

Ana Carolina de Bragança

**Efeito da carbamazepina na reabsorção de água pelo ducto coletor medular
interno de ratos normais e de ratos com diabetes insípido nefrogênico
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

Orientador: Dr. Antonio José Barros Magaldi

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Pesquisa Básica (LIM 12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com auxílio FFM, HCFMUSP, FMUSP e da FAPESP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Carmen,
pelo apoio e compreensão, pelo amor
incondicional e verdadeiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela vida e pela benção de viver bem todos os dias.

À minha mãe, Carmen, pelo amor, amizade e por tudo o que vivemos juntas, essencial para minha formação como pessoa.

Ao Prof. Dr. Antonio José Barros Magaldi, pela oportunidade, paciência e orientação deste estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro, chefe do Laboratório de Pesquisa Básica – LIM-12, pelas aulas didáticas e sugestões muito bem vindas.

À Profa. Dra. Lúcia Andrade, pela amizade e pela contribuição nos experimentos de *Western Blot*.

À bióloga e amiga, Zenaide P. Moysés, pelos ensinamentos da técnica de microperfusão e *Western Blot* e por toda a ajuda prestada.

Aos meus grandes amigos e profissionais de trabalho, Dr. Rildo Volpini e a doutoranda Talita Sanches, minha eterna amizade e agradecimento pelo carinho, companheirismo, apoio e disponibilidade em me ajudar.

À Cecília da Conceição Costa (nossa Ciça), pela amizade e todo o cuidado com os animais de biotério, essencial para a realização deste estudo.

À Profa. Dra. Cláudia Helou, à Dra. Maria Heloísa M. Shimizu, e à bióloga, Fabíola M. O. Monreal, pela amizade e ajuda prestada.

Ao Nivaldo Francisco da Silva e Eloá de Souza Neves, pelo carinho e pela ajuda administrativa.

E a todos os colegas e funcionários do LIM-12, por toda a ajuda e apoio.

À minha grande amiga e “irmã” do coração, Mariana C. Magri, pela amizade e por tudo o que dividimos juntas desde que chegamos em São Paulo.

Às minhas grandes amigas, Heloísa, Aline, Vanessa, Fernanda, Fabiana e Márcia, pela amizade verdadeira e por tudo o que vivemos juntas.

Aos técnicos da câmara escura do Instituto de Radiologia da Faculdade de Medicina da USP.

Às funcionárias Márcia Ribalta e Mirela A. R. Santinho do laboratório de Nefrologia do ICHC, pelas dosagens.

Aos funcionários do LIM-10, pelo apoio técnico e necessário para uso das ultracentrífugas.

Ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, pelo fornecimento dos animais.

Ao Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP.

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO.....1

OBJETIVOS.....11

MATERIAIS E MÉTODOS.....13

RESULTADOS.....22

DISCUSSÃO.....31

CONCLUSÃO.....36

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....38

APÊNDICE.....43

RESUMO

Bragança, AC. Efeito da carbamazepina na reabsorção de água pelo ducto coletor medular interno de ratos normais e de ratos com diabetes insípido nefrogênico induzido pelo lítio (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 43p.

Carbamazepina (Carba) é um anticonvulsivante, uma droga psicotrópica muito utilizada no tratamento de pacientes com distúrbios intelectuais. Esta droga foi utilizada para diminuir o volume urinário no Diabetes Insípido (DI), pois possui um efeito antidiurético, mas a incidência de hiponatremia é uma ocorrência comum. O lítio é uma das drogas mais importantes para o tratamento do distúrbio bipolar. No entanto, ele tem uma grande capacidade de induzir DI dificultando o seu uso em pacientes debilitados psicologicamente. Atualmente, a associação destas drogas é frequentemente utilizada para o tratamento de pacientes com distúrbios psiquiátricos e neurológicos. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da Carba no ducto coletor medular interno (DCMI) de ratos normais e elucidar a sua ação no DI induzido pelo lítio: 1) Estudos *in vitro*- A) Estudos com microperfusão de segmentos isolados do néfron onde a permeabilidade à água (Pf, $\mu\text{m}/\text{sec}$) foi determinada em DCMI perfundidos de ratos normais (n=20) na presença de Carba à 10^{-5} M, e na ausência de HAD.- B) estudos com a técnica de *Imunoblotting* para avaliar a expressão da proteína Aquaporina 2 (AQP2) em suspensão de túbulos de DCMI de ratos normais incubados com 10^{-5} M de Carba por 30 minutos. 2) Estudos *in vivo* – A) quatro grupos foram formados: a) Controle (n=5); b) Li (40 mmol/Kg/dieta por 3 semanas; n=4); c) Li+Carba (40 mmol Li/Kg/dieta + 400 mg carba/Kg/dia por 3 semanas; n=5); d) Carba (400 mg /Kg/dia por 3 semanas; n=5); - B) estudo da expressão da AQP2 no DCMI destes quatro grupos pela técnica de *Western Blot*. Resultados: 1) Estudos *in vitro* – A) nos estudos de microperfusão a carba adicionada ao banho aumentou a Pf dos DCMI, na ausência de HAD (n=6) – Controle-

12,3±3,6, Carba-62,6±14,8 (p<0,01), Recuperação (Rec)-17,4±5,5 (p<0,01). Com o intuito de estudar o mecanismo pelo qual a Carba ativa a cascata do HAD, foi utilizado o inibidor do receptor V2 do HAD (AV2; n=10): Controle-23,5±5,2, Carba-37,4±4,4 (p<0,01), Carba+AV2-19,6±5,0 (p<0,05), Rec-21,4±5,5; e Controle-18,6±7,0, AV2-27,3±7,2, AV2+Carba-25,3±5,7, Rec-32,6±6,4. O inibidor da PKA (H8; n=4) também foi utilizado: Controle-15,0±9,0, Carba-106,1±12,3 (p<0,01), Carba+H8-60,3±16,4 (p<0,01), Rec-44,5±13,2. B) a análise densitométrica mostrou um aumento de 38,8% na expressão da AQP2 (Controle-100,0±8,3 vs. Carba-138,8±12,12, p<0,05); 1) Estudos *in vivo* – Volume urinário (UV, mL/24h) – Controle-10,7±3,0, Li-62,6±6,0 (p<0,001), Li+Carba-28,5±4,9 (p<0,001), Carba-23,3±3,0 (<0,001). Osmolalidade urinária (mOsm/Kg/H₂O) – Controle-819,6±175,7, Li-149,4±18,0 (p<0,01), Li+Carba-251,5±39,7 (p<0,05), Carba-396,2±75,5 (p<0,01). FENa⁺ (%) - Controle-0,15±0,01, Li-0,10±0,02, Li+Carba-0,12±0,02, Carba-0,11±0,02. Expressão da AQP2 (%) – Controle-100,0±6,7, Li-55,8±5,4 (p<0,01), Li+Carba-75,8±9,6 (p<0,01), Carba-99,7±4,7 (p<0,05). Não houve diferenças significantes no Na⁺, K⁺ e Osmolalidade plasmáticas. Em resumo, nossos dados revelaram que a Carba diminui o UV, aumenta a osmolalidade urinária e a expressão da AQP2 no DI induzido pelo lítio, e aumenta a permeabilidade à água, provavelmente agindo diretamente no receptor da vasopressina (V2). Estes resultados enfatizam que a hiponatremia encontrada nos pacientes que fazem uso da Carba pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo aumento da permeabilidade osmótica no DCMI e que a poliúria do DI ocasionado pelo uso do lítio pode ser diminuída com a associação da Carba.

Descritores: 1. Carbamazepina 2. Diabetes insípido nefrogênico 3. Lítio 4. Hiponatremia 5. Aquaporinas 6. Água 7. Túbulos renais coletores

SUMMARY

Bragança, AC. Effect of carbamazepine on water absorption in the inner medullary collecting duct from normal rats and from rats with lithium-induced *diabetes insipidus* (dissertation). São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 43p.

Carbamazepine (Carba) is an anticonvulsant and a psychotropic medication commonly used in the treatment of patients with intellectual disability (ID). This drug has been used to try to decrease the urinary volume in *Diabetes Insipidus* (DI) because Carba presents an antidiuretic effect, but the incidence of the hyponatremia in neurological patients is a common occurrence. Lithium (Li) is one of the most important drugs used to treat bipolar mood disorders. However, Li has the undesirable capacity to induce DI complicating its usage in patients psychologically weakened. Nowadays, the association of these drugs is used in the treatment of patients with psychiatric and neurological problems. Our objective was to investigate the effect of Carba in the Inner Medullary Collecting Duct (IMCD) and elucidate its effect in the lithium-induced DI: 1) *In vitro* study: A) Microperfusion studies – the water permeability (Pf, $\mu\text{m}/\text{sec}$) was determined in normal rats IMCD isolated and perfused by the standard methods. Carba 10^{-5}M was added to the bath fluid. B) Immunoblotting studies for AQP2 protein expression in IMCD tubule suspension from normal rats incubated with Carba 10^{-5}M for 30 minutes. 2) *In vivo* study – A) four groups of normal rats were done - a) Control (C, n=5); b) Li (40 mmol/kg/food/3 weeks n=4) c) Li+Carba (40 mmol Li/kg/food/3 weeks and 400 mg Carba/kg/bw/2 last weeks, n=5); and Carba (400 mg Carba/kg/bw/3weeks, n=5); - B) AQP2 expression in IMCD from the four groups, by Western Blot. Results: 1) *In vitro* study – A) in microperfusion, Carba added to the bath in Vasopressin (Vp) absence (n=6) increased Pf – Control- 12.3 ± 3.6 , Carba- 62.6 ± 14.8 ($p<0.01$), Recuperation (Rec)- 17.4 ± 5.5 ($p<0.01$). In order to study the mechanism by which Carba activates the Vp cascade, the

antagonist of the Vp receptor 2 (AV2; n=10) was used: Control-23.5±5.2, Carba-37.4±4.4 (p<0.01), Carba+AV2-19.6±5.0 (p<0.05), Rec-21.4±5.5; and Control-18.6±7.0, AV2-27.3±7.2, AV2+Carba-25.3±5.7, Rec-32.6±6.4. The PKA inhibitor (H8; n=4) was also used: Control-15.0±9.0, Carba-106.1±12.3 (p<0,01), Carba+H8-60.3±16.4 (p<0.01), Rec-44.5±13.2.

