 eles³³. 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 GMPc³⁴. Pesquisas já demonstraram a expressão de PDE5 e PDE4 nos ductos coletores dos rins^{35,36}.

O Sildenafil (Sil) é um inibidor de PDE5 usado no tratamento da disfunção erétil e da hipertensão pulmonar e ele age da seguinte maneira^{34,37}:

cada uma das duas subunidades da PDE5 possui um domínio catalítico e um domínio regulatório; o domínio catalítico é o alvo dos inibidores de PDE5³⁷. É no domínio catalítico que está o sítio de ligação do GMPc. Quando o GMPc se liga nesse sítio, as estruturas da enzima PDE5 se modificam e quebram a ligação cíclica do fosfato do GMPc transformando-o em 5'-GMP linear³⁷. O que o Sil e os outros inibidores de PDE5 fazem é ocupar esse sítio no lugar do GMPc³⁷. Na verdade, a afinidade do Sil com o sítio de ligação do PDE5 é 1000 vezes maior que a afinidade deste com o GMPc³⁷. Dessa forma, há uma inibição competitiva do Sil com GMPc, levando ao aumento da concentração de GMPc no interior da célula³⁷. Além disso, no domínio regulatório da enzima de PDE5 também existe um sítio de ligação para GMPc³⁷. Quando o GMPc se liga nesse sítio, diferentemente do sítio catalítico, ele não é degradado e sim estimula a atividade enzimática da PDE5³⁷. Ou seja, quanto mais GMPc acumulado na célula, mais ativa a enzima de PDE5 vai estar. Portanto na presença de um inibidor de PDE5 o efeito da droga também será maior. A droga estimula a sua própria eficiência³⁷.

Nosso grupo demonstrou que o Sil reverte parcialmente o DIN induzido pelo Li³⁸. Observamos que há aumento da expressão protéica de AQP2 nos animais com DIN tratados com Sil³⁸. O tratamento diminuiu a diurese cerca de 50% em relação aos animais não tratados e houve um aumento da osmolalidade urinária³⁸. Demonstramos, como já havia sido observado anteriormente, que há diminuição da expressão da proteína UT-

A1³⁸. Observamos que o Sil restabelece completamente a expressão desta proteína nos animais com DIN³⁸.

Além disso, demonstramos pela primeira vez que há um aumento da resistência vascular renal nos animais com DIN induzido pelo Li³⁸. O tratamento com Sil normalizou completamente a resistência vascular renal³⁸.

Observamos também, semelhante a dados já publicados, que há aumento da natriurese induzida pelo Li e o tratamento com Sil reduziu a natriurese nestes animais³⁸.

Entretanto, os vários mecanismos pelos quais o Sil exerceu seus efeitos não foram esclarecidos no nosso estudo anterior. Portanto, no presente estudo investigaremos quais os mecanismos envolvidos na ação terapêutica do Sil no DIN induzido pelo Li.

Objetivos

Nos propusemos a investigar as questões levantadas no primeiro estudo. São elas:

1. As vias regulatórias do mecanismo de produção e tráfego da AQP2 nos animais com DIN induzido pelo Li e onde o Sil estaria atuando:
  - a. Expressão da proteína AQP2 em membrana plasmática e vesícula citoplasmática;
  - b. Expressão da PDE5;
  - c. Ação do ADH;
  - d. Participação do GMPc;
  - e. Fatores de transcrição do gene da AQP2: expressão de CREB e pCREB;
  - f. Ação do Sil na via de fosforilação da AQP2: papel da PKA e/ou PKG;
  - g. Expressão de GSK3 β ;
2. Estudo hemodinâmico, avaliando o motivo do aumento da resistência vascular renal e o efeito do Sil neste restabelecimento:
  - a. Expressão de óxido nítrico sintetase endotelial e induzível (eNOS e iNOS, respectivamente);
3. Os possíveis mecanismos do Sil envolvidos na diminuição da natriurese induzida pelo Li:
  - a. Expressão de β ENaC e α ENaC.

Materiais e Métodos

Triagem dos animais

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

Dieta alimentar

Os animais receberam dieta sólida em pó preparada no próprio laboratório.

A concentração de sódio desta dieta é 160 mEq/kg.

Grupos

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

Grupo 1 – Controle (C): O grupo 1 recebeu dieta alimentar normal durante as quatro semanas de experimento.

Grupo 2 – Li (L): O grupo 2 recebeu dieta alimentar adicionada de 40mmol Li por quilo de dieta durante as quatro semanas de experimento.

Grupo 3 – Li + Sil (Li+Sil): O grupo 3 recebeu dieta alimentar adicionada de 40 mmol Li por quilo de dieta durante as quatro semanas de experimento e recebeu 200 mg por quilo de dieta de Sil a partir da segunda semana.

Grupo 4 – Sil (Sil): O grupo 4 recebeu dieta alimentar normal durante a primeira semana de experimento e a partir da segunda semana passou a receber dieta adicionada de 200 mg de Sil por quilo de dieta.

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 das 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; a ingestão 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 foi medida utilizando-se um osmômetro (Advanced Osmometer, modelo 3D3).

No último dia de experimento os animais foram sacrificados e os rins extraídos. Um deles permaneceu inteiro e o outro foi separado em córtex e medula, foram então colocados imediatamente no nitrogênio líquido e em seguida estocados a -70°C . O sangue foi coletado para dosagem de sódio, potássio plasmático (fotômetro de chama - Instrumentation Laboratory, modelo 143) e lítio plasmático (eletrodo íon seletivo). A dosagem de creatinina plasmática foi realizada através de método colorimétrico (Labtest Diagnóstica).

