

ANATOMIA, FISILOGIA E IMPORTANZA CLINICA DEL TUBULO CONNETTORE

N. Miranda, M.A. Simeoni, E. Ciriana, C. Panico, E. Cappello, G.B. Capasso

Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna, Seconda Università degli Studi, Napoli

Anatomy, physiology and clinical relevance of the connecting tubule

The cortical distal nephron is the site of fine regulation of salt and water excretion by peptide and mineralocorticoid hormones and the site for specific actions of diuretics. Some data suggest that sodium reabsorption and potassium secretion in the distal convoluted tubule and the connecting tubule (CNT) are sufficient to maintain the sodium and potassium balance, with little or no contribution of the collecting duct. The homeostatic role of the sodium and potassium transport systems in the collecting duct can be questioned, especially in conditions where dietary sodium intake is high and potassium intake is low compared with the physiological needs of the organism. The functional expression of epithelial sodium channels (ENaC) in the CNT is sufficient for furosemide-stimulated urinary acidification and identifies the CNT as a major segment in electrogenic urinary acidification. In the outer renal cortex, the CNT returns to the glomerular hilus and contacts the renal afferent arterioles (Af-Art). This morphology is compatible with a cross-talk between the CNT and Af-Art. This novel regulatory mechanism of the renal microcirculation may participate in the vasodilatation observed during high salt intake, perhaps by antagonizing tubuloglomerular feedback. In conclusion, the cortical distal nephron appears to be a complex site for several physiological mechanisms; it is mainly involved in salt and fluid homeostasis and in acid-base balance maintenance. Furthermore, the CNT segment appears to promote a CNT-Af-Art feedback loop. (G Ital Nefrol 2009; 26: 55-63)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Renal afferent arteriole, ENaC, Acidbase balance, Water and electrolyte transport, Connecting tubule,

PAROLE CHIAVE:

Arteriola afferente, ENaC, Equilibrio acido-base, Trasporto idroelettrolitico, Tubulo connettore

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Nunzia Miranda
Cattedra di Nefrologia
Dipartimento di Medicina Interna,
Seconda Università degli Studi,
Padiglione 17 Policlinico Nuovo
Via Pansini, 5
80131 Napoli
e-mail: nunzy.miranda@libero.it

CENNI DI ANATOMIA E FISILOGIA DEL NEFRONE DISTALE

Il nefrone distale è il segmento tubulare che svolge un ruolo centrale nella regolazione dell'escrezione di elettroliti ed acqua. Tale funzione è mediata da peptidi, ormoni mineralcorticoidi e dalla specifica azione dei diuretici (1). Numerosi disordini dell'omeostasi del sodio, potassio, calcio, magnesio e del volume ematico (2) sono correlati a mutazioni di geni codificanti per proteine di trasporto di ioni e acqua localizzate nel nefrone distale (3). Da quanto detto si evince l'enorme importanza di questa porzione del nefrone dal punto di vista sia fisiologico che patologico (4). In base a criteri di anatomia microscopica, il nefrone distale comprende la porzione finale del tratto spesso ascendente

dell'ansa di Henle (TAL) ed il tubulo distale. Criteri strutturali e funzionali suddividono il tubulo distale in tubulo contorto distale (DCT) e tubulo connettore (CNT) (5). Il dotto collettore corticale (CCD) è da ritenersi funzionalmente parte del nefrone distale.

PROTEINE DI TRASPORTO E TUBULO CONNETTORE (CNT)

Il CNT è il segmento di nefrone distale corticale localizzato tra il DCT e il CCD (6). Attraverso studi di immunostochimica è stata studiata la distribuzione lungo il nefrone distale di proteine apicali, baso-laterali e citoplasmatiche evidenziando sostanziali differenze tra le varie specie di mammiferi prese in esame (7).

I canali epiteliali del sodio (ENaC) sono localizzati sulla membrana apicale e sono regolati dall'aldosterone. Le porzioni tubulari ENaC-positive costituiscono il nefrone distale aldosterone-sensibile che comprende il CNT e il CCD, e in alcune specie anche la parte più distale del DCT (7).

Il canale epiteliale del calcio (ECaC1, denominato recentemente TRPV5) fa parte del gruppo di canali apicali per il calcio diidropiridina-sensibili e pH-dipendenti.

Lo scambiatore basolaterale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) è una proteina di trasporto tubulare che permette il passaggio del calcio dal compartimento intracellulare nell'interstizio sfruttando il gradiente del sodio generato prevalentemente dall'attività della pompa $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$. I diuretici tiazidici sono in grado di incrementare l'attività di NCX perché potenziano il suddetto gradiente sodico in virtù della loro azione inibitrice nei confronti del co-trasportatore apicale Na-Cl (NCC); tale inibizione infatti comporta la riduzione della concentrazione intracellulare di sodio. Un effetto secondario dell'attività dei diuretici tiazidici è un'azione ipocalciurica legata alla stimolazione del riassorbimento del calcio da parte di NCX.

L'acquaporina di tipo 2 (AQP2) è una proteina appartenente alla famiglia dei canali per l'acqua ed è espressa selettivamente nel rene; essa è regolata dalla vasopressina (ADH) che stimola la fusione delle vescicole contenenti l'AQP2 con la membrana apicale attraverso il legame al recettore V1.

Attraverso studi di immunistochemica (Fig. 1), è stato possibile dimostrare che, nel coniglio, la comparsa sulla membrana apicale dell'ENaC identifica l'inizio del tubulo connettore (8), mentre in tutte le specie il co-trasportatore NCC è uno specifico marcatore del tubulo contorto distale. A livello basolaterale, invece, l'NCX rappresenta un marcatore del tubulo connettore. L'inizio del dotto collettore corticale coincide con la comparsa dell'AQP2 co-espressa con l'ENaC a tal livello (8). Nel coniglio quindi è possibile individuare delle linee di demarcazione ben nette tra i vari segmenti del nefrone distale.