B) the densitometric analysis showed an increased of 38.8% in AQP2 expression (Control-100.0±8.3 vs. Carba-138.8±12.12, p<0.05); B) *In vivo* study – Urinary volume (UV, mL/24h) – Control-10.7±3.0, Li-62.6±6.0 (p<0.001), Li+Carba-28.5±4.9 (p<0.001), Carba-23.3±3.0 (p<0.001). Urinary Osmolality (mOsm/Kg/H₂O) – Control-819.6±175.7, Li-149.4±18.0 (p<0.01), Li+Carba-251.5±39.7 (p<0.05), Carba-396.2±75.5 (p<0.01). FENa⁺ (%) - Control-0.15±0.01, Li-0.10±0.03, Li+Carba-0.12±0.02, Carba-0.11±0.02. AQP2 expression (%) – Control-100.0±6.7, Li-55.8±5,4 (p<0.01), Li+Carba-75.8±9.6 (p<0.01), Carba-99.7±4.7 (p<0.05). There were no significant differences in Na⁺, K⁺ and plasma osmolality. In summary, our data showed that Carba decreased the UV, increased the UOsm and the AQP2 expression in Li-induced DI, increased the water permeability, probably acting directly in the Vp V2 receptor-Protein G complex, since its action was blocked by the specific Vp V2 receptor antagonist. These results emphasize that the hyponatremia found in patients using Carba could be explained, at least in part, by increased osmotic permeability of IMCD. In addition, poliuria observed in lithium-induced DI can be decreased with Carba-treatment.

Descriptors: 1. Carbamazepine 2. Diabetes insipidus nephrogenic 3. Lithium 4. Hyponatremia 5. Aquaporins 6. Water 7. Renal Collecting tubules

INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Carbamazepina ou Tegretol[®] como é conhecida comercialmente, é uma droga antiepiléptica, utilizada no tratamento de crises convulsivas simples e complexas, no tratamento da neuralgia do trigêmeo e outras neuroalgias (1,2).

Relatos de casos de pacientes que fazem uso da Carbamazepina têm mostrado o aparecimento de hiponatremia, cuja origem tem sido atribuída a uma Secreção Inapropriada do Hormônio Antidiurético ou a uma ação direta desta droga sobre o rim, aumentando a reabsorção de água nos ductos coletores papilares renais. (3,4).

1.2 MECANISMO DE CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO URINÁRIA

A reabsorção da maior parte dos eletrólitos e da água filtrada é uma função primária do néfron e sua regulação é essencial para a manutenção do balanço de fluidos corpóreos. O processo de reabsorção de volume envolve o movimento de água através da camada de células epiteliais de várias regiões do néfron em resposta à diferença de osmolalidade através das membranas celulares individuais e/ou dos complexos juncionais e espaços paracelulares que separam as células adjacentes (5).

O sistema de contracorrente multiplicador inicialmente idealizado e aplicado à medula renal é o que melhor explica o mecanismo de concentração urinária. A energia inicial que movimenta este sistema seria dada pelo transporte ativo de NaCl da luz tubular para o interstício medular na porção ascendente da alça de Henle. Este transporte de NaCl, aumentando a osmolaridade do interstício, promoveria a reabsorção de água no ramo descendente da alça de Henle, com conseqüente aumento progressivo da osmolaridade do seu

fluido tubular em direção à papila. Este efeito inicial seria multiplicado e o gradiente osmótico então criado determinaria maior reabsorção de água no ducto coletor medular interno.

Os estudos funcionais da porção espessa da alça de Henle, tanto da região medular como da região cortical (segmento diluidor), mostraram ser eles impermeáveis à água, mesmo na presença do hormônio antidiurético (6). Neste segmento, na membrana luminal ocorre uma reabsorção de Na^+ acoplado a Cl^- e K^+ em um co-transporte $\text{Na}:\text{K}:2\text{Cl}$, secundariamente ativo ao transporte de Na^+ ativo pela $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ na membrana basolateral (7,8). Este transporte ativo propicia a formação de um gradiente eletroquímico favorável à entrada de Na^+ na célula. A passagem de Na^+ da luz tubular para o interstício, retirando Na^+ do fluido filtrado e adicionando-o ao interstício, constitui o chamado *efeito unitário* do mecanismo de contracorrente multiplicador.

Os ramos finos da alça de Henle, tanto ascendentes como descendentes, são formados por um epitélio simples escamoso, que repousa sobre uma membrana basal, e o citoplasma de suas células é escasso em mitocôndrias. Este padrão morfológico é de um epitélio favorável ao equilíbrio osmótico entre lúmen e o interstício, e não a um transporte ativo com gasto de energia (9).

O estudo funcional da porção fina descendente da alça de Henle mostra que este ramo é altamente permeável à água e pouco permeável ao sódio e a outros solutos, sugerindo que o equilíbrio osmótico com o interstício medular ocorra à custa da reabsorção de água, com conseqüente aumento da concentração de cloreto de sódio, uréia e outros solutos no fluido tubular, em direção à papila renal. A porção fina ascendente da alça de Henle apresenta características opostas às do ramo descendente. Observa-se que a porção ascendente é impermeável à água e é altamente permeável a Na^+ e Cl^- , sendo que o movimento transtubular de cloretos deve ocorrer por um mecanismo passivo facilitado.

Nestas condições, a diferença de permeabilidade à água e solutos nos ramos finos descendentes e ascendentes permite que o acúmulo de NaCl que ocorre na porção descendente da alça de Henle por reabsorção de água se desfça, pelo menos em parte, na porção fina ascendente, uma vez que este segmento passa a ser permeável ao sódio. No entanto, neste segmento ascendente o equilíbrio osmótico com o interstício medular dá-se à custa do efluxo da NaCl rápido e influxo de uréia mais lento, o que resulta na formação de um fluido tubular com menor concentração de NaCl que o interstício. Este fluido, agora atingindo a porção espessa ascendente onde ocorre grande reabsorção de NaCl ativamente, ficará cada vez mais hipotônico, sendo que sua osmolaridade pode atingir valores inferiores a 100 mOsm/Kg H₂O no início do túbulo distal. Por isto, este segmento é chamado de segmento diluidor. Assim, apenas as características opostas de permeabilidade dos ramos finos, descendentes e ascendentes, proporcionam um meio genial de adicionar soluto (NaCl) na região medular interna e de formar um fluido hipotônico à custa, unicamente, da reabsorção ativa de NaCl da região medular externa (10).

1.2.1 Ação do Hormônio Antidiurético

O conhecimento dos eventos celulares envolvidos na ação do hormônio antidiurético (HAD) expandiu-se consideravelmente nos últimos anos. O HAD é um hormônio capaz de induzir alterações estruturais na parede luminal das células principais do ducto coletor medular interno (DCMI) determinando um aumento da permeabilidade a água e a uréia. O HAD, que evoca a resposta celular, é o “primeiro mensageiro”, e o seu efeito intracelular é mediado por um “segundo mensageiro”, que é produzido como resultado da interação do hormônio com o seu receptor específico. Os dois mais significantes sistemas de “segundos mensageiros”

conhecidos, são os sistemas da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e o do Ca^{++} . O HAD exerce seu efeito hormonal no rim, estimulando dois tipos de receptores chamados de V1 e V2, sendo que respectivamente utilizam o Ca^{++} e o AMPC como “segundos mensageiros”. Estes receptores estão localizados na membrana basolateral da célula principal. O receptor V2 quando estimulado determina alterações bioquímicas intracelulares que por sua vez acarretam modificações na membrana luminal modulando ou regulando a permeabilidade à água.

Quando o HAD se liga ao receptor V2, é ativada uma enzima chamada de adenilciclase (AC). Acredita-se que esta enzima faça parte de um sistema regulador complexo que consiste de três subunidades diferentes: o receptor (R) a proteína G (o nucleotídeo Guanina) e uma unidade catalítica (AC). Neste modelo a AC estaria ligada a dois receptores de naturezas opostas: um deles a estimularia (Rs) enquanto o outro a inibiria (Ri), através das unidades reguladoras da proteína G, respectivamente Gs e Gi. Estes receptores ativariam (Gs) ou inibiriam (Gi) a AC quando o receptor estimulador ou inibidor fossem ocupados respectivamente. O receptor do HAD é o receptor estimulador (Rs), enquanto o receptor ocupado pelos agentes α -2 adrenérgicos seria inibidor (Ri) uma vez que estes agentes inibem o transporte de água (11).