Determinação do Clearance de água livre

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

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

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

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

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

onde C_{osm} é o clearance osmolar, $U_{osmolalidade}$ é a osmolalidade urinária, $U_{volume/1440\ min}$ 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

Para a determinação da pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular foram realizados os seguintes experimentos: Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg), colocados em mesa cirúrgica aquecida e submetidos à 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 cateter 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.

Imunohistoquímica

Os rins dos animais foram perfundidos com solução de PBS (NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). Em seguida um dos rins foi retirado e cortado transversalmente em um fragmento de cerca de meio centímetro que foi fixado em solução de methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante 24h horas. Após esse período a solução de methacarn foi substituída por álcool 70%. Posteriormente o tecido renal foi embebido em parafina, cortado em secções de 4 um, desparafinado e submetido à reação de imunohistoquímica.

Os cortes renais foram incubados com anticorpos anti-AQP2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA) e anti-UT-A1 (1:1000; gentilmente cedido por Jeff Sands, Emory University, Atlanta, GA),

durante a noite a 4°C. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina, incluindo ou não a adição de cloreto de níquel 8% (Sigma, St. Louis, MO, EUA), na presença de água oxigenada. A contra coloração foi feita com Methyl Green. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários e secundários em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz.

Dosagem de HAD

A concentração de HAD no plasma dos animais foi determinada através do kit arg⁸-Vasopressin Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os ensaios foram corridos em duplicata.

Estudo da expressão de transportadores renais

Extração de proteínas - os rins congelados 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). Todo o procedimento foi feito sob gelo. O homogenato foi então centrifugado a 4000 g por 15 minutos a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. O sobrenadante foi armazenado em freezer -70 °C para posterior análise das proteínas citoplasmáticas. Uma parte desse sobrenadante foi retirado e centrifugado a 17.000 g por 30 minutos. O pellet resultante foi ressuspenso em solução de K-Hepes. Com essa centrifugação é possível isolar proteínas de membrana plasmática. 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 TBS-T (24,2 g Tris base; 29,2 NaCl; 3,36 EDTA para 1 litro de água destilada) por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em TBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (anti-*rabbit* 1:2000, anti-*goat* 1:10000, anti-*mouse* 1:2000, Sigma) usando sistema de

quimioluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com o anticorpo para actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA).

Semi-quantificação das proteínas

As bandas obtidas nos filmes foram analisadas (Image J, NIH), e realizadas as densitometrias. As bandas foram normatizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina.

Foram estudadas as seguintes proteínas:

AQP2 - Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA

β ENaC – Millipore, MA, EUA

γ ENaC – Millipore, MA, EUA

PDE5 – Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA

eNOS – BD Transduction Laboratories, KY, EUA

iNOS – BD Transduction Laboratories, KY, EUA

CREB – Sigma, MO, EUA

p-CREB - Sigma, MO, EUA

GSK3 β – BD Transduction Laboratories, KY, EUA

Suspensão de túbulos

Animais dos grupos Controle (dieta normal) e Li (dieta com 40 mM de Li) foram separados para a suspensão de túbulos. Os animais foram sacrificados e tiveram seus rins removidos e a papila renal isolada. A papila foi colocada imediatamente em solução de Ringer HCO₃ (veículo; NaCl – 115 mM, NaHCO₃ – 25,0 mM, CH₃COONa – 10,0 mM, Glicose – 5,0 mM, NaH₂PO₄ – 1,2 mM, CaCl₂ – 1,0 mM, KCl – 5,0 mM, MgSO₄ – 1,2 mM) gelada e feixes do tecido papilar foram destacados e dissecados. O material foi incubado por 45 minutos a 37°C e borbulhados com solução carbogênica (CO₂ – 5%, O₂ – 95%). Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- ✓ Controle: Suspensão de túbulos em veículo de animais do grupo controle;
- ✓ Li: Suspensão de túbulos em veículo de animais do grupo Li;
- ✓ Li+Sil: Suspensão de túbulos em veículo contendo 5 mM de sildenafil de animais do grupo Li;

- ✓ Li+Sil+iPKA: Suspensão de túbulos em veículo contendo 5 mM de sildenafil e inibidor de PKA (iPKA, , Protein Kinase A Inhibitor 5-24, Calbiochem) em animais do grupo Li;
- ✓ Li+Sil+iPKG: Suspensão de túbulos em veículo contendo 5 mM de sildenafil e inibidor de PKG (iPKG, Protein Kinase G Inhibitor, Calbiochem) em animais do grupo Li;
- ✓ Sil: Suspensão de túbulos em veículo contendo 5 mM de sildenafil de animais do grupo Controle;

As amostras foram então congeladas e estocadas a -70 °C para posterior dosagem de GMPc e expressão protéica de AQP2.

Dosagem de GMPc

Para a dosagem de GMPc foi usado o kit Amersham cGMP Enzymeimmunoassay (EIA) System (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) de acordo com as normas do fabricante.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA (one-way analysis of variance) seguida do teste de Newman-Keuls utilizando o programa de análise estatística Graph-Pad Prism. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Todos os dados são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Resultados

Para facilitar o entendimento do trabalho iremos apresentar primeiramente os resultados do estudo preliminar³⁸.

