

**SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
HOSPITAL REGIONAL DA ASA SUL
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA MÉDICA EM PEDIATRIA**

CLÁUDIA JANAÍNA SILVA CRUZ

HIPOMAGNESEMIA DE ORIGEM HEREDITÁRIA: REVISÃO DA LITERATURA

**Brasília, DF
2009**

www.paulomargotto.com.br

Cláudia Janaína Silva Cruz

HIPOMAGNESEMIA DE ORIGEM HEREDITÁRIA: REVISÃO DA LITERATURA

Monografia apresentada ao Supervisor do Programa de Residência Médica em Pediatria da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, como requisito parcial para obtenção do título de especialista em Pediatria sob orientação da preceptora Dra Maristela Estevão Barbosa.

Brasília, DF
2009

Cláudia Janaína Silva Cruz

HIPOMAGNESEMIA DE ORIGEM HEREDITÁRIA: REVISÃO DA LITERATURA

Monografia apresentada ao Supervisor do Programa de Residência Médica em Pediatria da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, como requisito parcial para obtenção do título de especialista em Pediatria sob orientação da preceptora Dra Maristela Estevão Barbosa.

Data da aprovação: ____ / ____ / _____

Nome e assinatura do preceptor/orientador

Nome e assinatura do membro que representa a comunidade

Nome e assinatura do 3º membro da Banca Examinadora

Brasília, DF
2009

CRUZ, Cláudia Janaína Silva

Hipomagnesemia de Origem Hereditária: revisão de literatura /
Cláudia Janaína Silva Cruz. Brasília: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito
Federal, 2009.
xiv, 73f.

Trabalho de Conclusão de Residência Médica (Especialização) em
Pediatria – Hospital Regional da Asa Sul.
Orientadora: Maristela Estevão Barbosa

Hereditary Etiology of Hypomagnesemia: review articles

1. Homeostase do Magnésio 2. Hipomagnesemia 3. Hipomagnesemia
hereditária

*A todos os “pequenos” e suas famílias que
são a razão do nosso trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maristela pelas orientações prestadas, pela paciência incessante e pelo carinho fraterno;

Ao Dr. Jefferson pela amizade e solicitude infindável;

À Duda pelo auxílio na tradução do resumo para língua espanhola;

À todos aqueles que conviveram comigo nos momentos finais da monografia e que me ajudaram tanto: Rê, Sylvinha, Marcellinha, Giu, Roberto, Brenda, toda a equipe do PS (Dr. Filipe, Dr. Eduardo, Elaine, Ariadne, Debora, Pedro);

Ao Dr. Bruno, *staffs*, funcionários e colegas-amigos de residência, representados pela Renata Santarem, pelo incentivo à persistência no caminho escolhido;

Aos meus pais, meu irmão e todos os familiares, antigos e novos, e amigos pela sincera compreensão da minha ausência;

Ao meu querido Daniel pelo amor e apoio incondicional;

A Deus pela oportunidade contínua de crescimento.

“Mesmo que todas as questões científicas possíveis sejam respondidas,
os problemas da vida ainda não terão sido sequer tocados”

(Filósofo Austríaco Wittgenstein)

RESUMO

Hipomagnesemia é um achado laboratorial comum na prática clínica. Pode ser primária ou secundária. A hipomagnesemia primária constitui um raro grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por perda renal e/ou intestinal de magnésio, resultando em sintomas compartilhados de depleção de magnésio, como tetania e convulsões generalizadas, e frequentemente associado a distúrbios da excreção do cálcio. Por meio de estudos dessas entidades, tem-se esclarecido sobre os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na (re)absorção do magnésio. Estudos genéticos nas famílias com hipomagnesemia de origem hereditária identificaram alguns genes que estão direta ou indiretamente envolvidos na homeostase do magnésio. Estes revelaram algumas novas proteínas relacionadas no transporte de magnésio como o cotransportador de sódio-cloro sensível a tiazídicos (NCCT) presente na Síndrome de Gitelman, a subunidade γ na Hipomagnesemia Autossômica Dominante, o receptor potencial transiente, subfamília M, membro 6 (TRPM6) na Hipomagnesemia com Hipocalcemia Secundária, as claudinas 16 e 19 na Hipomagnesemia Familiar com Hipercalciúria e Nefrocalcinose, o fator de crescimento epitelial (EGF) na Hipomagnesemia Isolada Recessiva, o canal de cloro (CLC) e o receptor-sensor de cálcio (CaSR) na Síndrome de Bartter. O diagnóstico dessas condições deve ser precoce para prevenir morbidade e mortalidade, de modo que os pediatras são peças-chave nesse processo. O objetivo desse estudo foi realizar uma revisão sistemática da literatura sobre etiologia hereditária da hipomagnesemia nas bases de dados LILACS-BIREME, MD Consult, PUBMED, SciELO. Foram selecionados artigos publicados nos últimos dez anos.

Palavras-chave: Homeostase do magnésio, Hipomagnesemia, junção de oclusão, FHHNC, nefrocalcinose, claudina 16, claudina 19, FXYD2, EGF, CaSR, Síndrome de Gitelman, Síndrome de Bartter.

ABSTRACT

Hypomagnesemia is a common laboratory finding in clinical practice. It can be a result of a primary or secondary process. Primary hypomagnesemia constitutes a rare heterogeneous group of disorders characterized by renal and/or intestinal magnesium wasting resulting in generally shared symptoms of magnesium depletion, such as tetany and generalized seizures, and often including associated disturbances in calcium excretion. Through studies of these disorders, more insight into the molecular and cellular mechanisms that underlie magnesium (re)absorption is gained. Genetic studies in families with hereditary magnesium wasting syndromes have identified several genes that are either directly or indirectly involved in active magnesium handling. They revealed several new proteins involved in magnesium transport as the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter (NCCT) in the Gitelman's Syndrome, the γ subunit of the Na^+/K^+ -ATPase in the Autosomal Dominant Hypomagnesemia with Hypocalciuria, the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6 (TRPM6) in the Hypomagnesemia with Secondary Hypocalcemia, the claudins 16 and 19 in the Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis, the epidermal growth factor (EGF) in the Isolated Recessive Hypomagnesemia with Normocalciuria, the chloride channel (CLC) and calcium-sensing receptor (CaSR) in the Bartter's Syndrome. The diagnosis of these conditions must be early to prevent morbidity and mortality and that is why pediatricians should know about them. The aim of the present study was to realize a systematic review of literature in LILACS-BIREME, MD Consult, PUBMED, SciELO about hereditary etiology of hypomagnesemia. Articles published in the last ten years were selected.

Keywords: Magnesium handling, Hypomagnesemia, tight junction, FHHNC, nephrocalcinosis, claudin 16, claudin 19, FXD2, EGF, CaSR, Gitelman's Syndrome, Bartter's Syndrome.

RESUMEN

La hipomagnesemia es un hallado de laboratorio común en la práctica clínica. Puede ser primaria o secundaria. La hipomagnesemia primaria constituye un grupo raro heterogéneo de trastornos caracterizados por la pérdida renal y / o intestinal de magnesio, resultando en síntomas compartidos de la depleción de magnesio, como tetania y convulsiones generalizadas, y con frecuencia asociado a distubios de la excreción de calcio. Por medio de estudios de estas entidades se ha aclarado sobre los mecanismos moleculares y celulares implicados en la (re)absorción de magnesio. Los estudios genéticos en familias con hipomagnesemia hereditaria identificaron algunos genes directa o indirectamente involucrados en la homeostasis del magnesio. Ellos revelaron algunas nuevas proteínas relacionadas en el transporte de magnesio, como el cotransportador de cloro-sodio sensible a diuréticos tiazidicos (NCCT) en el síndrome Gitelman, la subunidad γ en la Hipomagnesemia Autosómica Dominante, el receptor potencial transitorio, subfamilia M, miembro 6 (TRPM6) en Hipomagnesemia con Hipocalcemia Secundaria, las claudinas 16 y 19 en la Hipomagnesemia Familiar con Hipercalciuria y Nefrocalcinosis, el factor de crecimiento epitelial (EGF) en la hipomagnesemia aislada recesiva, el canal del cloro (CLC) y el receptor-sensor de calcio (CaSR) en el síndrome de Bartter. El diagnóstico de estas condiciones debe ser precoz para prevenir la morbilidad y la mortalidad, por lo que los pediatras son fundamentales en ese proceso. El objetivo de ese estudio fue realizar una revisión sistemática de la literatura sobre la etiología de la hipomagnesemia hereditaria en las bases de datos LILACS-BIREME, MD Consult, PUBMED, SciELO. Fueron relacionados artículos de los últimos diez años.

Palabras clave: Homeostasis de magnesio, hipomagnesemia, FHHNC, claudina 16, claudina 19, FXYD2, EGF, CaSR, el síndrome de Gitelman, el síndrome de Bartter.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-APB	2-aminoetoxidiefenil
20-HETE	Ácido 20-hidroxiieicosatetraenóico
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
Ca²⁺	Cálcio
CaSR	Receptor-sensor de cálcio
Cl⁻	Cloro
CLC	Canal de cloro
CLC-Ka	Canal de cloro tipo Ka
CLC-Kb	Canal de cloro tipo Kb
DCT	Túbulo contorcido distal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECL1	Primeira alça extracelular
ECL2	Segunda alça extracelular
EGF	Fator de crescimento epitelial
EGFr	Receptor do fator de crescimento epitelial
FE_{Mg}	Fração de excreção de magnésio
FHNNC	Hipomagnesemia familiar com hiper calciúria e nefrocalcinose
HRAS	Hospital Regional da Asa Sul
K⁺	Potássio
MDCK	Células renais de cães Madin-Darby
Mg²⁺	Magnésio
Na⁺	Sódio
NCCT	Cotransportador de cloreto de sódio sensível a tiazídico
Ni²⁺	Níquel
NKCC	Cotransportador Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man numbers
P_{Cr}	Concentração plasmática da creatinina
PEG2	Prostaglandina E2
P_{Mg}	Concentração plasmática do magnésio

Pro-EGF	Precursor do fator de crescimento epitelial
PKA	Proteína α -quinase
PTH	Paratormônio
RACK1	Receptor de atividade proteína quinase C
REA	Receptor da atividade do estrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
ROMK	Canal de potássio medular
TAL	Ramo espesso da alça de Henle
TER	Resistência elétrica transepitelial
TRPs	Receptores potencial transiente
TRPM	Receptor potencial transiente, subfamília melastatina
TRPM6	Receptor potencial transiente, subfamília melastatina, membro 6
TRPM7	Receptor potencial transiente, subfamília melastatina, membro 7
U_{Cr}	Concentração urinária da creatinina
U_{Mg}	Concentração urinária do magnésio
Zi²⁺	Zinco
ZO	Proteína da <i>zonulla ocludens</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo esquemático das junções intercelulares (A). Microscopia eletrônica mostrando os componentes do complexo unitivo. A junção de oclusão aparece como uma área de fusão entre duas células na microscopia eletrônica (B).....	06
Figura 2	Modelo de circuito elétrico de resistência em série e paralelo através das vias trans- e paracelular de uma camada de célula epitelial.....	07
Figura 3	Localização renal das claudinas em mamíferos.....	08
Figura 4	Modelo conceitual de claudina.....	09
Figura 5	Coexpressão entre as claudinas 16 e 19 em uma célula epitelial.....	11
Figura 6	Modelo conceitual da estrutura das TRPM6 e 7.....	12
Figura 7	Representação esquemática dos homômeros TRPM6 e TRPM7 ligadas a um domínio quinase e do heterômero TRPM6/7.....	13
Figura 8	Resumo esquemático dos componentes moleculares envolvidos na regulação da TRPM6 de uma célula do túbulo contorcido distal.....	14
Figura 9	Modelo esquemático da movimentação iônica pela bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e da relação da proteína FXYD com esta bomba.....	17
Figura 10	Diagrama esquemático mostrando a seqüência de aminoácidos que formam os domínios do CaSR.....	19
Figura 11	Homeostase da regulação renal do magnésio.....	22
Figura 12	Fotografias de coloboma macular (A) e nefrocalcinose (B) registradas em pacientes com FHHNC.....	30

Figura 13	Modelo esquemático da localização da claudina 16 (paracelina-1) e claudina 19 na alça de Henle.....	31
Figura 14	Resíduos de aminoácidos afetados por mutações na claudina 16 em uma coorte de 25 famílias.....	32
Figura 15	Modelo conceitual mostrando a localização da subunidade γ nas células do túbulo contorcido distal.....	35
Figura 16	Heredograma da primeira família estudada com hipomagnesemia autossômica recessiva isolada (A). Representação esquemática da mutação C3209T do EGF (B).....	37
Figura 17	Modelo esquemático da mutação P1070L (A) impedindo a adequada estimulação do EGFr, com prejuízo da função da TRPM6 (B).....	38
Figura 18	Algumas mutações identificadas em pacientes com hipomagnesemia com hipocalcemia secundária.....	41
Figura 19	Modelo proposto de absorção intestinal do magnésio.....	42
Figura 20	Modelo celular de transporte do magnésio na alça de Henle, mostrando as proteínas envolvidas nas variantes da Síndrome de Bartter.....	43
Figura 21	Modelo estrutural do CLC-Kb e de algumas mutações encontradas em pacientes com Síndrome de Bartter clássica.....	44
Figura 22	Topografia das mutações no CaSR. Aquelas que indicam ganho de função foram marcadas com uma estrela.....	46
Figura 23	Diagrama esquemático de mutações identificadas em 25 chineses com Síndrome de Gitelman.....	48
Figura 24	Modelo celular de transporte do magnésio no túbulo contorcido distal, mostrando a localização do NCCT.....	49
Figura 25	Heredograma da família caucasiana. O caso índice foi identificado com uma seta, os hipertensos com H, os hipercolesterêmicos com C, os hipomagnêsemicos com cor preta e os assintomáticos com cor cinza.....	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Causas de Hipomagnesemia.....	26
Tabela 1	Fatores que influenciam a TRPM6 e suas consequências na homeostase do magnésio.....	16
Tabela 2	Proteínas envolvidas no controle molecular da homeostase do magnésio....	23
Tabela 3	Diagnóstico diferencial das hipomagnesemias hereditárias de origem renal.....	29
Tabela 4	Variantes da Síndrome de Bartter.....	43

SUMÁRIO

RESUMO.....	Vi
ABSTRACT.....	Vii
RESUMEN.....	Viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	Ix
LISTA DE FIGURAS E SIGLAS.....	Xi
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	Xiii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	03
3 METODOLOGIA.....	04
3.1 Pesquisa Bibliográfica.....	04
3.2 Normas Adotadas.....	04
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
4.1 Junção de Oclusão.....	06
4.2 Claudinas.....	08
4.3 TRPM6 e TRPM7.....	12
4.4 Bomba de Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	17
4.5 Receptor-sensor de Cálcio.....	19
4.6 Homeostase do Magnésio.....	21
4.7 Conteúdo Corporal e Função do Magnésio.....	24
4.8 Hipomagnesemia.....	25
4.9 Hipomagnesemia de Origem Hereditária.....	28
4.10 Hipomagnesemia familiar com hipercalciúria e nefrocalcinose.....	30
4.11 Hipomagnesemia autossômica dominante com hipocalciúria.....	35
4.12 Hipomagnesemia isolada autossômica recessiva.....	37
4.13 Hipomagnesemia com hipocalcemia secundária.....	40
4.14 Síndrome de Bartter.....	43
4.15 Síndrome de Gitelman.....	47
4.16 Hipomagnesemia, hipertensão e hipercolesterolemia.....	51
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

No universo dos elementos químicos que compõem o organismo humano, poucos são aqueles que participam de forma tão determinante em diversas reações bioquímicas como o magnésio. Embora esse íon seja o quarto mais abundante no corpo humano, ele é essencial à vida de todas as células animais e vegetais por estar diretamente imbricado aos processos de obtenção de energia.

É justamente por participar da manutenção da conformação de macromoléculas, de centenas de enzimas como cofator, da regulação de segundos mensageiros e de muitos transportadores e canais iônicos, que qualquer variação, ainda que tênue, na concentração plasmática de magnésio pode resultar em condições patológicas incompatíveis com a vida.

No intuito de garantir o precípua à sobrevivência, uma sinfonia molecular composta por proteínas transportadoras e gradientes hidrostáticos e osmóticos ora influem, ora permeiam o magnésio de um lado ao outro através das membranas plasmáticas e entre as mesmas.¹

A homeostase do magnésio depende do balanço entre sua absorção intestinal e excreção e reabsorção renais, os quais são processos molecularmente complexos ainda parcialmente compreendidos que dependem da pré-existência de potenciais elétricos adequados e da participação de milhares de proteínas, atuando como canais transmembrana e como carreadoras de íons e moléculas, constituindo-se assim as vias de sinalização e transporte dos íons de magnésio.²

É de se esperar, desse modo, que mutações nos genes responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas ao transporte do magnésio resultem em patologias caracterizadas pelo elevação dos níveis plasmáticos de magnésio – hipermagnesemia – ou por sua redução – hipomagnesemia.

As alterações patológicas relacionadas ao magnésio são decorrentes, em sua maioria, de distúrbios adquiridos. Trata-se de um achado comum em pacientes hospitalizados, principalmente em unidades de terapia intensiva. No entanto, reveste-se de certa raridade quando considerada sua origem hereditária.³

Os primeiros casos de tubulopatias hereditárias que cursavam com hipomagnesemia foram descobertos em meados dos anos sessenta, mas, somente nos anos noventa foram definidas como entidades clínicas com origem genética e fisiopatologia distintas.⁴

Neste trabalho, foi realizada uma revisão da bibliografia disponível nos últimos dez anos sobre hipomagnesemia de origem hereditária com o intuito de atualizar as informações aos profissionais de saúde.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Fornecer aos profissionais de saúde informações atuais sobre as etiologias hereditárias que cursam hipomagnesemia a fim de permitir um diagnóstico precoce dessas desordens para possibilitar uma diminuição na morbimortalidade desses indivíduos.

3 METODOLOGIA

3.1 Pesquisa bibliográfica

As referências bibliográficas foram selecionados a partir de pesquisa de artigos de revisão, relatos de caso e artigos originais nos idiomas português, espanhol e inglês publicados nos últimos dez anos. Os descritores utilizados foram: “Magnesium Handling”, “Hypomagnesemia”, “Hereditary Hypomagnesemia”, “Nephrocalcinoses”, “Claudin-16”, “Claudin-19”, “Tight Junction”, “TRPM6”, “EGF”, “CaSR”, “FXRD2”, “Batter Syndrome” e “Gitelman Syndrome”.

A pesquisa bibliográfica foi realizada de junho a setembro de 2009 nos sítios eletrônicos das bases de dados LILACS-BIREME (<http://bases.bireme.br>), PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov), MD CONSULT (<http://mdconsult.com>) e SciELO (www.scielo.br). A seleção dos artigos ocorreu de acordo com os critérios do Centro Oxford de Evidência.

3.2 Normas adotadas

Este trabalho seguiu as orientações das normas do *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver) para redação das referências bibliográficas e *List of Journals Indexed in Index Medicus* para abreviatura dos títulos dos periódicos.

4 REVISÃO DA LITERATURA

À medida que ocorre a diferenciação celular, as particularidades estruturais e fisiológicas características das funções que as células irão desempenhar vão surgindo. Isso permite que os diversos tipos de tecido desempenhem atribuições específicas. Os tecidos epiteliais, por exemplo, atuam no revestimento de superfícies e na secreção e absorção de substâncias.

Os epitélios intestinal e renal se especializaram então em um tipo de epitélio simples específico que lhes possibilita trocar água e solutos iônicos e não iônicos entre o intestíno e o lúmen e entre as células vizinhas por meio de mecanismos ativos ou passivos.⁵

Para haver essa permuta, podem ser utilizadas as vias transcelular ou paracelular. A via transcelular utiliza vários carregadores e canais transmembranas. Já a passagem pela via paracelular ocorre por meio das junções de oclusão. Juntas, essas duas vias complementares estabelecem a seletividade e a regulação das barreiras necessárias à absorção e secreção.⁶

Os epitélios chamados de compactos, onde o mecanismo transcelular gera elevados gradientes eletroquímicos, possuem uma permeabilidade paracelular menor e a seletividade iônica tem menos importância. No entanto, nos epitélios chamados de fenestrados, como o intestino delgado e os túbulos renais, a via paracelular é um componente importante do transporte como um todo e variações na seletividade iônica possuem um impacto significativo no transporte de fluidos.^{6,7}

Todos esses processos devem, portanto, estarem intactos para que seja estabelecido o pleno equilíbrio iônico, inclusive do magnésio, essencial ao funcionamento adequado do corpo humano. Qualquer interferência herdada ou adquirida nesse complexo contexto poderá acarretar em distúrbios orgânicos distintos.

Uma vez que o enfoque deste trabalho são aqueles distúrbios relacionados à deficiência de magnésio, ressaltaremos o papel das claudinas da junção de oclusão, dos receptores potencial transiente (TRPs), dos canais iônicos, do receptor-sensor de cálcio (CaSR) e do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFr), pois alterações em seus funcionamentos já foram correlacionadas com entidades clínicas definidas que cursam com hipomagnesemia.

