

Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal: Canais iônicos nas células do epitélio tubular renal

Antonio C Cassola

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
Endereço para correspondência: Antônio C. Cassola
Av. Lineu Prestes, 1524
05508-900 São Paulo, SP
E-mail: cassola@fisio.icb.usp.br.

Canais iônicos: fundamentos

A matriz das membranas celulares, plasmática ou de organelas, é a bicamada lipídica. Os lipídios de membrana – fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e colesterol – são moléculas que no seu eixo maior têm caráter anfipático, com uma extremidade hidrofílica e a outra hidrofóbica. Estruturas moleculares hidrofílicas são aquelas que interagem com a água. O ângulo entre as ligações covalentes dos hidrogênios com o oxigênio faz da molécula de água um dipolo, capaz de interações eletrostáticas e ávido por formação de pontes de H com grupamentos -OH, inclusive de outras moléculas de água, e -NH. Portanto, domínios moleculares hidrofílicos são aqueles que têm carga elétrica resultante ou a capacidade de formar pontes de H. Em meio aquoso a estrutura supramolecular mais estável para os lipídios de membrana é a bicamada lipídica, com os domínios hidrofílicos voltados para a fase aquosa, interagindo com a água, e os domínios hidrofóbicos constituindo o cerne da membrana, sem interação mais forte que as fracas forças de Van der Waals. O cerne hidrofóbico da bicamada lipídica constitui, portanto, barreira para o fluxo das espécies químicas hidrofílicas. A travessia da membrana por essas substâncias dá-se por estruturas especializadas, canais ou carregadores, que são proteínas de membrana, codificadas geneticamente.

Os canais são poros. As proteínas formam uma via razoavelmente hidrofílica que transpassa a bicamada lipídica. Com algumas exceções, os canais são vias para a passagem de íons inorgânicos. As dimensões restritas dos canais forçam a interação do íon com resíduos de aminoácidos da proteína e, por essas interações, os canais são seletivos.

O fluxo de íons pelos canais é passivo, movido pela concentração, pelo movimento térmico e pela diferença de potencial elétrico na membrana celular. Assim, o fluxo resultante de um íon pelos canais, que lhe são seletivos, dependerá da diferença de concentração entre os compartimentos intra e extracelulares e da diferença de potencial elétrico na membrana celular.

As oscilações térmicas dos átomos na molécula de proteína induzem incessantes modificações na sua conformação. Probabilisticamente, a proteína assume conformações que correspondem a estado condutivo (aberto) do canal ou não condutivo (fechado). Variáveis diversas como a diferença de potencial elétrico na membrana, ligação de compostos à proteína do canal, fosforilação e ligação à proteína de íons outros que não os que passam pelo canal mas têm afinidade por sítios da proteína podem modificar a probabilidade das conformações, favorecendo ou o estado fechado ou o aberto do canal. Os canais, então, são dependentes ou de voltagem, ou de mediadores, ou de ATP ou de Ca^{2+} .

Canais iônicos e o transporte de íons pelas células tubulares

Os túbulos renais são formados por células epiteliais. A característica que distingue o fenótipo celular epitelial é a diferenciação de dois domínios de membrana celular, o apical e o basolateral, definidos pelas junções intercelulares de tipo “tight junctions”. Os dois domínios contêm diferentes tipos de proteínas com funções de transporte como carregadores ou como canais. Essa diferenciação dos domínios, a que alguns autores costumam chamar de polarização da célula, permite o transporte vetorial das espécies químicas, que é a função dos epitélios, no sentido da absorção ou da secreção.