Resultados preliminares apresentados na dissertação de mestrado:

Como já era esperado, ao final das quatro semanas de experimentos observamos que os animais do grupo Li apresentavam sintomas de DIN. O volume urinário desses animais apresentava aumento significativo em relação aos grupos controle, Sil e Li+Sil (Tabela 1), enquanto que a osmolalidade urinária apresentava diminuição significativa no grupo Li em relação aos outros três grupos (Tabela 1).

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 e foram tratados com Sil em relação aos animais que receberam apenas Li (Tabela 1). Apesar de o volume urinário do grupo Li+Sil estar cerca de 50% diminuído em relação ao grupo Li, este ainda apresentava aumento significativo em relação aos grupos controle e Sil (Tabela 1) mostrando que o Sil conseguiu reverter parcialmente a diurese induzida pelo Li.

O aumento do volume urinário nos animais que receberam Li foi acompanhado da diminuição significativa da osmolalidade urinária em relação aos grupos controle, Li+Sil e Sil ao final da quarta semana de experimento (Tabela 1). 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 quando aplicado o teste ANOVA (Tabela 1).

O grupo que recebeu apenas Li apresentou clearance de água livre enquanto que o grupo Li+Sil apresentava diminuição significativ deste parâmetro (tabela 1). Os animais controle e Sil estavam em TC de água (Tabela 1).

O nível de Li sérico 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), mostrando que o tratamento com Sil não influencia na farmacodinâmica do Li.

Não foi observada diferença entre os grupos em relação às concentrações urinárias e plasmáticas de sódio e potássio (Tabela 1). Entretanto, a excreção de ureia estava aumentada nos animais que receberam Li em relação aos outros grupos e o tratamento com Sil reverteu esse aumento (Tabela 1).

Não foi observada diferença significativa no clearance de inulina entre os grupos estudados (Tabela 1) mostrando que nem o Li nem o tratamento com Sil influenciam na taxa de filtração glomerular.

Além disso, a função renal medida pela creatinina plasmática também não foi diferente entre os grupos (Tabela 1).

Observamos que a resistência vascular renal estava aumentada no grupo Li em relação aos outros grupos. O tratamento com Sil no grupo Li+Sil normalizou a resistência vascular renal (Tabela 2).

Não foi observada diferença na pressão arterial média entre os grupos (Tabela 2).

A expressão de AQP2 no grupo Li+Sil estava aumentada em relação ao grupo Li e diminuída em relação aos grupos controle e Sil. Além disso, a expressão de AQP2 apresentava aumento significativo no grupo Sil em relação ao grupo controle.

A expressão de NKCC2 e NHE3 apresentava aumento significativo nos grupos Li e Li+Sil em relação aos grupos controle e Sil.

No grupo Li+Sil a expressão da proteína UT-A1 estava aumentada em relação ao grupo Li, e não apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle. Apesar disso a expressão de UT-A1 estava discretamente menor que no grupo Sil. Não houve diferença significativa entre os grupos Sil e controle.

Não houve diferença na expressão de α -ENaC entre os grupos estudados.

Tabela 1 | Parâmetros fisiológicos

	Controle	Sil	Li	Li+Sil
Peso Corpóreo (g)	355 ± 9,0	339 ± 15,2	284 ± 11 ^{b,e,j}	315 ± 7,0 ^f
Volume Urinário (ml/dia)	9,4 ± 1,8	10,4 ± 1,7	60 ± 5,7 ^{b,c,d}	28,3 ± 3,4 ^{e,f}
Ingesta Hídrica (ml/dia)	12 ± 1,2	13,4 ± 1,9	59,6 ± 3,3 ^{b,c,d}	29,2 ± 2,6 ^{e,h}
Ingesta Sólida (g/dia)	28 ± 1,5	31,4 ± 2,3	29,3 ± 1,7	29 ± 1,7
Uosm (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}
Cinulina (ml/min/kl)	2,15±0,06	2,36±0,09	2,37±0,06	2,16±0,17
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
UVureia (mg/dia)	221± 47	250 ± 37	368 ± 41,4 ⁱ	196 ± 35
Creatinina Sérica (mg/dl)	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Lítio Sérico (mEq/L)			0,3 ± 0,05	0,26 ± 0,04
Sódio Sérico (mEq/L)	144 ± 2,0	142 ± 2,8	149 ± 2,7	146 ± 1,0
Potássio Sérico (mEq/L)	3,6 ± 0,11	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1

C_{H2O}, clearance de água livre; Cinulina, clearance de inulina; UVNa, excreção urinária de sódio de 24-h; UVK, excreção urinária de potássio de 24-h; UVureia, excreção urinária de ureia de 24-h.

^b*p* < 0,001 vs. Controle; ^c*p* < 0,001 vs. Sil; ^d*p* < 0,001 vs. Li+Sil; ^e*p* < 0,01 vs. Sil; ^f*p* < 0,05 vs. Controle; ^g*P* < 0,01 vs. Li+Sil; ^h*p* < 0,01 vs. Controle; ⁱ*p* < 0,05 vs. controle, Li+Sil; ^j*p* < 0,05 vs. Li+Sil.

Tabela 2 | Parâmetros Hemodinâmicos

	Controle	Sil	Li	Li+Sil
	(n = 8)	(n = 10)	(n = 13)	(n = 13)
PAM (mmHg)	129±5,3	128±5,4	131±6,0	129±3,4
RVR (mmhg/ml/min)	19,3±0,75	20,8±1,1	23,6±0,7 ^{b,c,d}	20,2±1,0
FSR (ml/min)	6,3±0,09	6,1±0,13	5,5±0,12 ^{d,e,f}	5,8±0,09 ^b

PAM, pressão arterial média; RVR, resistência vascular renal; FSR, fluxo sanguíneo renal.

p < 0,05 vs. Controle, ^c*p* < 0,05 vs. Sil; ^d*p* < 0,05 vs. Li+Sil; ^e*p* < 0,001 vs. Controle; ^f*p* < 0,01 vs. Sil.