A ativação da adenilciclase promoveria a conversão da adenosina trifosfato (ATP) no mediador intracelular 3',5' adenosina monofosfato cíclico (AMPC). A formação do AMPC é o início de uma reação em cascata que termina na incorporação de canais de água na membrana apical: o AMPC ativaria a proteinoquinase A (PKA) que fosforilaria proteínas do citosol, que por sua vez atuariam em elementos do citoesqueleto celular, tais como, microfilamentos e microtúbulos que participariam nos mecanismos pelos quais vesículas citoplasmáticas específicas carregando os canais de água (Aquaporina 2) seriam inicialmente inseridas na membrana apical e posteriormente removidas, consistindo no fenômeno hoje denominado

endocitose mediada por receptor. Neste processo, quando o ADH estiver presente no plasma, canais de água seriam inseridos na membrana apical (exocitose) enquanto na ausência de HAD, estes canais, seriam removidos da membrana apical (endocitose). Este processo, no entanto, pode ser modulado intracelularmente pela atividade da AMPc fosfodiesterase, (que transformaria o AMPc na sua forma inativa 5'adenosina monofosfato, 5'AMPc), bem como por autacóides como as Prostaglandinas e por outras substâncias como o Ca^{++} e proteinoquinase C (PKC).

Assim, a inserção de canais de água nas paredes luminais do ducto coletor medular interno (DCMI), permite que a água seja reabsorvida, da luz para o interstício, apenas pela ação do gradiente osmótico gerado pela medula renal em relação à luz tubular, formando uma urina concentrada (12, 13, 14).

1.2.2 Aquaporina 2

As aquaporinas compreendem uma família de proteínas de membrana que funcionam como canais de água que desempenham um importante papel no transporte de água pelas membranas celulares de todos os seres vivos. Atualmente, 13 aquaporinas já foram identificadas, sendo que 8 delas ocorrem no rim, onde quatro estão presentes nos ductos coletores, a AQP2, a AQP3, a AQP4, e a AQP6. Destas, apenas a AQP2 é regulada pela ação do HAD e é essencial para o mecanismo de concentração urinária. O HAD estimula a inserção da AQP2 na membrana plasmática da célula principal dos túbulos coletores pela proteína PKA promovendo a reabsorção de água (15).

A identificação das aquaporinas possibilitou a clonagem das mesmas facilitando sua detecção por técnicas apropriadas, como pela técnica de *Western blotting*. Desta forma,

evidenciou-se que a AQP2 é abundante na membrana plasmática apical e nas vesículas apicais das células principais do ducto coletor renal (16).

As aquaporinas possuem quatro monômeros, e cada monômero é formado por seis alfa-hélices transmembranas, com alças formadoras de poro. A alça contém a sequência NPA (asparagina-prolina-alanina) de aminoácidos que interagem com a membrana promovendo o movimento da água através da membrana plasmática (16).

1.3 CARBAMAZEPINA

Desde há muito tempo é conhecido que a Carbamazepina possui um efeito antidiurético, tendo sido usado no passado para o tratamento do Diabetes Insípido porque produz uma antidiurese com uma diminuição do volume urinário (17,18). Sabe-se também que pacientes neurológicos que usam esta droga como tratamento anticonvulsivante podem apresentar hiponatremia (19,20). Este efeito antidiurético da Carbamazepina não está ainda bem definido, tendo sido aventado a hipótese de esta droga estimular a liberação do HAD ou agir diretamente no túbulo renal (21). Em 1978, Stephens e colaboradores (22) mostraram que o nível plasmático do HAD não aumentava em pacientes voluntários que ingeriram Carbamazepina. Atualmente a literatura é carente em definir o efeito desta droga sobre o rim (23,24).

1.4 HIPONATREMIA

A hiponatremia está associada com a diminuição da tonicidade do plasma, isto é, um aumento da quantidade de água corporal total em relação ao sódio total, sendo usualmente definida como sódio sérico inferior a 134 mEq/L (25,26,27).

Mais comumente, a hiponatremia se manifesta quando a ingestão ou a administração de água livre excede a sua excreção renal.

As principais situações clínicas que podem estar associadas à hiponatremia são: síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática, pseudo-hiponatremia, distúrbios endócrinos, contração do volume intravascular ou extravascular, estresse emocional e físico, agentes farmacológicos e síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético (SIHAD).

Na hiponatremia, o sódio total do organismo pode estar normal, baixo ou alto. Assim, a hiponatremia pode ser classificada de acordo com a volemia: 1) Hiponatremia Hipovolêmica, sendo a perda de sódio maior do que de água como no caso de perdas renais, excesso de diuréticos, deficiência mineralcorticóide, deficiência da reabsorção de sódio, bicarbonatúria com acidose tubular renal e alcalose metabólica, cetonúria, diurese osmótica, sendo o Na^+ urinário menor que 20 mEq/L como no caso de perdas extrarrenais, vômitos, pancreatite, trauma e queimaduras; 2) Hiponatremia Hipervolêmica, causado por uma retenção de água maior que do que de sódio, no caso da Insuficiência Renal Crônica (IRC) e Insuficiência Renal Aguda (IRA), quando o Na^+ urinário está menor do que 20 mEq/L, como nos casos de Síndrome Nefrótica, Cirrose e Insuficiência Cardíaca; 3) Hiponatremia Euvolêmica, quando ocorre a retenção de água livre, decorrente de excesso de reabsorção de água, com presença

de edema, mantendo o Na^+ urinário maior que 20 mEq/L, como no caso de deficiência de glicocorticóide, hipotireoidismo, estresse, drogas e SIHAD (28,29).

1.5 DIABETES INSÍPIDO NEFROGÊNICO INDUZIDO PELO LÍTIO

O lítio (Li) tem sido amplamente usado como um agente farmacológico na terapia psiquiátrica, e é uma das drogas escolhidas para o tratamento de distúrbios afetivos bipolares (30).

O tratamento com o lítio está associado com alguns efeitos adversos, em particular, o Diabetes Insípido Nefrogênico (DIN). Os pacientes que fazem uso da terapia com o lítio frequentemente apresentam dificuldade de concentração urinária, com poliúria e polidipsia (30).

A concentração urinária depende da hipertonicidade do interstício medular, que é gerada em parte pela reabsorção ativa de NaCl nos segmentos impermeáveis a água, e pela alta permeabilidade à água nos segmentos tubulares renais finais, os quais necessitam das aquaporinas (AQPs) para efetuar a reabsorção osmótica da água. Assim, qualquer distúrbio que haja nesse mecanismo, prejudica o balanço de água.

O tratamento crônico com o lítio vem sendo associado com uma redução da expressão da AQP2 no ducto coletor medular interno das células principais, desenvolvendo poliúria severa. O DIN induzido pelo lítio pode ser, em parte, devido à redução da expressão das AQP2 (31).

1.5.1 A ação do lítio (Li) no rim

O Li geralmente é administrado na forma de carbonato de lítio (Li_2Ca) e é totalmente absorvido no trato gastrointestinal e excretado pelos rins.

No rim, o Li é livremente filtrado pelos glomérulos e aproximadamente 80% é reabsorvido, onde cerca de 60% é reabsorvido no túbulo proximal de forma similar ao sódio, e 20% é reabsorvido entre a alça de Henle e o ducto coletor. A reabsorção do Li pode ser diminuída pela ação de diuréticos de alça e pelo amiloride, indicando que a maior parte do lítio reabsorvido ocorre tanto no ramo espesso ascendente da alça de Henle como no ducto coletor cortical (32).

O lítio pode ser facilmente substituído pelo sódio ou pelo potássio através de proteínas transportadoras que normalmente transportam sódio ou potássio, mostrando a via pela qual o lítio entra nas células. As proteínas transportadoras de Li mais importantes são o canal de sódio (ENaC) e o trocador Sódio/Hidrogênio (NHE3), ambos inibidos pelo amiloride (32).

O canal de sódio-amiloride-sensível (ENaC) é o principal transportador envolvido na homeostase do sódio no ducto coletor. Este canal possui igual permeabilidade para o lítio e para o sódio e é a maior via de acúmulo de lítio nas células do ducto coletor (32).

O trocador NHE3, em condições normais, é responsável pela maior parte da reabsorção de sódio através do túbulo proximal, mas pode transportar lítio em substituição ao sódio, entretanto, o transporte de sódio é duas vezes maior do que o de Li (32).

OBJETIVOS

Verificar se a Carbamazepina têm um efeito semelhante ao do HAD, isto é, se ela teria a capacidade de aumentar a reabsorção de água em segmentos isolados do ducto coletor medular interno de ratos Wistar normais.

Verificar o efeito da Carbamazepina no Diabetes Insípido Nefrogênico induzido pelo tratamento com lítio em ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudos *in vitro*

3.1.1 Microperfusão

Para estudar o transporte de água no Ducto Coletor Medular Interno (DCMI) utilizou-se a técnica de microperfusão *in vitro* de segmentos isolados do néfron (33). Com esta técnica foi possível determinar a permeabilidade à água na ausência e na presença de carbamazepina. Os animais utilizados foram ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) normais, machos, com o peso em torno de 180g a 200g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos no biotério do nosso laboratório até o momento do uso. Foram alimentados com ração normal e água à vontade (O uso de animais neste projeto foi aprovado pela Comissão de Ética, sob o protocolo de pesquisa nº 0500/07).