4.1 Junção de Oclusão

Os tecidos epiteliais são formados por camadas celulares contíguas devido à capacidade de coesão entre suas células. Esta adesão celular é reforçada pelas junções intercelulares (figura 1), as quais são estruturas especializadas da membrana plasmática, que permitem a interconexão entre as células. O complexo unitivo é a união de quatro diferentes estruturas juncionais: junção de oclusão (*zonula occludens* ou *tight junctions*), junção aderente (*zonula adherens*), desmossomos (*maculea adherens*) e junção comunicante (*nexus* ou *gap junctions*).^{5,8}

A junção de oclusão localiza-se na porção mais apical da membrana lateral da célula epitelial. Ela é composta de bandas finas de proteínas da membrana plasmática que circundam completamente a célula epitelial e estão em contato com as bandas finas similares das células adjacentes. Ela aparece, à microscopia eletrônica, como uma área de fusão entre duas células (figura 1), mas podem ser visualizadas estrias em imagens de microscopia eletrônica por criofratura. Esses sulcos são feitos de partículas de proteínas de cerca de dez nanômetros de diâmetro.^{9,10,11}

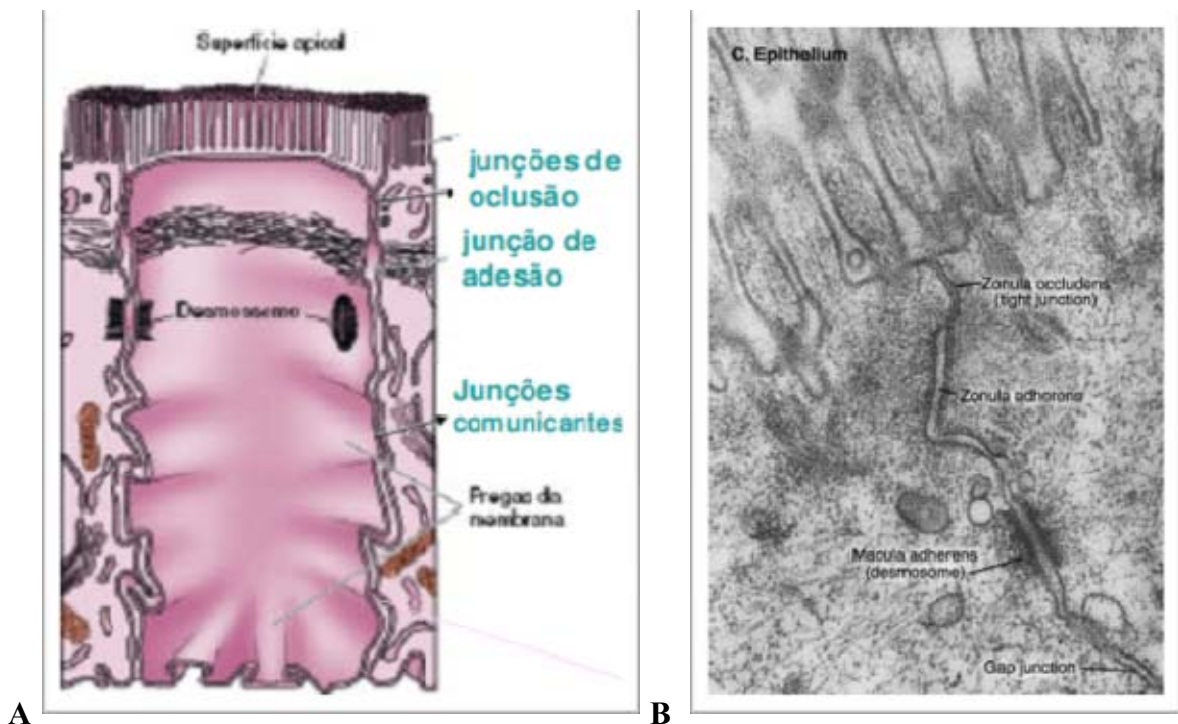


Figura 1. Modelo esquemático das junções intercelulares (A). Microscopia eletrônica mostrando os componentes do complexo unitivo. A junção de oclusão aparece como uma área de fusão entre duas células à microscopia eletrônica (B).

Fonte: Junqueira, 2004 (A) e Collares-Buzato, 2001 (B).

A junção de oclusão é então caracterizada pela justaposição das membranas de duas células contíguas, com fusão dos folhetos externos das membranas. Sua relevância reside na sua propriedade de formar uma barreira física paracelular, ou seja, entre as células epiteliais. Isso impede a livre passagem de fluidos e partículas através de sua espessura. O grau de oclusão varia de acordo com a função do órgão onde essa junção está localizada. Ela pode ser completa como a observada na bexiga ou possuir poros como as junções de segmentos do néfron. Esses fenômenos são importantes para a compreensão dos mecanismos absorptivos.⁵

Sabendo-se que as membranas celulares geralmente possuem resistência elevada, são as junções de oclusão que determinam a resistência elétrica transepitelial (TER). Teoricamente, o espaço intercelular lateral poderia contribuir para a resistência em série, mas existe pouca evidência de que isso seja significativo fisiologicamente (figura 2).⁷

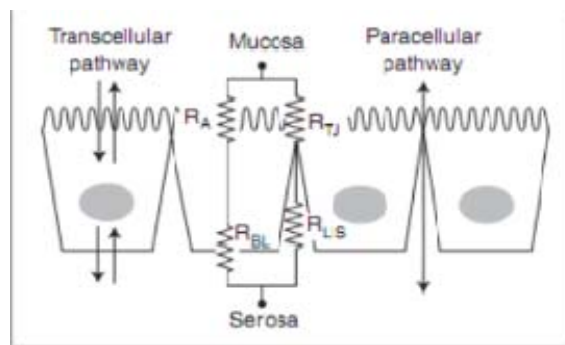


Figura 2. Modelo de circuito elétrico de resistência em série e paralelo através das vias trans- e paracelular de uma camada de célula epitelial. O transporte transcelular é controlado por transportadores nas superfícies apical e basolateral. A resistência desses elementos é tipicamente maior do que dos elementos da via paracelular. Assim, a resistência epitelial é determinada pela resistência das junções de oclusão, a qual é definida pela composição de claudinas dessas junções. R_A : resistência apical; R_{BL} : resistência basolateral; R_{LIS} : resistência do espaço lateral intercelular; R_{TJ} : resistência da junção de oclusão.

Fonte: Anderson, 2009.

A junção de oclusão é um complexo protéico. Já foram identificadas mais de 40 proteínas diferentes integrantes dessa junção. São proteínas transmembrana, placas citoplasmáticas e proteínas do citoesqueleto. Dentre elas, a claudina é considerada a mais crucial para a determinação das propriedades e da estrutura da junção de oclusão. Além das claudinas possuírem participação na definição da resistência elétrica, todos os estudos mais recentes apoiam também o papel delas na seletividade iônica das junções de oclusão.^{7,11}

A partir do ponto em que é sabida a relevância dessa junção no apropriado funcionamento do intestino e dos rins, e que esses órgãos estão envolvidos diretamente na homeostase do magnésio, foi descoberto que mutações em tipos específicos de claudinas podem levar a estados crônicos de hipomagnesemia.¹⁰

4.2 Claudinas

O nome claudina tem origem no latim *claudare*, que significa “perto”.⁷ As claudinas foram descritas pela primeira vez como integrantes da junção de oclusão por Furuse e Tsukita em 1998.¹² Sabe-se hoje que a família das claudinas inclui cerca de vinte e quatro membros.^{10,11} Muitos desses membros são encontrados ao longo do néfron (figura 3).¹²

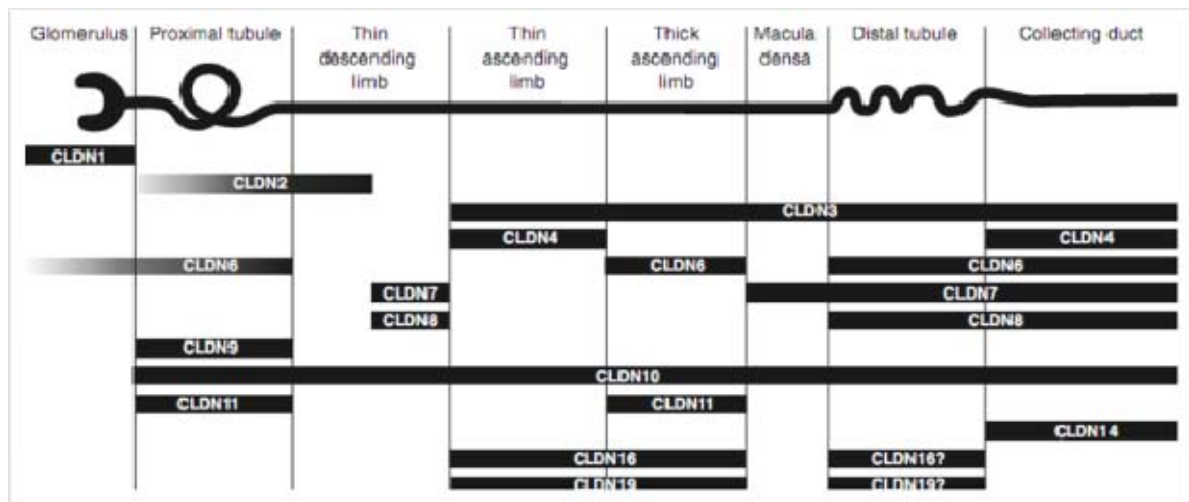


Figura 3. Localização renal das claudinas em mamíferos. A expressão tubular das claudinas 6 e 9 só foram encontradas no período neonatal. As claudinas 5 e 15 não foram exibidas nesse modelo porque localizam-se no endotélio vascular e glomerular. Não foram estudadas as claudinas 12, 18, 20-24.

Fonte: Günzel, 2008.

As claudinas são compostas de quatro domínios transmembranas, duas alças extracelulares e duas extremidades citoplasmáticas: uma sequência menor amino-terminal e outra maior e mais variável com uma porção carboxila terminal (figura 4). As alças extracelulares possuem constituição e função diferentes.^{7,11}

A primeira alça extracelular (ECL1) possui cerca de cinquenta aminoácidos com duas cisteínas que são conservadas em todas as claudinas. Esses aminoácidos podem apresentar cargas positivas ou negativas com surgimentos de forças atrativas ou repulsivas. Krause e colaboradores sugerem que a determinação da formação de poros ou da impermeabilidade da claudina é baseada no encontro espacial de um predomínio de forças repulsivas ou atrativas na ECL1. O poro é então aberto se o número de cargas repulsivas for equivalente e fechado se for desigual. Além disso, essas cargas conferem à ECL1 a propriedade de filtro eletrostático.^{7,9}

A segunda alça (ECL2) é menor, sendo composta por aproximadamente metade dos aminoácidos da ECL1. A ECL2 consegue estreitar a fenda paracelular pois possui os domínios de ligação célula-célula. Já foi observado oligomerização desta alça, embora seja desconhecido como esse processo ocorre.^{7,9}

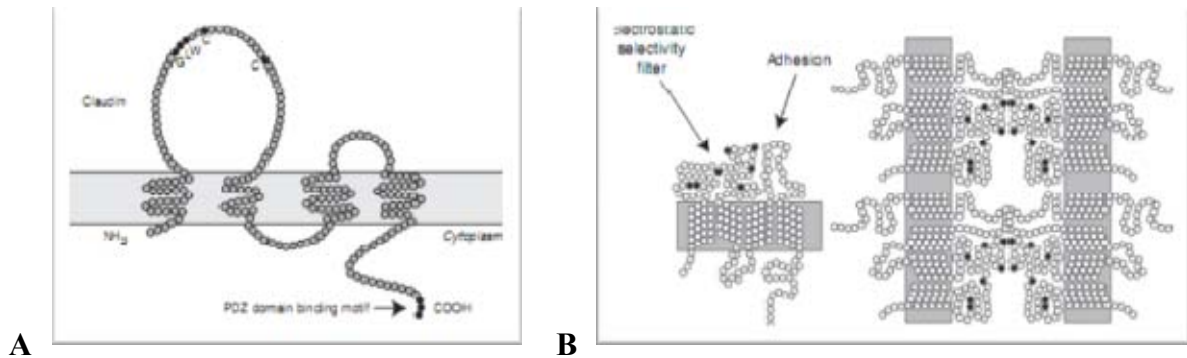


Figura 4. Modelo conceitual de claudina. A primeira hélice extracelular contém o filtro eletrostático do poro e a segunda hélice possui os domínios de ligação célula-célula (A). A união entre as células forma uma barreira com poros de tamanho e carga específicos (B).

Fontes: Furuse, 2009 (A) e Anderson, 2009 (B).

A longa extremidade citoplasmática com uma carboxila terminal é o local de ligação das proteínas da *zonula ocludens* (ZO). A ligação dos tipos 1 (ZO-1) ou 2 (ZO-2) dessas proteínas é essencial para a localização das claudinas na junção de oclusão. Um exemplo dessa atribuição foi realizado por meio de pesquisas com células renais de cães Madin-Darby (MDCK) onde a ruptura da ligação entre ZO-1 e a claudina16 fez com que esta se localizasse na membrana lateral ao invés de estar presente na junção de oclusão.^{13,14}

Os variados tipos de claudinas podem exercer papéis diferentes embora algumas delas ainda não tenham tido suas funções esclarecidas. Também é desconhecida a razão de somente alguns subtipos poderem formar poros (claudinas 2, 7, 10, 15 e 16).⁹

O perfil e os níveis de diferentes claudinas expressas em uma dada junção de oclusão apresentam um papel determinante na permeabilidade e seletividade da junção de oclusão. A permeabilidade também depende do tamanho do soluto. Solutos que possuem um raio menor do que 4 Å apresentam grande capacidade de passar pelos poros. Acredita-se, porém, que aqueles solutos que possuírem diâmetros maiores também poderão cruzar para o intestício caso haja uma quebra momentânea na barreira ou caso sejam parcialmente desidratados.

Além disso, os poros possuem uma capacidade de discriminar a carga iônica. Essa seletividade iônica provavelmente é mediada pela ECL1, conforme dito anteriormente. Claudinas 2, 15, 16 e 19 possuem uma preferência por cátion. Já a claudina 10 prefere ânions.

No entanto, a magnitude da seletividade iônica conferida pelas claudinas e o que regula o fluxo dos solutos ainda são obscuros.⁷

As claudinas 16 e 19 formam poros com alta seletividade para cátions, mas a claudina 16 funciona na verdade como um canal de sódio, enquanto a claudina 19 funciona como um bloqueador de cloro. Depleção da claudina 16 ou da 19 gera redução da seletividade catiônica da junção de oclusão.¹⁵ No entanto, a manutenção da TER indica que a função de barreira física permanece inalterada.¹⁴

Caso ambas claudinas estejam ausentes nos rins, a junção de oclusão ficará altamente permeável ao cloro, mas não ao sódio e apresentará elevada seletividade aniônica enquanto o potencial luminal inverte para valores negativos à medida que ocorre reabsorção de cloro. Esse fato eliminará a força de reabsorção do magnésio que seria produzida pela reabsorção de sódio, causando a perda de magnésio na urina juntamente com o cálcio. O acúmulo luminal de cloro também acabará com a neutralidade elétrica do fluido tubular, levando a uma retenção maior de sódio e potássio por meio de outras vias para alcançar um equilíbrio.¹⁵

Isso explica os achados de hipermagnesiúria e hipercalciúria em pacientes com hipomagnesemia familiar com hipercalciúria e nefrocalcinose (FHHNC) que podem possuir mutações na claudina 16 ou 19. A claudina 16, também conhecida como paracelina-1, é expressa apenas na alça de Henle. No entanto, a claudina 19 que tem a mesma localização renal, mas está presente nos olhos também, o que explica as alterações oculares associadas apresentadas por esses pacientes.^{14,15}

As claudinas possuem ainda a capacidade de unirem-se com a membrana plasmática da mesma célula (ligação *cis*) ou da célula vizinha (ligação *trans*). Interações também podem ocorrer entre duas moléculas de um mesmo tipo (forma homomérica) ou entre tipos diferentes (forma heteromérica).¹⁰ A combinação e a proporção das claudinas dessas ligações variam de acordo com o tecido.¹¹

Um estudo conseguiu demonstrar que as claudinas 16 e 19 interagem nas membranas celulares, resultando em sinergismo na determinação da seletividade iônica da junção de oclusão, agindo de modo cooperativo e não apenas adesivo. Quando as claudinas 16 e 19 foram coexpressadas em modelos celulares (figura 5), a seletividade iônica da via paracelular foi mudada dramaticamente de ânions para cátions. Mutações em qualquer dessas claudinas que promoviam interferência na habilidade de ligação entre elas, interrompem essa mudança fisiológica. A função da claudina 16 não é dependente da claudina 19, mas a interação entre essas claudinas tem papel no trânsito e na polimerização da claudina 16.⁷ A oligomerização das claudinas 16 e 19 deve ocorrer no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi,

assim como acontece com outras proteínas de membrana, antes delas alcançarem a junção de oclusão, já que esse passo é fundamental para o trânsito delas até a superfície da membrana celular.¹⁴

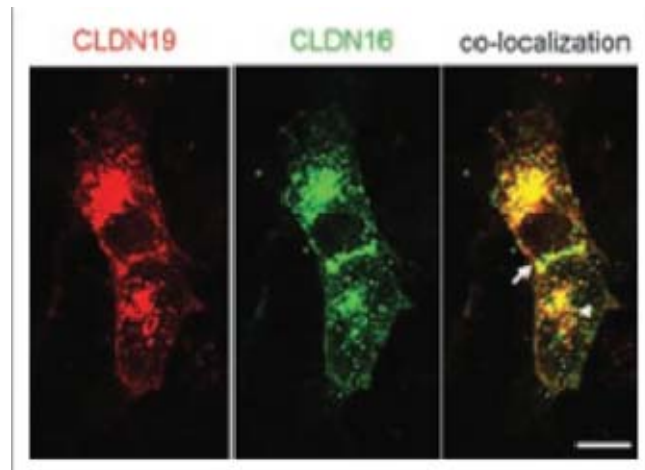


Figura 5. Coexpressão entre as claudinas 16 e 19 em uma célula epitelial. A colocalização dessas claudinas foi encontrada também na área de interação célula-célula (seta branca).

Fonte: Hou, 2008.

Com base em todas essas informações, tudo indica que a associação entre as claudinas 16 e 19, por meio de ligações heterométricas, pode modificar a seletividade iônica da via paracelular. Mutações na claudina 16 ou 19 que anulam a ligação entre elas aumentam a taxa de remoção dessas proteínas por meio de degradação das mesmas por lisossomos ou endossomos, produzindo junções de oclusão com seletividades iônicas muito parecidas com aquelas ocasionadas pela deleção de seus genes separadamente. Isso faz pensar que esse tipo de mutação também pode estar implicado na fisiopatologia da FHHNC.^{7,14}

Outras claudinas presentes nas junções de oclusão do ramo espesso da alça de Henle, incluindo as claudinas 3, 10, 11 e 18, podem desempenhar um importante papel na seletividade iônica dessas junções e assumirem a função da barreira na ausência das claudinas 16 e 19. A claudina 10, em particular, diminui a seletividade catiônica, podendo ser uma candidata a exercer o papel de limitadora do complexo funcional claudina16/claudina19. Pesquisas futuras poderão esclarecer melhor esses mecanismos que estão envolvidos também na homeostase do magnésio.^{14,15}

4.3 TRPM6 e TRPM7

O subgrupo melastatina da família TRP de canais catiônicos (TRPM) possui 8 membros. Dois deles estão envolvidos na regulação da homeostase do magnésio: TRPM6 (receptor potencial transitente, subfamília melastatina, membro 6) e TRPM7 (membro 7).¹⁶

Suas estruturas podem ser divididas em seis domínios transmembrana e dois longos domínios citoplasmáticos: uma região amino-terminal e outra carboxila-terminal.^{17,18} A enzima α -quinase está integrada à porção carboxila. Essa composição das TRPM6 e 7 as capacita para formar poros entre o quinto e o sexto segmentos transmembranas (figura 6).¹⁹

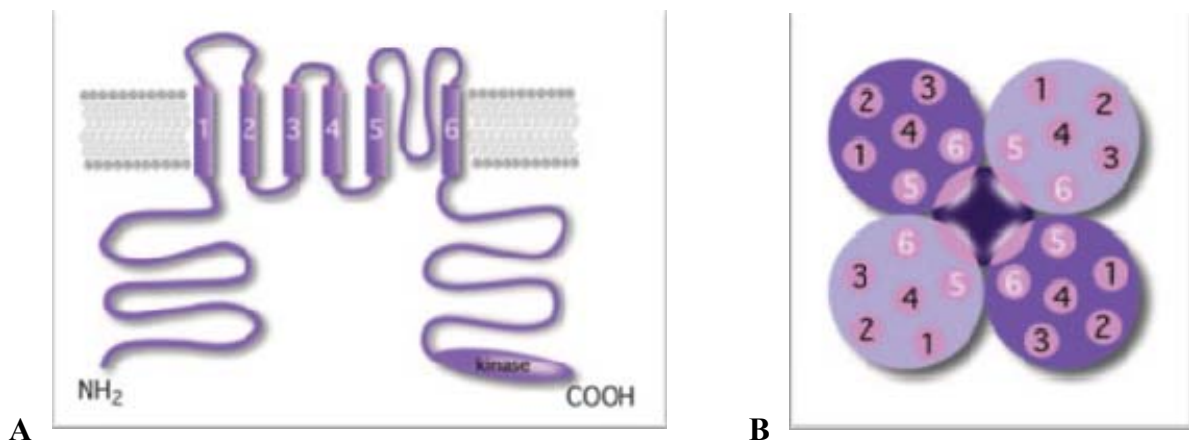


Figura 6. Modelo conceitual da estrutura das TRPM6 e 7. Elas pertencem aos maiores canais iônicos da família TRP e são formados por cerca de 2000 aminoácidos, incluindo os domínios com porções citoplasmáticas amino-terminal e carboxi-terminal e a proteína α -quinase (A). Presume-se que o poro central seja cercado pelos 6 domínios transmembrana (B).