Resultados da tese de doutorado

Estudo das vias regulatórias do mecanismo de tráfego e produção da AQP2 nos animais com DIN induzido pelo Li e atuação do Sil

Expressão da proteína AQP2 em membrana plasmática e vesícula citoplasmática

Já foi descrito que o Li diminui a expressão protéica de AQP2 total¹². Decidimos então, usando diferentes centrifugações, separar a fração celular de membrana plasmática (17,000 g) e de vesículas citoplasmáticas (200,000g) para analisarmos a expressão de AQP2 nessas duas frações separadamente. Fizemos também a imunohistoquímica para AQP2 e UT-A1 para analisarmos a expressão e localização dessas duas proteínas no tecido medular renal.

Foi verificado que a expressão da proteína AQP2 no grupo Li estava diminuída nas duas frações celulares estudadas. O tratamento com Sil reverteu parcialmente essa diminuição. Além disso, os animais do grupo Sil apresentaram aumento na expressão de AQP2 em relação ao grupo controle na fração vesicular (Figura 3 e 4).

Figure 3: Expressão protéica de AQP2 na medula renal em membrana plasmática (Li: 33,84±1,5 vs. Controle: 100±13,45; Sil: 102,7±4,34; ***p<0,001, Li vs, Li+Sil: 60,33±2,26; *p<0,05, Li+Sil vs, Controle; Sil; **p<0,01). Análise da densidade das bandas.

Figure 4: Expressão protéica de AQP2 na medula renal em vesículas citoplasmáticas (Li: $29,50 \pm 2,39$ vs. Controle: $98,67 \pm 1,45$; Li+Sil: $62 \pm 1,78$; Sil: $107,2 \pm 4,16$; *** $p < 0,001$, Li+Sil vs, Control; Sil; *** $p < 0,001$, Control vs, Sil; * $0,05$. Análise da densidade das bandas.

Esses resultados se confirmaram na imunohistoquímica. Nos cortes renais de ratos tratados com Li, a expressão protéica estava visivelmente diminuída e o tratamento com Sil reverteu parcialmente essa diminuição (figura 5).

Figura 5: Imunolocalização do canal de água AQP2 na medula renal de rato (A, E) Controle; (B, F) Li; (C, G) Li+Sil; e (D, H) Sil. Fotografias à direita 20X aumentadas; fotografias à esquerda 40X aumentadas. Observar que a intensidade de coloração da AQP2 é parcialmente restabelecida nos animais tratados com Sil.

A expressão protéica de UT-A1 no grupo Li estava visivelmente diminuída, confirmando os dados que já havíamos observado anteriormente por Western blot. O tratamento com Sil aumentou a expressão desta proteína no grupo Li+Sil em relação ao grupo Li, mas ainda apresentava uma discreta diminuição em relação aos grupos controle e Sil (Figura 6).

Figure 6: Imunolocalização do transportador de ureia UT-A1 na medula renal de rato (A, E) Controle; (B, F) Li; (C, G) Li+Sil; e (D, H) Sil. Fotografias à direita 20X aumentadas; fotografias à esquerda 40X aumentadas. Observar que a intensidade de coloração do UT-A1 é parcialmente restabelecida nos animais tratados com Sil.

Expressão protéica de GSK3 β em tecido renal

Como alguns trabalhos demonstraram que o Li inibe a atividade da enzima GSK3 β , estudamos a expressão desta proteína em medula renal para verificar uma possível ação do Sil nessa via. Não observamos diferenças entre os grupos estudados, apesar de ser possível observar uma tendência à diminuição nos grupos Li e Li+Sil (Figura 7).

Figure 7: Expressão protéica de GSK3 β em medula renal. (Control: 100±8,84; Li: 68,4±10,41; Li+Sil: 81,20±3,62; Sil: 94,58±11,13; ns). Análise da densidade das bandas.

Ação do Sil na via de fosforilação da AQP2: papel da PKA e/ou PKG;

Para analisarmos a possível via de ação do Sil na fosforilação da AQP2, utilizamos inibidores de PKA e PKG em suspensão de túbulos da papila renal. Observamos que a expressão de AQP2 na suspensão de túbulos incubados com Sil e inibidor de PKA não é diferente dos túbulos de animais incubados apenas com veículo (animais com DIN). Quando inibimos apenas a PKG, observamos aumento na expressão de AQP2, indicando que a provável via de fosforilação da AQP2 via GMPc é feita pela PKA (Figura 8).

Figure8: Expressão protéica de AQP2 em suspensão tubular de papila renal. (Control: $100 \pm 3,98$ vs, Li: $37,7 \pm 5,31$; Li+Sil iPKA: $36,13 \pm 1,73$; Li+Sil iPKG: $57,37 \pm 4,33$; *** $p < 0,001$, Li+Sil iPKG vs, Li; Li+Sil iPKA; ** $p < 0,01$). Análise da densidade das bandas.