Nel ratto e nel topo invece, la demarcazione tra un segmento tubulare e l'altro è meno definita, sia a livello apicale che a livello basolaterale. Tale differenza è da imputare all'ubiquitariet  di espressione di ENaC, TRPV5 e NCX, che compaiono sia nel DCT che nel CNT. L'unico trasportatore che nel ratto e nel topo sembra poter essere individuato come specifico marcatore del CNT   invece l'AQP2 che segna l'inizio di tale segmento ed   espressa in tutta la sua lunghezza.

Nell'uomo, infine, non   possibile demarcare l'inizio del tubulo connettore attraverso la localizzazione dei trasportatori epiteliali. L'ENaC ad esempio, comincia ad evidenziarsi alla fine del tubulo contorto

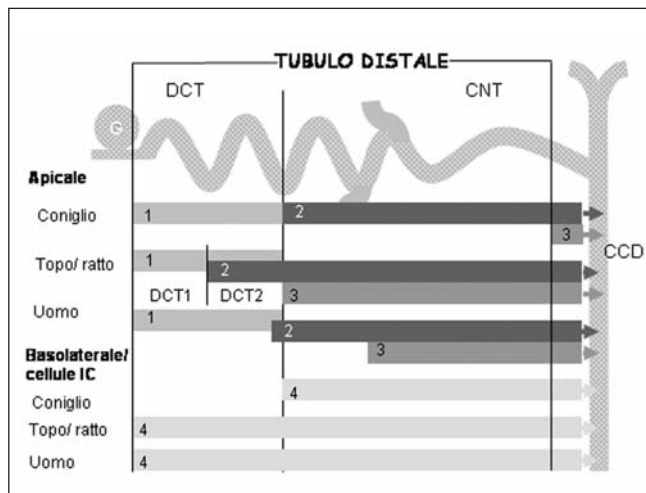


Fig. 1 - Confronto tra coniglio, topo/ratto, e uomo nell'organizzazione del tubulo distale.

Vengono considerati i trasportatori apicali (1-3) e basolaterali (4); G, glomerulo; DCT, tubulo convoluto distale; CNT, tubulo connettore; CCD, dotto collettore corticale; 1, NCC (co-trasporto Na-Cl); 2, ENaC (canali epiteliali del Na^+); 3, AQP2 (acquaporina 2); 4, proteine di trasporto del Ca^{+2} : PMCA (Ca^{+2} ATPasi), NCX (scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$), calbindina D28k (proteina legante il calcio di 28 kilodalton).

distale e in questo breve tratto si sovrappone all'NCC; l'AQP2 compare lungo il tubulo connettore, poco dopo il suo inizio laddove, come trasportatore apicale,   espresso solo l'ENaC. Dati relativi alla distribuzione di TRPV5 lungo il nefrone umano non sono ancora disponibili in letteratura. Da ultimo, a differenza di quanto evidenziabile in altre specie, nel nefrone umano NCX   presente anche nel dotto collettore corticale non arrestandosi la sua espressione al tubulo connettore (6).

TEST DI VERIFICA

1) In quale delle specie di mammiferi studiate con tecnica immunistochemica la distribuzione dei trasportatori apicali e basolaterali   tale da permettere la demarcazione di tutti i segmenti nel nefrone distale?

- Ratto e topo
- Coniglio
- Coniglio e uomo
- Ratto
- Nessuna delle precedenti.

2) Cos'  il tubulo distale?

-   sinonimo di tubulo contorto distale (DCT)
-   quel tratto di nefrone costituito dal tubulo contorto distale (DCT) e dal tubulo connettore (CNT)

- c. È un segmento del nefrone presente solo nella specie umana
 d. È il sito d'azione della Furosemide
 e. Nessuna delle precedenti.

3) Cosa determinano i diuretici tiazidici?

- a. Ipercalciuria
 b. Stimolazione diretta del co-trasportatore apicale Na-Cl (NCC)
 c. Ipercalciuria
 d. Ipocalcemia
 e. Escrezione solo di acqua per cui sono denominati anche acquaretici.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

IMPORTANZA DEL TUBULO CONNETTORE NEL TRASPORTO DELL'ACQUA E DEGLI ELETTROLITI

Alcune evidenze (9) supportano l'ipotesi che la parte terminale del DCT (late DCT) ed il CNT, piuttosto che il dotto collettore corticale (CCD), siano i principali regolatori dell'escrezione urinaria di sodio e potassio in condizioni di un introito alimentare elevato in sodio e ridotto in potassio, caratteristico delle abitudini alimentari nei Paesi Occidentali. Il CCD al contrario, è funzionalmente importante solo in caso di apporto dietetico profondamente iposodico (Fig. 2) e molto ricco in potassio, così come in caso di alterazioni genetiche che compromettano la funzionalità dei segmenti a monte (tubulopatie).

Infatti, in topi posti a dieta moderatamente iposodica si è dimostrato un aumento dell'espressione apicale degli ENaC, molto più pronunciato nella porzione terminale del DCT (late DCT) e nel CNT rispetto al CCD, che viene coinvolto solo se l'introito di sodio è ancora minore.

Analogamente, in esperimenti simili, una dieta moderatamente ricca di potassio aumenta l'espressione dei canali deputati alla secrezione del potassio (ROMK) principalmente nella porzione finale del DCT e nel CNT, venendo il CCD coinvolto solo per una dieta più ricca in potassio. Questi dati dimostrano come i primi due segmenti siano in grado di adattarsi perfettamente a variazioni anche modeste dell'introito ionico.