Fonte: Hoenderop, 2005.

A TRPM7 está presente em todos os tipos celulares e por isso é tido como um canal ubíquo. Promove sua autofosforilação, mas não consegue induzir esse processo em outras TRPs. Acredita-se que seja um canal constitutivo específico para cátions divalentes com permeabilidade predominante em condições fisiológicas para o Mg^{2+} e, em seguida, para o Ca^{2+} , mas que também está envolvido no transporte de Ni^{2+} e Zn^{2+} . Na ausência de cátions divalentes, esse canal conduz os cátions monovalentes. Pode ocorrer inibição gradual desse canal de acordo com o aumento da concentração intracelular do Mg^{2+} , processo este que é influenciado pela atividade da fosfotransferase.^{16,20,21} Assim, a TRPM7 potencialmente poderia servir como canal e sensor de magnésio. Alguns estudos sugerem ainda um papel na proliferação e morte celular.¹⁶

A TRPM6 é encontrada ao longo de todo o intestino e nos rins, na membrana apical do túbulo contorcido distal, sendo responsável pelo influxo ativo apical do magnésio nessas células. Alguns estudos também detectaram sua presença nos pulmões e testículos.¹⁶ A TRPM6 tem 50% da sua estrutura homóloga à da TRPM7. Os fatores que são capazes de aumentar a corrente elétrica, como a acidificação do meio extracelular e os níveis micromolares de 2-aminoetoxidiefenil (2-APB), são menos intensos na TRPM6 quando comparados com os efeitos exercidos na TRPM7.^{16,18} Mesmo assim os potenciais elétricos entre elas são similares mostrando que quando avaliados em ensaios em vivo esses fatores não apresentam significância clínica.^{20,23}

A TRPM6 é permeável ao Mg^{2+} e Ca^{2+} nessa ordem de prioridade, mas na ausência de cátions divalentes também se torna permeável ao Na^+ .^{16,48} A regulação da (re)absorção renal e intestinal do magnésio é diretamente inibida pelo aumento intracelular do Mg^{2+} .^{19,22} Esse controle negativo sobre o canal depende de sua autofosforilação. Essa proteína é ainda capaz de induzir a fosforilação do TRPM7.^{18,20}

A TRPM6 pode ser encontrada na forma homômera ou pode se fundir com o homólogo TRPM7 formando um complexo canal iônico heterômero da membrana plasmática (figura 7).^{18,20} A coexpressão da TRPM6 com a TRPM7 resulta em amplificação da corrente da TRPM7. Apesar disso, tem-se que essas proteínas, isoladamente ou unidas, exercem funções biológicas distintas indispensáveis e que a ausência de um canal não pode ser compensada pela presença do outro.¹⁶ A manutenção da carência de magnésio em vigência de mutações da TRPM6 observadas em pacientes com hipomagnesemia com hipocalcemia secundária exemplifica essa incapacidade.^{20,21}

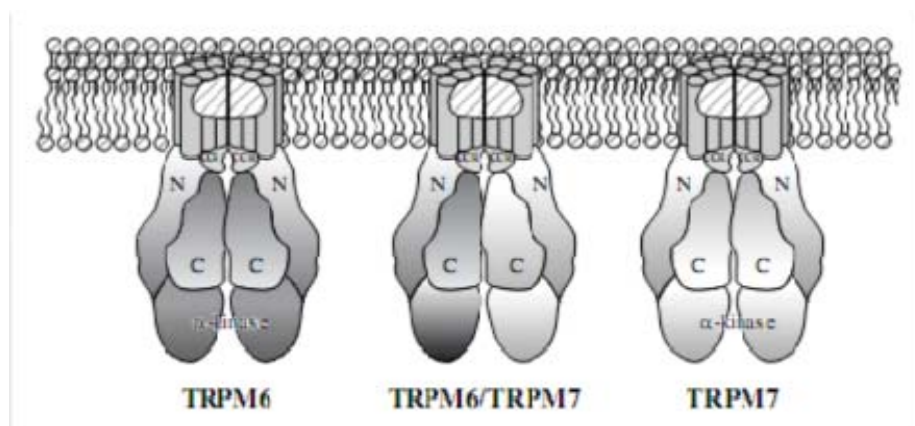


Figura 7. Representação esquemática dos homômeros TRPM6 e TRPM7 ligados a um domínio quinase e do heterômero TRPM6/7. Duas subunidades de cada canal são representadas como metade de um poro embebido na bicamada lipídica da membrana celular.

Fonte: Schmitz, 2007.

As TRPM6 e TRPM7 são consideradas estruturalmente únicas porque podem se fundir com um domínio quinase, estabelecendo uma ligação entre um canal iônico e uma enzima (figuras 6 e 7).^{20,22} Em função dessa união, essas estruturas podem ser chamadas de “canzimas”.^{20,23} Alguns estudos promoveram a deleção do domínio quinase e observaram ativação parcial do TRPM7 associada à diminuição da amplitude do gradiente eletroquímico. Apesar de não ser essencial para a propagação do canal, o domínio quinase provavelmente age como modulador da sua atividade por feedback negativo.^{19,20}

Alguns fatores podem interagir com o domínio α -quinase e inibir a atividade da TRPM6. São eles (figura 8): o receptor de atividade proteína quinase C (RACK1) e o receptor da atividade do estrogênio (REA). Sabe-se que as moléculas da adenosina trifosfato (ATP) interferem na regulação do domínio α -quinase, mas o mecanismo ainda é obscuro de modo que são necessários mais estudos.¹⁸

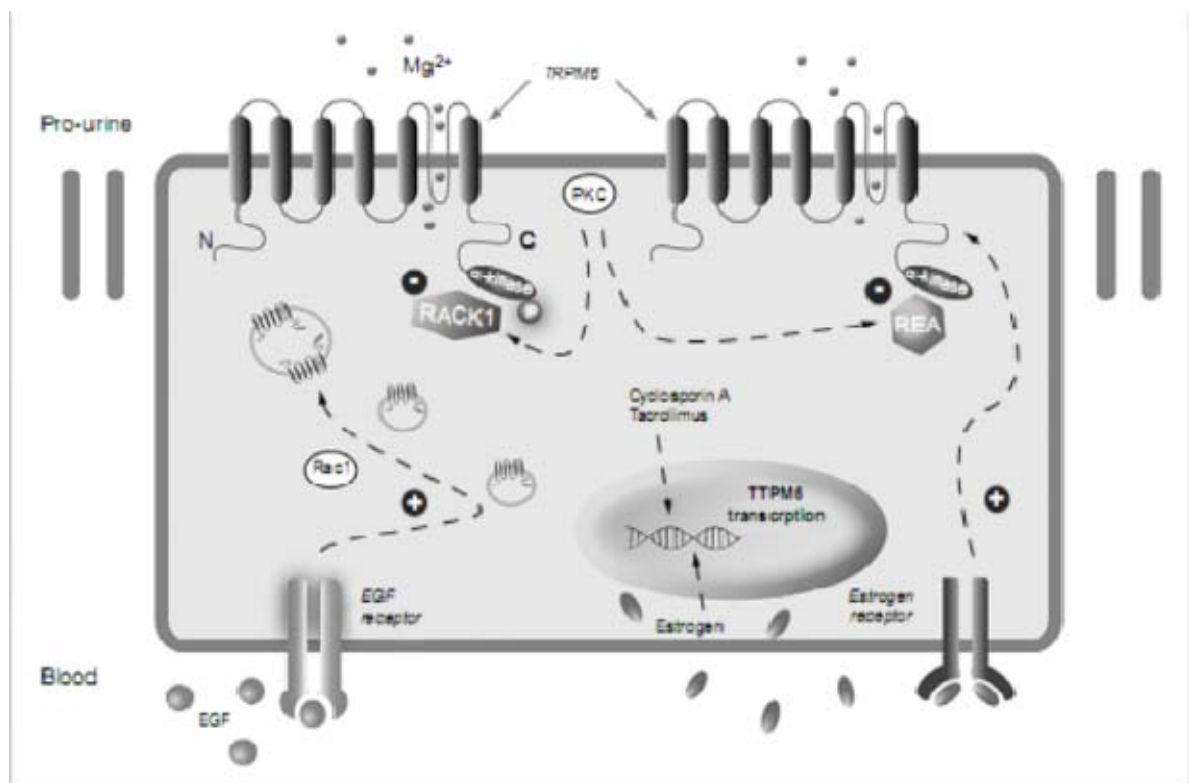


Figura 8. Resumo esquemático dos componentes moleculares envolvidos na regulação da TRPM6 de uma célula do túbulo contorcido distal. Tacrolimus e ciclosporina A regulam a expressão da TRPM6. Acidose metabólica aumenta a permeabilidade do canal aos cátions. O aumento da concentração intracelular de magnésio pode inibir a sua atividade. Outros moduladores, como RACK1, REA e ATP, regulam a atividade do canal por meio de ligações com o domínio quinase. Estrogênio e EGF funcionam como hormônios magnesiostáticos estimuladores da atividade da TRPM6.

Fonte: Wijst, 2009.

Dois fatores influenciam a atividade da TRPM6. São chamados de hormônios magnesiotrópicos em função de suas ações autócrina e parácrina na regulação do magnésio: EGF e o estrógeno. O EGF é expresso no túbulo contorcido distal juntamente com a TRPM6. O seu precursor (pro-EGF) é clivado em EGF por proteínas extracelulares nas membranas apical e basolateral. Esta molécula, que foi então ativada, estimula o seu receptor (EGFr) basolateral levando a uma cascata de sinalização que visa aumentar a expressão de TRPM6 na superfície celular e, conseqüentemente, o influxo de Mg^{2+} . Mutações no pro-EGF estão envolvidas na chamada hipomagnesemia isolada autossômica recessiva.^{18,24}

O segundo hormônio magnesiotrópico é estrogênio. Sua relação na homeostase do magnésio foi sugerida a partir de observação de mulheres em menopausa que apresentavam redução significativa da hipermagnesiúria com terapia de reposição hormonal. O estrogênio aumenta a atividade da TRPM6 por vias que envolvem o seu receptor, porém são necessários mais estudos para o completo entendimento desse mecanismo. Sabe-se apenas que o tratamento com 17β -estradiol tem um rápido efeito estimulatório da TRPM6 ao promover a dissociação entre o REA e o domínio quinase.^{16,18}

É possível que a insulina também esteja envolvida na homeostase do magnésio já que hipermagnesiúria foi relatada em pacientes com resistência à insulina e Diabetes do tipo 2. Estudos utilizando ratos que tiveram diabetes induzido observaram um aumento da expressão renal de TRPM6, sendo esta provavelmente compensatória à perda renal de magnésio. Esse processo foi revertido após a administração de insulina. O mecanismo permanece desconhecido até o momento e é possível que a descoberta do papel desse hormônio no equilíbrio do magnésio esclareça alguns pontos de sua (re)absorção ativa.¹⁸

Outros fatores foram relacionados à regulação da TRPM6 como, por exemplo, o fato de sua expressão ser afetada pela quantidade de magnésio presente na dieta, de modo que ela é aumentada na vigência de ingesta diminuída desse íon.^{16,18} Por outro lado, o uso prolongado de imunossupressores como tacrolimus e ciclosporina A diminuem a expressão renal de TRPM6, levando à hipermagnesiúria. Acidose metabólica crônica também acarreta mesmo efeito sobre esse canal.^{1,3,18}

O cotransportador de cloreto de sódio sensível à tiazídicos (NCCT) está colocalizado com a TRPM6.⁵³ Sabe-se que a inibição do NCCT promove diminuição da expressão renal de TRPM6. O mecanismo envolvido nesse processo permanece obscuro, mas este fato pode ser a explicação para a hipomagnesemia observada nos pacientes com Síndrome de Gitelman.¹⁸

Todos esses fatores que foram resumidos na tabela 1 apoiam o papel da TRPM6 na homeostase do magnésio, tornando o canal uma possibilidade terapêutica futura no manejo de pacientes com hipomagnesemia.¹⁸

Tabela 1. Fatores que influenciam a TRPM6 e suas consequências na homeostase do magnésio.

Efator	Efeito na TRPM6	Efeito na regulação do Mg²⁺
EGF	↑ atividade, mecanismo desconhecido	Hipomagnesiúria
RACK1	↑ atividade, via fosforilação do domínio α Kinase	Não determinado
Mg ²⁺ (intracelular)	↓ atividade	↑ excreção urinária
Mg ²⁺ (extracelular)	↓ sua expressão	↑ excreção urinária
Acidose	↓ sua expressão e sua atividade	↑ excreção urinária
Alcalose	↑ sua expressão	↓ excreção urinária
17 β-estradiol	↑ sua expressão	↓ excreção urinária
Ciclosporina	↓ sua expressão	↑ excreção urinária
Tiazídico	↓ sua expressão	↑ excreção urinária

Fonte: Alexander, 2008.

4.4 Bomba de Na^+/K^+ -ATPase

A bomba de Na^+/K^+ -ATPase é um tetrâmero da composição de duas subunidades α , sítio da ligação do ATP, e duas subunidades β , que podem gerenciar a sua formação e maturação. Os íons transportados se movem através de uma subunidade α fosforilada. Essa bomba utiliza a energia da hidrólise de ATP para introduzir 2 K^+ na célula e extrair 3 Na^+ da mesma (figura 9). Esse movimento ocorre contra a concentração entre os meios intra- e extracelulares: a concentração do potássio é maior no meio intracelular e a do sódio no meio extracelular. A manutenção dessa diferença de concentração é garantida pela bomba e gera um gradiente transmembrana, sendo este potencial utilizado também por outras proteínas para a reabsorção de outros íons como, por exemplo, o magnésio.

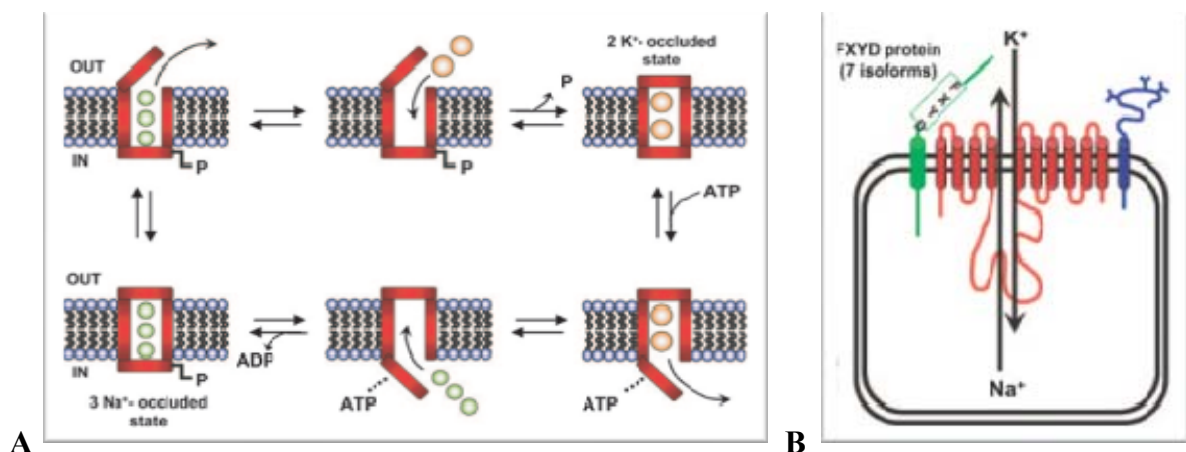


Figura 9. Modelo esquemático da movimentação iônica pela bomba Na^+/K^+ -ATPase (A) e da relação da proteína FXYP com esta bomba (B).

Fonte: Dubiak, 2004.

Proteínas transportadoras podem ter sua função profundamente alterada por moduladores específicos. A família de proteínas Fxyd é um exemplo de modulador tecido-específico da bomba de íons Na^+/K^+ -ATPase. Existem sete tipos presentes em diversos locais do organismo. Apesar da manutenção do ciclo catalítico, já foram descritos algumas diferenças na bomba de Na^+/K^+ -ATPase conforme sua localização tecidual como, por exemplo, na afinidade pelos seus substratos. Essas variações também influenciam sobre qual o tipo de proteína Fxyd em particular estará modulando uma determinada bomba.²⁵

A estrutura dessas proteínas pode ser dividida em um único domínio transmembrana, uma pequena região carboxila-terminal citosólica variável e uma região amino-terminal

extracelular comum a todos os tipos, com quatro aminoácidos nessa ordem (-F-X-Y-D-) que foi escolhida para nomear a família (figura9).²⁵

A proteína Fxyd2 é a menor da família. Também é chamada de subunidade γ da bomba de Na^+/K^+ -ATPase e pode ser encontrada no tecido renal, nas células do túbulo contorcido distal. Ela mantém o potencial transmembrana e o gradiente de sódio.²

Mutações nessa subunidade γ podem reduzir a afinidade dessa bomba iônica pelo sódio, afetando suas propriedades catalíticas.²⁶ Estudos sugerem que existe uma dependência do potencial de membrana promovido pela bomba de íons Na^+/K^+ -ATPase para ativação da TRPM6, sendo uma possível explicação para a associação entre mutações da subunidade γ e a doença hipomagnesemia autossômica dominante com hipocalciúria. Em avaliações de pacientes com hipomagnesemia, quando a manifestação da família é universal, devemos pensar nesse distúrbio uma vez que as demais hipomagnesemias hereditárias são recessivas.^{1,3,17}

metabólitos do ácido aracdônico.⁷⁸ Assim, o cálcio realiza a própria regulação ao servir como primeiro mensageiro, quando presente no meio extracelular, ou como segundo mensageiro, ao interagir com o seu receptor (CaSR) em diversos tecidos alvos.^{28,29,30}

Níveis elevados de cálcio ativam o CaSR na paratireóide para inibir a secreção de paratormônio (PTH) e aumentam a excreção renal de cálcio.^{34,76} As atividades do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC) e do canal de potássio medular (ROMK1) geram o potencial transmembrana necessário para a reabsorção paracelular de cálcio e magnésio na alça de Henle. O CaSR modula esse mecanismo ao inibir, de modo reversível, os canais ROMK1 por meio do ácido 20-hidroxicosatetraenóico (20-HETE), um derivado do ácido aracdônico formado após a ativação desse receptor. Assim, o aumento da sensibilidade do CaSR por mudança do seu *set point* acarreta em hipercalcúria e hipermagnesiúria.^{1,2}

Mutações no gene do CASR podem resultar em ganho ou perda de função do receptor. Aquelas com ganho de função são associadas à hipomagnesemia presente na Síndrome de Bartter tipo V.²⁸

4.6 Homeostase do Magnésio

A homeostase do magnésio ocorre graças a um balanço dos mecanismos envolvidos na sua absorção e excreção. A absorção do magnésio presente nos alimentos ocorre em todo o intestino, mas principalmente no jejuno proximal e no íleo (cerca de 30 a 50 % do total ingerido).^{17,31} O intestino secreta ainda 40 mg de magnésio dos quais 50% são reabsorvidos no cólon e reto.³¹

Alguns fatores podem interferir na absorção do magnésio. A lactose e alguns aminoácidos aumentam a absorção desse íon enquanto gorduras, fibras, fósforo, potássio e cálcio diminuem a mesma. Essa diminuição pode ocorrer devido à formação de complexos entre essas substâncias e o magnésio ou devido ao aumento da motilidade intestinal.²⁴

A absorção intestinal do magnésio ocorre por transporte passivo e ativo. O transporte passivo não é saturável e é desencadeado quando concentrações acima de 20 mEq/L são atingidas no lúmen intestinal. Ele utiliza a via paracelular e é capaz de promover elevada absorção de magnésio na presença de concentrações lúminais excessivas desse íon.^{1,3,19}