Túbulos proximais

Os túbulos proximais fazem a reabsorção maciça do ultrafiltrado glomerular, liberando para a porção descendente da alça de Henle 40% do volume que

Cassola AC - Canais iônicos

penetrou na cápsula de Bowman. Solutos orgânicos de baixo peso molecular que passaram pela membrana glomerular, como glicose e aminoácidos, são totalmente reabsorvidos nesse segmento. Contudo, a reabsorção é praticamente isotônica, pois a permeabilidade elevada do epitélio à água não lhe permite estabelecer diferenças de pressão osmótica. À subtração de solutos luminiais segue-se invariavelmente a reabsorção de água. Na Figura (A) tem-se um esquema da célula tubular proximal com os tipos fundamentais de transportadores. Na membrana basolateral, e só nela, estão as bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. O transporte por essas ATPases demanda ATP e é um dos poucos processos, na reabsorção, em que a energia metabólica é diretamente utilizada. Essas bombas transportam 3 Na^+ , da célula para o espaço intersticial, mantendo a concentração citosólica desse íon em torno de 10 mM , abaixo, portanto, da concentração do íon na luz e no plasma. O Na^+ , transportado pela bomba, vem do espaço luminal e é, assim, reabsorvido. As vias de transporte, na membrana apical, são carregadores que fazem co-transporte, como os carregadores para glicose e aminoácidos, ou contra-transporte, como o trocador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$. Nesses transportadores, a energia livre da diferença de concentração do Na^+ entre o citosol e o lúmen é, em parte, transferida para a diferença de concentração da espécie química de transporte acoplado. Em segmentos S1 e S2 de túbulos proximais não se observaram canais para Na^+ , que teriam efeito dissipativo da diferença de concentração do íon. Em segmentos S3, em que o fluido luminal é escasso de solutos orgânicos e o pH é relativamente ácido, há algumas evidências, não categóricas, de que as células expressariam canais para Na^+ de tipo sensível a amiloride.

A bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transporta, em um ciclo, 2 K^+ e 3 Na^+ . Os canais para K^+ da membrana basolateral são necessários para a recirculação desse íon. Não fossem eles, a concentração intracelular do K^+ cresceria a valores limitantes da atividade da bomba. Esses canais ainda asseguram a condutância elétrica da membrana, mais elevada a K^+ , que determina a diferença de potencial elétrico na membrana lateral, em torno de -70 mV (compartimento intracelular eletricamente negativo em relação ao extracelular). A fenomenologia desses canais foi já bastante estudada, tanto por técnicas de avaliação indireta da expressão eletrofisiológica deles, como por registros de canais unitários, por "patch clamping". Esses canais são do tipo retificador "para dentro". A probabilidade do estado aberto do canal se reduz com

a queda do pH intracelular e com a elevação da relação ATP/ADP no citosol. Há evidências convincentes de que, pela sensibilidade do canal aos nucleotídeos, a atividade desse seja modulada em nível adequado à atividade da bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$.¹ A estrutura molecular do canal ainda não foi determinada. Todavia, as propriedades do canal sustentam a conjectura de que pertença à classe estrutural dos canais com dois segmentos intramembrânicos.