Studi su topi *knockout* caratterizzati dall'assenza della subunità α di ENaC solo nel dotto collettore (topi Scnn1a^{lox/Cre}), e non nel DCT e nel CNT, posti ad una dieta iposodica non sviluppano una sindrome da per-

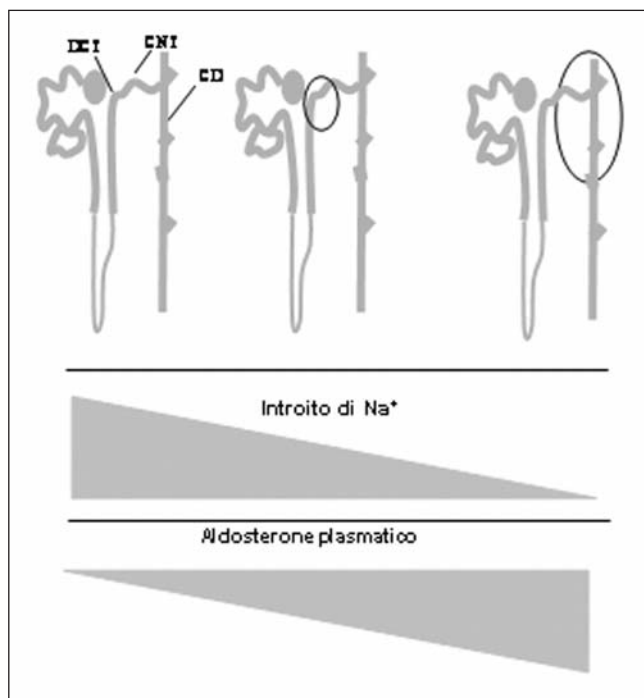


Fig. 2 - Riassorbimento di sodio nei vari segmenti del nefrone aldosterone-sensibile in relazione all'entità degli introiti di sodio con la dieta. In Figura 2a sono indicati i diversi segmenti aldosterone-sensibili nell'ambito del tubulo distale. In Figura 2b si nota il coinvolgimento della parte distale del DCT e del CNT che si verifica quando l'introito di sodio con la dieta è elevato; in tali condizioni, risultando bassi i livelli plasmatici di aldosterone, il dotto collettore contribuisce all'assorbimento del sodio in maniera poco significativa. In Figura 2c si nota invece come il decrescere dell'apporto di sodio con la dieta determina, in risposta all'aumento dei livelli plasmatici di aldosterone, il reclutamento anche del CCD.

dita di sale, confermando che il riassorbimento sodico limitato al DCT ed al CNT è sufficiente a preservare un corretto bilancio sodico (10).

Questa ipotesi è avvalorata dalla presenza a livello del DCT e del CNT di varie proteine regolatorie coinvolte nei processi ipertensivi sodio-dipendenti come le WNK chinasi e il sistema calcireina-chinina (11, 12). Nell'ambito della famiglia delle WNK chinasi spiccano, perché meglio studiate, WNK1 e WNK4, di cui WNK4 svolge un'azione inibitoria nei confronti dell'espressione epiteliale e della funzione di trasporto di NCC, mentre WNK1 esplica un'azione inibitoria verso WNK4 con rimozione dell'inibizione su NCC (13). A dimostrazione del coinvolgimento di tale famiglia di chinasi nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa sodio-dipendente con meccanismi confinati al tubulo renale distale, sono state identificate mutazioni dei geni che codificano per WNK1 e WNK4 responsabili di una sindrome familiare caratterizzata da ipertensione arteriosa associata ad iperpotassiemia (FHH; chiamata anche pseudoiperaldosteronismo tipo II, PHaII o sindrome

di Gordon) (14). Anche il sistema callicreina-chinina sembra svolgere un ruolo importante nel determinismo del processo ipertensivo specie in presenza di un alterato metabolismo del sodio. La callicreina è una proteina regolatrice, la cui espressione nel nefrone distale aldosterone-sensibile è ristretta soprattutto al segmento finale del DCT ed al CNT, dove comporta il rilascio di chinine dai chininogeni presenti nel plasma, nelle urine e negli altri liquidi biologici, esplicando una azione vasodilatatrice e natriuretica. Per tale ragione si suppone che livelli bassi della callicreina urinaria, riscontrabili soprattutto in presenza di una dieta ricca in sodio, possano correlare con lo sviluppo dell'ipertensione essenziale nell'uomo (15-18).

Infine, a sottolineare un possibile contributo della dieta allo sviluppo dell'ipertensione, risulta affascinante un'ipotesi evolutiva dell'adattamento del trasporto ionico nel tubulo distale in risposta al cambiamento del contenuto di sale nella dieta. È probabile, infatti, che nel tempo, in risposta alla perdita di abitudini alimentari di tipo vegetariano (19-22), si sia ridotta da una parte la necessità di riassorbire sodio, il cui introito alimentare è aumentato nel tempo, e dall'altra quella di secernere potassio, che invece è meno presente nella dieta dell'era moderna (23-26). Questo cambiamento dietetico è stato rapido in termini evolutivi e perciò è improbabile che sia stato accompagnato da un corrispondente adattamento genetico. Tale fenomeno potrebbe spiegare l'effetto dannoso di elevati introiti di sodio e di ridotti introiti di potassio sullo sviluppo di ipertensione e malattie cardiovascolari.

TEST DI VERIFICA

4) In quali segmenti del nefrone aumenta il riassorbimento di sodio in condizioni di bilancio sodico negativo?