No entanto, o transporte ativo transcelular é o mecanismo principal de absorção. Este pode também ser chamado de saturado e ocorre em condições de menores concentrações intraluminais do magnésio, tornando-se, por exemplo, a via utilizada em casos de ingesta diminuída.^{1,3} No intestino, esse tipo de transporte utiliza o canal de magnésio TRPM6,¹⁹ cuja a distribuição é mais abundante na borda em escova do duodeno.^{3,22}

A excreção do magnésio se dá por via fecal, em valores constantes, e pela via urinária. Mas compete aos rins aumentar ou diminuir a excreção desse íon, poupando mais em casos de deficiência e eliminando mais quando esse estiver em excesso. O rim tem capacidade para excretar de 0,5 a 80% do magnésio presente no filtrado glomerular, variando de acordo com as necessidades do organismo. Assim, o rim é o principal regulador do nível plasmático do magnésio e para tal utiliza-se de diferentes mecanismos ao longo da extensão do néfron.^{1,3}

O filtrado glomerular contém cerca de 70 a 80% do magnésio presente no plasma (figura 11). O néfron reabsorve 95% do magnésio filtrado. O principal local de reabsorção é a alça ascendente de Henle (segmento espesso), respondendo por 70% do filtrado glomerular. Os túbulos contorcidos proximal e distal também participam desse processo, mas numa taxa inferior: 15 a 25% e 5 a 10%, respectivamente. Em relação aos outros íons, o magnésio é o único que tem uma absorção mais intensa na alça de Henle do que no túbulo contorcido proximal.^{11,18}

A reabsorção do magnésio no túbulo contorcido proximal e na alça de Henle é mediada pelo mecanismo de transporte passivo paracelular, enquanto no túbulo contorcido distal observa-se o transporte ativo transcelular. Deste modo, o controle da fração de excreção do magnésio é feita no túbulo contorcido distal.¹⁷

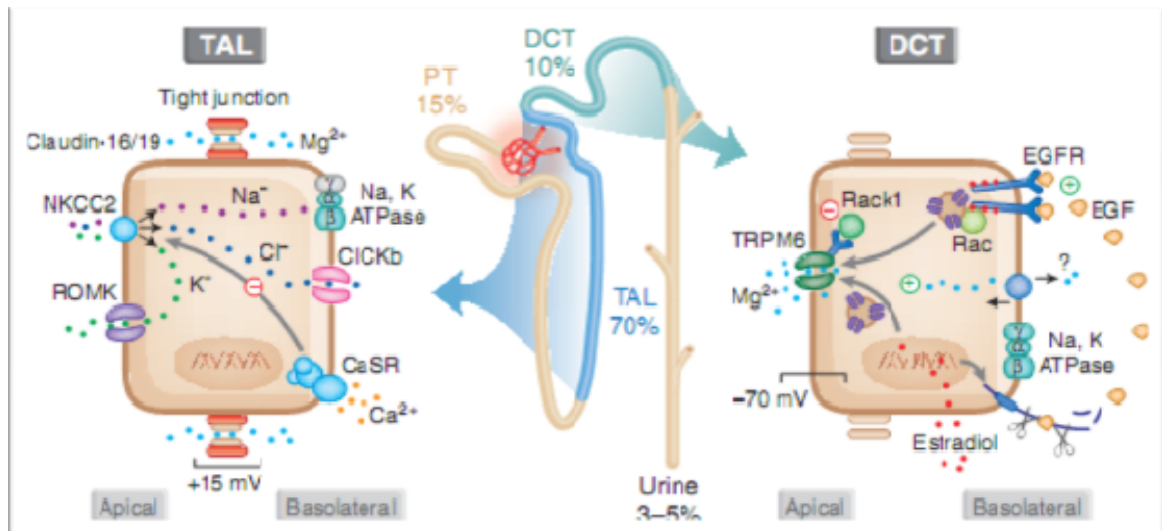


Figure 11. Homeostase da regulação renal do magnésio. Setenta a oitenta por cento do Mg^{2+} plasmático é filtrado no glomérulo, dos quais 15 a 25% é reabsorvido no túbulo proximal (PT), 70% no ramo espesso da alça de Henle (TAL), e and 5 a 10% no túbulo contorcido distal (DCT). Na urina, são excretados 3 a 5% do filtrado glomerular. O TAL é o principal local de reabsorção passiva paracelular do Mg^{2+} , um processo mediado pelas claudinas 16 e 19. Essa reabsorção paracelular depende da reabsorção ativa do Na^+ , que é mediado pela entrada apical do Na^+ através do cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC) e do influxo via a Na^+,K^+ -ATPase. O influxo do Cl^- ocorre via CLC-Kb e o K^+ é devolvido ao lúmen via ROMK. O receptor-sensor de Ca^{2+} (CaSR) inibe esse processo e previne a reabsorção de Ca^{2+} and Mg^{2+} . O Mg^{2+} é reabsorvido pela TRPM6 no DCT. O Mg^{2+} intracelular e o RACK1 inibem a TRPM6. EGF, clivado da membrana basolateral, ativa a TRPM6, o estradiol aumenta a expressão do EGF. EGFR: receptor EGF; PT: túbulo proximal.

Fonte: Alexander, 2008.

A via paracelular é na verdade uma estrutura complexa constituída a partir das forças hidrofílicas e hidrofóbicas estabelecidas entre as diversas proteínas, em particular as integrantes da família das claudinas.¹⁷ O controle paracelular ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que a reabsorção do magnésio no segmento espesso da alça de Henle utiliza o gradiente elétrico gerado pela reabsorção do sódio por meio do cotransportador NKCC2. Esse potencial elétrico age como modulador do carreamento do magnésio através dos poros formados pelas claudinas 16 e 19, as quais compõem a via paracelular.^{1,3}

O túbulo contorcido distal é o último local de reabsorção do magnésio no néfron. Trata-se da única porção renal que utiliza um mecanismo ativo transcelular por meio do canal iônico TRPM6. Estudos sugerem que a ativação da TRPM6 depende do potencial de

membrana promovido pela bomba de íons Na^+/K^+ -ATPase. Essa ativação também pode ser amplificada pelo EGF.^{1,3,17}

Assim, como no intestino, a TRPM6 localiza-se na porção apical da membrana celular do DCT, o que reforça o papel dessa proteína no influxo luminal do magnésio. Esse transporte é favorecido pelo potencial da membrana apical no túbulo contorcido distal, o qual deve ser de no mínimo -70 mV. Na verdade, esse potencial de membrana é considerado o fator determinante da entrada apical do Mg^{2+} , uma vez que as concentrações intra- e extracelulares desse íon são comparáveis.¹⁷ Postula-se que o mecanismo basolateral de efluxo do Mg^{2+} ocorra como um processo secundário ao transporte do Na^+ , resultando em um gasto energético. Dessa maneira, é possível que o efluxo de Mg^{2+} seja mediado por uma bomba “ Mg^{2+} -ATPase” específica contudo ainda não descrita.^{17,23}

A difusão transcelular do magnésio em direção ao interstício ainda não é conhecida. Todavia, considerando que outros íons como o cálcio, por exemplo, são transportados por meio de proteínas especializadas, denominadas chaperonas, é factível supor que o mesmo ocorra com o magnésio.¹⁷

Tabela 2. Proteínas envolvidas no controle molecular da homeostase do magnésio

Proteína	Localização Renal	Função	Doença
Claudina16	TAL, junção de oclusão	Permeabilidade paracelular	FHHNC
Claudina19	TAL, junção de oclusão	Permeabilidade paracelular	FHHNC
NCCT	DCT, membrana apical	Co-transportador Na^+/Cl^-	Síndrome de Gitelman
TRPM6	DCT, membrana apical	Canal seletivo de Mg^{2+} , transporte transcelular por influxo apical	Hipomagnesemia com hipocalcemia secundária
Na^+/K^+ -ATPase subunidade γ	Túbulos proximal e distal, TAL e medula renal	Altera troca entre Na^+ e K^+	Hipomagnesemia autossômica dominante
EGF	DCT	Aumenta a atividade da TRPM6	Hipomagnesemia isolada recessiva

Fonte: Alexander, 2008.

4.7 Conteúdo Corporal e Função do Magnésio

A concentração celular do magnésio varia de 14 a 20 mM, fazendo com que seja o cátion divalente mais abundante no corpo humano.²⁰ O osso é o principal tecido onde o magnésio pode ser encontrado (cerca de 60% do magnésio corporal total), seguido pelos tecidos de partes moles (principalmente músculos esqueléticos e fígado nos quais as taxas metabólicas são maiores) e, por último, pelo meio extracelulares (somente 1%). Um terço do magnésio presente no osso pode ser permutado lentamente com o meio extracelular, sendo o esqueleto uma fonte de reserva desse eletrólito.

O magnésio presente no meio intracelular encontra-se, em sua maioria, ligado a proteínas e moléculas negativas. Já no meio extracelular, 60% circula no organismo na forma livre ionizada. O restante do magnésio encontra-se ligado ou à albumina (30%) ou formando complexos com sais de citrato, oxalato, fosfato e outros ânions. Os métodos laboratoriais aferem o magnésio ligado à albumina.¹

As mitocôndrias são ricas em magnésio. Este eletrólito participa diretamente da respiração celular ao influenciar muitas enzimas mitocondriais como, por exemplo, desidrogenases e citocromo c oxidase. Mecanismos homeostáticos ainda parcialmente compreendidos regulam a concentração do magnésio nessa organela.²⁰

É sabido também que o magnésio é importante em diversas outras reações essenciais ao organismo. Algumas delas são: condução nervosa e contratilidade esquelética e miocárdica, estabilização de membranas, estruturação óssea (composição da hidroxiapatita), catalisação de reações enzimáticas e como cofator de reações como degradação de ácidos graxos, regulação da síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) e das proteínas e modulação da adenilciclase.^{1,17}

Uma pesquisa envolvendo ratos verificou que uma restrição dietética de magnésio pode promover modificações em diversos componentes do sistema imunológico, inclusive com prejuízo da resposta humoral.²⁰

Estima-se que a dieta ocidental, por meio de cereais, nozes, chocolate, verduras, carnes e mariscos, dentre outros, provenha 360 mg de magnésio, o bastante para a demanda fisiológica diária, sendo esta estimada em 0,15-0,20 mmol/Kg ao dia, podendo atingir até 13,3 mmol/dia para mulheres adultas e 17,5 mmol/dia para homens.¹

4.8 HIPOMAGNESEMIA

A hipomagnesemia é caracterizada por níveis plasmáticos de magnésio menores do que 1,5 mEq/L (ou < 1,7 mg/dL ou < 0,75 mM/L).¹¹ Como o magnésio é um eletrólito de predomínio intracelular, mesmo que sejam detectados níveis plasmáticos normais de magnésio, ainda assim pode-se estar diante de um quadro de deficiência desse íon no organismo, a qual é dita deficiência funcional do magnésio.

A hipomagnesemia resulta de um balanço negativo na homeostase do magnésio que ocorre quando a sua ingestão é menor, quando há um deslocamento para o meio intracelular ou quando a sua eliminação aumenta, seja pelo intestino, seja pelo filtrado glomerular.^{11, 18} As principais causas da hipomagnesemia podem ser visualizadas no quadro 1 a seguir.

A dosagem do magnésio urinário de amostra coletada durante um período de 24 horas (ou em amostra de urina isolada, por sua maior comodidade em obtenção) pode auxiliar na determinação etiológica da hipomagnesemia. Valores normais variam de 1 a 8%. Se a perda for extra-renal, o rim tentará compensá-la aumentando a reabsorção desse cátion de modo que sua fração de excreção será menor do que 2%.¹¹ No entanto, se o local de perda for o próprio rim, essa fração citada será maior do que 4%. Assim, na vigência de hipomagnesemia, espera-se encontrar hipomagnesiúria, caso os mecanismos renais estejam intactos. A identificação de magnésúria normal ou até elevada apontada para o sítio renal para etiologia do desequilíbrio da homeostase do magnésio.

A seguinte fórmula demonstra como calcular a fração de excreção de magnésio (FE_{Mg}):

$$FE_{Mg} = (U_{Mg} \times P_{Cr}) / ([0,7 \times P_{Mg}] \times U_{Cr}) \times 100$$

onde U_{Mg} = concentração urinária do magnésio, P_{Cr} = concentração plasmática da creatinina, P_{Mg} = concentração plasmática do magnésio, U_{Cr} = concentração urinária da creatinina.¹¹

O diagnóstico da deficiência do magnésio exige um bom nível de suspeição pois o quadro clínico pode ser inespecífico ou estar ausente. Além disso, o nível plasmático do magnésio não é dosado rotineiramente. Em geral, as primeiras queixas são letargia e fraqueza. Quando o quadro se acentua, ocorre aumento na excitabilidade neuromuscular e, ao atingir graus mais severos, surgem tremores, câimbras, espasmo carpopedal, convulsões

generalizadas e/ou tetania. Além disso, pode levar a alguns tipos de arritmias cardíacas como prolongamento do intervalo QT, *torsades de pointes* e taquicardia atrial ou ventricular.³

Quadro 1. Causas de Hipomagneseemia.

DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS

Diarréia
 Drenagem nasogástrica ou vômitos
 Doença intestinal inflamatória
 Doença celíaca
 Fibrose cística
 Linfangectasia intestinal
 Ressecção ou derivação do intestino delgado
 Pancreatite
 Desnutrição protéico-calórica
 Hipomagneseemia com hipocalcemia secundária

DISTÚRBIOS RENAIIS

Medicamentos: anfotericina, cisplatina, ciclosporina, diuréticos de alça, manitol, pentamidina, aminoglicosídeos, diuréticos tiazídicos.
 Diabete
 Necrose tubular aguda (fase de recuperação)
 Nefropatia pós-obstrutiva
 Doenças renais crônicas: nefrite intersticial, glomerulonefrite, pós-transplante renal
 Hipercalcemia
 Líquidos intravenosos (expansão do volume extracelular)
 Aldosteronismo primário
 Hipomagneseemia com hipocalcemia secundária
 Hipomagneseemia autossômica dominante com hiper calciúria
 Hipomagneseemia familiar com hiper calciúria e nefrocalcínose
 Hipomagneseemia recessiva isolada com normocalciúria
 Tubulopatias perdedoras de sal: Síndrome de Batter e Síndrome de Gitelman
 Hipoparatiroidismo autossômico dominante
 Doenças mitocondriais

CAUSAS VARIADAS

Baixa ingesta
 Síndrome do osso faminto
 Administração de insulina
 Retardo do crescimento intra-uterino
 RN filho de mãe diabética
 Transfusão total

Fonte: Greenbaum, 2005.

A hipomagnesemia pode estar associada a outros distúrbios eletrolíticos, como hipocalcemia e hipocalemia. Acredita-se que a hipomagnesemia possa levar a um aumento da secreção renal de potássio e, conseqüentemente, causar hipocalcemia. Já a hipocalcemia acontece geralmente quando a hipomagnesemia é mais acentuada. Pode estar relacionada tanto a uma diminuição dos níveis do PTH quanto a uma resistência óssea e renal aos efeitos desse hormônio.³

Experimentos utilizando animais que receberam uma dieta restrita em magnésio demonstraram uma redução da densidade mineral óssea. Observou-se uma diminuição no número e função dos osteoblastos além de aumento dos osteoclastos. Isso sugere que pacientes com hipomagnesemia possuem predisposição à osteopenia e osteoporose.¹⁷

O tratamento da hipomagnesemia envolve a eliminação da causa, quando possível, e correção dos níveis plasmáticos do magnésio. O primeiro passo consiste em dieta enriquecida com magnésio. Porém, na maioria dos casos é necessária uma suplementação medicamentosa adicional.¹

A via oral é preferível nos casos de hipomagnesemia leve ou em pacientes assintomáticos, lembrando que elevações repentinas nos níveis plasmáticos do magnésio podem interferir na reabsorção renal desse íon. Preparações de liberação prolongada são as preferidas: cloreto de magnésio e lactato de magnésio, por exemplo. Apesar do óxido de magnésio pode ser usado, deve ser lembrado que ele apresenta mais efeitos colaterais. No intuito de diminuir a diarreia induzida por essas medicações, pode-se optar por injeções intramusculares ou infusão nasogástrica noturna.^{1,2,32}

A via intravenosa é indicada quando a hipomagnesemia é mais importante ou nos casos sintomáticos, utilizando o sulfato de magnésio a 50% na dose de 25 a 50 mg/Kg a cada seis horas em infusão lenta. Podendo também ser aplicado por meio da via intramuscular, lembrando no entanto que pode ser muito doloroso principalmente para crianças. Mesmo assim, essa via costuma ser a mais efetiva nos casos de hipomagnesemia de origem genética.

O uso do amiloride, um diurético poupador de potássio, é indicado principalmente em pacientes com hipomagnesemia decorrente do uso de diuréticos, mas que não podem suspender essa medicação. Sua ação provavelmente envolve hiperpolarização da membrana celular com aumento da reabsorção renal de magnésio.

Recomenda-se a monitorização dos níveis plasmáticos para avaliação da resposta terapêutica e para identificação precoce de intoxicação. Os sinais de intoxicação consistem em oligúria, arreflexia e depressão do nível de consciência. A dose da reposição do magnésio deve ser reajustada caso paciente apresente insuficiência renal.¹

4.9 HIPOMAGNESEMIA DE ORIGEM HEREDITÁRIA

Dentre as mais variadas causas de hipomagneseemia, encontram-se aquelas de origem hereditária. Esse grupo de doenças raras tem sido alvo de diversos estudos e muito já se tem esclarecido a respeito de suas fisiopatologias. Diferentes tipos de herança genética estão envolvidos.^{34,41}

Assim, os primeiros relatos de tubulopatias associadas à deficiência de magnésio foram feitos em 1966 quando Freeman e Pearson descreveram uma família onde alguns membros apresentavam perda renal hereditária de magnésio isolada. A mãe e um de seus cinco filhos apresentavam hipomagneseemia com hipermagnesiúria e hipocalciúria. Esse distúrbio foi denominado de **hipomagneseemia autossômica dominante com hipocalciúria** (Online Mendelian Inheritance in Man numbers – OMIM – 154020).

No mesmo ano, foi descrita o que hoje é conhecida como **Síndrome de Gitelman** (OMIM 263800). Gitelman, Grahan e Welt descreveram três pacientes que apresentavam uma variante da **Síndrome de Batter** que cursava com hipomagneseemia, hipocalemia e alcalose metabólica decorrentes de falha na conservação renal desses eletrólitos.⁴¹

Dois anos mais tarde, em 1968, o primeiro caso conhecido de hipomagneseemia primária intestinal, também conhecida como **hipomagneseemia com hipocalcemia secundária** (OMIM 602014), foi relatado por Paunier e colaboradores.⁴⁶ Tratava-se de um lactente do sexo masculino que apresentava convulsões generalizadas associadas à hipocalcemia e hipomagneseemia. Após a suplementação oral com sais de magnésio, a hipocalcemia era totalmente revertida.⁴¹

Apesar de ter recebido denominação de Síndrome de Michelis-Castrillo em 1972,^{34,36} o primeiro caso de **hipomagneseemia familiar com hipercalcúria e nefrocalcinose** (OMIM 248250) foi provavelmente descrito por Alfrey e Jenkins em 1969. Eles relataram um adolescente de dezesseis anos do sexo masculino que apresentava, desde os cinco anos de idade, episódios intermitentes de tetania. Sua investigação evidenciou hipomagneseemia de 0,8 mg/dL, osmolaridade urinária de 260 mOsm/L, clearance de creatinina de 79 mL/min e nefrocalcinose.⁴¹

Em 1987, Geven e colaboradores relataram o caso de duas irmãs holandesas, cujos pais eram aparentados, que apresentavam atraso moderado do desenvolvimento neuropsicomotor e convulsões associados à hipomagneseemia severa. Ambas apresentavam níveis normais de calciúria.^{13,41} Os pais e outras irmãs, que eram assintomáticos, eram

heterozigóticas para essa mutação causadora dessa nova entidade, sugerindo o padrão de herança autossômica recessiva.² Ela ficou então conhecida como **hipomagnesemia isolada autossômica recessiva** (OMIM 611718).⁴¹

Essa foi a cronologia das descobertas das tubulopatias relacionadas direta ou indiretamente às manifestações de hipomagnesemia. Estudos posteriores identificaram as alterações genéticas envolvidas nessas desordens e serão descritas a seguir. Um resumo dessas entidades pode ser encontrado na tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Diagnóstico diferencial das hipomagnesemias hereditárias de origem renal.