Expressão protéica de PDE5 em tecido renal

Uma das questões levantadas no primeiro trabalho era a existência ou não de PDE5 em tecido renal, uma vez que é a PDE alvo do Sil, Apesar de já descrito em outros trabalhos^{35,36}, resolvemos verificar a presença de PDE5 em tecido de medula e ainda observar uma possível modulação de sua expressão nos animais tratados com Sil, Realizamos experimentos de Western blot e observamos que a expressão de PDE5 foi semelhante em todos os grupos (Figura 9).

Figure 9: Expressão proteica de PDE5 na medula renal, Análise da densidade das bandas. (Controle: $100 \pm 2,2\%$; Li: $91,4 \pm 5,2\%$; Li+Sil: $96 \pm 1,3\%$; Sil: $105 \pm 8,5\%$; NS).

Ação do HAD

Para descartarmos uma possível ação do HAD, já que alguns trabalhos descrevem que o tratamento com altas concentrações de desmopressina (hormônio sintético análogo ao HAD - DDAVP) melhora o DIN induzido pelo Li^{12,13}, dosamos a concentração plasmática de HAD em todos os grupos estudados. Não observamos diferença na concentração plasmática de HAD

entre os grupos, evidenciando que a via de ação do Sil não é mediada pelo HAD (Tabela 3).

Table 3 | Hormônio antidiurético

	Control (n = 8)	Sil (n = 10)	Li (n = 13)	Li+Sil (n = 13)
HAD (pg/ml)	23±2,2	23,3±2,7	27,5±4,5	26,7±3,7

HAD, hormônio antidiurético

Participação do GMPc

Uma das questões cruciais no trabalho anterior era a ação esperada do Sil no aumento da concentração de GMPc intracelular. Utilizando o método de ELISA em suspensão de túbulos papilares, pudemos observar que a concentração de GMPc intracelular foi maior no grupo com Li+Sil em relação ao grupo Li e ao grupo controle. Observamos ainda, que a concentração de GMPc foi maior no grupo Sil em relação ao grupo controle e Li (Figura 9).

Figura 9: Concentração intracelular de GMPc em células de ducto coletor em suspensão, (Li+Sil: 6402 ± 1162 vs, Controle: 1790 ± 262; Li: 1890 ± 302; ***p<0,001, Sil: 5012 ± 699 vs, Control; Li; **p<0,01).

Fatores de transcrição do gene da AQP2: expressão de Creb e pCreb

Um dos pontos de grande discussão entre os pesquisadores da área é o possível efeito do Li na produção de AQP2 e não apenas no tráfego da mesma. Optamos por verificar a expressão das proteínas Creb e pCreb (proteína Creb fosforilada – a forma ativa da proteína) em nossos grupos experimentais. Estudos indicam que a fosforilação da proteína Creb via PKA estimula a transcrição de AQP2³⁹. Não foram observadas diferenças na expressão da proteína Creb nos grupos estudados (Figura 10). Entretanto a

expressão da proteína fosforilada, e portanto a ativa (pCreb) se mostrou aumentada no grupo Li+Sil em relação a todos os outros grupos, (Figura 11).

Figura 10: Expressão protéica de Creb (Controle: 100±5,1; Li: 101,5±7,3; Li+Sil: 100,4±12,62; Sil:98,8±15,48; ns). Análise da densidade das bandas.

Figura 11: Expressão protéica de pCreb (Li+Sil: $355,2 \pm 60,99$ vs, Controle: $100 \pm 0,69$; Li: $162,3 \pm 13,36$; Sil: $169,8 \pm 9,38$; $**p < 0,01$). Análise da densidade das bandas.

Estudo do mecanismo hemodinâmico do Sil envolvido na melhora da resistência vascular renal

Expressão de eNOS e iNOS

No primeiro estudo, observamos que os animais com DIN induzido pelo Li apresentavam aumento na resistência vascular renal³⁸, Decidimos, portanto, verificar a expressão das proteínas eNOS e iNOS na medula renal dos grupos estudados. A expressão de eNOS estava diminuída nos animais com DIN induzido pelo Li em relação aos outros grupo. O tratamento com Sil reverteu essa diminuição (Figura 12). A expressão da proteína iNOS não estava alterada em nenhum dos grupos (Controle: $99 \pm 1,2\%$; Li: $90,3 \pm 3,9\%$; Li+Sil: $96,4 \pm 1,0\%$; Sil: $97,4 \pm 1,5\%$; NS).

Figure 12: Expressão protéica de eNOS na medula renal. Análise da densidade das bandas, ratos: controle (control), Li, Li+Sil, Sil, (Li : $51 \pm 2,4\%$ vs, Controle: $98 \pm 2,3\%$; Sil: $99 \pm 1,0\%$; Li+Sil: $96 \pm 3,0\%$, *** $p < 0,001$).

Estudo dos mecanismos do SiI envolvidos na diminuição da natriurese induzida pelo Li

Expressão de β ENaC e γ ENaC

Já foi descrito, inclusive em nosso estudo anterior, que animais tratados com Li apresentam aumento na natriurese^{12,38}. Vimos que o SiI foi capaz de reverter essa alteração³⁸. Decidimos estudar a expressão de β ENaC e γ ENaC e observamos que a subunidade γ ENaC estava significativamente diminuída nos animais que receberam Li em relação aos outros grupos. A subunidade β ENaC não apresentou diferença entre os grupos (Figura 13).