- Porzione finale del tubulo contorto distale (*late DCT*) e tubulo connettore (CNT)
- Porzione iniziale e finale del tubulo contorto distale (*early and late DCT*)
- Porzione iniziale del tubulo contorto distale (*early DCT*) e dotto collettore corticale (CCD)
- Esclusivamente il tubulo connettore (CNT)
- Porzione spessa ascendente dell'ansa di Henle (TAL).

5) Quale/i di queste affermazioni è vera riguardo alla parte finale del DCT (*late DCT*) e al CNT?

- Late DCT* e CNT sono in grado da soli di regolare l'equilibrio idro-elettrolitico quando l'introito dietetico di Na è alto e di K è basso

- Late DCT* e CNT sono stati probabilmente importanti nei tempi più remoti ma oggi hanno solo un ruolo marginale nel controllo dell'equilibrio idro-elettrolitico
- A differenza del dotto collettore corticale (CCD) *late DCT* e CNT non esprimono mai proteine coinvolte nella regolazione della pressione arteriosa
- Late DCT* e CNT sono i segmenti principalmente coinvolti nell'adattamento a moderate riduzioni di Na e moderati aumenti di K con la dieta
- Late DCT* e CNT costituiscono il tubulo distale.

6) Nella sindrome di Gordon le alterazioni riguardano:

- La callicreina
- L'ENaC
- La pendrina
- La WNK1 o la WNK4
- Nessuna delle precedenti.

IL TUBULO CONNETTORE E L'EQUILIBRIO ACIDO-BASE

Il CNT svolge un ruolo di rilievo oltre che nel trasporto idro-elettrolitico anche nella regolazione acido-base. Nell'uomo, le cellule intercalate, deputate al trasporto distale di acidi e basi, sono presenti sin dall'ultima parte del DCT e lungo tutto il decorso del CNT ed è possibile distinguerne due tipi, le cellule intercalate di tipo α e le cellule intercalate di tipo β , con opposte funzioni di trasporto degli acidi e delle basi (27). In particolare, le cellule intercalate di tipo α sono deputate alla secrezione di idrogenioni nel lume tubulare, grazie alla presenza a livello apicale della pompa H^+ -ATPasi vacuolare, ed al riassorbimento di bicarbonato tramite lo scambiatore basolaterale Cl^-/HCO_3^- (AE-1) (28). Le cellule intercalate di tipo β , invece sono poco espresse in condizioni fisiologiche, mentre aumentano in corso di alcalosi metabolica, in quanto esse sono adibite alla secrezione di bicarbonato attraverso il contro-trasportatore luminale Cl^-/HCO_3^- , di cui si conoscono due isotipi, la pendrina ed AE-4. Le cellule intercalate di tipo β sono inoltre deputate al recupero di idrogenioni attraverso la pompa protonica vacuolare che in questo tipo cellulare è invece espressa sulla membrana basolaterale (27).

Tra i trasportatori coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio acido-base a livello del tubulo distale, focalizzeremo l'attenzione sulle pompe protoniche vacuolari espresse dalle cellule intercalate. A tal proposito, va sottolineato come esse abbiano una struttura complessa, essendo composte da almeno 13 subunità di cui esistono diverse isoforme cellula e tessuto specifiche

(29, 30). Degna di nota è la subunità B che può presentarsi come B1 o B2; l'isoforma B1 sembra essere quella essenziale per il funzionamento della pompa protonica vacuolare (31-35), come dimostra il fatto che mutazioni geniche di tale isoforma danno luogo nell'uomo ad acidosi tubulare distale (dRTA), un disturbo caratterizzato dall'incapacità del nefrone distale di acidificare adeguatamente l'urina (34). Il cruciale ruolo funzionale di B1 nella pompa protonica vacuolare è stato ancor meglio dimostrato in un modello di topo *knockout* per il gene codificante per tale subunità (ATP6V1b1), che presenta acidosi metabolica con emissione di urine inappropriatamente alcaline. In questo modello sperimentale, dopo carico orale di cloruro di ammonio, è stato possibile verificare un netto peggioramento dell'acidosi metabolica sistemica, nonostante il riscontro di un marcato aumento dell'espressione della subunità B2 a livello luminale. Tale fenomeno dimostra l'incapacità della subunità B2 a compensare il deficit della subunità B1, che pertanto si rivela essere l'unica subunità realmente responsabile del funzionamento della pompa protonica vacuolare e dunque dell'acidificazione urinaria nel nefrone distale (36, 37).

È noto come il riassorbimento di sodio mediato dall'ENaC sia alla base del processo secretivo degli idrogenioni a livello distale, in virtù del fatto che il recupero di sodio genera un lume elettronegativo che di per sé è di stimolo alla secrezione di protoni mediata dalla H⁺-ATPasi (38). Nel dotto collettore midollare (MCD), invece, l'ENaC è espresso solo nella sua porzione iniziale (7) per cui, più distalmente, il lume sarà meno elettronegativo e di conseguenza la secrezione di protoni risulta indipendente dall'assorbimento del sodio (39, 10). Kovacicova et al. si sono proposti di studiare più nel dettaglio le caratteristiche dell'interazione funzionale tra il riassorbimento di sodio e la secrezione di protoni. In particolare hanno dimostrato, ad esempio, che la furosemide, un diuretico dell'ansa, è in grado di aumentare l'acidificazione urinaria in quanto l'inibizione del co-trasportatore Na⁺-K⁺-2Cl⁻ nella porzione spessa ascendente dell'ansa di Henle da essa indotta, comporta un aumento del carico di sodio che arriva distalmente con conseguente incremento dell'attività riassorbitiva da parte di ENaC nel CNT e nel CCD, e relativa stimolazione della secrezione di idrogenioni (38). L'effetto acidificante della furosemide è stato confermato con l'impiego dell'amiloride, che inibisce gli ENaC e dunque la capacità di compenso all'aumentato carico distale di sodio furosemide-dipendente.