FHHNC	S. Gitelman	Hipomagnesemia com hipocalcemia	Hipomagnesemia isolada recessiva	Hipomagnesemia autossômica dominante
OMIM ^a 248250 e 248190	OMIM 263800	OMIM 602014	OMIM 611718	OMIM 154020
Locus: 3q27 e 1p34	Locus: 16q13	Locus: 9q22	Locus: 4	Locus: 11q23
Gene: CLDN-16 e CLDN-19	Gene: SLC12A3	Gene: TRPM6	Gene: EGF	Gene: FXYD2
Claudina16 e 19	NCCT	TRPM6	EGF	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (γ)
Início: lactância pré-escolar	Início: variável	Início: neonatal ou lactância	Início: pré-escolar	Início: pré-escolar
Poliúria, litíase renal, anomalias oculares	Fadiga, tetania, condrocalcionse	Tetania, convulsões	Tetania, convulsões	Convulsões, condrocalcinose
Mg ²⁺ plasma ↓	Mg ²⁺ plasma ↓	Mg ²⁺ plasma ↓↓	Mg ²⁺ plasma ↓	Mg ²⁺ plasma ↓
Ca ²⁺ plasma N	Ca ²⁺ plasma N	Ca ²⁺ plasma ↓	Ca ²⁺ plasma N	Ca ²⁺ plasma N
K ⁺ plasma N	K ⁺ plasma ↓↓	K ⁺ plasma N	K ⁺ plasma N	K ⁺ plasma N
pH: N ^b ou ↓	pH: ↑	pH: N	pH: N	pH: N
Mg ²⁺ urina ↑↑	Mg ²⁺ urina ↑	Mg ²⁺ urina ↑	Mg ²⁺ urina ↑	Mg ²⁺ urina ↑
Ca ²⁺ urina ↑↑	Ca ²⁺ urina ↓	Ca ²⁺ urina N	Ca ²⁺ urina N	Ca ²⁺ urina ↓

OMIM^a: Online Mendelian Inheritance in Man numbers. **N^b:** normal.

Fonte: Baseado em Gonzáles, 2009.

4.10 Hipomagnesemia familiar com hiper calciúria e nefrocalcinose

Apesar de terem sido descritos mais de cem casos de hipomagnesemia familiar com hiper calciúria e nefrocalcinose, sua incidência e prevalência ainda não são conhecidas.³⁷ Trata-se de um distúrbio autossômico recessivo caracterizado por hipermagnesiúria e hiper calciúria, cujos sintomas surgem, freqüentemente, nos primeiros meses de vida. Mesmo assim, o diagnóstico costuma ser feito somente entre cinco e vinte e cinco anos, em média aos quinze anos, geralmente já em vigência de insuficiência renal.^{35,36,37,41}

Todos os pacientes apresentam hipomagnesemia, hipermagnesiúria, hiper calciúria.³⁷ Hipocalcemia é um achado raro apesar da acentuada hiper calciúria.³⁶ Podem ser encontrados níveis elevados de PTH no início dos sintomas.^{34,36} As queixas iniciais mais relatadas e que motivam a procura por assistência médica são polidipsia, poliúria e infecção do trato urinário recorrente.^{34,37} O quadro clínico abrange ainda dor abdominal, hipocitratúria, acidose tubular incompleta e, menos comumente, atraso do crescimento pondero-estatural, tetania e convulsões generalizadas.^{35,36,41} O risco de lesão neurológica permanente nesses casos é pequeno.³ A deficiência de crescimento pode ser atribuída à insuficiência renal crônica ou à própria tubulopatia. Alterações auditivas tem sido referidas em um décimo dos pacientes.^{39,41}

Alterações oculares também foram descritas nesses pacientes: miopia, geralmente acentuada, nistagmo horizontal, coloboma macular (figura 12),^{3,41} estrabismo³⁷ e sinais de retinite. A frequência dessas perturbações visuais pode ser relacionada com a origem étnica do paciente. São mais relatados em espanhóis (81% dos pacientes com FHHNC que possuem alguma alteração ocular) do que em outras nacionalidades (24%).⁴¹

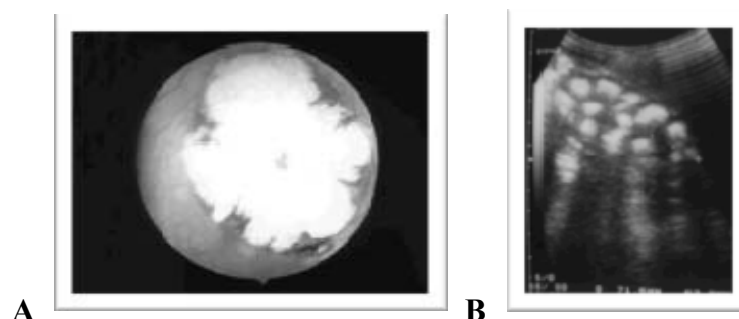


Figura 12. Fotografias de coloboma macular (A) e nefrocalcinose (B) registradas em pacientes com FHHNC.
Fonte: Pablo, 2004.

Nefrocalcinose e nefrolitíase podem ser identificados por meio de exames radiológicos e ecográficos como consequência da hipercalciúria.^{36,37,41} A nefrocalcinose está presente em todos os pacientes (figura 12), embora litíase renal seja um achado menos freqüente.³⁷ Hipercalciúria e nefrolitíase recorrentes foram identificados em 42% dos familiares “assintomáticos” de pacientes com FHHNC, que são heterozigóticos para a mutação.^{3,34,38}

A partir das observações referentes aos achados clínicos e laboratoriais encontrados nos pacientes com FHHNC e do conhecimento de que o maior percentual da reabsorção renal de magnésio ocorre no ramo espesso da alça de Henle, foi sugerido que este seria o local primário da disfunção (figura 13). Descobriu-se que a proteína comprometida na maioria dos pacientes é a claudina 16, que é expressa quase exclusivamente nesse segmento do néfron.^{3,36,37}

Por meio dos estudos de casos espanhóis de FHHNC com alterações oculares (OMIM 248190), não foram observadas alterações na claudina 16. No entanto, foram detectadas mutações da claudina 19 que está localizada no cromossomo 1p34.2. Algumas dessas mutações são: Gly20Asp, Gln57Glu, Leu90pro.⁴¹ Esta proteína tem função semelhante à da claudina 16 e pode formar complexos entre si, demonstrando que a FHHNC é uma doença genética heterogênea. Sua localização ocular além da renal explica as diferenças fenotípicas.³⁸

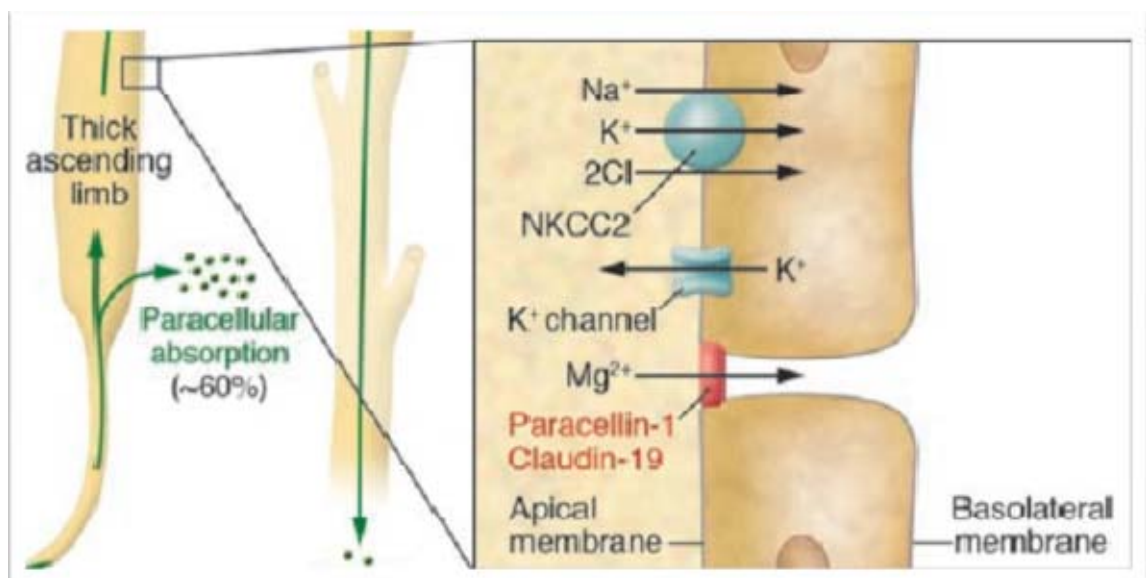


Figura 13. Modelo esquemático da localização da claudina 16 (paracelina-1) e claudina 19 na alça de Henle. **Fonte:** Muallem, 2007.

Através do mapeamento molecular realizado em vinte famílias pelo laboratório Liftons,³⁶ identificou-se que o gene CLDN16 está localizado no cromossomo 3q27-29. Desde então, mais de trinta mutações na claudina 16 foram identificadas em famílias com

FHHNC.^{3,36} A maioria das mutações compreende deleções, *frame shift* e, principalmente, do tipo *missense* (67%).^{36,37} Observa-se uma freqüente concordância dessas mutações dentro de uma mesma família, apesar da variabilidade interfamiliar.^{34,40}

Geralmente, acometem o domínio extracelular e transmembrana da proteína.³⁷ A ECL1 foi a região mais freqüentemente acometida da claudina 16 por trocas em um único nucleotídeo, conforme exemplificado pela figura 14.^{34,36} Poucas mutações na ECL2 tem sido descritas em pacientes com FHHNC. Hampson e colaboradores detectaram duas mutações nessa alça que acarretaram em perda completa da função da claudina 16, demonstrando a importância desse segmento da proteína.⁴¹

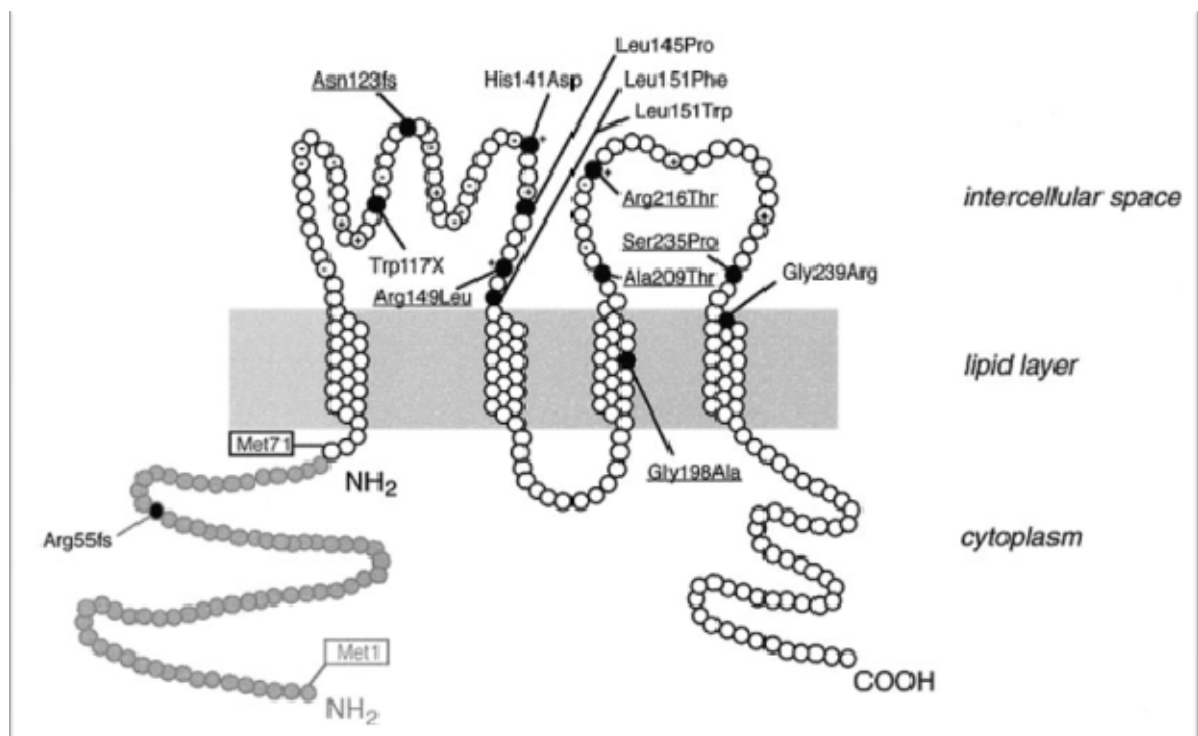


Figura 14. Resíduos de aminoácidos afetados por mutações na claudina 16 em uma coorte de 25 famílias. Os aminoácidos alterados foram marcados em negrito neste modelo proteico.

Fonte: Weber, 2001.

As mutações podem ser divididas em duas categorias: aquelas que interferem no tráfego intracelular da proteína e aquelas que alteram o transporte iônico paracelular propriamente dito.⁴⁰ No primeiro caso, a claudina 16 fica retida no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi e é degradada por lisossomos.^{36,40} O prejuízo do transporte pode ser decorrente de alterações conformacionais da proteína ou de interrupção das ligações *cis* e *trans* da oligomerização. Observou-se que mutações do tipo T2333R impedem a interação

entre a claudina 16 e a proteína ZO-1, aumentando a degradação da claudina e diminuindo a reabsorção de cátions divalentes como o magnésio.^{36,13}

O resultado das diversas mutações consiste em perda ou diminuição da função da claudina 16, ocasionando alteração da seletividade iônica conforme foi reproduzido em estudos utilizando modelos de ratos onde essa proteína estava ausente por meio de ácido ribonucléico (RNA) transgênico.^{38,42} Isso leva a um distúrbio do gradiente elétrico com deficiente reabsorção renal de magnésio e cálcio através da via paracelular. Assim, esses íons permanecem nos túbulos e são perdidos na urina, o que resulta na hipomagnesemia e nefrocalcinose.^{7,43,38} Acredita-se que a normocalcemia seja garantida por meio de outros mecanismos envolvidos na homeostase do cálcio, como um aumento na absorção intestinal do cálcio e/ou na liberação óssea para compensar essa perda, explicando o fato de ser incomum o achado da hipocalcemia concomitante, o que não ocorre com o magnésio.^{36,43}

A evolução clínica dos pacientes varia se há uma perda parcial ou completa da função da claudina 16. Alguns estudos observaram surgimento da insuficiência renal em idades ainda mais precoces nos pacientes que tinham mutações dos dois alelos que levavam à disfunção total dessa proteína.^{26,37,41} A mutação L151F da claudina 16, por exemplo, tem um curso menos grave com preservação parcial da função renal.³⁵

Embora muito progresso já tenha sido alcançado com a identificação das alterações genéticas envolvidas na FHHNC, ainda existem dúvidas a respeito da fisiopatologia da progressiva insuficiência renal observada nessa desordem.^{34,41} O achado mais comum na biópsia renal é nefrite intersticial crônica com depósito de cálcio.^{37,38} Postula-se que, além da própria ação da nefrocalcinose na insuficiência renal, as mutações das claudinas levariam a uma transformação de células epiteliais em fibroblastos com desestruturação do complexo da junção de oclusão, alteração na polarização celular e displasia tubular.³⁵ A presença de nefrocalcinose em outras tubulopatias como, por exemplo, na Síndrome de Batter neonatal, sem associação tão intrínseca com progressão desses casos para insuficiência renal crônica leva a crer que a mutação da claudina realmente tem um papel relevante nessa evolução.^{34,37}

Geralmente, a insuficiência renal surge entre a segunda e a terceira década de vida. Vinte e dois a 70% dos pacientes apresentam esta complicação ao diagnóstico, já que este costuma ser tardio.^{35,36,37} Segundo Negri, mais da metade dos pacientes com perda completa da função da claudina necessitam de diálise aos quinze anos de idade.²⁶

Quando a função glomerular ainda está preservada, o tratamento consiste na tentativa de normalização das alterações bioquímicas e de redução de alguns sintomas. A suplementação contínua de magnésio é considerada ineficaz: os níveis séricos permanecem

menores e há uma aumento da magnesiúria, o que demonstra que a via transcelular não é capaz de fazer essa compensação.^{20,34} Dessa maneira, diuréticos tiazídicos são utilizados com o intuito, nem sempre efetivo, de diminuir a hipercalcúria e de corrigir a acidose tubular renal incompleta quando esta entidade está associada ao quadro.^{3,36,37,41}

Administração de vitamina D pode ser necessária nos casos de hiperparatireoidismo para normalização desse hormônio e maior reabsorção renal de cálcio. O citrato de potássio é recomendado com o objetivo de diminuir a hipocitratúria e litíase recorrente.³⁷ Antibioticoterapia deve ser iniciada caso seja confirmado algum episódio de infecção do trato urinário.^{34,37}

Outras medidas consistem em ingesta hídrica abundante, ingesta normal de cálcio, restrição de sódio e de excesso de proteínas. A restrição da ingesta de cálcio não é sugerida em função da possibilidade do desenvolvimento de alterações ósseas bem como desencadeamento paradoxical de litíase renal.³⁷

O uso de inibidores de endocitose mediada por clatrininas pode aumentar a expressão e recuperação da função da claudina 16 conforme resultados de um estudo in vitro da mutação L203X dessa proteína. Esse poderá ser um caminho para o tratamento desses pacientes, mas ainda são necessários mais estudos.⁴¹

Até o momento, uma vez que a progressão para insuficiência renal terminal é inevitável, somente o transplante renal permite a cura desse distúrbio, deixando o prognóstico reservado para esses paciente.^{3,36,37,41} O resultado final do transplante, assim como percentual de rejeição, foram similares ao grupo controle.³⁶

4.11 Hipomagnesemia autossômica dominante com hipocalciúria

A hipomagnesemia autossômica dominante com hipocalciúria é uma tubulopatia caracterizada por hipomagneemia devida à perda renal de magnésio. A hipocalciúria provavelmente ocorre por aumento da reabsorção do cálcio na alça de Henle. O quadro clínico pode variar de convulsões generalizadas a, embora seja relatado o desenvolvimento de condrocalcinose quando esses pacientes atingem a idade adulta.² Neonatos de mães afetadas e assintomáticas ainda assim podem apresentar hipomagneemia severa, demonstrando a variabilidade clínica. Ao contrário da Síndrome de Gitelman, não há alcalose metabólica.³⁰

Em 2003, por meio de estudos genéticos em uma família holandesa com hipomagneemia autossômica dominante com hipocalciúria, identificou-se uma mutação do gene *FXND2* que codifica a subunidade γ da bomba Na^+/K^+ -ATPase presente na membrana basolateral das células do túbulo contorcido distal (figura 15).^{2,30}

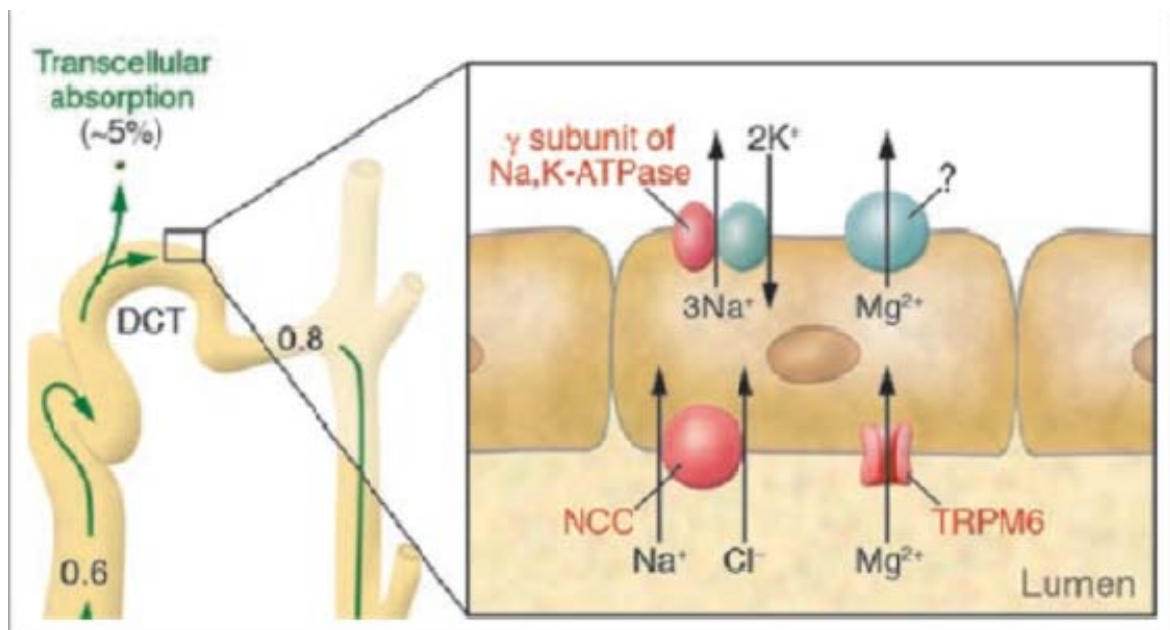


Figura 15. Modelo conceitual mostrando a localização da subunidade γ nas células do túbulo contorcido distal. **Fonte:** Muallem, 2007.