Para a retirada do rim, o animal foi anestesiado, e após a abertura da parede abdominal e retirada do rim cirurgicamente, a papila renal foi isolada e colocada em solução artificial de Ringer HCO₃ (Tabela 1). Feixes de tecido do córtex em direção a papila foram destacados, isolando segmentos do DCMI, cuja identificação foi feita pelas características morfológicas e relações anatômicas. O segmento isolado foi transportado para a câmara de perfusão por meio de aspiração com uma pipeta Pasteur.

Na câmara de perfusão, que é montada sob a platina de um microscópio invertido (Olympus, Tokyo), o segmento do DCMI transferido foi colocado entre duas micropipetas de vidro (Dumont Scientific Company) e por ação da gravidade fizemos passar por sua luz uma solução artificial de Ringer HCO₃ (Tabela 1), na qual foi adicionada um corante vital atóxico e livre de sódio, FDC (Keystone-Aniline Company) com o objetivo de detectar perfurações e

possíveis danos celulares. Esta solução de perfusão era isotônica ao plasma (295 ± 5 mOsm/Kg/H₂O).

A velocidade de perfusão foi dada pela pressão hidrostática de uma coluna de líquido de altura variável. O DCMI foi mantido em um banho de solução hipertônica (solução de Ringer acrescida de NaCl com osmolalidade em torno de 510 mOsm/Kg/H₂O) e a temperatura foi controlada a 37°C e o pH do meio foi mantido em torno de 7,4.

As extremidades das pipetas foram preenchidas com óleo Sylgard com a finalidade de promover um isolamento mecânico e elétrico entre o banho da câmara de perfusão e o fluido, tanto o coletado como o perfundido.

As determinações foram isotópicas, isto é, na solução perfusora, foi adicionada Inulina marcada com ¹⁴C (Amersham Life Science International and New England Nuclear), pois sabemos que ela não é secretada nem reabsorvida pelo rim. Comparando-se as concentrações isotópicas da inulina da solução perfusora com a da solução perfundida, foi possível, através de fórmulas adequadas (vide abaixo) determinar o transporte de água da luz para o banho.

Os resultados foram expressos em Permeabilidade Osmótica (Pf) Pf x μm/s. A medida da permeabilidade osmótica foi feita a partir do cálculo do volume de fluido absorvido (V_r) em resposta a um gradiente osmótico de soluto impermeante.

Este volume absorvido (V_r) foi calculado utilizando-se a seguinte equação:

$$V_r = V_i - V_c$$

Onde V_r tem as unidades de nanolitros por minuto, V_i é o volume infundido em nanolitros por minuto e V_c é o volume coletado nas mesmas unidades.

O volume coletado foi medido diretamente através da pipeta coletora, de volume constante e conhecido. Dividindo-se pelo tempo de coleta obtínhamos o volume coletado por minuto. O volume infundido foi calculado utilizando-se as seguintes equações:

$$V_i \cdot C_{in} = V_c \cdot C_c$$

$$V_i = V_c (C_c / C_{in})$$

Sendo C_c e C_{in} as contagens por minuto de Inulina ^{14}C coletada e infundida, respectivamente. O isótopo foi adicionado na solução perfusora na concentração final de 25-100cpm/nl.

A concentração de Inulina radioativa na solução perfusora (C_{in}), isto é, na solução infundida foi obtida tomando-se um volume conhecido, retirado diretamente da pipeta perfusora, logo após o término da experiência e verificando-se o número de contagens por minuto.

O volume de água reabsorvido (J_v) foi calculado pela fórmula:

$$J_v = (V_i - V_c) / L$$

Onde é L o comprimento do túbulo.

Utilizamos para o cálculo da permeabilidade osmótica a seguinte equação descrita por Bois e col. 1976 (34):

$$Pf = 1 / (RTA \cdot C_b^2) \cdot \{C_b(V_i - V_c) + C_i \cdot V_i [\ln(C_b - C_i) \cdot V_i - \ln(C_b \cdot V_c - C_i \cdot V_i)]\}$$

Onde C_b e C_i são as osmolaridades do banho e do fluido de perfusão inicial, respectivamente, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta e A é a área. A área foi calculada através da equação- $D_i \times L \times \pi$, onde D_i é o diâmetro interno e L é o comprimento do túbulo. Estas medidas foram feitas utilizando-se uma ocular com escala graduada e o resultado foi expresso em 10^{-4} cm^2 . Os resultados foram expressos em $10^{-5} \mu\text{m}/\text{seg}$.

O banho era trocado a cada 10 minutos para reduzir o efeito da evaporação e conseqüentemente o aumento do gradiente osmótico.

Em cada período foram efetuadas, no mínimo três coletas. As amostras coletadas eram imediatamente transferidas para os frascos de contagem apropriados e com 0,5 mL de

água e em seguida era adicionado 5 mL de líquido de cintilação (1000 ml Triton X-100, 2000ml Tolueno (Merck), 0,206g POPOP e 16,50g PPO (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA)).

A radiação presente nas amostras era contada em um contador para radiação beta (Packard Tricarb 1600TR, Downers Grove, IL) utilizando um canal para carbono ^{14}C . As contagens eram feitas por 2 minutos duas vezes.

A dose utilizada de Carba foi de 10^{-5} M, após um projeto piloto que mostrou ser esta a dose que apresentava melhor reprodutibilidade dos resultados.

Foram estudados 6 segmentos do DCMI na presença de Carbamazepina adicionados ao banho na concentração de 10^{-5} M; 10 segmentos na presença de Carbamazepina+Anti-V2 (antagonista do receptor V2 (Sanofi-Aventis)) na concentração de 10^{-6} M; e 4 segmentos na presença de Carbamazepina mais H8 (inibidor da PKA (Sigma-Aldrich)) na concentração de 10^{-6} M.

Tabela 1. Composição da solução de Ringer HCO_3

Substância	Concentração
NaCl	115,0 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
CH ₃ COONa	10,0 mM
Glicose	5,0 mM
NaH ₂ PO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,0 mM
KCl	5,0 mM
MgSO ₄	1,2 mM

Foram feitos três grupos de animais:

- 1- Efeito da Carbamazepina 10^{-5} M
- 2- Efeito do antagonista do Receptor V2 do HAD 10^{-6} M
- 3- Efeito do inibidor da Proteinoquinase A (H8) 10^{-6} M

3.1.2 Suspensão de túbulos

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) normais, machos, com o peso em torno de 180g a 200g. Os animais foram mantidos em nosso biotério até o momento do uso, com dieta normal e livre acesso a água. Os animais que apresentaram uréia plasmática maior que 50 mg% foram descartados. Os ratos normais foram sacrificados, os rins foram removidos cirurgicamente e a papila renal foi isolada. Esta foi imediatamente colocada em solução artificial de Ringer HCO_3 (Tabela 1) gelada e feixes de tecido papilar foram destacados, dissecando-se feixes de DCMI (35). Este material foi separado em grupo controle, que foi incubado com o veículo e, grupo tratado, que foi incubado com carbamazepina na concentração de 10^{-5} M. A incubação foi feita por 30 minutos a 37 °C. As amostras foram previamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80° C para análise da expressão da Aquaporina 2 pela técnica de *Western blotting*.

3.2 Estudos *in vivo*

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) normais, machos, com o peso em torno de 180g a 200g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos no

biotério do nosso laboratório até o momento do uso. Os animais receberam água à vontade e dieta em pó preparada em nosso próprio laboratório onde a concentração de sódio foi de 160 mEq/Kg. Antes do início deste protocolo, foi colhido sangue pela via caudal para a dosagem plasmática de uréia. Os animais que apresentaram uréia plasmática maior que 50 mg% foram descartados (Método de Crocker modificado – Espectrofotômetro Femto 432C).

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- 1) Grupo controle (C): os animais receberam dieta normal durante 3 semanas de experimento;
- 2) Grupo Lítio (Li): os animais receberam dieta suplementada com 40 mmol de Li/Kg/dieta (31) durante 3 semanas de experimento;
- 3) Grupo Lítio+Carbamazepina (Li+Carba): os animais receberam dieta suplementada com 40 mmol de Li/Kg/dieta por 3 semanas e a partir da segunda semana a dieta foi suplementada com 400 mg Carba/Kg/dia;
- 4) Grupo Carbamazepina (Carba): os animais receberam dieta normal na primeira semana, e a partir da segunda semana a dieta foi suplementada com 400 mg Carba/Kg/dia .

Para a dieta que recebeu suplementação de lítio foi utilizado cloreto de lítio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) e a carbamazepina foi utilizado o próprio princípio ativo (gentilmente cedido pela Ache/Biosintética).

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas no fim da primeira semana e no fim da terceira semana para a coleta de urina por 24h. O peso dos animais foi verificado antes e após a permanência na gaiola metabólica e o volume de água ingerido foi verificado após 24h. A urina coletada foi utilizada para dosagens bioquímicas de sódio, potássio e osmolalidade.

No último dia de experimento, os animais foram sacrificados e o sangue total foi colhido via punção cardíaca para a análise de sódio, potássio, osmolalidade, creatinina e lítio no plasma e imediatamente após, os rins foram removidos cirurgicamente e a papila renal foi isolada. A papila foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80 °C para a análise da expressão da Aquaporina 2 pela técnica de *Western blotting*.

3.3 Extração da proteína e *Western Blotting*

Para a realização da técnica de *Western blotting* foram utilizadas as amostras das papilas renais dos animais tratados com dieta normal e dos animais tratados com lítio e lítio+carbamazepina e carbamazepina e da suspensão de túbulos, previamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80° C.