Infine, Kovacicova et al. si sono proposti di identificare nell'ambito del tubulo distale quale fosse il segmento principalmente coinvolto nel processo di acidificazione delle urine indotto dal diuretico dell'ansa (39,

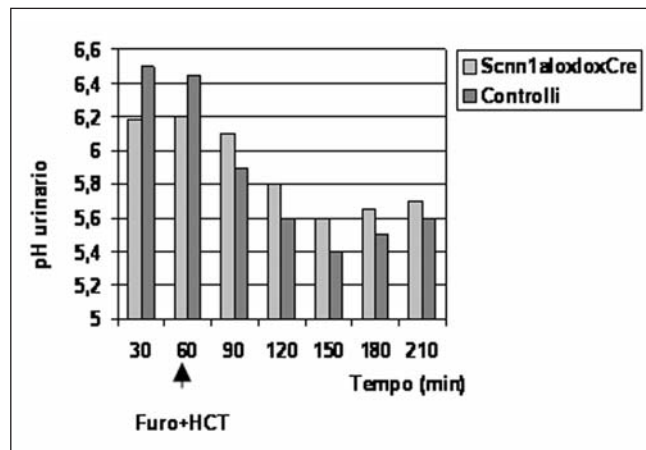


Fig. 3 - Effetto della furosemide (Furo) e dell'idroclorotiazide (HCT) sull'acidificazione urinaria in topi *Scnn1 α loxlox* (controlli) (n=6) e *Scnn1 α loxloxCre* (privi della subunità alfa dell'ENaC) (n=6). Il pH urinario dei topi *Scnn1 α loxloxCre* non differisce significativamente da quello dei topi *Scnn1 α loxlox* sia prima che dopo la somministrazione di furosemide e idroclorotiazide.

10). A tale scopo il gruppo di Kovacicova ha condotto esperimenti su topi con ablazione genetica selettiva della subunità α degli ENaC (topi *Scnn1 α loxloxCre*). Dal momento che tale subunità è essenziale per la funzionalità dei canali del sodio (10) esclusivamente nel CCD e nell'OMCD e per la localizzazione luminale delle altre due subunità (β e γ) degli ENaC negli stessi segmenti, i canali del sodio del CNT nei topi mutati conservano una normale funzione e localizzazione. Al fine di dimostrare che il CNT è da solo in grado di far fronte all'acidificazione urinaria anche in condizioni di massimalizzazione del carico distale di sodio, i topi *Scnn1 α loxloxCre* sono stati trattati sia con la furosemide da sola che con l'associazione di furosemide ed idroclorotiazide, e tale associazione è stata impiegata al fine di escludere un qualsiasi effetto compensatorio al riassorbimento di sodio da parte del co-trasportatore NCC. Sia i topi trattati con la furosemide che quelli con l'associazione furosemide-idroclorotiazide, operavano una normale acidificazione urinaria (Fig. 3), a dimostrazione del fatto che la presenza degli ENaC nel CNT è più che sufficiente per la furosemide ad indurre l'acidificazione urinaria nonostante la mancanza di ENaC nei segmenti più a valle.

In conclusione, noto il ruolo cruciale del tubulo distale nella gestione dell'equilibrio acido-base, il CNT emerge, almeno in studi condotti su animali, come il segmento principale coinvolto nei meccanismi di acidificazione urinaria.

TEST DI VERIFICA

7) Mutazioni nel gene che codifica per la subunità B1 dell'H⁺-ATPasi vacuolare sono associate nell'uomo a:

- Escrezione di urine eccessivamente acide
- Acidosi tubulare prossimale
- Acidosi tubulare distale
- Acidosi metabolica a gap anionico aumentato
- Nessuna alterazione a causa dell'attivazione di meccanismi compensatori.

8) Una sola di queste affermazioni è corretta:

- La furosemide induce un'importante acidificazione urinaria mediata dagli ENaC e dall'H⁺-ATPasi vacuolare contenente la subunità B1
- L'isoforma B1 è espressa solo nel CNT
- L'amiloride annulla l'effetto diuretico della furosemide
- Solo il CNT è coinvolto nell'acidificazione urinaria furosemide-indotta
- Sono tutte vere.

9) In quale segmento del nefrone distale la secrezione di protoni è indipendente dall'assorbimento di sodio?

- Non esiste nessun segmento del nefrone distale ad avere tale peculiarità
- Tubulo connettore (CNT)
- Dotto collettore midollare (MCD)
- Dotto collettore corticale (CCD)
- Tubulo distale.

NUOVE PROSPETTIVE SUL RUOLO FIOLOGICO DEL TUBULO CONNETTORE

Studi condotti da Ren et al. (40) permettono di ipotizzare un nuovo ed importante ruolo fisiologico del CNT. Il CNT dei nefroni superficiali della corticale renale ritorna al polo vascolare del glomerulo accompagnando nel suo decorso l'arteriola afferente (Af-Art) per una lunghezza variabile (41, 42) e tale conformazione anatomica potrebbe essere compatibile con l'esistenza di un *feedback* tra il CNT e l'Af-Art. Tale *cross-talk* è stato dimostrato da Ren et al. (40), attraverso esperimenti di microperfusione in vitro di glomeruli isolati con il corrispondente tubulo connettore. La perfusione del CNT con soluzioni a concentrazioni crescenti di NaCl determinava dilatazione dell'Af-Art, soprattutto dopo induzione di ipertono vasale con noradrenalina (Fig. 4). Il gruppo di Ren ha inoltre dimostrato come la dilatazione dell'Af-Art era correlata al solo riassorbimento di sodio da parte del CNT e non anche a quella del cloro dal momento che, sostituen-

tuendo il NaCl con il cloruro di colina nella soluzione di perfusione, non si otteneva effetto vasodilatatorio. Ad ulteriore conferma del ruolo centrale del sodio nel determinismo del *feedback* CNT-Af-Art, è stato indotto il blocco degli ENaC con amiloride che ha rivelato come la perfusione del CNT con NaCl in tali condizioni non è in grado di far dilatare l'Af-Art. Lo stesso effetto non è stato invece osservato quando il blocco del riassorbimento del sodio era indotto al di fuori del CNT, mediante impiego dell'idroclorotiazide, che invece inibisce come è noto la NCC nel DCT.