Figure 13: Expressão proteica de β ENaC (Controle: $100 \pm 2,2\%$; Li: $91,4 \pm 5,2\%$; Li+Sil: $96,0 \pm 1,3\%$; Sil: $105 \pm 8,5\%$; NS) e γ ENaC (Li: $34,3 \pm 8,9\%$ vs. Controle: $99,3 \pm 0,9\%$; Li: $99,1 \pm 1,3\%$; Li+Sil: $98,4 \pm 0,9\%$; *** $p < 0,001$ para todos) na medula renal. Análise da densidade das bandas.

Discussão

Sabe-se que o tratamento crônico com Li é uma das maiores causas de DIN⁶, e já foi demonstrado que nessa condição há diminuição na expressão protéica de AQP2 associada ao desenvolvimento de poliúria severa^{12,13}. Já havíamos demonstrado que em ratos com DIN induzido pelo Li, o tratamento crônico com Sil aumenta a expressão protéica de AQP2, diminuindo a diurese, restabelece a resistência vascular renal e diminui a natriurese³⁸. No estudo atual investigamos por quais meios o Sil exerce sua ação terapêutica em animais com DIN induzido pelo Li.

Estudo das vias regulatórias do mecanismo de tráfego e produção da AQP2 nos animais com DIN induzido pelo Li e atuação do Sil

O ducto coletor é o principal sítio da regulação fina da reabsorção de água⁴⁰. A permeabilidade do ducto coletor a água é regulada pelo HAD e sua presença promove grande aumento da reabsorção de água do fluido tubular⁴¹. 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^{20,42,43}. Já foi demonstrado que o Li inibe a atividade da adenilciclase e diminui os níveis de AMPc intracelular do ducto coletor

medular¹³ e essa inibição é a causa aparente da redução da expressão protéica de AQP2⁴⁴. Entretanto, outros estudos também mostraram que há diminuição da transcrição da proteína AQP2 em cultura de célula tratada com Li¹⁷. Esses fatores acabam por culminar na diminuição da permeabilidade à água no ducto coletor, isto é, na poliúria encontrada nesses animais. Em nosso estudo observamos que a expressão de AQP2 estava diminuída tanto na fração da membrana plasmática quanto na fração das vesículas citoplasmáticas dos animais do grupo Li. Essa diminuição também pôde ser notada nas imagens de imunohistoquímica. O tratamento com Sil reverteu parcialmente a diminuição de expressão de AQP2 nas duas frações.

Em 2000, Bouley *et al* identificaram uma via alternativa para a inserção de AQP2 na membrana plasmática³¹. Os autores descreveram uma via dependente de GMPc para a inserção de AQP2 na membrana celular do epitélio renal³¹. Esses resultados sugerem que o óxido nítrico pode iniciar uma cadeia similar de eventos da via do AMPc mesmo na ausência desse mediador³¹. Semelhante ao processo de estímulo mediado pelo HAD, na via do GMPc, o tráfego de AQP2 para a superfície celular também depende da fosforilação do sítio S256 na cauda citoplasmática da AQP2^{31,44}. Ainda era incerto se o passo final desta fosforilação ocorria via PKA e/ou PKG ^{31,44}.

O Sil age inibindo a PDE5 e por consequência aumenta a acumulação de GMPc intracelular³². Identificamos a presença de PDE5 em tecido medular renal, como já havia sido demonstrado anteriormente³⁶. É interessante notar que o Sil não inibe a produção de PDE5 e sim a atividade da PDE, ocupando

o sítio de ligação destinado ao GMPc e exercendo assim seu efeito³⁷. Em nossos resultados foi possível observar que não há diferença de expressão de PDE 5 entre os grupos.

Já foi visto que o Sil é capaz de estimular a inserção de AQP2 na membrana plasmática das células do ducto coletor e de células LLC-AQP2³². Em culturas de células isso ocorre sem aumento detectável de AMPc ³². Em nosso estudo, observamos que o tratamento com Sil aumentou a concentração de GMPc intracelular no ducto coletor em suspensão de túbulos. Foi descrito que níveis supra fisiológicos de HAD podem aumentar a inserção de AQP2 na membrana celular mesmo na presença de Li¹³. Para descartarmos um possível aumento de HAD estimulado pelo Sil, nós dosamos a concentração deste hormônio no plasma de todos os grupos do estudo e não encontramos diferenças entre eles. Portanto, podemos relacionar o aumento da expressão protéica de AQP2 na membrana celular ao aumento do GMPc intracelular nos animais com DIN induzido pelo Li e tratados com Sil.

Em nosso estudo, foi observado que quando era feita a inibição da PKA em suspensão de túbulos papilares tratados com Sil, a expressão protéica de AQP2 era semelhante à de túbulos de animais com DIN. Entretanto, quando a inibição era feita com a PKG nessas mesmas condições, a expressão de AQP2 aumentava. Esse fatores indicam que provavelmente a AQP2 é fosforilada pela PKA na via do GMPc.

Além de regular a translocação da AQP2, o HAD regula também sua produção via AMPc/PKA¹⁷. Quando estimulada pelo HAD, a PKA fosforila a proteína Creb transformando-a em p-Creb, que irá se ligar ao *promoter* do gene de AQP2 e dar início a sua produção¹⁷. Apesar de estudos em cultura de célula indicarem que o Li não interfere na expressão ou fosforilação do Creb¹⁷, decidimos investigar uma possível ação do Sil nesta proteína, já que observamos que a provável responsável pela fosforilação da AQP2 na via do GMPc é a PKA. Não observamos diferenças entre os grupos estudados em relação à expressão da proteína Creb. Porém, observamos que a expressão da proteína pCreb estava aumentada do grupo Li+Sil em relação a todos os outros grupos. Este fato indica que o Sil provavelmente esteja estimulando a fosforilação do Creb. Sabe-se que a PKA não é a única via de fosforilação do Creb, Umenishi F e colaboradores demonstraram que a regulação de AQP2 via Creb pode ser independente de PKA através da proteína de troca diretamente ativada por AMPc (*exchange protein directly activated by AMPc-EPAC*)³⁹.

