

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

Estabelecimento de um modelo celular para o estudo
da regulação da expressão da WNK1
pela aldosterona e angiotensina II
[*resumo*]

Ana Luísa Fernandes Neves Soares

2009

Orientadora: Juliette Hadchouel, VetMD, PhD

Institut National de la Santé et Recherche Médicale

Unité 772 – Gènes et Pression Artérielle

11, Place Marcelin Berthelot | 75004 Paris

Director : Xavier Jeunemaître, MD, PhD

RESUMO

Introdução

A *WNK1* (*With-No lysine Kinase 1*) é uma serina-treonina cínase recentemente descoberta, cujas mutações são responsáveis por uma rara forma de hipertensão arterial, de transmissão autossómica dominante, designada Hipertensão Hipercaliémica Familiar (HHF) ou Síndrome de Gordon. A *WNK1* possui duas isoformas: uma longa (*long WNK1*, *L-WNK1*) que poderá activar o co-transportador Na-Cl (*NCC – Na-Cl cotransporter*), o canal epitelial de sódio (*ENaC – epithelial sodium channel*) e inibir o canal de potássio (*ROMK – renal outer medulla potassium channel*), e uma isoforma renal (*kidney specific WNK1 – KS-WNK1*) que poderá regular a actividade da isoforma longa, através de um mecanismo dominante-negativo.

A expressão de *KS-WNK1* varia em resposta as alterações da dieta: a expressão de mRNA da *KS-WNK1* aumenta nos rins de ratinhos submetidos a uma dieta rica em potássio ou infusão crónica de aldosterona, enquanto as variações no conteúdo em sódio parecem não ter efeito na expressão de *KS-WNK1*. Desta forma, três condições diferentes, mas todas caracterizadas por elevados níveis de aldosterona, têm diferentes efeitos na regulação da expressão de *KS-WNK1*. Estes resultados sugerem que a aldosterona estimula a expressão de *KS-WNK1*, mas que um segundo estímulo, possivelmente a angiotensina II, regula negativamente a sua expressão em condições de baixa ingestão de sódio.

O objectivo deste projecto foi o estabelecimento de um modelo celular no qual os efeitos da aldosterona e da angiotensina II na expressão das isoformas de *WNK1* pudessem ser testados e posteriormente caracterizados, uma vez que a identificação destas vias de sinalização *in vivo* se tem demonstrado frequentemente difícil.

Materiais e métodos

O nível de expressão de mRNA de *L-WNK1* e *KS-WNK1* foi quantificado por *real-time RT-PCR* (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*), em células da linha celular Madin-Derby Canine Kidney (MDCK) com sobre-expressão do receptor mineralocorticóide humano (hMR), na presença ou ausência de aldosterona.

Resultados

Inicialmente foi feita a caracterização da expressão do receptor mineralocorticóide (hMR) e da *KS-WNK1* nas células MDCK, de forma a validar o

modelo MDCK como um modelo adequado para o estudo da regulação da expressão da WNK1 pela aldosterona. Foi demonstrado que a *KS-WNK1* é expressa em baixo nível nas células MDCK, e que a sua expressão diminui com o aumento do número de ciclos celulares. O hMR é também expresso em baixo nível nesta linha celular. Deste modo, este modelo poderá ser utilizado para o estudo da estimulação da *KS-WNK1* pela aldosterona, mas não no estudo da sua inibição pela angiotensina II.

Relativamente à regulação da expressão das isoformas de *WNK1* pela aldosterona, em células MDCK com sobreexpressão do hMR, foi demonstrado que a aldosterona estimula não apenas a expressão do mRNA da *KS-WNK1*, mas também da *L-WNK1*.

Conclusões

O efeito estimulador da aldosterona sobre a expressão do mRNA de *KS-WNK1* nas células MDCK é concordante com estudos prévios realizados no modelo celular *Cortical Collecting Duct* (CCD). No entanto, o nosso estudo é o primeiro a descrever um efeito estimulante relativamente ao efeito da aldosterona na expressão de *L-WNK1*. Estes dados discordam de resultados prévios obtidos *in vitro* (no nefrónio distal, sensível à aldosterona) e *in vivo*, e podem sugerir que a *L-WNK1* é expressa ao longo de todo o nefrónio, num baixo nível, e não especificamente no nefrónio distal, sensível à aldosterona. Um aumento na expressão de *L-WNK1* pela aldosterona num único segmento do nefrónio, tal como o tubo contornado distal, poderia deste modo ser marcado pela expressão global de *L-WNK1*.

Dados recentes sugerem que outro modelo celular (mpkDCT - *mouse distal convoluted tubule*) poderá constituir uma outra possibilidade no estudo da regulação da expressão de *WNK1* pela angiotensina II, o qual não parece ser possível utilizando o modelo MDCK.