Al fine di escludere che vi fosse una compartecipazione dei sistemi ossidativi nell'indurre la vasodilatazione arteriolare, Ren et al. hanno condotto i loro esperimenti di perfusione del CNT con NaCl in presenza di N-Nitro-L-Arginina Metil Estere (L-NAME), un inibitore dell'ossido nitrico sintetasi. L'aggiunta di tale inibitore al perfusato di NaCl comportava sorprendentemente una più marcata dilatazione dell'Af-Art, il che indica che l'ossido nitrico (NO) prodotto nel CNT non sarebbe, come atteso, un fattore di stimolo alla vasodilatazione dell'Af-Art. Al contrario, i dati di Ren et al. suggerirebbero che la carenza di NO L-NAME-indotta nel CNT sia in grado di potenziare l'effetto vasodilatatorio arteriolare NaCl dipendente. In conclusione, sulla scorta di quanto osservato dal gruppo di Ren, si può ipotizzare che l'NO funga da modulatore negativo nell'interazione tra CNT e Af-Art attraverso un'interferenza sul riassorbimento del sodio nel CNT, probabilmente attraverso un'azione inibente sugli ENaC a tal livello (43-45) (Fig. 5).

Il meccanismo di *feedback* tra CNT e Af-Art è stato denominato "*feedback* tubulo connettore-glomerulare" (CTGF) per differenziarlo dal "*feedback* tubulo-glomerulare" (TGF) che intercorre tra l'Af-Art e la macula densa nel DCT. Tra il CTGF e il TGF sussistono alcune similitudini ma anche profonde differenze. Entrando nel dettaglio, entrambi i meccanismi sono regolati dalla concentrazione intraluminale di sodio, ma i processi di trasporto dello ione avvengono su siti diversi, attraverso l'NKCC2 nella macula densa per il TGF e attraverso gli ENaC nel CNT per il CTGF. Sia il TGF che il CTGF sono potenziati dalla perfusione di inibitori della sintesi di NO, ma mentre nel caso del TGF la ridotta biodisponibilità di NO causa costrizione dell'Af-Art, riduzione del flusso plasmatico renale e dunque della velocità di filtrazione glomerulare (VFG), nel CTGF tale carenza comporta invece vasodilatazione arteriolare e aumento del flusso plasmatico renale e della VFG.

Alla luce delle conoscenze attuali è ipotizzabile che il CTGF costituisca un meccanismo autonomo di regolazione del microcircolo renale i cui effetti, sostanzialmente opposti a quelli del TGF, sono compatibili con una funzione modulatrice e/o controregolatoria (41).

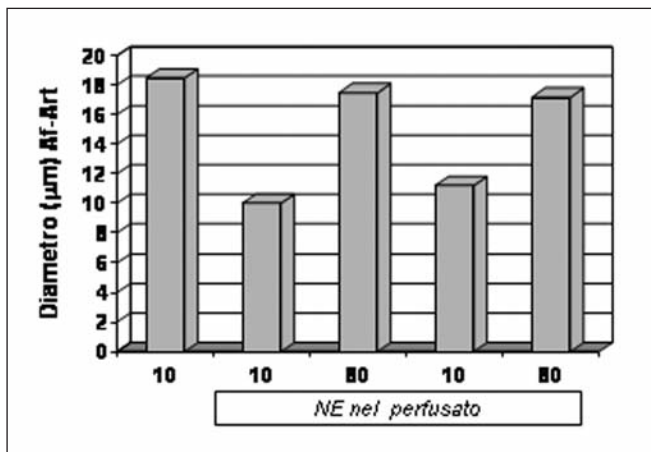


Fig. 4 - Effetto della microperfusione del CNT con ridotte (10 mM) o elevate (80 mM) concentrazioni di NaCl nel perfusato sul diametro dell'arteriola afferente. La perfusione del CNT con concentrazioni crescenti di NaCl determina una marcata dilatazione dell'Af-Art pre-costretta con noradrenalina ($2.5 \times 10^{-7} M$), con variazione del diametro da $10.1 \pm 1.3 \mu m$ a $17.3 \pm 1.6 \mu m$ ($p < 0.05$). Il grafico riportato dimostra peraltro la riproducibilità delle risposte del CTGF in prove successive nel corso di uno stesso esperimento.