Trata-se de uma mutação *missense* heterozigótica (Gly41Arg) que está localizada na região 5.6-cM do cromossomo 11q23.^{2,3,30} A mutação da *Fxyd2* acarreta uma interrupção na interação da subunidade γ com as outras subunidades α e β da bomba Na^+/K^+ -ATPase, impedindo que a subunidade γ alcance a membrana celular e module a bomba.^{2,26} A proteína mutada é acumulada nas estruturas perinucleares como no complexo de Golgi conforme

demonstrado em estudos de células de túbulos renais de mamíferos, o que aponta para um distúrbio no processo pós-transducional.^{3,30}

Há um relato de magneemia normal em 2 indivíduos com deleção do alelo do FXVD2. Isso foi reproduzido em ratos e é um indício de que essa perda isolada no FXVD2 não é suficiente para causar hipomagneemia. Supõe-se então que a hipomagneemia seja causada mais pelo efeito negativo dominante do que pela hapolinsuficiência.^{2,3,26}

O exato mecanismo molecular desse distúrbio ainda necessita maiores esclarecimentos, mas acredita-se que a alteração da subunidade γ e a conseqüente modificação do potencial de membrana por aumento na concentração intracelular de sódio e diminuição na concentração intracelular de potássio prejudique a reabsorção apical de magnésio através da TRPM6, causando a hipomagneemia. Também permanece desconhecida a razão do aumento na reabsorção do cálcio que leva à hipocalciúria nesses pacientes.^{2,3,36,30}

4.12 Hipomagnesemia isolada autossômica recessiva

A hipomagnesemia isolada autossômica recessiva é uma entidade caracterizada por hipomagnesemia e atraso do desenvolvimento mental, com início dos sintomas na infância. A fração de excreção de magnésio tende a ser normal, apontando para uma reabsorção tubular prejudicada como já citado anteriormente. Os pacientes acometidos não apresentam outras anormalidades bioquímicas, sendo esta síndrome uma variante clínica que cursa com normocalciúria e que foi originalmente descrita em uma duas irmãs holandesas cujos pais eram consangüíneos.³

As análises genômicas dessas irmãs e de seus familiares excluíram mutações conhecidas como as que ocorrem na TRPM6, CLDN16, FXYD2 e SLC12A3. Groenestege e colaboradores, por meio de uma estratégia de mapeamento genômico refinada, identificaram que o gene relacionado à essa doença está localizado no cromossomo 4 entre os marcadores D4S2623 e D4S1575. A procura por genes nessa região revelou o gene EGF. Este foi sequenciado nas amostras das duas irmãs, verificando a existência de uma mesma mutação homozigótica, C3209T, no exon 22, e que não foi encontrada no grupo controle. Os pais, as irmãs assintomáticas e uma tia paterna eram heterozigotas para essa mutação (figura 16).⁴⁴

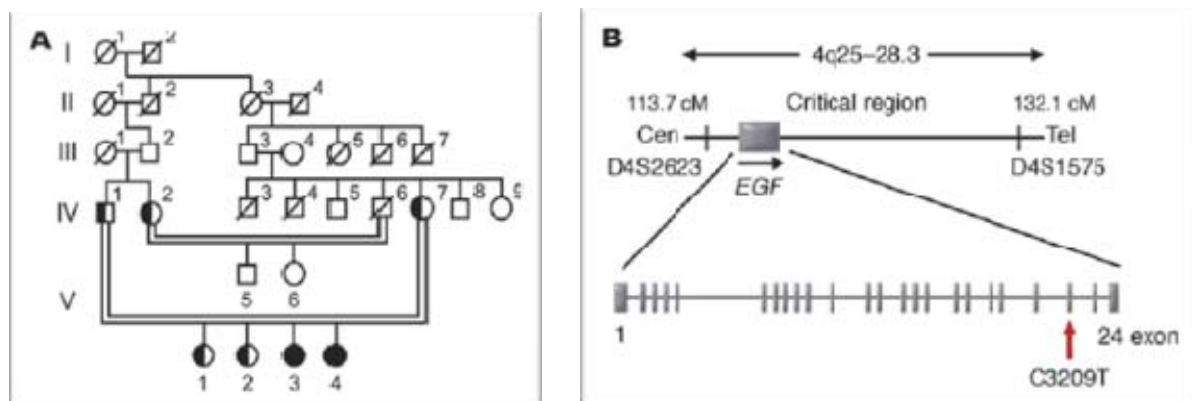


Figura 16. Heredograma da primeira família estudada com hipomagnesemia autossômica recessiva isolada. As duas irmãs estudadas estão representadas aqui por V3 e V4 (A). Representação esquemática do intervalo entre os marcadores D4S2623 e D4S1575 do cromossomo 4 e a mutação C3209T do EGF (B).

Fonte: Groenestege, 2007.

Essa mutação promove a substituição, na porção citoplasmática do pro-EGF, da prolina 1070 por leucina (P1070L). Isso faz com que a chegada do pro-EGF até a membrana basolateral seja interrompida, com conseqüente estimulação inadequada do receptor EGF e

inibição da liberação do EGF para o espaço extracelular.^{24,44} Esse efeito foi demonstrado por meio de estudos com células embrionárias humanas portadoras dessa mutação e foi observado também que houve falha concomitante na estimulação da TRPM6 (figura 17). Dessa forma, foi proposto um modelo em que a plena ativação do receptor EGF aumenta a atividade da TRPM6. Caso esse mecanismo esteja prejudicado, pode-se observar perda renal de magnésio por falha do transporte ativo desse eletrólito no túbulo contorcido distal.^{3,44}

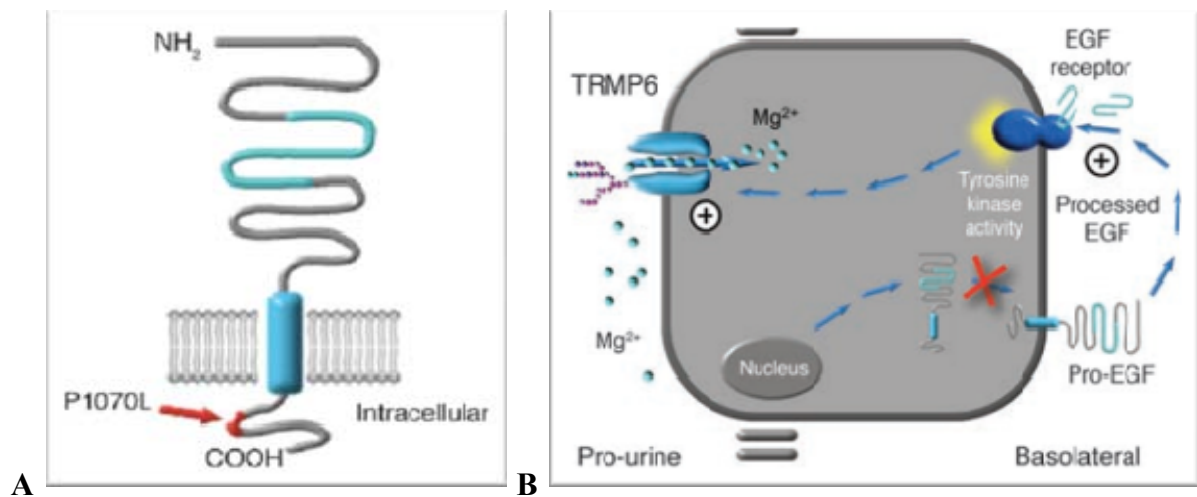


Figura 17. Modelo esquemático da mutação P1070L (A) impedindo a adequada estimulação do EGFr, com prejuízo da função da TRPM6 (B).

Fonte: Groenestege, 2007.

O EGF está presente no líquido e é um fator neurotrópico regulador do desenvolvimento neuronal. Alguns estudos já reportam a associação entre o decréscimo dos níveis de EGF e distúrbios psiquiátricos. Apesar da necessidade de mais estudos para o esclarecimento do papel exato do EGF no desenvolvimento mental, sua relevância nesse processo é sugerida pelo achado tanto do grave comprometimento dessa função em ambas as irmãs quanto da presença de esquizofrenia em uma das irmãs heterozigotas para a mutação.⁴⁴

O uso do cetuximab, um anticorpo anti-receptor do EGF, para tratamento de câncer de cólon, ocasiona hipomagnesemia através de um modelo compatível com o referido anteriormente. Além disso, através de cultura de células pré-incubadas com cetuximab, foi demonstrado que esse anticorpo, além de interromper a estimulação da TRPM6, também antagoniza esse processo.² Outras medicações antineoplásicas como panitumumab e matuzumab apresentam efeito semelhante.⁴⁵

Desta forma visualizamos várias causas de hipomagnesemia autossômica recessiva, além das mutações inicialmente relatadas das claudinas, da TRPM6 e do NCCT, mutações no

pro-EGF devem ser aventadas frente a presença de herança recessiva. Historicamente, medicações que posteriormente tiveram ação revelada em receptores têm norteado o esclarecimento etiológico e sua terapêutica. Assim descoberta de agentes capazes de interferir na regulação da atividade do EGF pode ser um caminho futuro para o tratamento de alguns tipos de distúrbios da homeostase do magnésio.⁴⁴

4.13 Hipomagnesemia com hipocalcemia secundária

A hipomagnesemia com hipocalcemia secundária é uma doença autossômica recessiva rara que cursa com hipomagnesemia severa sintomática, com início geralmente no período neonatal ou lactância.^{2,3} Uma vez que o magnésio ultrapassa a barreira placentária livremente, essa troca permite níveis normais desse íon no período intra-uterino. Após o nascimento, essas taxas declinam progressivamente e o paciente torna-se sintomático.⁴⁶

As queixas mais freqüentes são sintomas de aumento da excitabilidade neuromuscular, como espasmos musculares ou tetania, e convulsões generalizadas.^{2,47} Schlingmann encontrou uma prevalência de 96% de convulsão entre indivíduos acometidos por hipomagnesemia com hipocalcemia secundária em um estudo de vinte e uma famílias. A recorrência dos sintomas pode ocorrer se a hipomagnesemia for considerada transitória ou se não for creditada como etiologia do quadro clínico.⁴⁶ Têm-se descrito ainda movimentos coreoatetóicos, dificuldades na fala e no sensorio em crianças mais velhas que não obtiveram controle adequado dos níveis séricos do magnésio.⁴⁷

A investigação laboratorial revela hipomagnesemia acentuada associada à hipocalcemia e hipoparatiroidismo.^{21,46} Acredita-se que a hipomagnesemia crônica leve a uma resistência ao PTH e/ou falência da paratiroides com conseqüente hipocalcemia.^{2,20}

Foi descoberto que esse distúrbio está associado à perda completa da função da TRPM6, levando a uma redução na absorção intestinal de magnésio, que pode ser acompanhada também de diminuição na reabsorção renal do magnésio,^{16,41} prejudicando o transporte ativo.⁴⁷ Embora nem sempre disponível, o uso por via oral de suplemento de magnésio marcado com isótopo radioativo permite demonstrar o defeito na absorção intestinal desse íon.^{46,48}

Na vigência de hipomagnesemia, os mecanismos renais atuam de modo a diminuir a excreção do magnésio para tentar compensar esse distúrbio. Assim, espera-se hipomagnesiúria nos pacientes com essa condição, sendo colocado por alguns até a possibilidade de ausência de excreção renal de magnésio. Isso indica inclusive que o achado de normocalciúria assinala para a falha desse mecanismo, provalvemente em função da presença concomitante da alteração da função da TRPM6 no túbulo contorcido distal. Outro fato a favor dessa evidência é que as taxas de excreção de magnésio nesses pacientes no início da suplementação tendem a ser maiores do que as esperadas considerando-se que o conteúdo corporal total desse íon estaria ainda diminuído.²¹⁴⁶

Estudos genéticos mapearam a TRPM6 no cromossomo 9q12-22.2. As mutações estão distribuídas em toda proteína e incluem deleções de exons, códons de terminação e substituição ou exclusão de domínios ligantes de sua cadeia de aminoácidos.^{2,46} A mutação S141L na porção citosólica N-terminal da TRPM6 (figura abaixo) faz com que a proteína seja mantida dentro do retículo endoplasmático, impedindo a heteromização com a TRPM7.^{20,21} Uma segunda mutação missense encontrada nesses pacientes acarreta em troca do aminoácido P1017R na região do poro da TRPM6. Essas mutações apresentam também um efeito negativo na função da TRPM7.²⁰ No entanto, a perda da função da TRPM6 independe do local e tipo da mutação.⁴⁶

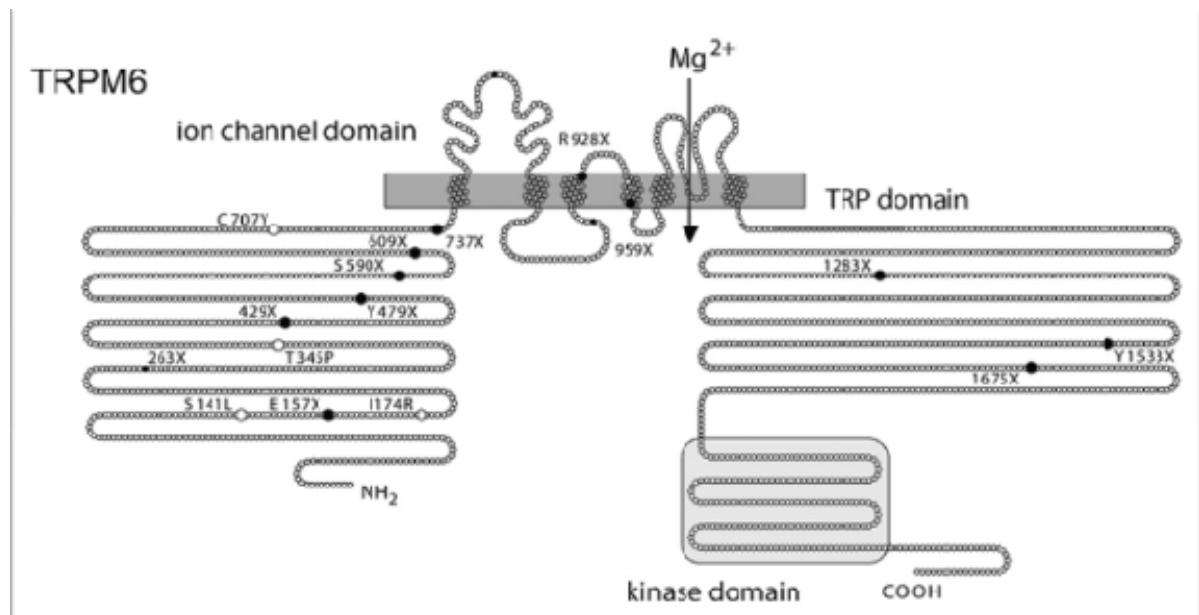


Figura 18. Algumas mutações identificadas em pacientes com hipomagnesemia com hipocalcemia secundária. **Fonte:** Schlingmann, 2007.

O tratamento desses pacientes envolve o alívio dos sintomas e a normalização do cálcio sérico por meio da imediata administração de magnésio, geralmente iniciada por via parenteral: intravenosa ou intramuscular.^{3,47} Após a estabilização do quadro, mantém-se uma dose oral elevada de suplementação de magnésio por toda a vida,^{2,47} de modo que ele será absorvido pela via paracelular que se encontra íntegra e que pode ser potencializada com aumento da concentração intraluminal do eletrólito (figura 19).^{19,46}

Em algumas situações, essa dose pode ser 20 vezes maior do que a ingestão fisiológica, o que pode acarretar em diarreia e abandono do tratamento.^{21,30} Adolescentes são menos tolerantes à terapia do que lactentes e crianças.²¹ Alternativas consistem em administração do magnésio por via parenteral ou por infusão nasogástrica noturna contínua.³⁰

Deve ser comentado que essa terapia pode ser ineficaz em corrigir completamente os níveis séricos do magnésio.^{2,20,47} Acredita-se que essa incapacidade ocorra quando há perda renal de magnésio concomitante.⁴⁶ Usualmente, a hipocalcemia é corrigida com a administração do magnésio, mas caso persista tende a ser resistente ao tratamento com vitamina D ou suplementação de cálcio.³⁰

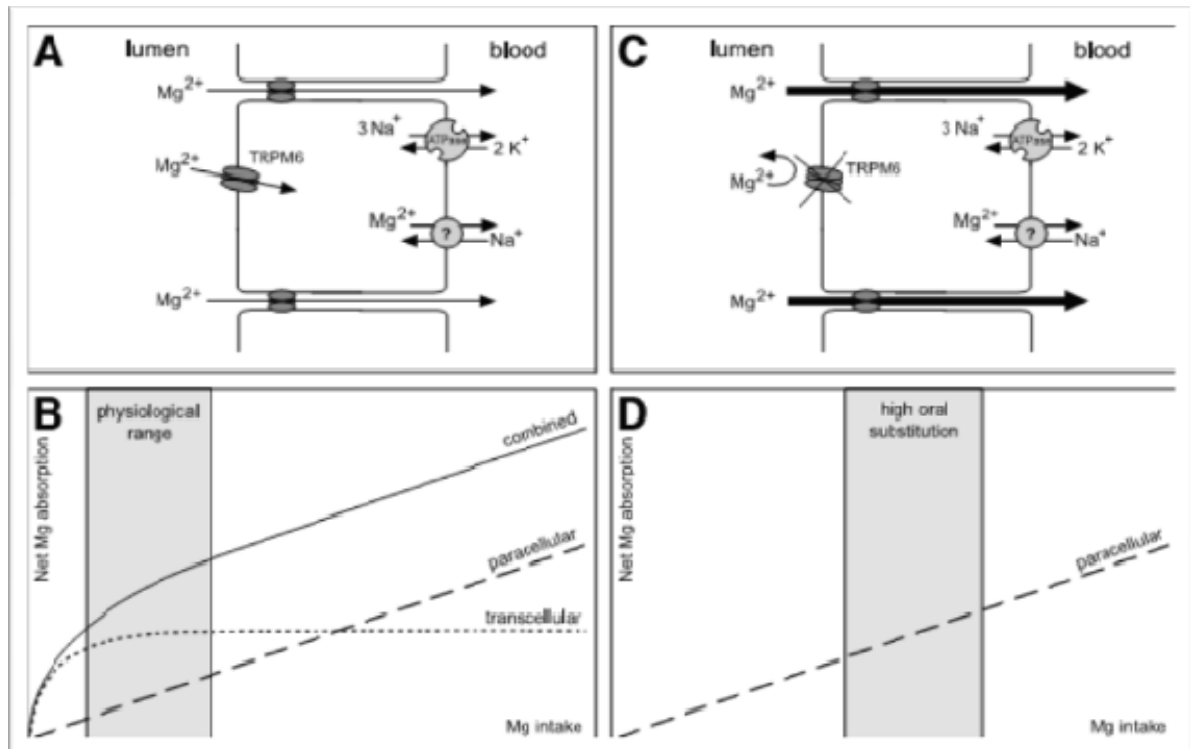


Figura 19. Modelo proposto de absorção intestinal do magnésio (A). Comparação entre a ingesta e a absorção intestinal do magnésio (B). A mutação na TRPM6 leva a uma interrupção da via transcelular e, conseqüentemente, todo o magnésio é absorvido pela via paracelular (C). Doses elevadas de magnésio suplementar em pacientes com hipomagnesemia com hipocalcemia secundária permitem uma absorção do magnésio mais efetiva ao utilizar a via paracelular (D).
Fonte: KONRAD, 2004.

Caso não seja instituído um tratamento precoce, os danos neurológicos podem ser irreversíveis ou pode ocorrer óbito do paciente.⁴⁶ Ainda são necessários mais estudos para o completo entendimento desta condição.⁴⁷

4.14 Síndrome de Bartter

A Síndrome de Bartter é um transtorno hereditário autossômico recessivo produzido por um defeito na reabsorção tubular combinada de sódio, potássio e cloro. Ela é caracterizada por hipocalemia, hipocloremia, alcalose metabólica e aumento da atividade de renina e aldosterona. Os níveis tensionais tendem a ser normais nesses pacientes. Além disso, observa-se aumento dos níveis urinários de prostaglandina E2 (PEG2), principalmente na infância.^{49,50} Não há relatos de predileção por sexo ou etnia nesse distúrbio. Essa síndrome reúne um grupo de doenças tubulares renais que podem ser diferenciadas em cinco tipos de acordo com o início dos sintomas e a gravidade do quadro clínico.⁴⁹

Tabela 4. Variantes da Síndrome de Bartter.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
OMIM	601678	241200	607364	602522	601199
Cromossomo	15q15-21	11q24-25	1p36	1p31	3q13.3-q21
Gene	SLC12A1	KCNJ1	CLCNKB	BSND	CASR
Proteína	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻	ROMK	ClC-Kb	Bartina	CaSR

Fonte: Baseado em Naderi, 2007.