A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette (36), com pequenas modificações. As amostras das papilas renais foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em solução K-Hepes (20 mM Mannitol; 80 mM Hepes; 41 KOH, pH 7,5) e coquetel de inibidores de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Em seguida, centrifugadas a 4.000 g por 15 minutos a 4 °C para remover núcleo, mitocôndrias e debris celulares. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 200.000 g por 60 minutos a 4 °C (rotor 50Ti, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). O pellet (proteínas de membrana) foi suspenso em solução K-Hepes e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bioagency). Foi utilizado aproximadamente 2,5 µg de proteína desnaturada em tampão de amostra por poço. As amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em minigéis SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) 12 %, em tampão de corrida (Tris 1920 mM, Glicina 250 mM, SDS 10%, pH 8,3) e a transferência para

membrana de nitrocelulose foi feita com tampão de transferência (Tris 1920 mM, Glicina 250 mM, metanol 20%). A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em PBS-T (Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 100mM, Tween 0,1%, pH 7,5) por 1 hora. A incubação primária foi feita com anticorpo anti-aquaporina 2 (Santa Cruz, Biotchenology) na diluição 1:10.000 e anticorpo anti-actina (Santa Cruz, Biotchenology) na diluição 1:2.000 em solução de PBS-T, *overnight* a 4° C. A incubação secundária foi realizada com anticorpo anti-goat (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na diluição 1:10.000 também em solução de PBS-T com 0,1% leite em pó. O procedimento de detecção foi o sistema baseado em quimioluminescência (ECL, Amershan). A semi-quantificação das proteínas foi feita por densitometria (Imagem Master VDS Pharmacia Biotech).

3.4 Análise estatística

Para a análise dos dados obtidos dos experimentos de microperfusão utilizamos o teste “t de Student” pareado, e para cada período o valor apresentado representa a média de 3 a 4 coletas. A análise estatística dos resultados bioquímicos e da expressão da AQP2 dos animais tratados foi a de variância ANOVA (*one-way analysis of variance*). Todas as análises foram realizadas através do programa de estatística GraphPad Prism, e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Estudos *in vitro*

4.1.1 Microperfusão

Nestes grupos de experimentos foram determinados a permeabilidade osmótica ($P_f \times 10^{-5} \mu\text{m/s}$) dos DCMI's de ratos normais, na ausência de HAD.

1- Efeito da Carbamazepina- A Carba adicionada ao banho na concentração de 10^{-5}M determinou um aumento significativo da permeabilidade à água. No período controle a permeabilidade à água foi de $12,31 \pm 3,54$, aumentando para $62,57 \pm 14,83$ ($p < 0,01$) e recuperando-se para $17,43 \pm 5,48$ ($p < 0,01$) após a retirada da droga (Figura 1, Tabela 2).

2- Efeito do bloqueador do Receptor V2 do HAD- A adição de 10^{-5}M de Carba mais 10^{-6}M de anti-V2 (Carba+AV2) ao banho produziu uma diminuição da permeabilidade osmótica: Controle (C)- $23,55 \pm 5,25$; Carba- $37,36 \pm 4,38$; Carba+Anti-V2- $19,65 \pm 5,01$ ($p < 0,05$) e Carba- $21,43 \pm 5,51$ (Figura 2, Tabela 2), e no experimento onde se adicionou primeiramente o Anti-V2, observamos que não houve diferenças significativas de permeabilidade, mostrando que o receptor V2 quando é bloqueado, não permite a ação da carbamazepina (Figura 3, Tabela 2); Controle (C)- $23,14 \pm 6,52$, Anti-V2- $32,67 \pm 6,16$; Anti-V2+Carba- $29,39 \pm 5,19$ e Anti-V2- $37,26 \pm 5,71$.

3- Efeito do inibidor da PKA- A adição de 10^{-5}M de Carba mais 10^{-6}M do H8 também diminuiu a permeabilidade à água: Controle (C)- $15,00 \pm 9,01$; Carba- $106,11 \pm 12,31$, Carba+H8- $60,30 \pm 16,40$ ($p < 0,01$), Carba- $44,50 \pm 13,20$ (Figura 4, Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos experimentos de microperfusão.

P_f ($\mu\text{m/s}$)				
n	Controle	Carba	Recuperação	
6	12,31 \pm 3,54	62,57 \pm 14,83**	17,43 \pm 5,48 ⁺⁺	
n	Controle	Carba	Carba+H8	Carba
4	15,00 \pm 9,01	106,11 \pm 12,31**	60,30 \pm 16,40 ⁺⁺	44,50 \pm 13,20
n	Controle	Carba	Carba+AV2	Carba
6	23,55 \pm 5,25	37,36 \pm 4,38**	19,65 \pm 5,01 ⁺	21,43 \pm 5,51
n	Controle	AV2	AV2+Carba	AV2
4	23,14 \pm 6,52	32,67 \pm 6,16	29,39 \pm 5,19	37,26 \pm 5,71

**p<0,01 vs. Controle; ⁺⁺p<0,01 vs. Carba; ⁺p<0,05 vs. Carba

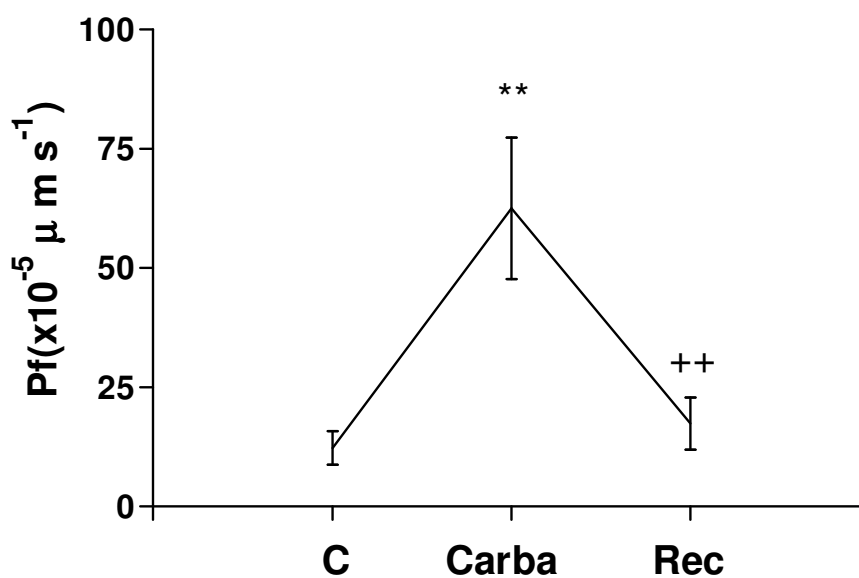


Figura 1. Efeito da Carbamazepina sobre a permeabilidade osmótica em ratos Wistar normais (n=6); ** p<0,01 vs. Controle (C) e ++p<0,01 vs. Carba.

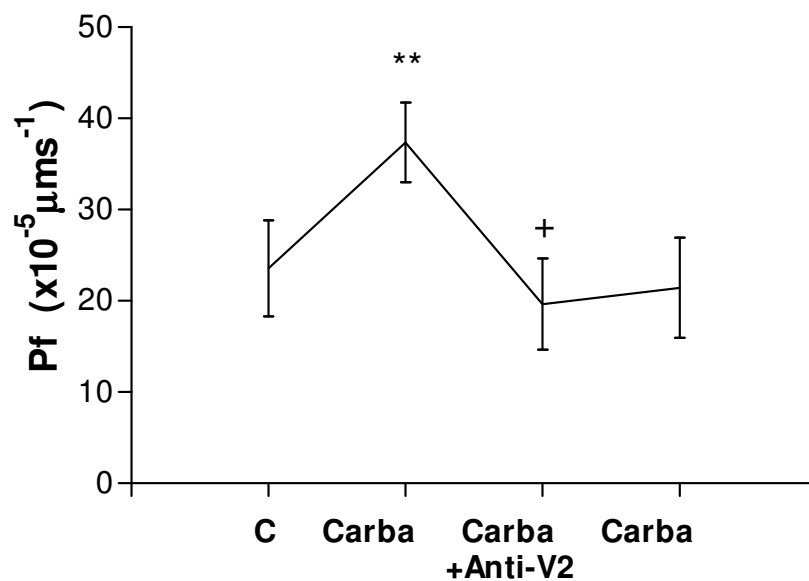


Figura 2. Efeito da Carbamazepina mais Anti-V2 sobre a permeabilidade osmótica em ratos Wistar normais (n=6); ** p<0,01 vs. Controle (C); e +p<0,05 vs. Carba.

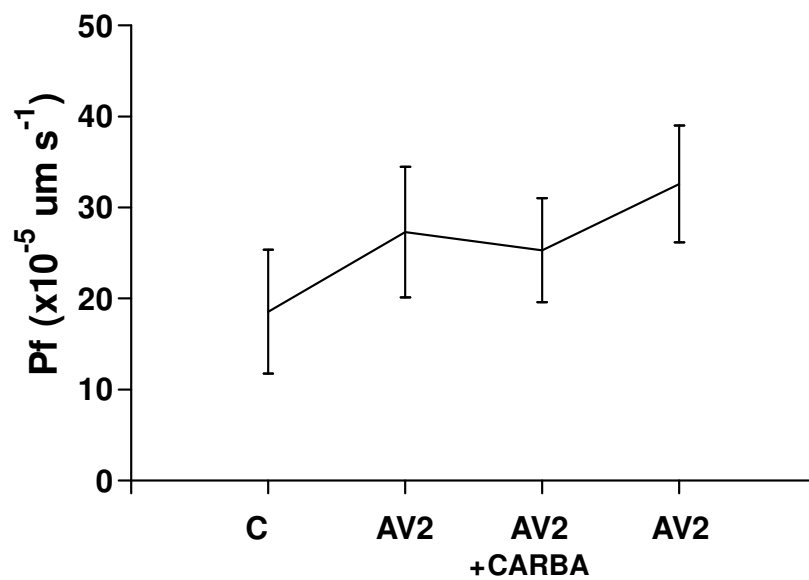


Figura 3. Efeito do Anti-V2 mais Carbamazepina sobre a permeabilidade osmótica em ratos Wistar normais (n=4).