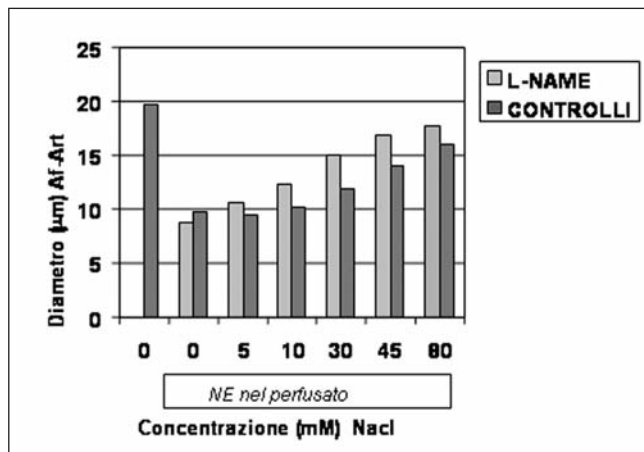


Fig. 5 - Risposta in termini di variazione del diametro dell'arteriola afferente in relazione a concentrazioni crescenti di NaCl nel lume del CNT. L'incremento progressivo della concentrazione di NaCl (5-10-30-45-80 mM) dilata l'arteriola afferente in maniera dose-dipendente (con diametro arteriolare rispettivamente di: $9.6 \pm 1.2 \mu m$, $10.2 \pm 1.3 \mu m$, $11.7 \pm 1.2 \mu m$, $14.1 \pm 0.8 \mu m$ e $16.3 \pm 1.1 \mu m$) (colonne scure). In presenza di L-NAME nel perfusato (concentrazione di L-NAME = $10^{-4} M$) viene incrementata la vasodilatazione NaCl-dipendente dell'arteriola afferente ed il feedback CNT-glomerulare (colonne chiare). Le variazioni del diametro dell'arteriola afferente in presenza di L-NAME nel perfusato ($9.0 \pm 0.9 \mu m$, $10.7 \pm 1.3 \mu m$, $12.6 \pm 1.0 \mu m$, $15.0 \pm 1.0 \mu m$, $17.6 \pm 1.0 \mu m$.) corrispondono a dosi crescenti di NaCl (5-10-30-45-80 mM).

TEST DI VERIFICA

10) Negli esperimenti di microperfusione *in vitro* Ren et al. hanno osservato che la dilatazione dell'arteriola afferente era correlata a:

- Assorbimento di Cl^- nel CNT attraverso l'NKCC
- Assorbimento di Na^+ nel CNT attraverso gli ENaC
- Assorbimento di Na^+ nel CNT attraverso l'NCC
- Inibizione di mediatori vasocostrittori
- Sono tutte vere.

11) Il CTGF (connetting tubule glomerular feedback) è probabilmente:

- Un cross-talk tra tubulo connettore e macula densa
- Un meccanismo in grado di provocare dilatazione dell'Af-Art e un aumento del GFR in caso di un aumento dell'apporto di sale
- Un meccanismo sinergico con il TGF
- Un mediatore coinvolto nella dilatazione dell'Af-Art (MOD - un meccanismo in grado di determinare vasodilatazione dell'arteriola efferente
- Un meccanismo in cui la vasodilatazione dell'Af-Art è dipendente esclusivamente dal riassorbimento del Cl.

12) Quale di queste affermazioni può ritenersi corretta?

- L'NO si è dimostrato essere un modulatore negativo del CTGF
- L'NO sembrerebbe fungere da modulatore positivo dell'interazione tra CNT e Af-Art
- Il cloruro di colina nel bagno di perfusione determina sull'arteriola afferente un effetto vasodilatativo molto più intenso rispetto al cloruro di sodio
- Il blocco degli ENaC con l'amiloride non interferisce con la vasodilatazione dell'Af-Art sodio-indotta
- Sono corrette le risposte A, C e D.

RIASSUNTO

Il nefrone distale è il segmento tubulare che svolge un ruolo centrale nella regolazione dell'escrezione di elettroliti ed acqua. Tale funzione è mediata da peptidi, ormoni mineralcorticoidi e dalla specifica azione dei diuretici. Alcuni dati suggeriscono che la parte terminale del tubulo convoluto distale (late DCT) ed il tubulo connettore (CNT), piuttosto che il dotto collettore corticale, siano i principali regolatori dell'escrezione urinaria di sodio e potassio in presenza di un introito alimentare elevato in

sodio e ridotto in potassio, caratteristico delle abitudini alimentari dei paesi occidentali. La presenza nel CNT dei canali epiteliali del sodio (ENaC), inoltre, sembra sufficiente a garantire l'acidificazione urinaria furosemide-indotta e ciò identifica il CNT come il principale segmento coinvolto nel processo di acidificazione delle urine indotto dal diuretico dell'ansa. Nella corticale renale esterna, il CNT ritorna al polo vascolare del glomerulo accompagnando nel suo decorso l'arteriola afferente. Tale conformazione anatomica potrebbe essere compati-

