

Resumos de Artigos: Fisiologia e Fisiopatologia Renal

José Benedito Oliveira Amorim, Luciene Machado dos Reis

Localization of components of the kallikrein-kinin system in the kidney: relation to renal function

Vio CP, Loyola S, and Velarde V

Hypertension. 1992; 19: (Suppl. II- 2)

Introdução

O Sistema Calicreína-Cinina (SCC) Renal é composto por um complexo conjunto multi-enzimático, do qual os principais elementos são: a enzima calicreína, o substrato cininogênio, hormônios efetores ou cininas, dentre os quais se encontra a bradicinina (BK e lysyl-BK), enzimas metabólicas (entre as mais relevantes encontram-se a cininase I, cininase II (ECA) e endopeptidase neutra NEP), e um número ainda desconhecido de ativadores e inibidores de calicreína e cininases. Este sistema parece participar de inúmeros processos complexos, tais como controle do volume extracelular, regulação da pressão sanguínea, controle da excreção de sódio e água, resistência vascular renal e liberação de renina. Sendo assim, o conhecimento morfo-fisiológico deste sistema constitui alvo de grande interesse, sobretudo em anormalidades que eventualmente estejam associadas como hipertensão e diabetes melito.

Objetivo

O objetivo do presente estudo é dirigida à caracterização morfofisiológica de alguns dos principais componentes do SCC no rim, dentro do atual estado do conhecimento. Para tanto, os autores fazem uma revisão sobre o assunto, e ainda propõem dois microambientes, a saber: Túbulo Conector-Coletor e Aparelho

Justaglomerular, onde as cininas liberadas no lado basal, ou luminal, ou em ambos, poderiam desempenhar um possível efeito parácrino.⁶

Comentários

Para que um evento seja considerado como efeito parácrino, de um sistema hormonal em qualquer tecido, necessário se faz a presença de componentes para geração local de hormônios como: enzima, substrato, presença de receptores (ou sítios de ligação) para o hormônio, eventos funcionais relacionados, e a presença de enzimas metabólicas para degradação destas substâncias ativas. O conhecimento atual da localização da calicreína nos líquidos corpóreos, através de várias metodologias aplicadas como: microdissecação de segmentos de néfron de coelhos, imunoreação à calicreína em segmentos de néfrons microdissecados, estudos de micropunção em ratos, e estudos de imunocitoquímica, indica a presença desta enzima nas células do Túbulo Conector.¹ Estas células podem possivelmente estar relacionadas também com a secreção de K⁺ distal, o que deixa em aberto como estes fenômenos possam estar relacionados (no passado, o SCC renal era grandemente associado com a excreção de Na⁺ e H₂O). Com respeito à presença de calicreína na membrana plasmática, a enzima foi observada ao longo de extensas áreas basal e luminal, como reportado recentemente em frações de membrana purificadas. A

calicreína pode atuar na membrana como ectoenzima, como sugerido por dados obtidos em suspensão de células corticais; e pode ser liberada para dentro da urina e compartimento vascular, já que é encontrada em ambos os efluentes de rins isolados perfundidos. No rim humano, com os mesmos métodos, a calicreína foi localizada no segmento correspondente ao túbulo conector. A estreita associação anatômica desta região com o aparelho justaglomerular sugere uma função fisiológica desempenhada pelas células do CNT, como regulação do FSR, RFG e liberação de renina, o que é consistente com um efeito parácrino. Isto é apoiado considerando a inexistência de calicreína no túbulo proximal (sugerindo que a calicreína não é filtrada em quantidades significantes no glomérulo). Porém, em condições patológicas, como insuficiência renal crônica, pode ser detectada a presença desta enzima no filtrado glomerular.

A fonte primária, mas não exclusiva de biossíntese de cinogênicos, é o fígado, porém pelo método de imunofluorescência e imunocitoquímica foi demonstrada a presença deste substrato em células de ducto coletor de rins de rato. Fato curioso nestes estudos é a presença de cinogênio próximo à calicreína em segmentos de transição entre túbulo conector e coletor de rim humano.

A ação da calicreína sobre seu substrato leva à geração de cininas, das quais a bradicinina é a mais notada. A capacidade vasodilatadora destas substâncias, que modula a função renal através de ação vascular e tubular, vem sendo extensivamente investigada, sob vários artifícios metodológicos, como: uso de BK, administração de antagonistas, uso de anticorpos, inibidores de cininases (Captopril, Enalapril), inibidores de NEP (Phosphoramidon) e inibidores de cinogênio (aprotinin). As cininas causam aumento do FSR, medeiam a indução de hiperfiltração por dieta rica em proteínas, inibem a resposta hidrosmótica da vasopressina em ducto coletor cortical isolado, e reabsorção de sódio no ducto coletor medular interno, além da indução de liberação de renina, em glomérulo isolado.