Investigamos também como o transportador de ureia é afetado pelo tratamento com Sil nos animais com DIN induzido pelo Li. Neste modelo, a expressão de UT-A1 está diminuída²¹ e tal constatação também foi confirmada em nossos estudos. Já foi demonstrado que o HAD aumenta a permeabilidade do ducto coletor a ureia por uma via AMPc dependente^{31,32}. Em estudos anteriores foi evidenciado que o HAD, através da proteína quinase A, induziu a fosforilação do transportador UT-A1 em suspensões de

células de ductos coletores da medula interna^{45,46}. Foi demonstrado que houve diminuição da sensibilidade do transportador UT-A1 à fosforilação induzida pelo HAD em ratos tratados com Li⁴⁵. 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 ureia no fluido do ducto coletor medular interno, onde a permeabilidade a ureia é notavelmente alta⁵⁴. Isto poderia explicar o aumento da expressão de UT-A1 nos ratos que receberam a combinação de Li e Sil em nosso estudo. Entretanto, 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.

Estudos recentes vêm demonstrando a ação da enzima GSK3 β na regulação da reabsorção de água pelo ducto coletor²⁶. Além disso, há evidências de que o Li inibe a atividade da GSK3 β aumentando sua fosforilação²⁶. O pGSK3 β , forma inativa da GSK3 β , eleva a expressão de COX2 aumentando a concentração de PGE2 intracelular, inibindo por fim a geração de AMPc e consequentemente diminuindo a inserção de AQP2 nas células do ducto coletor²⁶. Em nosso estudo, vimos que a expressão da forma ativa da enzima não apresenta alterações entre os grupos, apesar da constatação de uma tendência a menor expressão nos grupos Li e Li+Sil. Portanto, o Sil provavelmente, não exerce nenhuma ação na via de regulação

da reabsorção de água mediada pelo GSK3 β . Na verdade, ainda serão necessários mais estudos para definir o papel do Sil nesta via do GSK3 β .

Estudo do mecanismo hemodinâmico do Sil envolvido na melhora da resistência vascular renal

Como já havíamos demonstrado, a resistência vascular renal estava aumentada no grupo que recebeu Li e foi completamente normalizada pelo tratamento com Sil³⁸. No estudo atual observamos que a expressão da proteína eNOS estava diminuída nos animais que receberam Li e o tratamento com Sil restabeleceu a expressão da proteína. A diminuição da proteína eNOS parece ser o fator responsável pelo aumento da resistência vascular renal encontrada nos animais com DIN induzido pelo Li. Pesquisadores demonstraram que camundongos *knockout* para as três isoformas da óxido nítrico sintetase (NOS), isto é, iNOS, óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e eNOS apresentam sintomas de DIN, incluindo diminuição da expressão de AQP2 no tecido renal e insensibilidade ao HAD⁴⁸. Além disso, estudos revelaram que o óxido nítrico estimula a produção de AMPc via ativação de adenilclase dependente de GMPc, promovendo a inserção de AQP2 na membrana celular em rins isolados de rato^{49,50}.

Até hoje nenhum trabalho havia demonstrado a diminuição da expressão de eNOS induzida pelo Li. Entretanto, alguns pesquisadores observaram que a disfunção erétil vista em pacientes tratados com Li poderia ser atribuída ao bloqueio da via do óxido nítrico⁵¹. O tratamento crônico com Li prejudicaria o relaxamento dos corpos cavernosos de ratos mediado pelo óxido nítrico e portanto, poderia ser prevenido com o uso de L-arginina, um precursor do óxido nítrico⁵¹. 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 Sil⁵². Esses autores não observaram alterações significativas no fluxo sanguíneo renal, fluxo urinário e na excreção urinária de sódio⁵². 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 renais⁵³.

Estudo dos mecanismos do Sil envolvidos na diminuição da natriurese induzida pelo Li

O tratamento crônico com Li está associado a um aumento significativo da excreção urinária de sódio em ratos¹³, principalmente nos modelos de alta

dose de Li (60 mmol/kg dieta)¹⁸. Mesmo em modelos de baixa dose de Li (40 mmol/kg dieta), foi observado aumento na excreção urinária de sódio¹⁸. Anteriormente havíamos observado aumento na natriurese, apesar da diferença entre os grupos tratados e o grupo controle não ter sido significativa³⁸. Vimos que no grupo Li e Li+Sil a expressão dos transportadores NHE3 e NKCC2 estava aumentada em relação ao grupo controle e Sil. Já a subunidade α do transportador ENaC não apresentou diferença de expressão entre os grupos. No trabalho atual estudamos as outras duas subunidades do canal de sódio e observamos que a subunidade β ENaC não foi afetada pelo Li, Porém, a expressão da subunidade γ ENaC estava diminuída nos animais que receberam Li e o tratamento com Sil normalizou a expressão desta subunidade da proteína. A expressão da subunidade α do ENaC é considerada o fator limitante para a montagem e inserção na membrana do complexo ENaC, embora as três subunidades sejam necessárias para o funcionamento total do canal⁵⁴. Estudos futuros, usando uma dose alta de Li, são necessários para podermos elucidar a maneira pela qual o Sil é capaz de melhorar a natriurese induzida pelo Li.