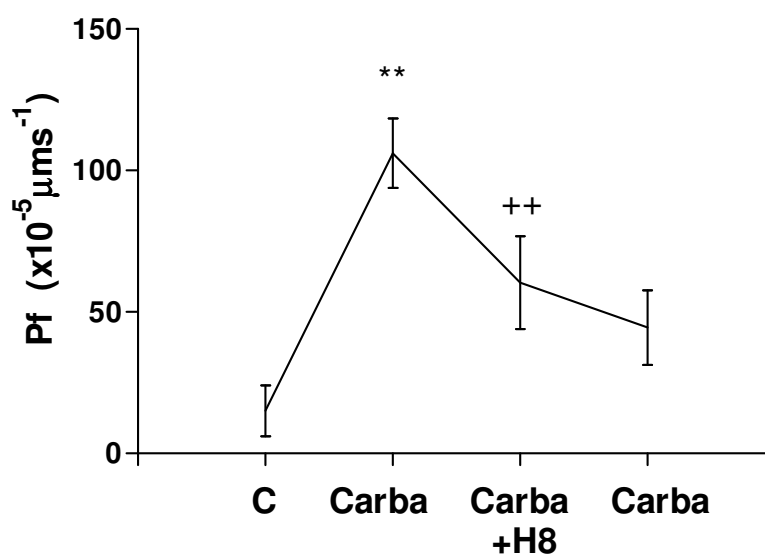


Figura 4. Efeito da Carbamazepina mais H8 sobre a permeabilidade osmótica em ratos Wistar normais (n=4); ** p<0,01 vs. Controle (C); e ++p<0,01 vs. Carba.

4.1.2 Suspensão de túbulos

Na suspensão de túbulos incubada com Carba na concentração de 10^{-5}M , as bandas para AQP2 apresentaram maior intensidade quando comparadas com o grupo Controle. A média das incubações do grupo Controle foi de $100,0 \pm 8,3$, e a média das incubações do grupo Carba foi de $138,8 \pm 12,12$ (Figura 5).

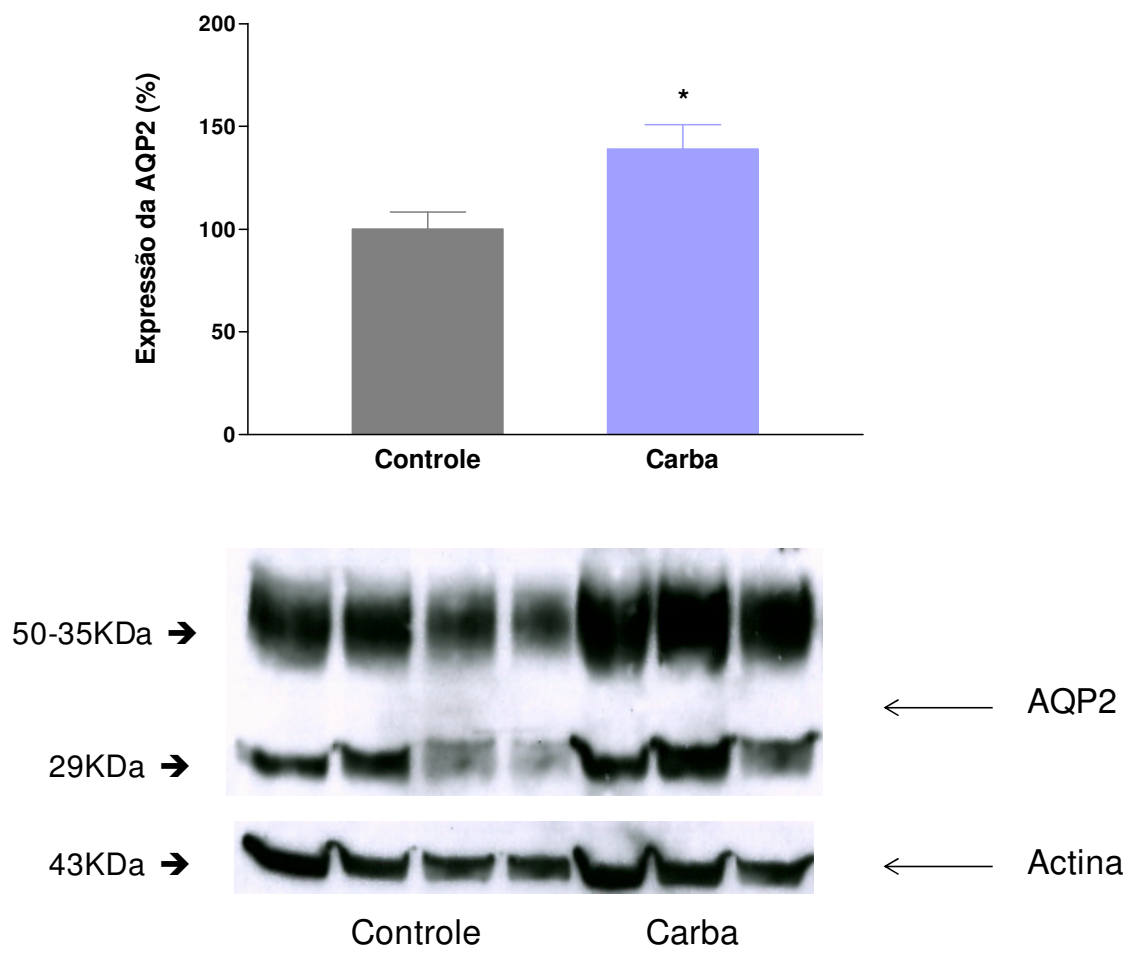


Figura 5. Análise por *Western blotting* das incubações de suspensão de túbulos. Bandas de 29 KDa e 35-50 KDa para AQP2 e 43 KDa para Actina; * $p < 0,05$ vs. Controle. Controles $n = 4$, Carba $n = 3$.

4.2 Estudos *in vivo*

O lítio na concentração de 40 mmol/Kg/dieta induziu Diabetes Insípido (DI) nos animais que receberam o tratamento por 3 semanas, demonstrado pelo aumento do volume urinário e da ingestão de água (Tabela 3). A Carba conseguiu reverter a poliúria induzida pelo

lítio quando administrada juntamente com esse sal (Tabela 3). A osmolalidade urinária foi menor em todos os grupos quando comparada com o grupo Controle, e a Carba aumentou a osmolalidade urinária quando comparada com o grupo Li e Li+Carba apenas (Tabela 3).

Os animais controle e os que receberam Carba tiveram um ganho de peso ao final do experimento, e ambos os grupos de animais que receberam lítio tiveram perda de peso (Tabela 3).

Nenhuma diferença foi observada na Fração de excreção (Fe) de sódio e de potássio nos grupos analisados (Tabela 3).

A creatinina plasmática foi semelhante em todos os grupos estudados (Tabela 3).

O lítio plasmático não foi detectado nos grupos Controle e Carba, e foi detectado nos grupos Li e Li+Carba, mas nenhuma diferença estatística foi encontrada entre esses dois grupos (Tabela 3).

O sódio e o potássio plasmático não se alteraram em nenhum dos grupos estudados (Tabela 3).

A análise por *Western blotting* da expressão da Aquaporina 2 revelou que os animais que receberam lítio tiveram a expressão da Aquaporina 2 reduzida cerca de 50% quando comparadas com o grupo controle (Figura 6). O tratamento com a Carba juntamente com o Li conseguiu reverter em parte essa diminuição da expressão da Aquaporina 2 (Figura 6). O tratamento apenas com a Carba não alterou a expressão da Aquaporina 2 quando comparada com o grupo Controle e grupo Li+Carba, mas foi mais intensa em relação ao grupo Li (Figura 6).

Tabela 3. Resultados bioquímicos dos grupos estudados.

	Controle (n=5)	Lítio (Li) (n=4)	Lítio(Li)+Carba (n=5)	Carba (n=5)
Peso dos animais (g)	306,4±14,12	179,0±11,98 ^a	132,5±7,77 ^a	270,8±19,04 ^{d,f}
Volume urinário (mL/dia)	10,68±3,0	62,60±6,0 ^a	28,50±4,9 ^{c,d}	23,31±3,0 ^{c,d}
Ingestão de água (mL/dia)	9,4±3,37	66,0±7,65 ^a	47,75±2,29 ^{a,e}	35,0±3,88 ^{b,d}
U_{Osm} (mOsm/Kg/H₂O)	819,6±175,7	149,4±18,05 ^b	251,5±39,74 ^{b,e}	396,2±75,46 ^b
FENa (%)	0,15±0,01	0,10±0,03	0,12±0,02	0,11±0,02
FEK (%)	7,80±0,79	8,29±0,74	7,67±1,22	7,81±0,41
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,38±0,03	0,32±0,02	0,29±0,02	0,33±0,02
Lítio plasmático (mEq/L)	Não detectável	0,13±0,02	0,17±0,05	Não detectável
Na plasmático (mEq/L)	141,6±2,7	143,8±1,0	146,0±0,9	146,0±1,1
K plasmático (mEq/L)	4,4±0,15	4,2±0,25	3,9±0,2	4,5±0,1

U_{Osm}, Osmolalidade urinária; Fe Na, fração de excreção de sódio; Fe K, fração de excreção de potássio.