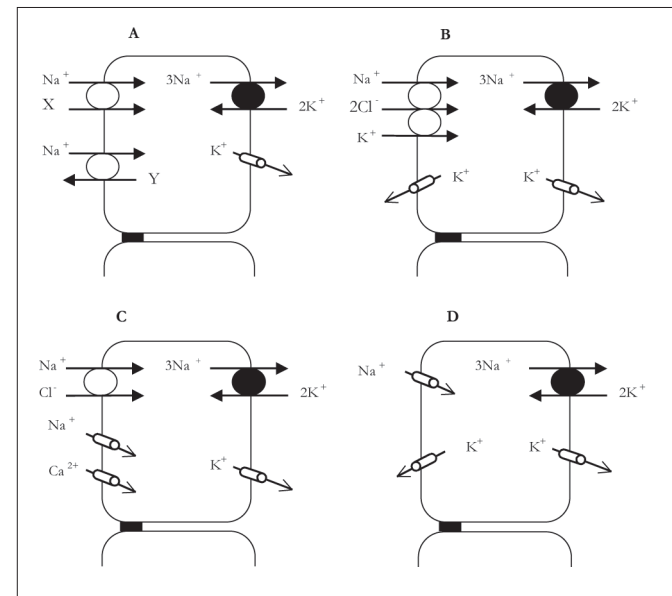


Figura – Esquemas dos processos de transporte nas membranas celulares, nos vários segmentos do néfropo. A: túbulo proximal, B: ramo ascendente espesso da alça de Henle, C: túbulo distal, D: duto coletor. Os círculos negros representam bombas que hidrolisam o ATP para efetuar a transferência dos íons indicados, na direção das setas. Os círculos brancos indicam transportadores com acoplamento, que não utilizam diretamente energia metabólica. Os cilindros representam canais. As setas, vazando os cilindros, indicam a direção do fluxo resultante do íon, nas condições fisiológicas.

Ramo ascendente espesso da alça de Henle

O ramo ascendente espesso da alça de Henle se situa em parte na medula e em parte no córtex. Na proposta de revisão da nomenclatura, esse segmento passaria a ser considerado a porção reta do túbulo distal, estendendo-se da porção fina ascendente da alça de Henle até a mácula densa, no glomérulo. O ramo ascendente espesso reabsorve sais, diluindo o fluido luminal pois o epitélio é impermeável à água. A porção medular do segmento produz o efeito unitário do sistema contracorrente multiplicador que gera a hipertonicidade medular.

Os transportadores fundamentais para a reabsor-

ção de NaCl são mostrados no esquema da Figura (B). Como em todas as células do epitélio do nefro, na membrana basolateral estão as bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, que utilizam energia metabólica e mantém baixa a concentração citosólica de Na^+ e elevada a de K^+ . Na membrana basolateral, canais seletivos possibilitam o efluxo de K^+ , transportado para o citosol pela bomba. Esses canais conferem à membrana a permeabilidade predominante ao íon K^+ e formam a via condutiva pela qual o fluxo desses íons prepondera na determinação da diferença de potencial elétrico na membrana celular.

O co-transporte $\text{Na}^+ - 2\text{Cl}^- - \text{K}^+$, que opera na membrana apical, é fundamental para a reabsorção de NaCl. As células do ramo ascendente espesso parecem ser as únicas a expressar essa proteína. O transportador eleva as concentrações intracelulares do Cl^- acima do valor de equilíbrio e cria, portanto, a força que transfere o ânion através da membrana basolateral, por canais ou por co-transporte. O transportador não está implicado na reabsorção do K^+ , pois o íon retorna ao lúmen por canais para K^+ e a sua ligação ao transportador assegura que, em um ciclo de transporte, não ocorra transferência resultante de carga elétrica. Como são transportadas duas cargas negativas e duas positivas a cada ciclo, o campo elétrico da membrana apical não interfere nas forças que determinam o transporte. Esse é determinado apenas pelas diferenças de concentração das espécies químicas transportadas. Dessa forma, os canais para K^+ , ao permitir a recirculação do íon, determinam o ritmo de transporte de NaCl pelo segmento.

Os canais para K^+ da membrana apical foram exaustivamente estudados pela técnica de "patch clamp". São canais do tipo retificador para dentro, com condutância máxima de 30-35pS. A probabilidade de estarem no estado aberto é reduzida por pH baixo e pela razão ATP/ADP. Quando a relação se eleva o canal é inibido. O cDNA para a proteína do canal foi clonado, e a seqüência de aminoácidos determinada.² Desde então o canal, a proteína e o gene correspondente foram denominados ROMK (Renal outer medulla K channel). As informações disponíveis indicam que o canal pertence à classe estrutural dos canais para K^+ com dois segmentos intramembrânicos. O canal se forma por tetramerização da proteína. Ainda não se sabe de subunidades reguladoras para o canal, à semelhança do SUR (receptores para sulfoniluréias), associados a canais para K^+ de propriedades semelhantes, expressos por células pancreáticas β .