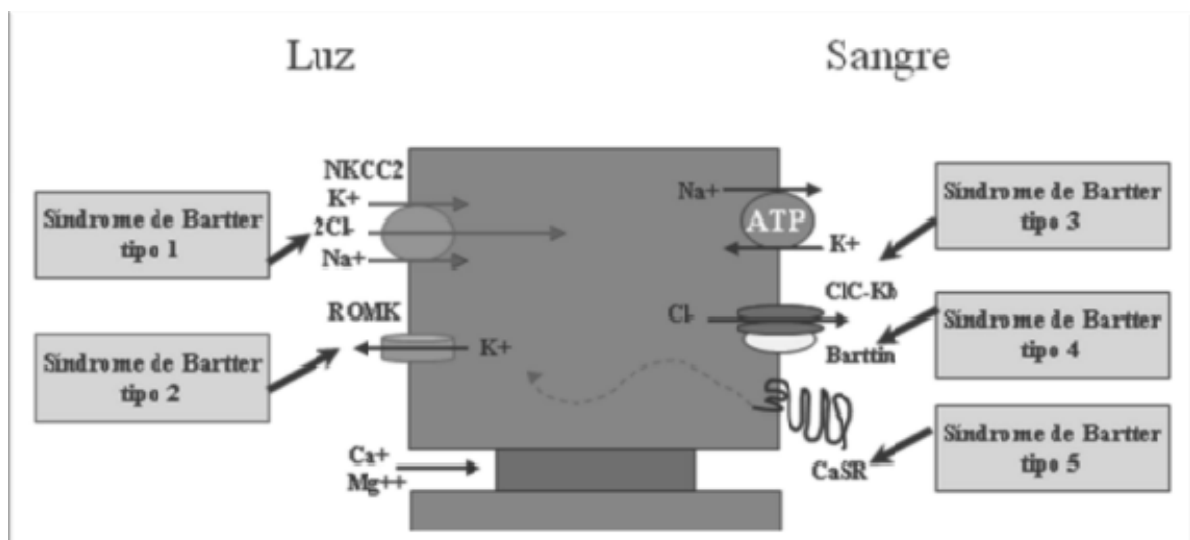


Figura 20. Modelo celular de transporte do magnésio na alça de Henle, mostrando as proteínas envolvidas nas variantes da Síndrome de Bartter.

Fonte: Higueta, 2009.

Ao contrário da Síndrome de Gitelman, os defeitos estão localizados na alça de Henle na Síndrome de Bartter. O transporte do cloreto de sódio nesse segmento do néfron requer a

presença de no mínimo cinco proteínas. Na membrana luminal, o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) utiliza o gradiente elétrico promovido pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase para reabsorver o sódio, potássio e cloro. O potássio é devolvido à urina por meio do ROMK. Essa reciclagem do potássio estabelece o gradiente utilizado na reabsorção paracelular de magnésio e cálcio. Na membrana basolateral, o sódio atravessa a membrana por meio da bomba de Na^+/K^+ -ATPase e o cloro por meio dos dois canais de cloro CLC-Kb, principalmente, e CLC-Ka. A bartina é uma proteína específica necessária para ativar a função desses dois canais.⁵⁰ Mutações nessas proteínas citadas promoverão as variantes da Síndrome de Bartter (tabela 4 e figura 20).³

Hipomagnesemia está presente apenas nos tipos III e V e é, por isso, que enfocaremos esses dois tipos. A Síndrome de Bartter do tipo III (OMIM 607364), também conhecida como Síndrome de Bartter clássica, manifesta-se clinicamente na infância, geralmente antes dos dois anos de idade. O quadro clínico compreende poliúria, enurese, polidipsia, desejo de comer sal, tendência à desidratação, vômitos, constipação, fadiga e atraso do crescimento. Alguns pacientes apresentam parestesias e paralisias musculares transitórias. A pressão arterial tende a ser normal ou baixa. Podem apresentar normo- ou hipercalcúria, sendo esta última envolvida no surgimento incomum de nefrocalcinose.⁴⁹

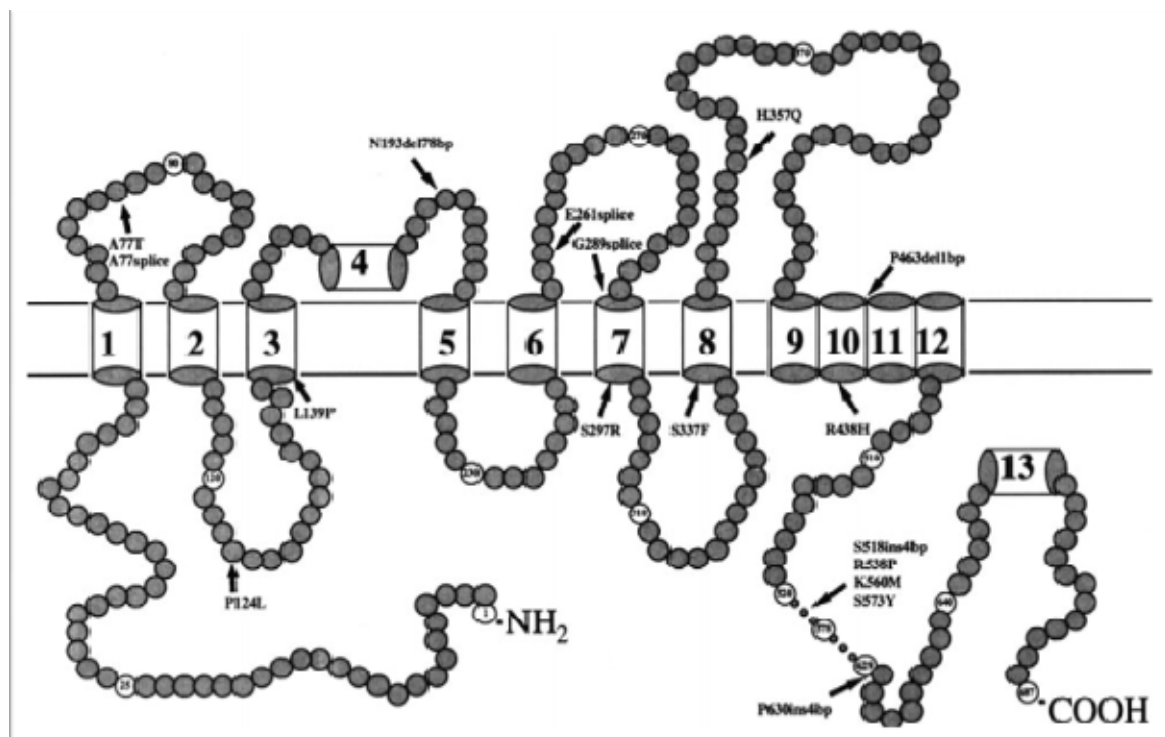


Figura 21. Modelo estrutural do CLC-Kb e de algumas mutações encontradas em pacientes com Síndrome de Bartter clássica.

Fonte: Konrad, 2000.

A alteração genética envolvida na Síndrome de Batter do tipo III foi identificada em 1997 pelo grupo Lifton ao descrever uma mutação que envolve o gene CLCNKB localizado no cromossomo 1p36. São conhecidas ao menos 26 mutações diferentes nesse gene que alteram o CIC-Kb presente na membrana basolateral da alça de Henle.³³ Observa-se uma taxa elevada de deleções em todo o gene, conforme demonstrado por Konrad e colaboradores (figura 21), provocando modificações na proteína com alteração de sua função com perda renal de sal, potássio, íons de hidrogênio e, às vezes, magnésio e cálcio.⁵¹

Uma pesquisa japonesa revelou 6 famílias que apresentavam a mutação *nonsense* W610X do CLCNKB, gerando um canal de cloro (CIC) disfuncional. Essa mutação sugere a existência de um ancestral comum entre essas famílias, uma vez que essa mutação não foi identificada em outras raças. No entanto, mesmo sendo portadores de uma mesma mutação, os indivíduos acometidos por esse distúrbio podem manifestar fenótipos diferenciados.

O diagnóstico da Síndrome de Bartter é feito quando um paciente apresenta hipocalemia, ao redor de 1,5 a 2,5 mEq/L, associada à hipocloremia, alcalose metabólica. Em 50% casos, observa-se hipomagnesemia. As alterações urinárias mais marcantes são o aumento da fração de excreção do potássio, sódio, cloro e cálcio, sem haver perda completa da capacidade renal de concentrar a urina. A dosagem da PGE₂ urinária também pode auxiliar na definição diagnóstica, embora não seja tão alterada quanto nos outros tipos da síndrome.⁴⁹

O paciente com Síndrome de Bartter enfrenta várias dificuldades no tratamento, principalmente quanto mais jovem ele for. O principal objetivo da terapêutica é corrigir a alcalose e a hipocalemia. Além do uso de xarope de cloreto de potássio, pode ser que seja necessária a associação de um diurético poupador de potássio como a espironolactona. No entanto, os inibidores da síntese de prostaglandinas, como a indometacina, são os medicamentos mais efetivos na melhora dos sintomas a longo prazo. Ibuprofeno, cetoprofeno e ácido acetilsalicílico são outras medicações que podem ser utilizadas e não está definido qual delas é a melhor opção. Os pacientes devem ser encorajados a adotar uma dieta hiperssódica. Caso haja hipomagnesemia, o paciente deverá receber suplementação de magnésio também.^{49,50}

Recentemente, tem sido relatado o quinto tipo da Síndrome de Bartter (OMIM 601199) que cursa com hipocalcemia, secreção deficiente de paratormônio, hipocalemia, hipomagnesemia e nefrocalcinose. Pode ser uma evolução da hipocalcemia autossômica dominante que é produzida por mutações do tipo ganho de função no gene CASR localizado no cromossomo 3q13.3-21 que codifica o CaSR. Mais de quarenta mutações do tipo ganho de função do CaSR já foram descritas (figura 22). A maioria delas são do tipo *missense*. Esse

tipo de mutação tem a propriedade de ativar o CaSR, inibindo o canal ROMK com prejuízo da reabsorção do cloreto de sódio. Isso produz perda salina, hipocalcemia e hiperaldosteronismo secundário. São necessário mais estudos para confirmar essa etiologia.^{28,33,49}

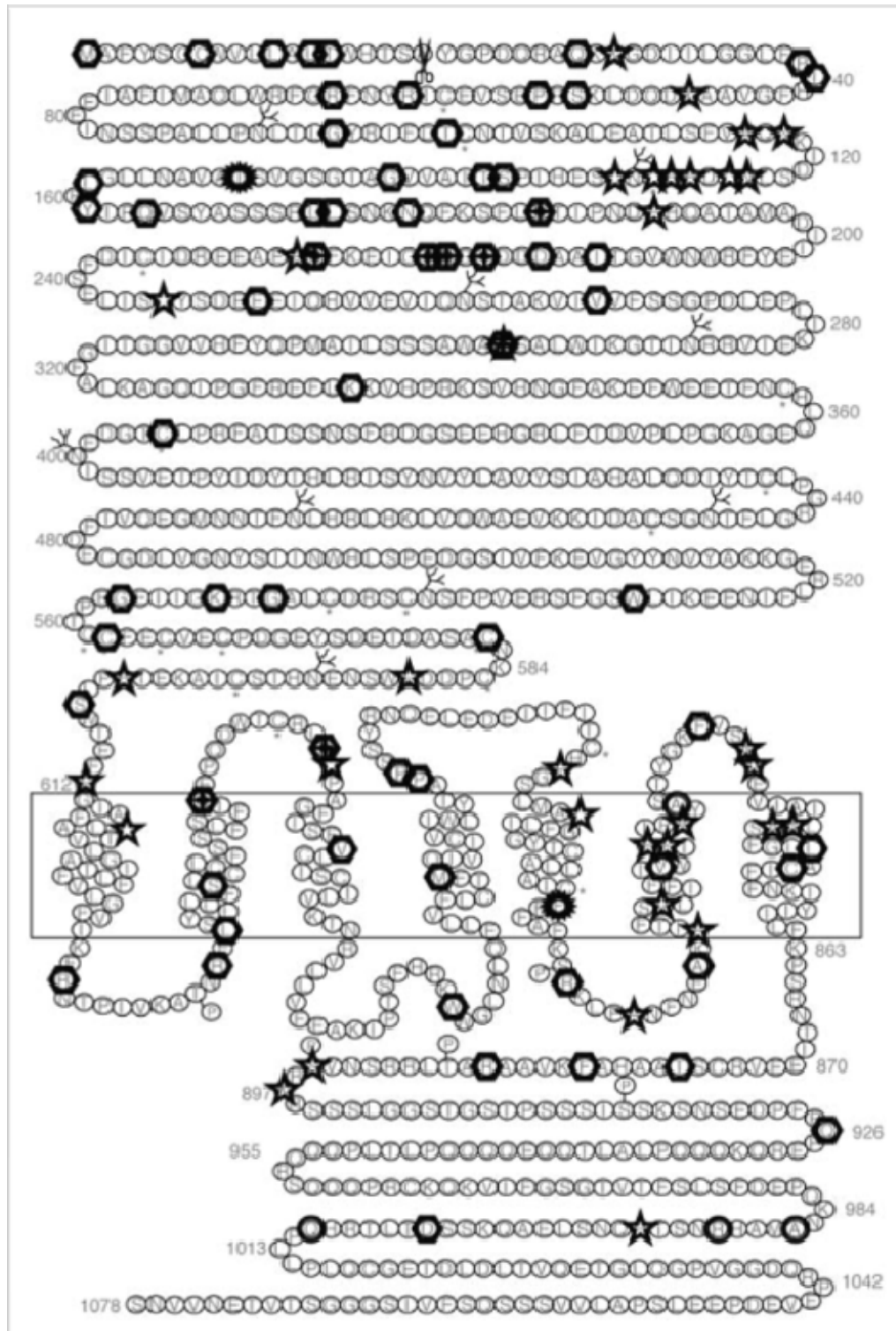


Figura 22. Topografia das mutações no CaSR. Aquelas que indicam ganho de função foram marcadas com uma estrela.

Fonte: D'Souza-Li, 2006.

4.15 Síndrome de Gitelman

Síndrome de Gitelman é uma das tubulopatias renais primárias mais frequentes, com incidência estimada em 1:40.000 e a prevalência em 25:1.000.000.⁵² Ela é caracterizada por hipomagnesemia, hipocalciúria e aldesteronismo secundário, que é responsável pela hipocalemia e alcalose metabólica. Em relação à Síndrome de Bartter, é uma doença genética e clinicamente distinta.² A sintomatologia tem início mais tardio em comparação com a Síndrome de Bartter, geralmente no final da infância ou na adolescência, mesmo que as alterações bioquímicas possam ser detectadas anteriormente.^{3,30}

Freqüentemente são referidos câimbras, tetania, espasmos recorrentes e avidez por sal,³⁰ principalmente em vigência de febre ou quando mais magnésio é perdido como quando ocorrem vômitos ou diarreia. No entanto, desidratação não é um achado comum. Parestesias são mais referidas na face. Astenia é uma queixa comum, embora variável. A fadiga pode ser tão intensa em alguns pacientes, ao ponto de interferir na execução das atividades do cotidiano, enquanto outros nunca reclamam de cansaço. Essa diferença de sintomas não está completamente relacionada ao grau de hipocalemia.²

Podem apresentar condrocalcinose e, mais raramente, rabdomiólise, as quais estão relacionadas à hipomagnesemia crônica e hipocalemia severa respectivamente.⁴⁷ Nefrocalcinose nunca foi observada nesses pacientes.⁴³ Quando se encontra deficiência de crescimento nesses pacientes, ela é severa se houver hipocalemia e hipomagnesemia intensas. Mesmo assim, possui menor intensidade do que a relatada nos pacientes com Síndrome de Bartter.²

A pressão arterial tanto naqueles com Síndrome de Gitelman quanto nos portadores heterozigóticos é menor do que a dos outros indivíduos.² Supõe-se que haja um bloqueio na sinalização da angiotensina II com interferência na depleção de sal e volume, promovendo a tendência à hipotensão ou normotensão. A maioria dos casos não apresenta arritmias. No entanto, cerca de 50% deles possuem prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma. Morte súbita já foi relatada em alguns pacientes com Síndrome de Gitelman.^{2,53}

Cruz e colaboradores realizaram uma avaliação da qualidade de vida em 50 pacientes com Síndrome de Gitelman e de 25 pacientes-controles. A pesquisa evidenciou prejuízos comparáveis aos vivenciados por pacientes com diabetes, inclusive entre os pacientes ditos assintomáticos. Foi possível detectar sintomas mais sutis como, por exemplo, parestesias,

tontura, fadiga e noctúria. Não foi possível uma associação entre os sintomas e o grau das alterações eletrolíticas.⁵⁴

Ainda são necessários mais estudos, mas há evidências que sugerem que o quadro clínico é mais severo nos pacientes do sexo masculino.^{2,55} Lin e colaboradores, em um estudo de vinte e cinco pacientes chineses com Síndrome de Gitelman, encontraram hipocalemia mais severa associada à episódios de paralisia em pacientes do sexo masculino quando comparados com os do sexo feminino. Estudos em animais demonstram que o gênero pode ter influência na regulação do NCCT e talvez essa seja a explicação para esses achados.⁵⁵

Estudos utilizando infusão de solução salina demonstraram uma reduzida reabsorção de cloreto no túbulo contorcido distal, além de uma capacidade de concentração urinária preservada ou ligeiramente afetada. A rápida natriurese após administração de furosemida sinaliza que o defeito verificado nesses pacientes se encontra no túbulo contorcido distal.²

Somente em 1996, foi descoberto que se tratava de uma doença de herança autossômica recessiva decorrente de mutações que ocasionam inativação do gene SCL12A3 localizado no cromossomo 16q13. Mais de cento e quarenta mutações diferentes já foram identificadas. A maioria dessas mutações é decorrente de substituições de aminoácidos nos domínios intracelulares (figura 23).^{2,55}

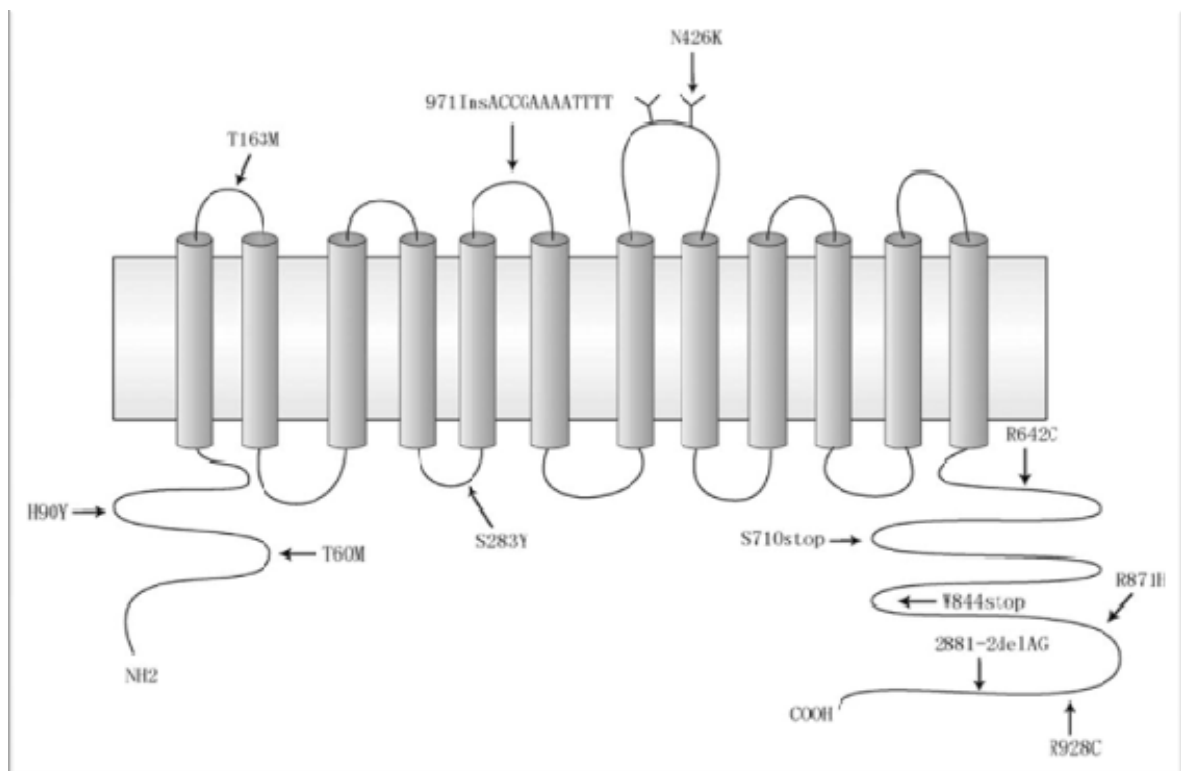


Figura 23. Diagrama esquemático de mutações identificadas em 25 chineses com Síndrome de Gitelman.
Fonte: Lin, 2005.

Acredita-se que 1% dos indivíduos caucasianos seja portadores heterozigotos. Esse percentual atinge 2% entre os europeus de etnia gitana, onde é descrito uma mutação de provável origem remota e exclusiva que consiste na substituição da guanina por timina na posição 1 do intron 9.⁵³ Até o momento, não foi identificada uma correlação específica entre as alterações genotípicas e fenotípicas.^{53,55}

Uma minoria de pacientes com Síndrome de Gitelman, ao invés de mutação no gene SCL12A3, possuíam mutações no gene CLCNKB.² Essa alteração gênica pode acarretar em quadros muito variáveis, desde espectro da Síndrome de Batter até Síndrome de Gitelman. Um teste com tiazídicos pode ser útil nessa diferenciação.^{2,53} Essa mutação deve ser pesquisada se a mutação SCL12A3 não for encontrada nos pacientes com Síndrome de Gitelman.