bile con l'esistenza di un feed-back tra il CNT e l'arteriola afferente che esplicherebbe una funzione modulatrice e/o contro-regolatoria nei confronti del feed-back tubulo-glomerulare.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 2000; 80: 277-313.
2. Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet* 1996; 13: 183-8.
3. van Os CH, Deen PM. Aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 395-400.
4. Scheinman SJ, Guay-Woodford LM, Thakker RV, Warnock DG. Genetic disorders of renal electrolyte transport. *N Engl J Med* 1999; 340: 1177-87.
5. Câmpean V, Kricke J, Ellison DH, Luft FC, Bachmann S. Localization of thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransport and associated gene products in the mouse DCT. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F1028-35.
6. Biner HL, Arpin-Bott MP, Loffing J, et al. Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 836-47.
7. Loffing J, Kaissling B. Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F628-43.
8. Loffing J, Loffing-Cueni D, Macher A, et al. Localization of epithelial sodium channel and aquaporin-2 in rabbit kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F530-9.
9. Meneton P, Loffing J, Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F593-601.
10. Rubera I, Loffing J, Palmer LG, et al. Collecting duct-specific gene inactivation of alphaENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance. *J Clin Invest* 2003; 112: 554-65.
11. Guyton AC. Blood pressure control—special role of the kidneys and body fluids. *Science* 1991; 252: 1813-6.
12. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104: 545-56.
13. Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 2001; 20: 5562-9.
14. Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001; 293: 1107-12.
15. Figueroa CD, Caorsi I, Subiabre J, Vio CP. Immunoreactive kallikrein localization in the rat kidney: an immuno-electron-microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 117-21.
16. Figueroa CD, MacIver AG, Mackenzie JC, Bhoola KD. Localisation of immunoreactive kininogen and tissue kallikrein in the human nephron. *Histochemistry* 1988; 89: 437-42.
17. Omata K, Carretero OA, Scicli AG, Jackson BA. Localization of active and inactive kallikrein (kininogenase activity) in the microdissected rabbit nephron. *Kidney Int* 1982; 22: 602-7.
18. Proud D, Knepper MA, Pisano JJ. Distribution of immunoreactive kallikrein along the rat nephron. *Am J Physiol* 1983; 244: F510-5.
19. Denton DA. *The Hunger for Salt*. Heidelberg: Springer Verlag, 1982.
20. Elliott P, Dyer A, Stamler R. The INTERSALT study: results for 24 hour sodium and potassium, by age and sex. INTERSALT Co-operative Research Group. *J Hum Hypertens* 1989; 3: 323-30.
21. Eaton SB, Eaton SB 3rd. Paleolithic vs. modern diets—selected pathophysiological implications. *Eur J Nutr* 2000; 39: 67-70.
22. Frassetto L, Morris RC Jr, Sellmeyer DE, Todd K, Sebastian A. Diet, evolution and aging—the pathophysiologic effects of the post-agricultural inversion of the potassium-to-sodium and base-to-chloride ratios in the human diet. *Eur J Nutr* 2001; 40: 200-13.
23. Eaton SB, Cordain L, Lindeberg S. Evolutionary health promotion: a consideration of common counterarguments. *Prev Med* 2002; 34: 119-23.
24. Eaton SB, Strassman BI, Nesse RM, et al. Evolutionary health promotion. *Prev Med* 2002; 34: 109-18.
25. He FJ, MacGregor GA. Fortnightly review: Beneficial effects of potassium. *BMJ* 2001; 323: 497-501.
26. MacGregor G, de Wardener HE. Salt, blood pressure and health. *Int J Epidemiol* 2002; 31: 320-7; discussion 331-2.
27. Schuster VL. Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 267-88.
28. Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev* 2004; 84: 1263-314.
29. Nishi T, Forgacs M. The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 94-103.
30. Peng SB, Crider BP, Xie XS, Stone DK. Alternative mRNA splicing generates tissue-specific isoforms of 116-kDa

- polypeptide of vacuolar proton pump. *J Biol Chem* 1994; 269: 17262-6.
31. Peng SB, Li X, Crider BP, et al. Identification and reconstitution of an isoform of the 116-kDa subunit of the vacuolar proton translocating ATPase. *J Biol Chem* 1999; 274: 2549-55.
 32. Smith AN, Finberg KE, Wagner CA, et al. Molecular cloning and characterization of Atp6n1b: A novel fourth murine vacuolar H⁺-ATPase α -subunit gene. *J Biol Chem* 2001; 276: 42382-8. Epub 2001 Aug 8.
 33. Toyomura T, Oka T, Yamaguchi C, Wada Y, Futai M. Three subunit α isoforms of mouse vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. Preferential expression of the α 3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 8760-5.
 34. Bastani B, Purcell H, Hemken P, Trigg D, Gluck S. Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali loads in the rat. *J Clin Invest* 1991; 88: 126-36.
 35. Laghmani K, Richer C, Borensztein P, Paillard M, Froissart M. Expression of rat thick limb Na/H exchangers in potassium depletion and chronic metabolic acidosis. *Kidney Int* 2001; 60: 1386-96.
 36. Wagner CA, Kovacokova J, Stehberger PA, Winter C, Benabbas C, Mohebbi N. Renal acid-base transport: old and new players. *Nephron Physiol* 2006; 103: 1-6. Epub 2005 Dec 12.
 37. Nelson RD, Guo XL, Masood K, Brown D, Kalkbrenner M, Gluck S. Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATP-ase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3541-5.
 38. Hamm LL, Alpern RJ. Cellular mechanisms of renal tubular acidification, in the kidney: physiology and pathophysiology, edited by Seldin DW, Giebisch G, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 1935-79.
 39. Kovacikova J, Winter C, Loffing-Cueni D, et al. The connecting tubule is the main site of the furosemide-induced urinary acidification by the vacuolar H⁺-ATPase. *Kidney Int* 2006; 70 (10): 1706-16. Epub 2006 Sep 20.
 40. Ren Y, Garvin JL, Liu R, Carretero OA. Crosstalk between the connecting tubule and the afferent arteriole regulates renal microcirculation. *Kidney Int* 2007; 111: 16-21. Epub 2007 Mar 14.
 41. Tsuganezawa H, Kobayashi K, Iory M, et al. A new member of the HCO₃⁽⁻⁾ transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. *J Biol Chem* 2001; 276: 8180-9. Epub 2000 Dec 1.
 42. Barajas L, Powers K, Carretero O, Scicli AG, Inagami T. Immunocytochemical localization of renin and kallikrein in the rat renal cortex. *Kidney Int* 1986; 29: 965-70.
 43. Dørup J, Morsing P, Rasch R. Tubule-tubule and tubule-arteriole contacts in rat kidney distal nephrons. A morphologic study based on computer-assisted three-dimensional reconstructions. *Lab Invest* 1992; 67: 761-9.
 44. Faarup P. On the morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Acta Anat (Basel)* 1965; 60: 20-38.
 45. Frindt G, Palmer LG. Na channels in the rat connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F669-74. Epub 2003 Dec 2.