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;
- ✓ Portanto, o tratamento com Sildenafil leva a um aumento da translocação de AQP2 via GMPc/PKA;
- ✓ O Sildenafil, fosforilando o promotor Creb, leva a uma ativação do gene da AQP2 aumentando a produção da proteína;
- ✓ O Sildenafil leva a um aumento da produção e também da translocação da proteína AQP2;
- ✓ Além disso, o Sildenafil normaliza a resistência vascular renal nos ratos com DIN induzido pelo Li, regularizando a expressão de eNOS;
- ✓ Propomos assim, a seguinte via de ação do Sildenafil no tratamento do 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. Johnson G. Lithium--early development, toxicity, and renal function. *Neuropsychopharmacology*. 1998;19(3):200-5.
2. Livingstone C, Rampes H. Lithium: a review of its metabolic adverse effects, *J Psychopharmacol*. 2006;20(3):347-55.
3. Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. *Mol Interv*. 2004;4(5):259-72.
4. Lenox RH, McNamara RK, Papke RL, Manji HK. Neurobiology of lithium: an update. *J Clin Psychiatry*. 1998;59 Suppl 6:37-47.
5. Dunne FJ. Lithium toxicity: the importance of clinical signs. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2010;71(4):206-10.
6. Timmer RT, Sands JM. Lithium intoxication. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(3):666-74.
7. Holstein-Rathlou NH. Lithium transport across biological membranes. *Kidney Int Suppl*. 1990;28:S4-9.
8. Greger R. Possible sites of lithium transport in the nephron. *Kidney Int Suppl*. 1990;28:S26-30.
9. Kortenoeven ML, Li Y, Shaw S, Gaeggeler HP, Rossier BC, Wetzels JF, et al. Amiloride blocks lithium entry through the sodium channel thereby attenuating the resultant nephrogenic diabetes insipidus. *Kidney Int*. 2009;76(1):44-53.
10. 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.
11. Christensen BM, Zuber AM, Loffing J, Stehle JC, Deen PM, Rossier BC, et al. α ENaC-mediated lithium absorption promotes nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):253-61.

12. 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.
13. 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.
14. 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.* 1997;272(23):14800-4.
15. Katsura T, Gustafson CE, Ausiello DA, Brown D. Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1997;272(6 Pt 2):F817-22.
16. Hoffert JD, Fenton RA, Moeller HB, Simons B, Tchapyjnikov D, McDill BW, et al. Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *J Biol Chem.* 2008;283(36):24617-27.
17. Li Y, Shaw S, Kamsteeg EJ, Vandewalle A, Deen PM. Development of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is dissociated from adenylyl cyclase activity. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4):1063-72.
18. Kwon TH, Laursen UH, Marples D, Maunsbach AB, Knepper MA, Frøkier J, et al. Altered expression of renal AQP2 and Na⁺ transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(3):F552-64.
19. Fenton RA, Knepper MA. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1083-112.
20. 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.

21. 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.
22. 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):F1244-57.
23. Nielsen J, Kwon TH, Praetorius J, Kim YH, Frøkiaer 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):F1198-209.
24. 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):F1222-33.
25. 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):F702-9.
26. Rao R, Zhang MZ, Zhao M, Cai H, Harris RC, Breyer MD, et al. Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(4):F642-9.
27. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(3):720-5.
28. 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):F702-9.

29. Verbalis JG, Berl T. Disorders of water balance. In: Brenner BM, editor. Brenner and Rector's The Kidney. Vol 1. Philadelphia: Saunders, 2008. P, 459-504.
30. 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.
31. 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. 2000;106(9):1115-26.
32. 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.
33. Riella MC, Pachaly MA. Metabolismo de água. In: Riella MC, editor. Principios de Nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.100-131.
34. 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.
35. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. Kidney Int. 1999;55(1):29-62.
36. 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.

37. Corbin JD, Francis SH. Molecular biology and pharmacology of PDE-5-inhibitor therapy for erectile dysfunction. *J Androl*. 2003;24(6 Suppl):S38-41.
38. Sanches TR. Estudo da ação do inibidore de fosfodiesterase (Sildenafil) no Diabetes Insipidus induzido pelo lítio. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.
39. Umenishi F, Narikiyo T, Vandewalle A, Schrier RW. cAMP regulates vasopressin-induced AQP2 expression via protein kinase A-independent pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(8):1100-5.
40. Schrier RW. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):1820-32.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Brown D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(5):F893-901.
45. 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):F85-90.
46. Sands JM. Renal urea transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13(5):525-32.

- 47.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.
- 48.Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci.* 2006;102(2):147-54.
- 49.Heuzé-Joubert I, Mennecier P, Simonet S, Laubie M, Verbeuren TJ. Effect of vasodilators, including nitric oxide, on the release of cGMP and cAMP in the isolated perfused rat kidney. *Eur J Pharmacol.* 1992;220(2-3):161-71.
- 50.Pelligrino DA, Wang Q. Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilation. *Prog Neurobiol.* 1998;56(1):1-18.
- 51.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;10:69-73; discussion 73-74.
- 52.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.
- 53.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.
- 54.Nielsen J, Kwon TH, Christensen BM, Frøkiaer J, Nielsen S. Dysregulation of renal aquaporins and epithelial sodium channel in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol.* 2008;28(3):227-44.

Artigo Publicado