Os receptores de cininas têm sido caracterizados através de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de clonagem molecular,^{2,4} sendo localizados em células justaglomerulares, área mesangeal segmento fino e espesso da alça de Henle, túbulo proximal e distal.⁵ Bradicinin também causa um relaxamento dose-dependente de arteríolas aferentes isoladas de ratos. Ainda, um sítio ligante semelhante ao receptor de BK foi

descrito em membrana glomerular de ratos. O sítio específico e sua afinidade parecem ser semelhantes ao receptor de cinina B2. O receptor mais importante da bradicinina no rim, BK2, tem sido localizado por técnicas de PCR reserva e hibridização "in situ" de RNAm, em quase todos os segmentos do néfron. Sua maior concentração está em ducto coletores, túbulos distais e *pars recta* do túbulo proximal.^{4,5}

A atualização de antagonistas de receptores B2 tornou-se ferramenta importante para compreensão dos efeitos destas substâncias. Em ratos pré-tratados com DOCA sob infusão de captopril e phosphoramidon, a utilização de antagonistas de BK causa queda do FSR, RFG, e da excreção de sódio. Outra metodologia aplicada é a utilização de anticorpos de cininas (BK-Fab). A associação destes anticorpos com antagonistas em ratos DOCA-tratados mostrou que ambos diminuem a excreção de Na⁺, sugerindo que as cininas participam no controle da excreção de H₂O e Na⁺. O desenvolvimento de um antagonista de BK, denominado Hoe 140³, com potência de 2 a 3 vezes maior do que outros antagonistas, e com meia vida maior, tornou-se ferramenta importante no estudo dos efeitos destas cininas.

Com relação às cininases, vemos que as enzimas mais ativas no metabolismo das cininas são a ECA e a NEP. Ambas estão presentes no rim, concentradas na orla em escova em células do túbulo proximal e na urina. Uma diferença encontrada entre ambas refere-se a sua principal localização, sendo que a ECA apresenta-se predominantemente nas células endoteliais, enquanto que a expressão de NEP nestas células é muito baixa. A NEP é responsável por cerca de 2/3 da atividade cininásica na urina, enquanto que a cininase I e ECA contribuem somente com 9% e 23% respectivamente. Por esta razão, a NEP parece desenvolver papel maior no catabolismo das cininas, e o aumento da excreção de H₂O e Na⁺ após a administração de phosphoramidon pode ser explicado em parte por inibição da cisão intrarenal de cininas. Deve-se, contudo, ter cuidado nestas interpretações, desde que a NEP também contribui para o metabolismo de outros peptídeos que atuam na modulação da excreção de H₂O e Na⁺, como o Fator Atrial Natriurético e Endotelinas.

A aprotinina é um inibidor efetivo de calicreína (e de outras proteases séricas) "in vivo" e "in vitro" e vem sendo utilizada para o estudo de possíveis ações do SCC sobre várias condições patofisiológicas. Esta substância significativamente diminui a excreção de calicreína, cininas, Na⁺, K⁺, H₂O, e prostaglandinas e

J. B. O. Amorim / L. M. Reis - Resumos de Artigos: Fisiologia e Fisiopatologia Renal

baixa o FSR e o RFG. Alguns trabalhos mostram efeitos da aprotinina na prevenção do aumento da atividade de renina plasmática induzida por furosemide e anestesia.

Conclusão

Os dois microambientes propostos, nominalmente CNT-JGA, sob o ponto de vista anatômico e funcional, podem efetivamente participar na modulação das funções renais, uma vez que estas estruturas possuem todos os elementos chave necessários para geração de cininas, incluindo sítios ligantes de cininas, cininases e eventos relacionados com hormônios, podendo exercer papel importante na regulação da hemodinâmica renal, bem como na liberação de renina. Dada a relevância deste sistema para a função renal, o presente estudo contribui sobremaneira para o conhecimento de condições fisiopatológicas que se relacionam com estes processos, contribuindo também para o entendimento da regulação e a purificação de receptores de bradicinina.