^ap<0,001 vs. Controle; ^bp<0,01 vs. Controle; ^cp<0,05 vs. Controle; ^dp<0,001 vs. Li; ^ep<0,05 vs. Li; ^fp<0,001 vs. Li+Carba.

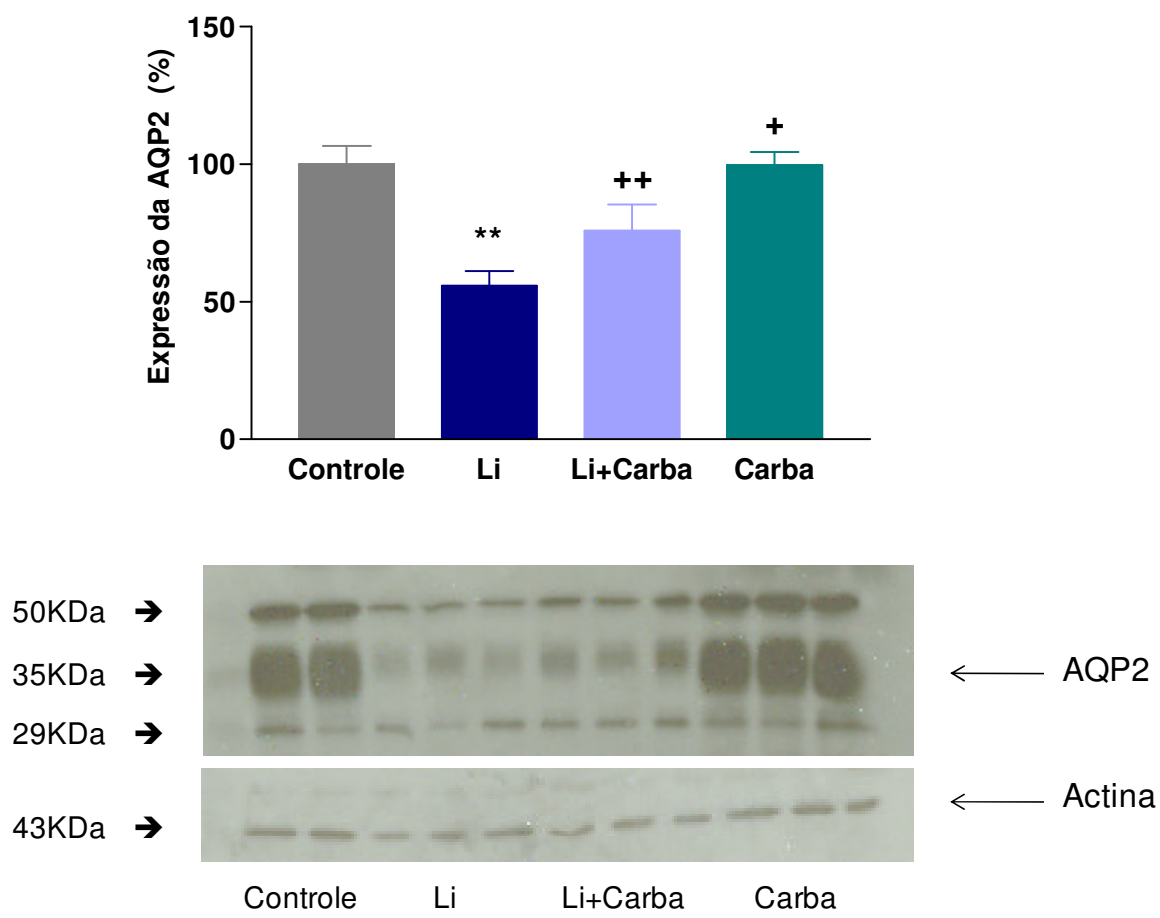


Figura 6. Análise por *Western blotting* dos animais tratados. Bandas de 29 KDa e 35-50 KDa para AQP2 e 43 KDa para Actina; ** $p < 0,01$ (vs. Controle); + $p < 0,05$ (vs. Li); e ++ $p < 0,01$ (vs. Li).

DISCUSSÃO

A integração do “sistema” sede-HAD-rim permite que mesmo com grandes variações na ingesta líquida a osmolalidade do organismo seja mantida mais ou menos constante. Quando a osmolalidade dos líquidos corporais sobe acima do normal, a Neurohipófise secreta mais HAD, que aumenta a permeabilidade à água dos túbulos distais e dos ductos coletores. Isto permite que grandes quantidades de água sejam reabsorvidas, diminuindo o volume urinário sem alterar acentuadamente a taxa de excreção renal dos solutos. Quando há excesso de água no corpo e a osmolalidade do líquido extracelular for reduzida, a secreção de HAD pela hipófise será diminuída, reduzindo assim a permeabilidade dos túbulos distais e dos ductos coletores à água, o que causa a excreção de grandes quantidades de urina diluída. Deste modo, a presença ou ausência de HAD determina a excreção renal de urina diluída ou concentrada.

Alterações do balanço de água no organismo podem levar ao aumento ou à diminuição da reabsorção de água no último segmento do néfron, implicando em patologias tais como hiponatremias ou hipernatremias. Estas alterações podem ser devido, entre outras causas, ao efeito de algumas drogas que interferem com a ação do HAD.

O tratamento crônico com o lítio diminui dramaticamente a expressão da Aquaporina 2 nos ductos coletores medulares levando ao um declínio na osmolalidade urinária e a um aumento da polidipsia e a uma severa poliúria (32).

De acordo com relatos, o uso da carbamazepina pode levar a um quadro de hiponatremia, em decorrência do aumento da reabsorção de água (19,20). O presente estudo teve como objetivo estudar o efeito da carbamazepina no ducto coletor medular interno e no Diabetes Insípido Nefrogênico induzido pelo tratamento com o lítio.

Perfusão *in vitro* – Neste grupo de experimento foi determinada a permeabilidade osmótica à água do ducto coletor medular interno na ausência de HAD e na presença de

Carba. Nosso estudo mostrou, que no grupo de experimentos onde adicionamos a Carba ao banho do sistema de microperfusão na ausência de HAD, a permeabilidade à água aumentou, ou seja, houve aumento da reabsorção de água, demonstrando que a droga age no ducto coletor renal, podendo explicar a hiponatremia dilucional observada em pacientes que fazem uso deste anticonvulsivante. Em seguida, para verificar em que ponto da cascata de eventos celulares do HAD a Carba estaria agindo, a Pf foi determinada em experimentos com o bloqueio da PKA (H8) e com o bloqueio do receptor V2 (Anti-V2). Nossos dados, demonstraram que a Carba aumentou a permeabilidade à água e que age no receptor V2, uma vez que o uso de bloqueadores deste receptor impediu a sua ação. O uso do inibidor H8 também impediu a ação da Carba evidenciando que a sua ação se dá antes da estimulação da PKA. Este resultado mostra uma ação direta da Carba sobre o DCMI, como havia sido sugerida por Meinders e cols. (21).

Estudos *in vivo* – Com o intuito de estudar o efeito da Carba em um estado aonde houvesse uma diminuição ou uma ausência da ação do HAD, foi administrado aos animais o cloreto de lítio, que reconhecidamente produz DIN. Desta forma poderíamos demonstrar o efeito “secundário” deste anticonvulsivante, já evidenciado nos experimentos *in vitro*, isto é, o efeito de aumentar a reabsorção de água, em ratos com DIN, confirmando o seu uso terapêutico nos DIs.

Peso – Os resultados encontrados mostraram uma redução do peso dos animais que receberam lítio e com a adição de Carba no grupo Li+Carba não houve alteração estatisticamente significativa do peso (Tabela 3). É conhecido que o lítio causa redução de peso (31), entretanto, nada se sabe sobre o efeito da Carba no peso de animais de experimentação.

Ingestão de água, volume urinário e osmolalidade urinária – Os resultados mostraram que os animais que receberam lítio apresentaram aumento do volume urinário e da

ingestão de água e uma diminuição da osmolalidade urinária que foi revertida, em parte, pela adição da Carba à dieta. A poliúria é um dos efeitos secundários mais comuns do tratamento com o lítio porque os pacientes apresentam uma redução da capacidade de concentração urinária induzida por esta droga (30,31). A concentração e a diluição urinária depende da presença e da distribuição de propriedades de transportes ao longo do túbulo renal, e a concentração urinária depende da hipertonicidade medular do interstício, o qual é gerado pela reabsorção ativa de NaCl em consequência da multiplicação do sistema de contracorrente nos segmentos do néfron impermeáveis à água, e pela alta permeabilidade à água no segmento do ducto coletor renal sensível à ação do HAD para que ocorra um equilíbrio osmótico (30). Qualquer distúrbio neste mecanismo, a concentração urinária fica prejudicada. De acordo com a literatura, a Carba tem a capacidade de diminuir o volume urinário promovendo uma antidiurese (17,18), isto foi visto após a adição de Carba à dieta do grupo Li+Carba.