Túbulo distal

O túbulo distal, ou, na nova nomenclatura, porção convoluta do túbulo distal, localiza-se no córtex renal e estende-se da mácula densa ao segmento de conexão, que é um segmento de transição entre túbulo distal e duto coletor cortical. O túbulo distal convoluto, curto e frágil na dissecação, não é bem conhecido. Na Figura (C) tem-se os mecanismos de transporte para os quais há boas evidências experimentais. Como nos demais segmentos, na membrana basolateral há bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e canais para K^+ . No domínio apical há co-transportadores $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$, alvos dos diuréticos da classe dos tiazídicos. Há boas evidências de que, na membrana apical, haja canais para Ca^{2+} . O íon entraria nas células, em fluxo resultante movido pela diferença de concentração e de potencial elétrico na membrana apical, e seria transportado de volta ao plasma pelo trocador $\text{Na}^+ \text{x} \text{Ca}^{2+}$ e pela bomba de Ca^{2+} , ambos na membrana basolateral.

O transporte de Ca^{2+} pelas células tubulares é inibido pelo verapamil e por dihidropiridinas, como a nifedipina. Esses inibidores afetam os canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem, de tipo L. Todavia, a clonagem por homologia revelou a expressão, em tecido renal, de subunidades α_{1A} , que são produtos do gene CaCh4.³ Essas subunidades formam canais classificados como P, característicos de neurônios, e que não são sensíveis aos bloqueadores discutidos acima. Portanto, a caracterização funcional e molecular dos canais para Ca^{2+} do epitélio tubular renal é ainda bastante incompleta.

Duto Coletor

As características funcionais e os fenótipos celulares desse segmento variam axialmente, a ponto de, funcionalmente, subdividir-se o duto coletor em cortical e medular. O duto coletor cortical é um segmento com dois tipos de células, as intercalares e as principais. As células intercalares, conforme o subtipo, α ou β , secretam H^+ ou bicarbonato e conferem ao rim competência para intervir no equilíbrio ácido-base. As células principais reabsorvem Na^+ e secretam K^+ sob o controle dos hormônios aldosterona e arginina vasopressina, que é o hormônio antidiurético. Como as células de qualquer outro segmento, as principais têm, na membrana basolateral, bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e canais para K^+ , pelos quais a difusão do íon compensa o influxo pela bomba e contribui preponderantemente para o estabelecimento da diferença de potencial elétrico na membrana basolateral. Na membrana apical há canais para Na^+ e para

Cassola AC - Canais iônicos

K⁺. Os canais para K⁺ são do tipo ROMK, proteínas iguais às dos canais do ramo ascendente espesso da alça de Henle. Os canais para Na⁺ são identificados farmacologicamente pela sensibilidade ao amiloride e, mais recentemente, foram denominados ENaC (epithelial Na channels). Esses canais são formados por três proteínas homólogas, α , β e γ . Admite-se, pelas características dos aminoácidos, que cada uma dessas subunidades assumam conformação que inclui dois segmentos na membrana, com os terminais C e N no citoplasma e um longo segmento extracelular. É possível que a estequiometria das subunidades varie em diferentes células epiteliais. As evidências acumuladas indicam que a subunidade α forma o poro. A aldosterona estimula a reabsorção de Na⁺ nesse segmento. Um dos mecanismos do efeito é o aumento da síntese de proteínas do ENaC e, portanto, aumento da atividade dos canais. A insulina age em células epiteliais aumentando a atividade dos ENaC por mecanismos diferentes daqueles da aldosterona, pois as ações dos dois hormônios se somam. Quanto à função renal, o significado da ação da insulina sobre canais para Na⁺ está por esclarecer. Um segundo tipo de canal para Na⁺ inibido por amiloride, expresso em células tubulares, é o canal sensível a guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (cGMP). Níveis elevados do cGMP inibem o canal. Embora mRNA para a proteína desse canal tenha sido detectado por RT-PCR em praticamente todos os segmentos do nefro, a expressão de canais funcionais foi demonstrada inequivocamente em duto coletor da medula interna. Nessa região os canais para Na⁺ sensíveis a cGMP são a via principal para a entrada do íon na célula, pela membrana apical. O fator natriurético atrial, ao induzir o aumento de cGMP, inibe esse canal, reduzindo a reabsorção do Na⁺. A expressão de canais desse tipo em outros segmentos do nefro não foi demonstrada.

Alterações patológicas da função renal associadas a mutações em canais iônicos

Com as técnicas de biologia molecular desenvolvidas nas últimas décadas demonstrou-se que algumas doenças renais ou associadas a modificações da função renal têm como causa mutações em genes cujos produtos são canais iônicos, expressos em células tubulares. Essas mutações resultam em alterações nas propriedades dos canais, com alterações nas funções tubulares.

Síndrome de Liddle

A síndrome de Liddle, ou pseudoaldosteronismo, é uma forma de hipertensão humana, autossômica e do-

minante, descrita em 1963. Os portadores da síndrome desenvolvem hipertensão severa e precoce e, frequentemente, hipokalemia, associadas a supressão da atividade da renina plasmática e baixos níveis de aldosterona. Tanto a hipertensão quanto a hipokalemia respondem bem ao tratamento com triamtereno, um diurético antikalurético. Em 1994 demonstrou-se a completa ligação da síndrome com o gene que codifica a subunidade β do canal para Na⁺.⁴ A análise do gene revelou mutação, criando um códon de parada (stop codon) prematuro, que trunca a terminação carboxila da proteína. O truncamento aumenta a expressão dos canais ENaC no nefro distal, com aumento na reabsorção de Na⁺ e comprometimento da homeostase do volume extracelular, que predispõe à hipertensão.

Nefrolitíase

Há três formas de nefrolitíase com hipercaleiúria – doença de Dent, nefrolitíase recessiva ligada ao cromossoma X e raquitismo hipofosfatêmico recessivo, ligado ao cromossoma X – que foram associadas ao locus Xp11.22 do cromossoma. Em todas essas formas de nefrolitíase o gene do canal para cloreto CLCN5, que se localiza no locus, está modificado por mutações de diferentes tipos.⁵ Algumas das mutações foram expressas em sistemas heterólogos sem produzir canais funcionantes. Esse tipo de canal para cloreto é expresso por células tubulares renais. A relação entre a mutação que produz genes cujos produtos não formam canais funcionantes e o aumento na excreção urinária do Ca²⁺ ainda não está esclarecida.

Fibrose cística (CFTR)

O produto do gene da CFTR forma canais para cloreto e opera como regulador de outros canais para cloreto ou para Na⁺. Muito embora o gene CFTR se expresse em tecido renal,⁶ os portadores das mutações que provocam a fibrose cística não demonstram comprometimento da função renal. É provável que a coexpressão de outros tipos de canais para cloreto garanta a função das células portadoras da mutação.

Referências

1. Welling PA. Cross-talk and the role of K_{ATP} channels in the proximal tubule. *Kidney Int* 1995;48:1017-23.
2. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993;362:31-8.

3. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Identification of calcium channels that control neurosecretion. *Science* 1994;266:828-30.
4. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, et al. Liddle's syndrome: Heritable human hypertension caused by mutations in the b subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994;79:407-14.
5. Lloyd SE, Pearce SHS, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 1998;379:445-9.
6. Morales MM, Carroll TP, Morita T, Schwiebert EM, Devuyst O, Wilson PD, et al. Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol Renal, Fluid Electrolyte Physiol* 1996;270:F1038-F48.

Fonte de financiamento: Fapesp (Processo nº 95/04628-4).
Conflito de interesses inexistente.