As mutações levam à redução da expressão do NCCT na membrana celular apical da primeira porção do túbulo contorcido distal, por meio de permanência deste receptor no retículo endoplasmático. Algumas vezes, a proteína consegue alcançar a membrana, mas permanece parcial ou totalmente inativada.²

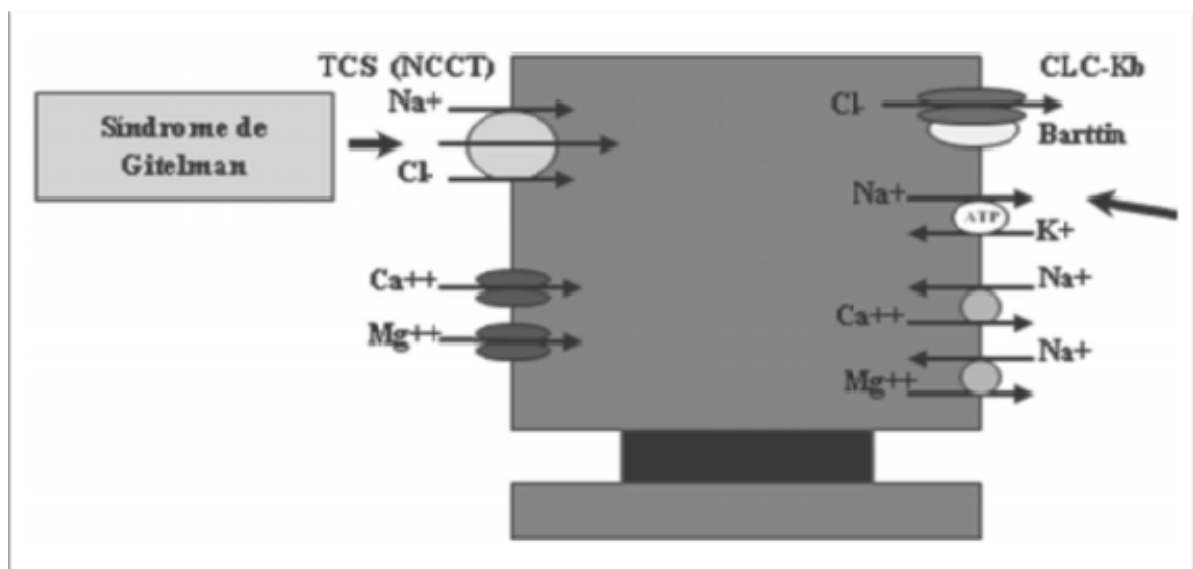


Figura 24. Modelo celular de transporte do magnésio no túbulo contorcido distal, mostrando a localização do NCCT e das outras proteínas envolvidas nesse processo.

Fonte: Higuita, 2009.

Quando ocorrem perdas de função tanto do NCCT quanto do CLC-Kb, há uma interrupção na reabsorção renal de NaCl com mais sódio atingindo o ducto coletor. Para manter o volume vascular, o sistema renina-angiotensina-aldosterona é ativado. Os níveis elevados de aldosterona favorecem a reabsorção no ducto coletor e a secreção renal de

potássio e hidrogênio, levando à hipocalemia e alcalose metabólica. No entanto, o exato mecanismo que causa a hipomagnesemia ainda é desconhecido. A redução da expressão do canal TRPM6 com conseqüente perda renal de magnésio é uma hipótese para esse achado. O motivo da hipocalciúria também não está bem estabelecido, mas acredita-se que ocorra reabsorção passiva de cálcio no túbulo proximal.^{2,52}

O diagnóstico é feito mediante os sintomas clínicos e as alterações bioquímicas, que são semelhantes aqueles provocados pelo uso abusivo de diuréticos.^{3,52} As anormalidades mais características são hipocalemia, hipomagnesemia e hipocalciúria. Geralmente, apresentam magnesemia < 0,5 mEq/L, calemia < 3 mEq/L e bicarbonato > 29 mEq/L associados à hipermagnesiúria, hiperpotassiúria com hipocalciúria (menos de 2 mg/Kg/dia).⁴⁹ Pode ser diferenciada da Síndrome de Batter por apresentar hipomagnesemia com hipocalciúria e maior capacidade de concentrar a urina. Além disso, os níveis da prostaglandina E se encontram dentro dos padrões de normalidade e os níveis plasmáticos de renina e aldosterona estão pouco aumentados.^{2,49}

O tratamento envolve principalmente a suplementação ininterrupta de magnésio por meio de dieta e de cloreto de magnésio, compensando tanto as perdas renais de magnésio quanto de cloro.⁴² Isso se justifica em função da condrocalcinose.⁵² Em quadros mais severos, pode ser necessário administrar sulfato de magnésio por via parenteral.⁵³ A suplementação do potássio ou o uso de espironolactona para a correção da hipocalemia não são obrigatórios em todos os casos.²

Em casos excepcionais, utiliza-se indometacina para evitar o déficit de crescimento. O início precoce dessas medidas é determinante no sucesso da terapia.⁴⁹ Uma possibilidade terapêutica futura é a criação de chaperonas que consigam levar o NCCT até a membrana plasmática quando o problema for a retenção do receptor no retículo endoplasmático.

Deve-se fazer a recomendação para esses pacientes evitarem esportes competitivos e medicamentos que causem esse prolongamento do intervalo QT.⁵³

A longo prazo, geralmente, o prognóstico dos pacientes com a Síndrome de Gitelman é bom. Entretanto, a severidade da fadiga pode promover um comprometimento importante das atividades diárias. O desenvolvimento de insuficiência renal crônica é muito raro.²

4.16 Hipomagnesemia, hipertensão e hipercolesterolemia

A associação entre hipomagnesemia, hipertensão e hipercolesterolemia foi descrita em por Wilson em 2004. Seus estudos adviram de uma família caucasiana onde foi observado que, dentre os 142 familiares estudados, incluindo o caso índice, 38 membros eram hipertensos, 33 hipercolesterolêmico e 32 pacientes apresentavam hipomagnesemia. Assim, os pacientes apresentam uma variabilidade fenotípica, com penetrância de 50% para cada um desses achados. Observou-se também um aumento na prevalência de enxaqueca, perdas auditivas e miocardiopatia hipertrófica nesses pacientes em relação ao grupo controle.

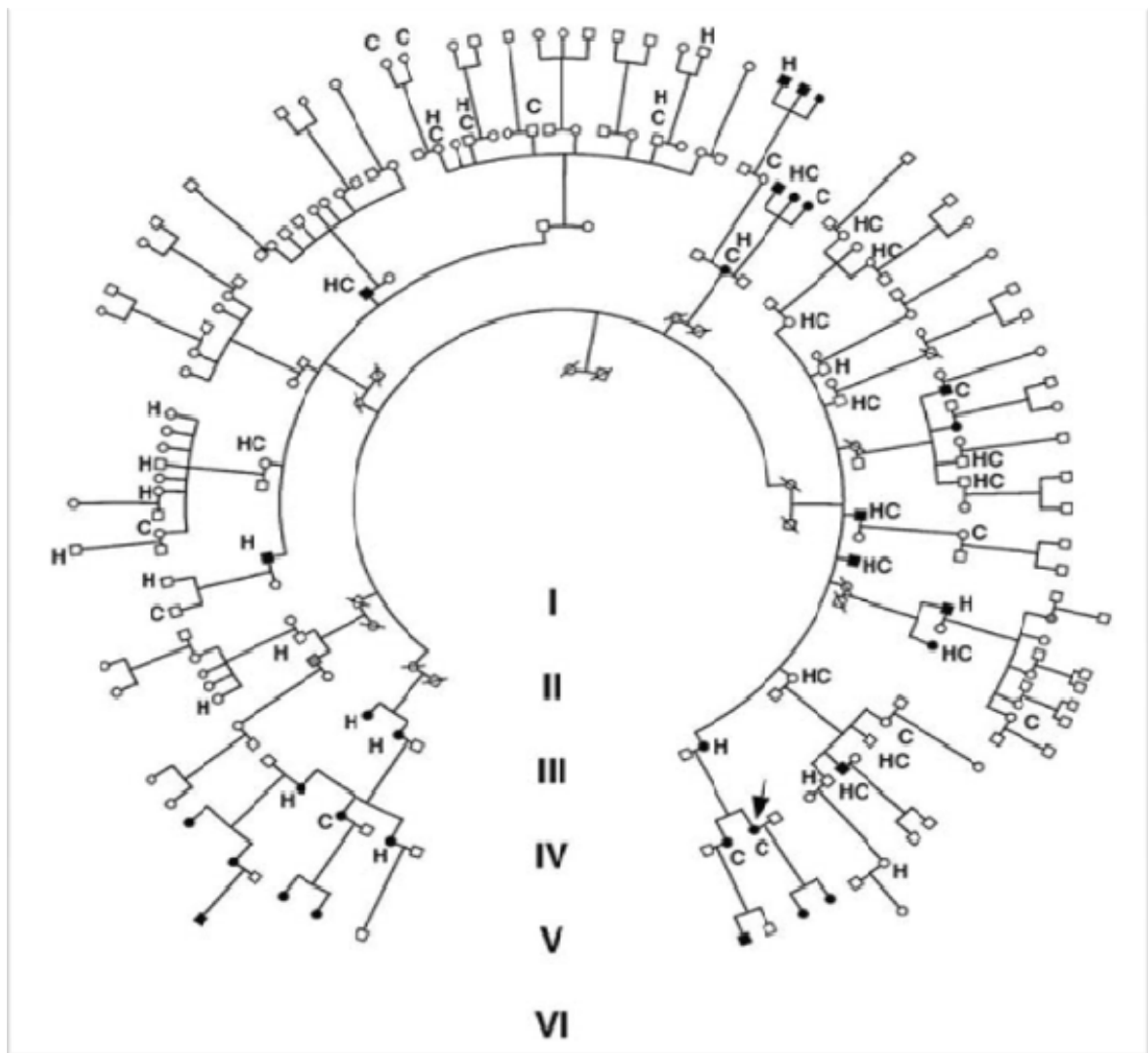


Figura 25. Heredograma da família caucasiana. O caso índice foi identificado com uma seta, os hipertensos com H, os hipercolesterolêmicos com C, os hipomagnêsemicos com cor preta e os assintomáticos com cor cinza.

Fonte: Wilson, 2004.

Esses pacientes apresentavam um aumento de 13 mmHg na pressão sistólica e de 5 mmHg na pressão diastólica em comparação com o grupo controle bem como um aumento de 26 mg/dL no colesterol total sem influência no HDL. Não foi observado diferença nos níveis plasmáticos de renina e aldosterona nessa família em relação ao grupo controle.

A presença de hipomagnesemia foi detectada em várias gerações dessa família e em ambos os sexos, não tendo sido identificado efeito da idade nessa incidência. Foi descartado a possibilidade de causa medicamentosa para a hipomagnesemia encontrada. Observou-se hipermagnesiúria por distúrbio na reabsorção no túbulo contorcido distal. Associado a isso, podem apresentar uma diminuição da excreção de cálcio na urina, apesar de normocalcemia. Esses pacientes podem ainda apresentar hipocalcemia por perda urinária desse íon. Não foram observados alterações na excreção do sódio.

Os indivíduos do sexo masculino não eram capazes de transmitir essa herança a seus filhos. No entanto, a maioria dos filhos das mulheres afetadas também apresentam essas alterações metabólicas. Isso levantou a hipótese de herança mitocondrial. Inibidores da produção de ATP aumentam a síntese de colesterol e a pressão arterial em modelos animais.

O sequenciamento de todo o genoma mitocondrial foi realizado com objetivo de detectar variações, uma vez que não foram observadas deleções. Encontrou-se uma mutação timidina-citidina imediatamente no anticodon do RNA transportador. A substituição da uridina por citidina nessa posição prejudica de modo significativo a ligação com o ribossomo, evidenciando a importância funcional dessa mutação.

São necessários mais estudos para elucidar a relação entre genótipo e fenótipo, mas esse estudo sugere que a perda de função da mitocôndria possa explicar o surgimento hipertensão ou hipercolesterolemia com o avançar da idade dos seres humanos. Este é o primeiro relato até o momento de uma mitocondriopatia com componente de hipomagnesemia, mas outros casos poderão ser descritos.⁵⁶

5 CONCLUSÃO

O interesse em compreender os mecanismos moleculares que controlam a homeostase do magnésio é relativamente recente, mesmo porque somente com o avanço das técnicas de biologia molecular usadas na identificação e caracterização funcional de genes e proteínas, é que se adquiriu um conhecimento mais claro sobre a relação entre os desequilíbrios na concentração desse íon e diversas doenças hereditárias.

A análise sistemática das publicações científicas nos últimos dez anos corrobora para a crença de que possivelmente milhares de novas proteínas e genes serão relacionados ao controle da homeostase do magnésio, visto que embora a literatura explique os mecanismos de cada tipo de hipomagnesemia de origem hereditária em detalhes, ainda resta um quê a se desvendar. No entanto, devemos lembrar que a manifestação clínica dessas doenças é o fator motivador para todas essas pesquisas.

A hipomagnesemia foi tratada durante muito tempo apenas como uma alteração laboratorial e não uma doença. Assim, uma vez diagnosticada não devemos nos ater somente ao seu tratamento, mas sim suspeitar de todas as alterações metabólicas complexas que podem estar associadas que traduzem todas essas desordens descritas neste trabalho, motivados pelo entendimento que o diagnóstico precoce dessas entidades pode diminuir morbimortalidade e aumentar qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rondón-Berrios H. Hipomagnesemia. *An Fac Med Lima*. 2006; (1): 38-48.
2. Knoers NVAM. Inherited forms of renal hypomagnesemia: an update. *Pediatr Nephrol*. 2008; 24(4):697-705.
3. Naderi ASA, Reilly Jr RF. Hereditary etiologies of hypomagnesemia. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008; 4(2): 80-89.
4. Gonzáles, MJH. Hipomagnesemia de origen genético. Trabalho apresentado no XXXV Congr Nefr Ped. Ilhas Canárias, 2009.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Tecidos Epiteliais in: *Histologia Básica: texto e atlas*. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2004, p.
6. Colegio OR, Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 283: C142-47.
7. Anderson JM, Itallie CMV. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org>> Acesso em: 02 set. 2009.
8. Collares-Buzato CB. Junções celulares. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A Célula* 2001. 1. ed. Barueri: Ed. Manole Ltda; 2001, p. 57-73.
9. Krause G, Winkler, Piehl C, Blasig I, Piontek J, Muller SL. Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1165: 34-43.
10. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, et al. Formation of tight junction: determinants of hemophilic between classic claudins. *FASEB*. 2008; 22: 146-158.
11. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org>>. Acesso em: 10 set. 2009.
12. Günzel D, YU ASL. Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Eur J Physiol*. Disponível em: <<http://www.springerlink.com>>. Acesso em: 30 ago. 2009.
13. Ikari A, Hiari N, Shiroma M, Harada H, Sakai H, Hayashi H, et al. Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. *J Bio Chem*. 2004; 279(52): 54826-32.

14. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, et al. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *PNAS*. 2009; 106: 15350-55.
15. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest*. 2008; 118(2): 619-28.
16. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7 – Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772: 813-21.
17. Alexander RT, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 1451-58.
18. Wijst J, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Epithelial Mg^{2+} channel TRPM6: insights into the molecular regulation. *Magnes Res*. 2009; 22(3): 127-32.
19. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 286: F599-605.
20. Schmitz C, Deason F, Perraud A. Molecular components of vertebrate Mg^{2+} -homeostasis regulation. *Magnes Res*. 2007; 20(1): 6-18.
21. Schlingmann, KP, Gudermann T. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *J Physiol*. 2005; 566.2: 301-08.
22. Voets T, Niliust B, Hoefs S, Kemp AWCMV, Droogmans G, Bindels RJM, et al. TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J Biol Chem*. 2004, 279: 19-25.
23. Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 15-26.
24. Muallem S, Moe OW. When EGF is offside, magnesium is wasted. *J Clin Invest*. 2007; 117: 2086-89.
25. Dubyak GR. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv. Physiol. Educ*. 2004; 28: 143-154.
26. Negri AL. Hereditary disorders of magnesium reveal new proteins implicated in its renal transport. *Nefrologia*. 2008; 28(5): 549-553.
27. Hu J, McLarnon SJ, Mora S, Jiang J, Thomas C, Jacobson KA, et al. A region in the seven-transmembrane domain of the human Ca^{2+} receptor critical for response to Ca^{2+} . *J Bio Chem*. 2005; 280: 5113-20.
28. D'Souza-Li L. The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50: 628-639.

29. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Paillard M, et al. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe Autosomal Dominant Hypocalcemia with a Bartter-Like Syndrome. *J Am Nephrol.* 2002; 13: 2259-66.
30. Konrad M, Weber S. Recent Advances in Molecular Genetics of Hereditary Magnesium-Losing Disorders. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 249-260.
31. Kantorovich V, Adams JS, Gaines JE, Guo X, Pandian MR, Cohn DH, et al. Genetic heterogeneity in familial renal magnesium wasting. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 612-617.
32. Greenbaum L. A. Distúrbio Eletrolíticos e Ácido-Básicos. In: Berman, RE, Kliegman RM, Jenson HB. *NELSON: Tratado de Pediatría.* 17 ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier Ltda; 2005, p. 236-39.
33. Zamorano MM. Síndrome de Batter. In: XXXV Congr Nefr Ped, 2009, Ilhas Canárias.
34. Weber S, Schneider L, Peters M, Witz JM, Ronnefarth G, Boswald M, et al. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 1872-81.
35. Pablo CL. Hipomagnesemia con hipercalciuria y nefrocalcinosis familiar. In: XXXV Congr Nefr Ped, 2009, Ilhas Canárias.
36. Prabahar MR, Manorajan R, Fernando ME, Venkatraman R, Balaraman V, Jayakumar M. Nefrocalcinosis in siblings – Familial hypomagnesemia, hypercalciuria with nephrocalcinosis (FHHNC Syndrome). *JAPI.* 2006, 54: 497-500.
37. Pablo CL, Vicente, CM, Albero AS, Roldán MJ, Novella CF. Hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis y asociación con alteraciones oculares. *An Pediatr.* 2004; 61(6): 502-08.
38. Konrad M, Hou J, Weber S, Dotsch J, Kari JA, Seeman T, et al. CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 171-81.
39. Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, Vigier ROV, Truttmann AC, Bianchetti MG. Hypomagnesemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 605-10.
40. Kausalya PJ, Amasheh S, Gunzel D, Wurps H, Muller D, Fromm M, et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* 2006; 116(4): 878-91.
41. Hampson G, Konrad MA, Scoble J. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC): compound heterozygous mutation in the claudin 16 (CLDN16) gene. *BMC Nephrology.* 2008; 9: 1-6.

42. Hou J, Shan Q, Wang T, Gomes AS, Yan QS, Paul DL, et al. Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Bio Chem.* 2007; 282: 17114-22.
43. Weber S, Hoffman K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8: 414-22.
44. Groenestege WMT, Thébault S, Wijist JVD, Berg DVD, Janssen R, Tejpar S, et al. Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J Clin Invest.* 2007; 117(8): 2260-67.
45. Ellison DH. Renal magnification by EGF. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2008; 23: 1497-99.
46. Schlingmann KP, Sassen MC, Weber S, Pechmann U, Kusch K, Pelken L, et al. Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 3061-69.
47. Cole DEC, Quamme GA. Inherited disorders of renal magnesium handling. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1937-47.
48. Carranza FR, Souza MSF, Romaldini C, Feferbaun R, Diniz EA. Metabolismo do magnésio na hipomagnesemia primária crônica. *J Pediatr.* 2000; 76(4): 310-14.
49. Higueta LMS, Londoño LMB, Vásquez CMM, Trujillo NP, Ruiz JJV. Síndromes de Batter y Gitelman: revisión de los aspectos genéticos, fisiopatológicos y clínicos. *Iatreia.* 2009, 22(1): 67-76.
50. Kleta R, Bockenhaouer D. Bartter Syndromes and Other Salt-Losing Tubulopathies. *Nephron Physiology.* 2006; 104: 73-80.
51. Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, Heuvel LPWJVD, Jeck N, Vargas-Poussou R, et al. Mutations in the chloride channel gene CLCKB as a cause of classic Bartter Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1449-59.
52. Knoers NV, Levtchenko E. Gitelman syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2008; 3: 22.
53. Morín JDH. Enfermedad de Gitelman. In: XXXV Congr Nefr Ped, 2009, Ilhas Canárias.
54. Cruz DN, Shaer, AJ, Bia MJ, Lifton RP, Simon DB. Gitelman's syndrome revisited: An evaluation of symptoms and health-related quality of life. *Kidney Int.* 2001; 710-17.
55. Lin S, Shiang J, Huang C, Yang S, Hsu Y, Cheng C. Phenotype and genotype analysis in Chinese patients with Gitelman's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(5): 2500-07.

56. Wilson FH, Hariri A, Farhi A, Zhao H, Petersen KF, Toka HR, et al. A cluster of methabolic defects caused by mutation in a mithochondrial tRNA. *Science*. 2004; 306: 1190-94.