O grupo Carbamazepina demonstrou um aumento na ingestão de água quando comparado com o grupo Controle. Este foi um fato inesperado e de difícil compreensão, entretanto, poderia se pensar em um efeito dipsogênico em vez de uma capacidade da Carbamazepina de aumentar a secreção do HAD. Esta hipótese ainda não foi relatada até o momento, e se verdadeira, poderia pelo menos em parte, contribuir para a produção de uma hiponatremia, mas esse achado requer uma investigação mais profunda.

Expressão da Aquaporina 2 - A expressão da AQP2 foi determinada nos ductos coletores de ratos previamente tratados com Li e Li+Carba e nos ductos coletores de ratos normais incubados com a Carba. Os resultados encontrados, nos dois grupos, mostraram que a Carba promoveu um aumento da expressão da AQP2, confirmando os dados encontrados nos experimentos de microperfusão. O tratamento crônico com o lítio diminuiu dramaticamente a expressão da AQP2 nos ductos coletores medulares, e está associado com uma dificuldade de

concentração urinária como foi demonstrado na figura 6 e pelos dados de gaiola metabólica deste estudo. O ducto coletor é responsável pelo ajuste final de água, ou seja, o que deve ou não ser eliminada na forma de urina, e ainda a permeabilidade à água no ducto coletor é regulada pela ação do HAD (30). De acordo com estudos, o lítio, no epitélio renal, inibe a via de transdução de sinal do AMPc pela competição com o magnésio para a ativação da proteína G, o qual inibe a ativação da adenilciclase sensível à vasopressina (HAD). O AMPc, por sua vez inibido, bloqueia a ação do HAD, o que pode ser a causa da diminuição da expressão da AQP2, o que resulta na diminuição da permeabilidade osmótica à água no ducto coletor sendo um fator chave na etiologia da diurese observada no tratamento com o lítio (30,32). A Carba conseguiu reverter cerca de 20% desta inibição produzida pelo lítio. De acordo com nossos experimentos de microperfusão, a Carba aumenta a permeabilidade à água, aumentando, assim, a reabsorção de água no ducto coletor medular interno, podendo explicar esse aumento da expressão da AQP2, quando comparado com o grupo lítio apenas.

Nossos resultados mostraram que de fato a Carba foi capaz de diminuir o volume urinário e de aumentar a osmolalidade urinária nos animais com DIN, revertendo parcialmente os efeitos do lítio. Esta associação de drogas já havia sido descrita na literatura sem, no entanto, ter sido explicada a sua fisiopatologia. O efeito observado da Carba não foi o de retorno total aos níveis normais, mas de resolução parcial, porém produzindo uma diminuição cerca de 45% do volume urinário. Levando-se em consideração que o aumento do volume urinário é uma queixa freqüente dos pacientes que fazem uso do lítio, esta diminuição é significativa, colaborando com a adesão ao tratamento pelo paciente psiquiátrico.

CONCLUSÃO

Os experimentos de microperfusão confirmaram a hipótese de que a Carbamazepina aumenta a permeabilidade à água, promovendo a sua reabsorção da luz para o interstício no ducto coletor medular interno e que provavelmente a droga age no complexo Receptor V2-Proteína G na membrana basolateral.

O aumento da expressão da AQP2 nos ductos coletores que estiveram em contato com a Carbamazepina confirma os achados dos experimentos de microperfusão.

Embora não tenham sido feitas dosagens de HAD circulante, nossos dados trazem uma forte evidência de que a hiponatremia encontrada em pacientes que fazem uso da Carbamazepina é devido ao efeito “vasopressin like” desta droga e com muita probabilidade, não devido a uma secreção inapropriada do HAD, como sugerem trabalhos da literatura.

Os dados encontrados neste estudo mostraram que a Carbamazepina diminuiu o volume urinário, aumentou a osmolalidade urinária e a expressão da AQP2 no Diabetes Insípido induzido pelo lítio. A diminuição da poliúria e da polidipsia evidenciam que esta associação de drogas é benéfica ao paciente psiquiátrico, do ponto de vista de adesão ao tratamento com o lítio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gon, KP. Management of Hyponatremia. *American Family Physician* 69(10):2388, 2004
2. Van Amelsvoort T, Bakshi R, Devaux CB, Schwabe S. Hyponatremia associated with carbamazepine and oxcarbamazepine therapy: a review. *Epilepsia* 35(1): 181-8, 1994.
3. Lahr MB. Hyponatremia during carbamazepine therapy. *Clin Pharmacol Ther* 37:693-6, 1985.
4. Ranta A, Wooten GF. Hyponatremia due to an additive effect of carbamazepine and thiazide diuretics. *Epilepsia* 45(7):879, 2004.
5. Cheidde L, Schor N. Revisão: transportadores de água. *Rev Ass Med Brasil* 45(1):71-8, 1999.
6. Burg MB, Green N, Function of the thick ascending limb of the Henle's loop. *Am J Physiol.* 1973; 224:659-668.
7. Rocha, AS, Kokko JP. Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. *J. Clin Invest.* 1973; 52:612-624.
8. Sands JM, Kenepper M, Spring KR. Na-K-Cl cotransport in apical membrane of rabbit renal papillary surface epithelium. *Am J Physiol.* 1986; 251:F475-480.
9. Jamison RL, Bennett CM, Berliner RW. Countercurrent multiplication by the thin loops of Henle. *Am J Physiol.* 1967; 212:357-366.
10. Kokko JP, Rector FC Jr. Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. *Kidney Int.* 1972; 2:214-223.
11. Abramow M, Beauwens, Cogan E. Cellular events in vasopressin action. *Kidney Int.* 1987; 323 (suppl 21): S-56-66.
12. Brenner BM., Rector Jr FC. *The Kidney.* 6^o edition. W.B.Saunders Company, Phil., 2000.

13. Magaldi AJB., Seguro AC. Bases moleculares da Nefrologia. Atheneu vol.3:25, 2004.
14. Magaldi AJB. Fisiologia Renal. Atheneu vol.2:57, 2000.
15. Nielsen S, Kwon TH, Frokiaer J, and Agre P. Regulation and dysregulation of Aquaporins in water balance disorders. *Jornal of Internal Medicine* 2007; 261:53-64.
16. Nielsen S, Kwon T, Christensen BM, Promeneur D, Frokler J and Marples D. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:647-663.
17. Bickler RN. Treatment of diabetes insipidus with carbamazepine. *Lancet* 2(7988): 749, 1976.
18. Moses AM., Miller M. Drug-induced dilutional hyponatremia. *Medical Progress*, 291(23):1234, 1974.
19. Singh AN. Fluid retention during treatment with carbamazepine. *Can Med Assoc J* 118:24, 1978.
20. Lane RM. SSRIs and hyponatraemia. *Br J Clin Pract.* 51:144, 1997.
21. Meinders AE et al. The antidiuretic action of carbamazepine in man. *Clin Sci Mol Med* 47:289, 1974.
22. Stephens WP et al. Plasma arginine vasopressin concentrations and antidiuretic action of carbamazepine. *Br Med J* 1:1445, 1978.
23. Kamiyama T et al. Carbamazepine- induced hyponatremia in a patient with partial central Diabetes Insipidus. *Nephron* 64:142, 1993.
24. Gold PW et al. Carbamazepine diminishes the sensitivity of the plasma arginine vasopressin response to osmotic stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 57:952, 1983.
25. Yeates KE., Singer M., Morton AR. Salt and Water: a simple approach to hyponatremia. *CMAJ* 170(3):365, 2004.

26. Hawkins RC. Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia. *Clinica Chimica Acta* 337:169, 2003.
27. Milionis HJ., Liamis G.L., Elisaf MS. The hyponatremic patient: a systematic approach to laboratory diagnosis. *CMAJ* 166(8):1056, 2002.
28. Kumar S., Berl T. Diseases of water metabolism. *Lancet* vol.352(9123):220, 1998.
29. Chan TY. Drug-induced syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. Causes, diagnosis and management. *Drugs Aging* 11(1):27-44, 1997.
30. Kwon Tae-Hwan, Laursen UH, Marples D, Maunsbach AB, Knepper MA, Frokiaer J, and Nielsen S. Altered expression of renal AQP2 and Na⁺ transporters in rats with Lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F552-F564, 2000.
31. Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, and Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 95: 1838-1845, 1995.
32. Timmer, RT and Sands, MJ. Lithium Intoxication. *J Am Soc Nephrol* 10: 666-674, 1999.
33. Magaldi AJ et al. Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch* 447:223, 2003.
34. Bois DR, Verniory A, Abramow M.. Computation of the osmotic water permeability of perfused tubule segments. *Kidney Int.* 1976; 10:478-479.
35. Shaw S, Marples D. A rat kidney tubule suspension for the study of vasopressin-induced shuttling of AQP2 water channels. *Am J Physiol.* 2002; 283:F1160-F1166.
36. Burnette W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic

detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* (112):195–203, 1981.

APÊNDICE



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0500/07**, intitulado: **"EFEITO DA CARBAMAZEPINA NA REABSORÇÃO DE ÁGUA PELO DUCTO COLETOR MEDULAR INTERNO (DCMI) DE RATOS WISTAR"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **ANTÔNIO JOSÉ BARROS MAGALDI**

Pesquisador (a) Executante: **ANA CAROLINA DE BRAGANÇA**

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)