Referências

1. Beasley D, Oza NB, Levinsky NG. Micropuncture localization of Kallikrein secretion in the rat nephron. *Kidney Int.* 1987; 32: 26-30
2. Chai KX, et al. Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics.* 1996; 31(1): 51-57
3. Hock FJ, et al. Hoe 140, a new potent and long acting bradykinin-antagonist; in vitro studies. *Br J Pharmacol.* 1991; 102: 769-773
4. Marin-Castano ME, et al. RT-PCR microlocalization of bradykinin B2 receptor mRNA in microdissected rat nephron segments. *Immunopharmacol.* 1996; 33(1-3): 171-173
5. Song Q, et al. Cellular localization of low-molecular-weight Kininogen and bradykinin B2 receptor mRNAs in human kidney. *Am J Physiol.* 1996; 270(6-2): F919-926
6. Vio CP. Renal Kallikrein. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. In Laragh JH, Brenner BM, eds. New York, Raven Press Publishers, 1990, 819-829

José Benedito Oliveira Amorim

Laboratório de Fisiologia Renal - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Subtotal nephrectomy alters tubular function: Effect of phosphorus restriction

Laouari D, Friedlander G, Burtin M, Silve C, Dechaux M, Garabedian M, and Kleinknecht C

Kidney Int. 1997; 52: 1550-1560

Objetivos

Investigar a função tubular após nefrectomia subtotal, bem como a influência da restrição de fósforo na expressão de proteínas, enzimas envolvidas no metabolismo celular e co-transportadores presentes na borda em escova da membrana tubular (MT).

Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley jovens (130-150 g). Os animais foram submetidos a nefrectomia (Nx) em dois tempos, com retirada de 70% ou 80% da massa renal.

Os animais foram divididos em 3 grupos: controle CNP, n = 10; nefrectomizados 70% (uNP, n = 5);

nefrectomizados 80% (UNP, n = 12). Esses animais receberam dieta normal em fósforo - 0,46 g/100 g (%). Outros 2 grupos, controle (CLP, n = 10) e nefrectomizados 80% (ULP, n = 14), receberam dieta pobre em fósforo (0,1%).

Exames laboratoriais foram colhidos na 3ª e 6ª semanas após o início do protocolo, ou seja, colheu-se urina 24 horas na qual foram dosados creatinina, proteínas e eletrólitos, AMP cíclico (cAMP) e a concentração do fator de crescimento epidérmico (EGF). No plasma foram analisados a creatinina, a uréia, Na, K, e o Ca. O pH sanguíneo e o cálcio iônico foram dosados em apenas 5 animais de cada grupo. No momento do sacrifício (6ª semana) foram colhidas amostras de sangue para determinação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH, P, triglicérides e colesterol além de ser retirado parte do fígado e do rim. Esses órgãos foram congelados, pesados, pulverizados e novamente congelados em nitrogênio líquido. No substrato do tecido renal foram determinadas as atividades das enzimas 5'-nucleotidase (5'-nu), γ -glutamyltransferase (γ -GT), fosfatase alcalina (Pase) e Na,K-ATPase. Avaliou-se a concentração da proteína co-transportadora NaPi-2 e, além disso, quantificou-se a concentração de proteínas e de DNA visando avaliar os níveis de hipertrofia e hiperplasia tecidual. Extraiu-se, também, RNA para quantificação do mRNA do co-transportador NaPi-2 e das enzimas presentes na MT. Em relação ao tecido hepático, foram estudadas as atividades das enzimas 5'-nu, γ -GT e Pase, visando avaliar a especificidade tecidual dessas enzimas.

Resultados

A análise das enzimas da BT revelou que a atividade de 5'-Nu foi semelhante nos grupos uNP e UNP e significativamente menor nos ratos CNP. A restrição de fósforo não afetou a atividade das enzimas em nenhum dos grupos.

A atividade da enzima γ -GT foi menor e proporcional à severidade da insuficiência renal. A restrição de fósforo não afetou a atividade dessa enzima nos animais controles, elevando-se nos urêmicos. Em relação a Pase, sua atividade estava reduzida nos ratos uNP, sendo mais acentuada nos ratos UNP. A restrição de fósforo estimulou sua atividade nos ratos ULP (ULP x UNP, $p < 0,01$).

Quanto à expressão do mRNA para as enzimas da MT, observou-se que a 5'Nu não foi afetada pela severidade da insuficiência renal e pela restrição de fósfo-

ro. Já para a γ -GT, houve redução nos ratos uNP, que foi muito acentuada nos animais UNP ($p < 0,01$). A restrição de fósforo em nada alterou a expressão dessa enzima. Quanto à Pase, sua expressão foi menor nos ratos uNP e diminuiu acentuadamente nos animais UNP. A restrição de fósforo elevou sua expressão em ratos urêmicos (ULP x UNP, $p < 0,01$).

A concentração de proteína NaPi-2 não mostrou-se alterada nos ratos uNP, mas diminuiu nos ratos UNP. A restrição de P elevou em 25% a concentração dessa proteína em ratos CLP e praticamente normalizou-se em ratos ULP.

A expressão do mRNA para o co-transportador NaPi-2 estava extremamente reduzida em ratos UNP e a restrição de fósforo praticamente normalizou essa expressão nos ratos urêmicos.

Quanto à atividade da enzima Na,K-ATPase, essa diminuiu significativamente nos ratos UNP e não se modificou com a restrição de fósforo.

A produção de EGF aumentou nos ratos Nx, sendo maior nos ratos uNP e a restrição de P não modificou sua excreção.

O peso do rim residual foi maior nos ratos uNP que nos CNP e UNP e foi menor nos animais submetidos à restrição de fósforo.

A concentração protéica foi maior nos ratos uNP quando comparados aos CNP, e aqueles animais submetidos à restrição de fósforo a concentração protéica foi menor nos animais ULP que nos UNP.

A quantificação da massa de DNA do tecido renal indicou que a nefrectomia aumenta a hiperplasia e que nos animais submetidos à restrição de fósforo a hiperplasia foi menos acentuada.

A hipertrofia celular, avaliada pela razão proteína renal/DNA, revelou que ela estava discretamente elevada nos animais uNP e muito reduzida nos ratos UNP.

Quanto à creatinina plasmática, ela aumentou proporcionalmente à extensão da ablação e o "clearance" de creatinina reduziu-se discretamente nos ratos uNP, caindo acentuadamente nos ratos UNP e não melhorando nos animais ULP.

Os níveis de PTH sérico aumentaram proporcionalmente à severidade da insuficiência renal e a restrição de fósforo levou a uma queda acentuada desse hormônio nos ratos urêmicos. Os níveis de PTH e de fósforo sérico correlacionaram-se negativamente com a atividade da γ -GT e Pase, assim como com o NaPi-2. Não se observou correlação entre o PTH e a 5'Nu ou seu mRNA.

J. B. O. Amorim / L. M. Reis - Resumos de Artigos: Fisiologia e Fisiopatologia Renal

A excreção de cAMP foi maior nos ratos uNP quando comparados aos controles e semelhante nos animais CNP e UNP. A restrição de fósforo levou a uma queda moderada de sua excreção tanto nos ratos controles quanto nos urêmicos.

A concentração de fósforo estava elevada nos animais UNP e a de cálcio total e iônico reduzidas. Animais submetidos à restrição de fósforo diminuíram o fósforo plasmático normalizando o cálcio total e iônico nos ratos urêmicos.

A concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foi avaliada em poucos animais, sendo menor nos ratos nefrectomizados quando comparados aos controles.

Quanto à atividade das enzimas 5'Nu e Pase no tecido hepático, essas não se modificaram com a insuficiência renal. Apenas a atividade da γ -GT foi significativamente mais elevada nos urêmicos que nos controles.

Conclusão

São poucos os estudos que avaliaram a função tubular pós nefrectomia subtotal. O estudo em questão utilizou ablação 70% e 80%, associada a dieta pobre em fósforo no grupo 80%. Avaliou-se a atividade e expressão do mRNA das enzimas 5'Nu, Pase e γ -GT envolvidas no metabolismo energético celular e presentes na membrana tubular, assim como a proteína e a expressão de um co-transportador da MT, o NaPi-2, após 6 semanas da nefrectomia. Estudou-se também mudanças na atividade da Na,K-ATPase (enzima basolateral expressa ao longo do néfron) e mudanças na produção do EGF.

A ablação 70% reduziu de forma moderada a atividade e não a expressão das enzimas da MT. A ablação 80% diminuiu a atividade e a expressão das enzimas Pase e γ -GT, diminuindo também a expressão do co-

transportador NaPi-2 e da atividade da Na,K-ATPase. Esses efeitos, à exceção da 5'Nu e Na,K-ATPase, foram parcialmente revertidos pela restrição de fósforo. Além disso, os autores observaram um aumento na produção do EGF, especialmente nos animais nefrectomizados 70%. Esse aumento foi parcialmente revertido pela restrição de fósforo.

A piora das alterações tubulares correlacionaram-se com o aumento da hiperplasia renal, redução da filtração glomerular e com a hiperfosfatemia e elevação do PTH.

A melhora da função tubular observada após a restrição de fósforo, estava associada com a redução da hiperplasia e a queda da fosfatemia e do PTH.

Os dados demonstraram que a nefrectomia parcial afeta a função tubular, a nível transcripcional e essas modificações são parcialmente revertidas pela restrição de fósforo.

Os dados levam a conclusão que a concentração intracelular e que fatores de crescimento podem estar envolvidos nas modificações da função tubular no modelo proposto.

Comentários

O modelo de nefrectomia parcial afeta a função tubular e o mecanismo é complexo.

A nefrectomia promoveu alterações de enzimas envolvidas no metabolismo energético e de transportadores da MT, os quais foram parcialmente revertidos com a restrição da ingestão de fósforo, sugerindo que o fósforo intracelular possa estar envolvido nessas modificações.

Luciene Machado dos Reis

Laboratório de Fisiologia Renal - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo