Elida Adalgisa Neri

**Efeito da Variação do Conteúdo de K^+
na Dieta Sobre a Expressão Renal de
AT1R, ATRAP e WNKs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

Elida Adalgisa Neri

**Efeito da Variação do Conteúdo de K^+ na
Dieta Sobre a Expressão Renal de AT1R,
ATRAP e WNKs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Neri, Elida Adalgisa.

Efeito da variação do conteúdo de K⁺ na dieta sobre a expressão renal de AT1R, ATRAP e WNKs / Elida Adalgisa Neri. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Transporte de íons em células epiteliais.

Versão do título para o inglês: Effect of varying the K⁺ content of the diet on renal expression of AT1R, ATRAP and WNKs.

1. Depleção de potássio 2. Sistema renina angiotensina-aldosterona 3. Angiotensina II 4. AT1R 5. ATRAP 6. WNKs I. Rebouças, Profa. Dra. Nancy Amaral II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB097/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elida Adalgisa Neri.

Título da Tese: Efeito da variação do conteúdo de K^+ na dieta sobre a expressão renal de AT1R, ATRAP e WNKs.

Orientador(a): Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **162** nas fls. **137** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Nancy Amaral Rebouças**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Modulação de transportadores iônicos em tecido renal*" do qual participam o(s) aluno(s), **Elida Adalgisa Neri, Juliano Zequini Polidoro, Pedro Henrique Imenez Silva e a Pesquisadora Gabriella Duarte Queiroz-Leite**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30.10.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 31 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre guiando meus passos.

À minha orientador, Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças, por me aceitar no seu laboratório e ter contribuído 100% no meu conhecimento sobre Biologia Molecular, por sempre me orientar, direcionar e estimular o meu crescimento profissional.

A minha amiga, técnica e segunda orientadora do laboratório 222 Camila Nogueira que me ensinou e auxiliou em todas as técnicas que eu aprendi no laboratório, sem ela também não seria nada. Que sempre emprestou o ombro amigo nestes 8 anos de lab 222.

A todos os integrantes e ex-integrantes de lab 222 pela ótima convivência: Carlos, Gabriella, Juliano, Mara, Mariana e Nancy. Que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e que tornaram meus dias mais alegres com muitas conversas e risadas.

Aos outros laboratórios e professores do departamento de Fisiologia e Biofísica que sempre estiveram de portas abertas e que tanto me ajudaram com favores e empréstimos de material e que de alguma forma me auxiliaram a desenvolver este projeto

Ao meu namorado Nildo Chaves que tem me dado incentivo, amor, apoio e atenção nesta etapa importante da minha vida.

Também a todos os funcionários técnicos-administrativos do departamento de Fisiologia e Biofísica (biotério e secretarias). Em especial ao Adilson da S. Alves que me auxiliou em vários experimentos.

Ao laboratório de Cardiologia e Genética Molecular do Incor que me apoiou neste último ano de doutorado. Em especial as minhas amigas Ana Maria, Lúcia e Sileide.

As duas entidades de fomentos: CAPES pela minha bolsa de doutorado e FAPESP pelas verbas de laboratório e cobertura de despesas em congressos.

RESUMO

NERI, E. A. **Efeito da variação do conteúdo de K^+ na dieta sobre a expressão renal de AT1R, ATRAP e WNKs**. 2014. 86 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O mecanismo mais importante para a homeostase do K^+ frente à variação do conteúdo deste íon na dieta é o controle da secreção de K^+ no néfron distal. Como a angiotensina II (Ang II) é um importante modulador da secreção de K^+ , o objetivo deste trabalho foi avaliar, em animais submetidos à depleção de K^+ por sete dias, o nível de expressão do receptor tipo I para angiotensina II (AT1R) e da proteína associada a AT1R (ATRAP). Além disso, pretendíamos avaliar a possível ativação de algumas vias de sinalização desencadeada pela Ang II via AT1R. Procuramos avaliar ainda a expressão de alguns transportadores iônicos e das *with no lysine kinases* (WNKs) WNK1, KS-WNK1 e WNK4 nesses animais, visto que alguns dos efeitos da angiotensina II nos segmentos tubulares distais são mediados por estas cinases. Os animais submetidos à depleção de K^+ apresentaram menor ganho de peso corporal, hipertrofia renal, poliúria acentuada, isostenúria, e redução importante na FE de Na^+ e K^+ , além de aumento do nível plasmático de Ang II, sem alterar o nível de aldosterona.

Verificamos que a expressão de AT1R e ATRAP está aumentada em todas as frações celulares analisadas, com aumento mais acentuado de AT1R em lisado celular total, e o aumento de ATRAP não foi significativo apenas na membrana apical. Não detectamos variação nos níveis de RNAm dessas proteínas, sugerindo que não tenha havido alteração da taxa de transcrição. Os níveis de RNAm dos permutadores iônicos Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) e Cl/Formato (CFEX), abundantes em túbulos proximais, também não se mostraram alterados. Quanto às vias de sinalização, a depleção induziu a fosforilação das proteínas c-Src, ERK1/2 e p38, bem como aumento significativo dos RNAm de WNK1 e WNK4, e redução do RNAm de KS-WNK1. Considerando nossos resultados, a depleção de K^+ aumenta a ação da Ang II em tecido renal, muito provavelmente devido à hiperexpressão de AT1R, e esse efeito não está associado à redução na expressão de ATRAP. No entanto, no lisado celular total, o aumento de AT1R foi maior que o de ATRAP. A hiperexpressão de WNK1 e WNK4, associada à redução da KS-WNK1, parece ser muito importante para a inibição da secreção de K^+ nos animais com depleção de K^+ . A atividade inibidora de WNK4 sobre os canais ROMK depende de sua desfosforilação, a qual depende da ativação de c-Src. A ativação de c-Src foi evidenciada pelo aumento de sua fosforilação nos animais depletados de K^+ .

Palavras-chave: Depleção de Potássio. Sistema Renina Angiotensina- Aldosterona. Angiotensina II. AT1R. ATRAP. WNKs

ABSTRACT

NERI, E. A. **Effect of varying the K⁺ content of the diet on renal expression of AT1R, ATRAP and WNKs.** 2014. 86 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The most important mechanism for the K⁺ homeostasis on varying the content of this ion in the diet is the control of K⁺ secretion in the distal nephron. Since angiotensin II (Ang II) is an important modulator of K⁺ secretion, the aim of this study was to evaluate, in animals subjected to K⁺ depletion for seven days, the expression level of angiotensin type 1 receptor (AT1R) and the AT1R-associated protein (ATRAP). Moreover, it was intended to evaluate the possible activation of some signaling pathways triggered by Ang II via AT1R. We also looked for evaluate the expression of ion transporters and “with no lysine kinases” (WNKs) WNK1, KS-WNK1 and WNK4 in these animals, since some of the effects of angiotensin II in the distal tubular segments are mediated by these kinases. The animals subjected to K⁺ depletion have showed lower body weight gain, renal hypertrophy, marked polyuria, isosthenuria, and significant reduction in FE Na⁺ and K⁺, and increased plasmatic Ang II levels, without changing the aldosterone levels. We found that the expression of ATRAP and AT1R is increased in all cell fractions analyzed, with the highest rise in the AT1R in total cell lysate and ATRAP increase was not significant in the apical membrane. We did not detect changes in mRNA levels of these proteins, suggesting no changes in the transcription rate.

The mRNA levels of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) and Cl⁻/Formate (CFEX), abundant in proximal tubules were not altered as well. Regarding signaling pathways, K⁺ depletion induced c-Src, ERK1/2 and p38 phosphorylation, as well as a significant increase in WNK1 and WNK4 mRNA, and reduced KS- WNK1 mRNA. Considering our results, K⁺ depletion increases Ang II action in renal tissue, probably due to the overexpression of AT1R, and that effect is not associated to the decreased expression of ATRAP. However, the total cell lysate AT1R increasing, was greater than that of ATRAP. The overexpression of WNK1 and WNK4 associated with (to) the reduction of KS - WNK1 appears to be important for K⁺ secretion inhibition in K⁺-depleted animals. The inhibitory activity of WNK4 on ROMK channels depends on its dephosphorylation, which depends on the activation of c-Src. The activation of c-Src was evidenced by the increase in K⁺ -depleted animals phosphorylation.

Keywords: Potassium depletion. Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Angiotensin II. AT1R. ATRAP. WNKs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação entre a concentração plasmática de K^+ e a atividade da renina plasmática.....	22
Figura 2 - Disposição do receptor AT1 na membrana celular com a indicação de alguns domínios relevantes para a função do receptor.....	23
Figura 3 - Vias de sinalizações dependentes de proteínas G ativadas por Ang II/AT1. (Rebouças NA).....	24
Figura 4 - Ang II/AT1R promove a ativação de ERK1/2 por via dependente de proteína G e por ativação de PLC γ , ambas resultando em ativação de PKC ζ . (Rebouças NA).....	25
Figura 5 - Esquema que ilustra a estrutura de c-Src, tirosina-cinase ativada por Ang II. (Rebouças NA).....	26
Figura 6 - A ativação de c-Src mediada por Ang II/AT1R envolve a produção de ROS por Nox4. (Rebouças NA).....	27
Figura 7 - A ativação de ERK1/2 associada a β -arrestina 2 se restringe ao citoplasma. (Rebouças NA).....	28
Figura 8 - Supostos mecanismos de modulação do AT1R por ARAP e ATRAP.....	30
Figura 9 - Sequência primária e esquema dos domínios transmembrana (retângulos azuis) e cauda citoplasmática de ATRAP. A cauda citoplasmática apresenta 7 serinas, 1 tirosina e 3 lisinas, mas não se sabe se ATRAP sofre fosforilação. (Rebouças NA).....	31
Figura 10 - Estrutura da PITPs codificadas no genoma humano. RdgB β interage com ATRAP por meio de seu domínio PITP. (Rebouças NA).....	33
Figura 11 - Possível papel de ATRAP na reposição de PI na membrana plasmática para posterior geração de PIP2. Este papel parece ser válido para retina, já que a depleção de ATRAP reduz a sinalização do Ca^{2+} , sendo a única situação descrita até o momento em que ATRAP teria um efeito positivo sobre a sinalização. (Rebouças NA).....	34
Figura 12 - Esquema das vias envolvidas na comutação entre a ativação de ENaC e ROMK, com inibição de NCC, e a inibição de ENaC e ROMK, com ativação de NCC. WNK4 está no centro desta comutação, embora em TCD a expressão ou não de KS-WNK1 também pareça importante nesse processo. (Rebouças NA).....	35
Figura 13 – Análise do ganho de peso corporal em gramas dos animais controles (22) e dos animais com depleção de K^+ (23). *** $p < 0.0001$ (teste “ t ” de <i>Student</i>).....	49
Figura 14 – Quantidade de ração consumida em 24 horas pelo grupo controle (6) e pelo grupo com depleção de K^+ (6). * $p < 0.020$ (teste “ t ” de <i>Student</i>).....	50

Figura 15 – Peso Relativo dos rins direito (A) e esquerdo (B) dos animais do grupo controle (14) e do grupo com depleção de K ⁺ (11). Rim direito ** p < 0.0040 e rim esquerdo *** p < 0.0001 (teste “t” de Student).....	50
Figura 16 - Fluxo Urinário de 24 horas, em µL/min, de animais controles (17) e de animais com depleção de K ⁺ (19). ***p<0.001 (teste “t” de Student).....	51
Figura 17 - Osmolaridade urinária dos animais controles (11) e dos animais com depleção de K ⁺ (15). ***p<0.001 (teste “t” de Student).....	52
Figura 18 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), em ml/min.100 g de peso corporal, de animais controle (14) e com depleção de K ⁺ (15). p > 0,05 (teste “t” de Student).....	52
Figura 19 - Fração de excreção de K ⁺ , em %, dos animais controle (9) e dos animais com depleção de K ⁺ (11). ***p<0.0006, como indicado pelo teste “t” de Student.....	53
Figura 20 - Fração de excreção de Na ⁺ , em %, dos animais controles (8) e dos animais com depleção de K ⁺ (12). ***p<0.001 (teste “t” de Student).....	53
Figura 21 - Níveis plasmáticos de Ang II nos animais controles (4) e nos animais tratados com depleção de K ⁺ (5). * p < 0.0237 (teste “t” de Student).....	56
Figura 22 - Quantificação por <i>western-immunoblots</i> de AT1R e ATRAP em amostras de lisado total de córtex renal de ratos controles ou com depleção de K ⁺ . A) Bandas representativas dos <i>western-immunoblots</i> de AT1R, ATRAP e β- actina. β- actina foi utilizada como controle interno. B) Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pela β- actina, expressas em relação ao controle. * p< 0.0257, ** p<0.0028 (teste “t” de Student).....	56
Figura 23 - Quantificação por <i>western-immunoblots</i> de AT1R e ATRAP em amostras de membranas totais de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K ⁺ . A) Bandas representativas dos <i>western-immunoblots</i> de AT1R, ATRAP e β- actina. B) Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pela β- actina. *** p < 0.0008 para ATRAP (teste “t” de Student).....	57
Figura 24 - Quantificação por <i>western-immunoblots</i> de AT1R e ATRAP em amostras de membrana apical de córtex renal de ratos controles ou com depleção de K ⁺ . A) Bandas representativas dos <i>western-immunoblots</i> de AT1R, ATRAP, β- actina, DPPIV e <i>Commassie Blue</i> . B) Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pelo <i>Commassie Blue</i> , expressas em relação ao controle. * p< 0.0179 (teste “t” de Student).....	59
Figura 25 - Quantificação por <i>western-immunoblots</i> de AT1R e ATRAP em amostras de extrato nuclear de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K ⁺ . A) Bandas	

representativas dos <i>western-immunoblots</i> de AT1R, ATRAP e gel de eletroforese corado com <i>coomassie</i> , usado como normalizador. B) Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP. * $p < 0.0240$ para AT1R e *** $p < 0.0001$ para ATRAP (teste “ <i>t</i> ” de Student).....	61
Figura 26 - Quantificação por <i>western-immunoblots</i> de AT1R e ATRAP em amostras de adrenal dos ratos controles e com depleção de K^+ . A) Bandas representativas dos <i>western-immunoblots</i> de AT1R, ATRAP e β - actina. B) Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pela β - actina, expressas em relação ao controle. * $p < 0.0154$ (teste “ <i>t</i> ” de Student).....	63
Figura 27 - Quantificação dos RNAm de AT1R e ATRAP por RT-PCR em tempo real, normalizado pelo RNAm de GAPDH. Os gráficos de barra mostram a expressão dos RNAm de AT1R e ATRAP, normalizados por GAPDH e em relação ao controle, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	64
Figura 28 - Quantificação dos RNAm de NHE3 e PAT1 por RT-PCR em tempo real, normalizado pelo RNAm de GAPDH. Os gráficos de barras mostram a expressão dos RNAm de NHE3 e PAT1, normalizados por β - actina e em relação ao controle, $2^{-\Delta\Delta Ct}$	65
Figura 29 - Quantificação por <i>western-immunoblot</i> de c-Src e p-c-SRC em amostras de lisado total de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . A) Bandas representativas dos <i>immunoblots</i> da proteína c-Src total e fosforilada e da β -actina, utilizada como controle interno. B) O gráfico de barras mostra a densitometria das bandas de cSrc e p-cSrc, normalizadas por β -actina e expresso em relação ao controle, correspondentes a todos os experimentos * $p < 0.0151$ (teste “ <i>t</i> ” de Student).....	66
Figura 30 - Quantificação por <i>western-immunoblot</i> de ERK1/2, pERK1/2 em amostras de lisado total de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . A) Bandas representativas da proteína ERK1/2 total e fosforilada e da β - actina utilizada como controle interno. B) Os gráficos de barras mostram a análise densitométrica das bandas de ERK1/2 fosforilada, normalizada por β -actina e expressa em relação ao controle, correspondentes a todos os experimentos. * $p < 0.0131$ (teste “ <i>t</i> ” de Student).....	68
Figura 31 - Quantificação da p38 MAPK em lisado total de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . A) Bandas representativas da proteína p38 MAPK total e fosforilada e da β - actina, utilizada como controle interno. B) O gráfico de barras mostra a análise densitométrica das bandas de p38 MAPK total e fosforilada, normalizada por β -actina, correspondente a todos os experimentos. * $p < 0.0217$ (teste “ <i>t</i> ” de Student).....	69
Figura 32 - Quantificação relativa do RNAm da WNK1 nos animais controle (n= 6) e depletados de K^+ (n=6). A) Figura representativa das bandas da WNK1 e da β - actina utilizada	

como controle interno. **B)** Análise densitométrica das bandas de WNK1 e β - actina correspondentes a todos os experimentos representados em gráfico de barras. *** $p < 0.0009$, como indicado no teste “*t*” de *Student*.....71

Figura 33 - Efeito da depleção de K^+ sobre a quantidade de RNAm da KS-WNK1. Os valores de expressão de KS-WNK1 apresentados como % do controle já foram normalizados pelos valores de expressão de β - actina e estão apresentados como média. * $p < 0.0198$, como indicado no teste “*t*” de *Student*.....72

Figura 34 - Efeito da depleção de K^+ sobre a quantidade de RNAm da WNK4. Os valores de expressão de WNK4 apresentados como % do controle já foram normalizados pelos valores de expressão de β - actina e estão apresentados como média. ** $p < 0.0029$, como indicado no teste “*t*” de *Student*.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes descritos e respectivos tamanhos dos produtos amplificados.....	44
Tabela 2- Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>imunoblotting</i>	48
Tabela 3- Resumo dos parâmetros fisiológicos dos animais Controle e Depleção de K ⁺	54
Tabela 4- Variação na expressão de AT1R e ATRAP nas diferentes frações celulares de córtex renal de rins de ratos com depleção de K ⁺ . ns: sem alteração.....	62
Tabela 5 - Resumo das variações na expressão das proteínas c-Src, ERK1/2 e p38 MAPK fosforiladas em animais tratados com baixo K ⁺	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC- adenilato ciclase
ADH- Hormônio Antidiurético
AMPc- Monofosfato cíclico de adenosina
Ang I- Angiotensina I
Ang 1-7- Angiotensina 1-7
Ang II- Angiotensina II
Ang III- Angiotensina III
AP2- *Activating protein 2*
AQP2- aquaporina 2
AT1R- Receptor de Angiotensina II do tipo 1
AT2R- Receptor de Angiotensina II do tipo 2
ATRAP- *AT1-receptor associated protein*
ARAP1- *Type 1 Ang II receptor-associated protein*
BK- *Big Potassium*
BRET- *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*
Ca²⁺- Cálcio
CAML- *Ca²⁺ modulating cyclophilin ligand*
CCP- *clathrin coated pits*
CCV- *clathrin coated vesicles*
CDKs- cinases dependentes de ciclinas
cDNA- Ácido desoxirribunucleico complementar
CFEX- cloreto/formato *exchanger*
Cl⁻- Cloreto
C- terminal- Carboxi-terminal
DAG- diacilglicerol
DCC- ducto coletor cortical
DEPC- dietilpirocarbonato
DPPIV- dipeptidilpeptidase IV
ECA- Enzima conversora de angiotensina
EGFR- *Epidermal Growth Factor Receptor*
ENaC- Canal epitelial para Na⁺
ERK- *extracellular-signal-regulated kinases*

FE_{Na}- Fração de Excreção de Na⁺
FE_K- Fração de Excreção de K⁺
GEF-Ras (GEF: *Guanin nucleotide Exchanger Factor*)
GIPS- *GPCR interacting proteins*
GIT- isotilcianato de guanidina
GPCR- receptores acoplados a proteína G
Grb2- *Growth factor receptor-bound protein 2*
GRKs- cinases de receptores acoplados a proteína G
HCO₃⁻ Bicarbonato
HEK293- *Human Embryonic Kidney 293 cells*
IGF-1- *Insulin-like growth factor 1*
JAK2- *Janus kinase 2*
K⁺- potássio
KCl- Cloreto de potássio
KS- WNK1- *kidney specific WNK1*
MAPKs- *Mitogen-activated protein kinases*
MR- Receptor para mineralocorticoide
NaCl- Cloreto de Sódio
NADH e da NADPH
NBC1- cotransportador 1Na⁺- 3HCO₃⁻
NFATs- *nuclear factor of activated T cells*
Nedd4-2- *neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4*
NCC- cotransportador Na⁺-Cl⁻
NHE3- trocador Na⁺/H⁺ isoforma 3
NHERF- *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factors*
NKCC2- cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻
N-terminal- Amino- terminal
ORS1- *oxidative stress responsive protein type 1*
PA- Pressão Arterial
PA- ácido fosfatídico
PDK1- *Phosphoinositide-dependent kinase-1*
PI- fosfatidilinositol
PKCs- proteínas cinases C
PLC-β₁- fosfolipase C β₁

PLD- fosfolipase D

PIP2 - *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*

PMA- *Phorbol Myristate Acetate*

PM- membrana citoplasmática

PITPs- *Phosphatidylinositol transfer proteins*

PP1- *protein phosphatase 1*

PTK- *proteínas tirosina-cinases*

RdgB β (Retinal degeneration B β).

RACK1- *receptor for activated C kinase 1*

RE- retículo endoplasmático

RFG- Ritmo de Filtração Glomerular

RNA- Ácido ribunucleico

ROMK- *renal outer medullary potassium channel*

ROS- espécies reativas de oxigênio

Ser/Thr- Serina/Treonina

SGK1- *Serum and Glucocorticoid dependent Kinase 1*

SH2 e 3- Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2)

siRNA- *Small interfering RNA*

SPAK- *proline alanine-rich kinase*

SRAA- Sistema Renina Angiotensina- Aldosterona

TCD- Túbulo convoluto distal

TonEBP- Tonicity-responsive Enhancer

WNKs- *with no lysine - K*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Efeitos da Variação do Conteúdo de K ⁺ na Dieta sobre a Pressão Arterial	20
2.2 Alterações Estruturais e Funcionais nos Rins dos Animais com Depleção de K ⁺	21
2.3 Relação da Concentração Plasmática de K ⁺ e Secreção de Renina	22
2.4 A sinalização Intracelular Mediada pela Ativação de AT1R por Ang II	22
2.5 AT1R na Ativação de c-Src	25
2.6 GRKs e β -arrestinas na Sinalização de AT1R	27
2.7 Dessensibilização, Internalização e Reciclagem do Receptor AT1R	28
2.8 Interações de AT1R com outras Proteínas	29
2.8.1 ATRAP	30
2.8.2 Proteínas que Interagem com ATRAP	32
2.8.3 CAML	32
2.8.4 RdgB β	33
2.9 Ativação de AT1R em Situações de Depleção de K ⁺	34
2.10 Angiotensina II na Modulação das WNKs em Néfron Distal	35
3 OBJETIVOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Lista de Reagentes	39
4.2 Plano Geral da Experimentação	39
4.2.1 Medida de Clearance e Fração de Excreção	40
4.2.2 Análise da Concentração Plasmática de Ang II e Aldosterona	41
4.2.3 Extração de RNA Total	42
4.2.4 Tratamento do RNA Total com DNase	42
4.2.5 Síntese de cDNA	43
4.2.6 Quantificação Relativa por PCR em Tempo Real	43
4.2.7 Quantificação Relativa por PCR do Gene da WNK1	44
4.2.8 Extração de Proteínas Totais de Córtex Renal	45
4.2.9 Extração de Membranas Totais	45
4.2.10 Extração de Membrana Apical	45
4.2.11 Extração de Proteínas Nucleares	46
4.2.12 Transferência das Proteínas do Gel Para Membrana de PVDF	46

<i>4.2.13 Coloração dos Géis com Coomassie Blue</i>	46
<i>4.2.14 Imunoblot</i>	47
<i>4.2.15 Análise Estatística</i>	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Peso Corporal e Peso Renal dos Animais Submetidos à Depleção de K⁺	49
5.2 Avaliação da Função Renal dos Animais	51
5.3 Análise dos Níveis Plasmáticos de Ang II e Aldosterona nos Animais com Depleção de K⁺	54
5.4 Efeito da Depleção de K⁺ sobre a Expressão de AT1R e ATRAP no Córtex Renal ...55	
<i>5.4.1 Expressão de AT1R e ATRAP em Lisado Celular Total</i>	55
<i>5.4.2 Expressão de AT1R e ATRAP em Membranas Totais, Sem os Núcleos Celulares</i>	57
<i>5.4.3 Expressão de AT1R e ATRAP em Membrana Apical</i>	58
<i>5.4.4 Expressão de AT1R e ATRAP em Extrato Nuclear</i>	60
5.5 Análise da Expressão de AT1R e ATRAP em Córtex Adrenal	62
5.6 Análise das Quantidades de RNAm de AT1R, ATRAP e dos transportadores NHE3, PAT1 (CFEX)	63
5.7 Análise de Algumas Vias de Sinalização Eventualmente Ativadas ou Inibidas na Depleção de K⁺	65
<i>5.7.1 Análise da Ativação de c-Src</i>	65
<i>5.7.2 Análise da Ativação de ERK1/2 e p38-MAPK</i>	67
5.8 Efeito da Depleção K⁺ na Expressão das Cinases WNKS	70
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O potássio (K^+) é o cátion mais abundante do meio intracelular e desempenha papel importante em funções básicas das células, tais como na determinação potencial de repouso da membrana, excitabilidade, resistência vascular, manutenção do volume celular e regulação do pH intracelular (1), além de ser importante para a atividade de muitas enzimas.

No organismo, 90% do K^+ total estão no meio intracelular, no qual sua concentração varia entre 130 – 140 mM, e 10% estão no espaço extracelular, destes, 2% encontram-se no plasma e fluido intersticial e 8%, no tecido ósseo. Os níveis extracelulares de K^+ devem ser mantidos dentro de limites bem estreitos, próximo de 4 mM, principalmente porque alteração na concentração extracelular de K^+ leva a mudança no potencial elétrico das membranas celulares, interferindo drasticamente com a função das células excitáveis, neurônios, miócitos cardíacos e músculos esqueléticos.

A homeostase de K^+ é mantida principalmente via de excreção renal, sendo que ~ 90% da excreção diária é feita por via urinária e 10% por meio da perda fecal (1). O balanço interno de K^+ entre os compartimentos intra e extracelular também é finamente regulado. Fatores humorais como a insulina, agonista β -adrenérgico (epinefrina), aldosterona e mudança do pH alteram a atividade da $Na^+ - K^+$ ATPase, que faz ajuste rápido e efetivo da distribuição dos estoques, principalmente em músculos e fígado (2).

Segundo o *Dietary Reference Intakes for Water, Sodium, Chloride, and Sulfate*, o consumo diário de K^+ deve ser por volta de 4,7 g (120 mmoles/dia) para a adequada manutenção da pressão arterial, redução do risco de infarto, e prevenção da resistência à insulina e da síndrome metabólica (3; 4). Com as mudanças no estilo de vida dos seres humanos ao longo do tempo, estes passaram de uma dieta com alto teor de K^+ (150 – 190 mmoles/dia) e baixo teor de Na^+ (1-10 mmoles/dia), para uma dieta com alto teor de Na^+ (170 – 200 mmoles/dia) e baixo teor de K^+ (~ 70 mmoles/dia). Isso foi decorrência do aumento do consumo de alimentos processados e da redução no consumo de frutas e vegetais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2 Efeitos da Variação do Conteúdo de K^+ na Dieta sobre a Pressão Arterial

Diversos pesquisadores têm observado que a hipocalemia aumenta a Pressão Arterial (PA) em cerca de 5 mmHg, enquanto a hipercalemia tende a reduzir a PA, tanto em indivíduos normais como em hipertensos (5; 6; 7).

Lawton et al. (1990) observaram que a restrição de K^+ induz aumento discreto da pressão arterial, tanto em normotensos como hipertensos *borderlines*; em nenhum dos grupos foram observadas alterações no Sistema Renina Angiotensina - Aldosterona (SRAA), mas os hipertensos apresentaram redução da atividade simpática quando em dieta com K^+ baixo, comparado com pacientes do mesmo grupo com K^+ alto (7). O efeito hipertensor da dieta com K^+ baixo foi também observado por Coruzzi et al. (2001), em estudo feito com pacientes hipertensos. Esses pacientes apresentaram também redução na atividade de renina e redução dos níveis plasmáticos de aldosterona quando submetidos à dieta com K^+ baixo (5). Geleijnse et al. (2003), por sua vez, mostraram que tanto indivíduos normais como hipertensos, submetidos a dieta com K^+ alto, apresentavam redução da PA, sendo o efeito mais proeminente nos hipertensos (6). A redução da PA induzida por sobrecarga de K^+ não foi observada por Matthesen et al. (2012), mas os pacientes apresentaram aumento da aldosterona plasmática, alteração na função tubular, com aumento da fração de excreção de K^+ e redução do clearance de água livre, sem alteração do ritmo de filtração glomerular (RFG) e sem mudança na Ang II plasmática (8).

Segundo Haddy et al. (2006), numa revisão em que analisa a relação entre sal e hipertensão, fornece algumas explicações para o efeito hipotensor de uma maior oferta de K^+ . Em células musculares lisas vasculares, quando o K^+ externo é elevado de 1 a 15 mM, ocorre hiperpolarização. Embora esse efeito seja contraintuitivo, ele deve-se à ativação de canais para K^+ retificadores para dentro (K_{ir} 1,2), que são ativados por K^+ externo. A abertura de mais canais para K^+ leva a uma hiperpolarização que supera o efeito despolarizante da elevação do K^+ extracelular. Outra possibilidade seria o efeito do elusivo fator hiperpolarizante derivado do endotélio, cujo mecanismo está relacionado com o aumento do cálcio intracelular em células endoteliais, que ativaria canais para K^+ sensíveis a cálcio, levando a hiperpolarização que se transmitiria para células musculares lisas por acoplamento

direto, via junções comunicantes. Outros fatores, como óxido nítrico e maior captação da norepinefrina por terminais nervosos simpáticos, também podem estar envolvidos (9).

2.2 Alterações Estruturais e Funcionais nos Rins dos Animais com Depleção de K^+

A depleção de K^+ leva a alterações estruturais e morfológicas no rim. Já foi confirmado em vários laboratórios que ratos submetidos à dieta com baixo teor de potássio apresentam aumento do peso renal, associado à hipertrofia da medula externa e interna e hiperplasia e hipertrofia do ducto coletor, especialmente de células intercaladas, que são responsáveis pela reabsorção de K^+ em ducto coletor (10). Ray et al. (2001), ainda, observaram injúria túbulo-intersticial e fibrose, em animais com depleção de K^+ por 14 a 21 dias (11).

Além das alterações estruturais, animais com depleção de K^+ exibem diminuição do RFG, da taxa de filtração por néfron e redução da osmolaridade urinária, que poderia estar associada à redução na expressão de alguns transportadores iônicos ao longo do nefro, especialmente em segmento espesso da alça de Henle, levando a redução da osmolaridade intersticial medular (12). A expressão de canais para K^+ tipo ROMK, do cotransportador $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC2) (13) e da aquaporina 2 (AQ2) (14) mostraram-se reduzidas em animais com depleção de K^+ .

A expressão dos transportadores de Na^+ não acoplados a transporte de K^+ , tais como NHE3 e canal epitelial para sódio (ENaC), também se mostrou alterada com a depleção de K^+ . Animais tratados por 4 dias com dieta com baixo teor de K^+ mostraram aumento da expressão do NHE3 e redução de ENaC e do cotransportador Na^+-Cl^- (NCC). Os autores postulam que o aumento de NHE3 possa ser decorrente da depleção do volume extracelular resultante da maior perda urinária de Na^+ e/ou um mecanismo de manutenção do pH intracelular, já que hipocalemia usualmente está associada a saída de K^+ e entrada de H^+ nas células (15). Também ocorre aumento da expressão e da atividade da Na^+-K^+ ATPase em rins de ratos tratados por 2 semanas com dieta com K^+ baixo (16; 17).

Os animais submetidos à depleção de K^+ mostram, obviamente, baixa fração de excreção do K^+ . O K^+ filtrado é constitutivamente reabsorvido ao longo dos túbulos, de modo que em túbulo convoluto distal chegam menos de 10% da carga filtrada de K^+ . A redução na excreção de K^+ é resultado da supressão da secreção de K^+ pelas células principais e da estimulação da absorção pelas células intercaladas, via H^+-K^+ ATPase, especialmente em

segmento de conexão e ducto coletor cortical. Nas células principais, a secreção ocorre por meio dos canais SK ROMK-like. A principal via de secreção de K^+ em condição basal é o ROMK, mas, com aumento do aporte de K^+ ou do fluxo tubular, também os maxi-canais Big Potassium (BK) também são ativados (2).

2.3 Relação da Concentração Plasmática de K^+ e Secreção de Renina

Vander, em 1970, observou efeito direto do K^+ na secreção de renina (18), havendo uma relação inversa entre a concentração de K^+ e o nível plasmático de renina. Sealey et al., também em 1970, mostraram que animais com hipercalemia apresentavam redução da atividade da renina e Ang II plasmáticas, enquanto os animais com hipocalemia apresentavam aumento, como apresentado na figura 1 (19). Estes mesmos efeitos foram observados em humanos normotensos e hipertensos quando tratados com dieta com depleção ou sobrecarga de K^+ (20).

Figura 1 - Relação entre a concentração plasmática de K^+ e a atividade da renina plasmática.

Fonte: Sealey et al. (1970).

2.4 A Sinalização Intracelular Mediada pela Ativação de AT1R por Ang II

Existem dois subtipos mais importantes de receptores para Angiotensina II (Ang II), o receptor tipo 1 (AT1R) e o receptor tipo 2 (AT2R), ambos pertencentes à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs – *G Protein Coupled Receptors*). Já está bem documentado que AT1R medeia a maioria das funções fisiológicas conhecidas da Ang II. Na figura 2 é apresentada a disposição do AT1R na membrana, com a indicação de alguns domínios funcionalmente relevantes. Em murinos, há duas isoformas de receptores AT1R

(AT_{1A}R e AT_{1B}R), codificadas por dois genes que apresentam distribuições de expressão nitidamente distintas. A forma AT_{1a}R, predominantemente renal (21), é a isoforma homóloga a AT₁R humano.

Figura 2 - Disposição do receptor AT₁ na membrana celular com a indicação de alguns domínios relevantes para a função do receptor.

Fonte: Modificado de Gasc et al. (1994).

AT₁R sinaliza principalmente através do acoplamento a uma proteína G heterotrimérica G_(q/11), que ativa fosfolipase C β_1 (PLC- β_1), levando à hidrólise do fosfoinositídeo PIP₂ com geração de diacilglicerol (DAG) e IP₃, seguida da sinalização mediada por Ca²⁺ e IP₃, com ativação de proteínas cinases C (PKCs). AT₁R pode também ativar G_{12/13}, com consequente ativação de canais para Ca²⁺ tipo L. As subunidades $\beta\gamma$ de G₁₂ ativam a fosfolipase D (PLD), com a consequente ativação da via do ácido aracdônico. Em ratos, AT₁R também se acopla à proteína Gi/o, que inibe adenilato ciclase (AC), resultando

em redução dos níveis de AMPc na célula. Mas Ang II pode provocar também leve aumento dos níveis intracelulares de AMPc por ativar ACs sensíveis a Ca^{2+} (22). As subunidades $\beta\gamma$ de Gi/o , por sua vez, ativam a fosfolipase β_2 ($\text{PLC}\beta_2$), contribuindo para a geração de DAG e IP_3 . A interação Ang II/AT1R ativa também *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) por meio da ativação da PKC isoforma ζ , portanto, também dependente de proteína G. PKC ζ ativa Ras, uma proteína G monomérica solúvel, que ativa a via das MAP cinases (23), e estas fosforilam seus alvos em Ser e Thr. A ativação de proteínas G é eficientemente interrompida com a fosforilação do receptor por GRKs (GPC Receptor Kinases). Ao receptor fosforilado, ligam-se β -arrestinas (Figura 3).

Figura 3 - Vias de sinalizações dependentes de proteínas G ativadas por Ang II/AT1. (Rebouças NA)

Fonte: Modificado de Kim et al. (2009).

A ligação de Ang II ao receptor AT1 induz também a ativação da $\text{PLC}\gamma$, que se ativa ao ser fosforilada em tirosina, com pico de fosforilação em 30 s (24). Os GPCRs não exibem atividade de tirosina cinase, sendo, portanto, um efeito indireto da ativação do receptor. A produção de IP_3 decorrente da ativação da $\text{PLC}\gamma$ atinge o pico em 30 s ou mais, enquanto a ativação da $\text{PLC}\beta$ leva a aumento de IP_3 em menos de 15 s. A $\text{PLC}\gamma$ interage com a cauda C-

terminal de AT1R no motivo YIPP fosforilado, local que também parece ser o sítio da interação com JAK2, esta provavelmente num complexo com a fosfatase de tirosina, SHP-2 (22). A fosforilação em tirosina da PLC γ desencadeada por Ang II depende da ativação da c-Src, uma tirosina-cinase do tipo não receptor (25).

A ativação por Ang II da via das MAPKs parece ocorrer sempre por mecanismos que envolvem, pelo menos parcialmente, a transativação do receptor tirosina-cinase EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), seja pela via dependente de proteína G, com ativação de PKC ζ , mas principalmente pela via dependente β -arrestina 2. A Ang II induz fosforilação de EGFR na Tyr845, sítio fosforilado por c-Src (23). A fosforilação do EGFR leva ao recrutamento da proteína adaptadora Grb2, que por sua vez recruta Sos, uma GEF-Ras (GEF: *Guanin nucleotide Exchanger Factor*), para ativar Ras (26). Ras-GTP ativa, na sequência, MEK e ERK, ou ainda pode ativar PI3K, resultando na ativação das Ser/Thr - cinases Akt/PKB (Figura 4).

Figura 4 - Ang II/AT1R promove a ativação de ERK1/2 por via dependente de proteína G e por ativação de PLC γ , ambas resultando em ativação de PKC ζ . (Rebouças NA)

Fonte: Modificado de Eguchi et al. (1999)

2.5 AT1R na Ativação de c-Src

Mais recentemente, foi observado que a proteína c-Src, membro da família das tirosina-cinases Src, é um elemento chave na sinalização intracelular mediada por Ang II. c-Src é ativada por trans-autofosforilação na Tyr416 ou por interação com proteínas adaptadoras contendo domínios PXXP ou fosfo-Tyr, por meio de seus domínios SH3 e SH2,

respectivamente. A desfosforilação da Tyr527 de c-Src leva a alteração estrutural da enzima, possibilitando a fosforilação de Tyr416. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) também pode ativar c-Src pela oxidação de cisteínas (27). A Figura 5 ilustra a estrutura e os mecanismos de ativação de c-Src.

Figura 5 - Esquema que ilustra a estrutura de c-Src, tirosina-quinase ativada por Ang II. (Rebouças NA)

Fonte: Modificado de Giannoni e Chiarugu P. (2013).

A ativação de AT1R pelo agonista Ang II induz aumento da produção de ROS por ativação da NADH e da NADPH oxidases. Esse efeito é bloqueado por losartan, inibidor de AT1R (28). As NAD(P)H oxidases da família Nox são as principais fontes de ROS em células não fagocíticas, incluindo células renais. Foram identificados sete membros da família Nox no genoma humano: Nox1 – 5 e as dual-oxidases Duox1 e 2. Nox 4 (NAD(P)H oxidase 4) é a forma abundante em vasos e córtex renal. Block et al. (2008) mostraram que Ang II induz aumento da quantidade de Nox4 e aumenta produção H_2O_2 , o que pode ativar c-Src pela oxidação de cisteínas. A c-Src ativada leva a fosforilação de PDK1 em tirosinas. PDK1 ativada ativa vários substratos, entre eles Akt/PKB (Figura 6) (29). A ativação de c-Src por ROS, derivados de Nox4, requer uma grande proximidade entre Nox4 e c-Src, em subcompartimentos celulares bem delimitados, o que possibilita a ativação localizada e persistente de c-Src. Xi et al. (2013) mostraram que durante a ativação do IGF-1 (Insulin

Growth Factor 1), a proximidade entre Nox4 e c-Src é garantida pela interação com a proteínas de ancoragem SHPS-1 (SHPS-1: SHP Substrate 1; SHP-1 é uma fosfatase de fosfotirosina) (30). IGF-1 induz a fosforilação de Nox4 na Tyr-491, e essa fosfo-Tyr interage com o domínio SH2 de Grb2, que faz parte do complexo com SHPS-1. É possível que um mecanismo similar de aproximação de Nox4 e c-Src em domínios celulares bem localizados esteja também envolvido na ativação de Nox4 e c-Src por Ang II/AT1R. Isso requer ainda elucidação.

Figura 6 - A ativação de c-Src mediada por Ang II/AT1R envolve a produção de ROS por Nox4. (Rebouças NA)

2.6 GRKs e β -arrestinas na sinalização de AT1R

As diferentes isoformas ubíquas de GRKs (GRK2, GRK3, GRK5 e GRK6) e de β -arrestinas (β -arrestina 1 e β -arrestina 2) apresentam envolvimento diferenciado no processo de dessensibilização e de sinalização em endossomos. Kim et al. (2005) mostraram que enquanto a fosforilação de AT1R por GRK2/3 promove o recrutamento de ambas as isoformas ubíquas de β -arrestina ao receptor, a ativação de ERK dependente de β -arrestina-2 requer especificamente GRK5 e GRK6, fenômeno observado não só com AT1R, mas também com outros GPCRs como receptor V2-vasopressina, β 2-adrenérgico e receptor para hormônio folículo-estimulante. Com a ativação do receptor, GRK2 e GRK3 são translocadas para a membrana onde se associam às subunidades $\beta\gamma$ da proteína G heterotrimérica, o que torna a ativação dessas GRKs dependente da ativação de proteínas G (31). Por outro lado, GRKs 5 e 6 estão constitutivamente ligadas à membrana e podem interagir com e fosforilar o receptor independente de proteína G.

A via estimulada por β -arrestinas melhor caracterizada até o momento é a via de ERK1/2. β -arrestina-2 serve como proteína de ancoragem para os componentes da cascata de MAPK (Raf-1, MEK1 e ERK), em complexos com o receptor AT1, levando à ativação de ERK1/2. A distribuição espacial da ERK ativada por vias dependente e independente de proteína G é diferente. A ativação dependente de proteína G dispara a translocação de ERK para o núcleo, enquanto o endereçamento de ERK1/2 para endossomos, dependente β -arrestina 2, impede sua translocação para núcleo e a ativação de genes dependentes de ERK1/2 (31) (Figura 7). Na ausência de β -arrestina 2, AT1R ativa primariamente ERK1/2 via PKC. As duas vias mostram também cinéticas de ativação diferentes: a ativação de ERK via proteína G é rápida e transitória, enquanto a ativação mediada por β -arrestina-2 é lenta e persistente.

Figura 7 - A ativação de ERK1/2 associada a β -arrestina 2 se restringe ao citoplasma. (Rebouças NA)

Fonte: Kim et al. (2005).

2.7 Dessensibilização, Internalização e Reciclagem do Receptor AT1R

Após ativação pelo ligante, AT1R sofre rápida fosforilação pela ação de cinases relacionadas à GPCRs (GRKs), o que promove a translocação dos receptores na membrana e subsequente associação a β -arrestina, passos que interrompem com eficiência o processo de ativação de proteínas G e que estabilizam o receptor em uma forma de baixa afinidade ao ligante. As β -arrestinas servem como adaptadores para a internalização por meio da interação com clatrina e com a subunidade $\beta 2$ -adaptina do complexo adaptador AP2. Ao interagir com

AT1R fosforilado, as interações intramoleculares entre os domínios amino e carboxi-terminal da β -arrestina são desfeitas, expondo o domínio C-terminal para que ocorra a interação com o complexo de internalização, resultando na formação de clusters de receptores em “clathrin coated pits - CCP” (32;33;34). Em seguida, vesículas revestidas de clatrina (clathrin coated vesicles - CCV) sofrem a fissão que as desprende da membrana, havendo a internalização do receptor em pequenas vesículas endocíticas. O endereçamento dos receptores internalizados para vias lisossomais ou para vias de reciclagem produz efeitos opostos sobre a sinalização. Enquanto a via de reciclagem pode resultar em rápida recuperação da responsividade celular ao agonista, o direcionamento para lisossomos representa um mecanismo importante pelo qual os GPCRs e vários outros receptores são hipo-regulados após ativação.

2.8 Interações de AT1R com Outras Proteínas

Além de interagirem com proteínas G heterotriméricas, os GPCRs interagem com muitas outras proteínas que, em seu conjunto, são denominadas GIPs (*GPCR interacting proteins*) e estão envolvidas em tráfego e direcionamento, sinalização, e regulação alostérica (35).

Daviet et al. (1999), utilizando o método de duplo híbrido (*yeast two-hybrid system*), identificaram, em uma biblioteca de cDNA de rim de camundongo, uma proteína que interage com os 20 últimos aminoácidos (resíduos 339-359) do domínio C-terminal citoplasmático de AT1R, mas não com outros GPCRS (AT2R, m3-muscarínico, bradicinina B2, endotelina B, β 2-adrenérgico), e esta foi denominada ATRAP (*AT1 receptor-associated protein*) (36). Tal interação foi confirmada pelos mesmos autores por meio de ensaios de ligação *in vitro* e imunoprecipitação e também por Lopez-Illasaca et al. (2003) por meio de experimentos de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) e *pull-down* (37).

Outra GIP que interage com AT1R é ARAP, também identificada por ensaio de duplo-híbrido (33). ARAP mostrou ser capaz de aumentar a reciclagem de AT1R para a membrana em células HEK293. A hiperexpressão de ARAP aumenta a quantidade de AT1R na membrana (Figura 8).

Figura 8 - Supostos mecanismos de modulação do AT1R por ARAP e ATRAP.

Fonte: Modificado de Mogi et al. (2007) por Rebouças NA

2.8.1 ATRAP

ATRAP é uma proteína três segmentos transmembrânicos (resíduos 14-36, 55-77 e 88-108) e uma região hidrofílica citoplasmática (resíduos 109-160). ATRAP interage com AT1R por meio dos aminoácidos 110 a 122, que se seguem ao terceiro segmento transmembrânico (Figura 9) (37). Cockroft e Garner (2012) observaram um *splice* alternativo de ATRAP que resulta em perda dos resíduos 116-121, provavelmente sem possibilidade de interação com AT1R (38).

Figura 9 - Sequência primária e esquema dos domínios transmembrana (retângulos azuis) e cauda citoplasmática de ATRAP. A cauda citoplasmática apresenta 7 serinas, 1 tirosina e 3 lisinas, mas não se sabe se ATRAP sofre fosforilação. (Rebouças NA)

Em células HEK-293, é observada a colocalização de AT1R e ATRAP tanto na periferia da célula como em uma região perinuclear associada ao retículo endoplasmático e ao complexo de Golgi (37). Tsurumi et al. (2006) observaram colocalização parcial de ATRAP e AT1R *in vivo* em vários segmentos tubulares renais (39). O RNAm-ATRAP é mais abundante em rim, observando-se a seguinte ordem decrescente de expressão: rim > testículo $\cong$ adrenal > coração > pulmão > fígado $\cong$ cérebro $\cong$ baço (36).

A super-expressão de ATRAP em células de músculo liso vascular tende a reduzir a sinalização de AT1R estimulada por Ang II e diminui a quantidade de AT1R localizado na membrana plasmática após tratamento com Ang II, sugerindo que a proteína funcione como um regulador negativo desse receptor (37; 40; 41; 42; 43).

Camundongos com inativação do gene ATRAP exibiram aumento do volume extracelular, aumento de pressão arterial, diminuição do pH da urina e aumento da reabsorção de sódio sensível a acetazolamida (um inibidor da anidrase carbônica), o que sugere que a proteína ATRAP exerça modulação negativa da atividade de NHE3 em túbulos proximais renais, visto ser este o transportador preponderantemente inibido por acetazolamida (42). Camundongos transgênicos com superexpressão de ATRAP generalizada (44) ou com super-expressão restrita ao coração (43) apresentam inibição de hipertrofia cardíaca induzida por infusão de Ang II, mas apenas o grupo com super-expressão generalizada mostrou consistente atenuação do aumento da pressão arterial provocada Ang II. Animais transgênicos com

hiperexpressão de ATRAP restrita a túbulo convoluto distal não desenvolveram hipertensão com administração de Ang II, nem aumento da expressão do cotransportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) e ENaC - subunidade α , o que usualmente é observado em resposta a Ang II (45). Essas são evidências de que ATRAP interfere com a reabsorção de Na^+ estimulada por Ang II em néfron proximal e distal.

2.8.2 *Proteínas que Interagem com ATRAP*

Em ensaios de duplo-híbrido, foi também observada a interação de ATRAP com duas proteínas: CAML (Ca^{2+} modulating cyclophilin ligand) e RdgB β (Retinal degeneration B β).

2.8.3 *CAML*

CAML é uma proteína com 296 aminoácidos, com três segmentos transmembrânicos no C-terminal e um domínio N-terminal citoplasmático com 189 aminoácidos que interage com os aminoácidos 40 a 82 de ATRAP. CAML foi identificada inicialmente em um screening de duplo-híbrido que tinha como isca ciclofilina D. Foi observado que a hiperexpressão de CAML em células Jurkat ativava NFATs, confirmando seu envolvimento na ativação da via calcineurina/NFAT (46). CAML age a montante da calcineurina, depleta parcialmente o estoque intracelular de Ca^{2+} e potencializa os efeitos do aumento Ca^{2+} intracelular na ativação da calcineurina (47). A interação de ATRAP com CAML leva a inibição da cascata de ativação dos fatores de transcrição NFAT desencadeada tanto por Ang II como por hiperexpressão de CAML (48). NFATs devem ser desfosforilados pelas fosfatases calcineurinas para que exerçam suas funções de ativadores de transcrição no núcleo. NFATs ligam-se a elementos do DNA nos promotores, sendo a sequência consensual de ligação (T/AGGGANA/T/C) (49; 50).

O mecanismo pelo qual ATRAP diminui a atividade da calcineurina não é conhecido, mas esse efeito não parece depender da sinalização de AT1R/Ang II, visto que valsartan não reduz a atividade de NFAT induzida por Ang II (51); mas depende de CAML, visto que *knockdown* de CAML com siRNA reduz a ativação da calcineurina, e a expressão apenas do domínio citoplasmático de CAML que interage com ATRAP aumenta a ativação da calcineurina por Ang II, por impedir a interação ATRAP/CAML (48).

2.8.4 *RdgB β*

RdgB β é uma proteína solúvel que transfere fosfatidilinositol (PI) do retículo endoplasmático (RE) para a membrana citoplasmática (PM), e ácido fosfatídico (PA) da PM para RE. *RdgBs* são conhecidas pelo envolvimento na fisiologia da retina (38; 52) onde a depleção dessas proteínas reduz muito a sinalização via DAG e IP₃, levando a degeneração da retina. Em humanos, existem 5 diferentes PITPs que estão esquematizadas na figura 9. *RdgB β* , com 1224 aminoácidos, sofre fosforilação em duas serinas de sua extremidade carboxi, provavelmente por PKC. A ativação de PKC por PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) durante algumas horas aumenta significativamente a colocalização de ATRAP/*RdgB β* em região perinuclear.

Figura 10 - Estrutura da PITPs codificadas no genoma humano. *RdgB β* interage com ATRAP por meio de seu domínio PITP. (Rebouças NA)

A ativação de fosfolipases C ou D depleta PI (4,5) P, PIP₂, da membrana, gerando os sinalizadores diacilglicerol (DAG) inositol (1,4,5) trifosfato (IP₃). Dependendo do receptor e do agonista, a quantidade de PIP₂ hidrolisada pode exceder grandemente a quantidade inicial de PIP₂ na membrana. A regeneração de PIP₂ deve ocorrer rapidamente e esta depende da transferência de lipídeos entre o RE e a membrana citoplasmática. As PITPs transferem lipídeos entre essas duas membranas; as de classe I transferem apenas PI, e as de classe II

transferem ácido fosfatídico (PA) e PI. Cockroft e Garner (2012) sugerem que ATRAP poderia atuar aproximando RdgB β da membrana plasmática, possibilitando a transferência dos lipídeos (Figura 11), e teria importância na estimulação crônica por Ang II (38). Células de epitélio pigmentado da retina oriundas de camundongos nocauteados para ATRAP apresentaram um menor transiente de Ca²⁺ induzido por ativação de AT1R, tanto no valor máximo como naquele da fase sustentada, sendo o mecanismo subjacente parcialmente dependente de estoques de Ca²⁺ sensíveis a IP₃ (53).

Figura 11 - Possível papel de ATRAP na reposição de PI na membrana plasmática para posterior geração de PIP₂. Este papel parece ser válido para retina, já que a depleção de ATRAP reduz a sinalização do Ca²⁺, sendo a única situação descrita até o momento em que ATRAP teria um efeito positivo sobre a sinalização. (Rebouças NA)

Finalmente, outra proteína associada à ATRAP em situação basal é RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) (54), uma proteína andaime com grande capacidade de ancorar diversas proteínas e regular cascatas de sinalização (55). RACK1 aumenta a expressão de AT1R na superfície da célula (56). As consequências funcionais da interação ATRAP/RACK1 não são conhecidas.

2.9 Ativação de AT1R em Situações de Depleção de K⁺

Como discutido anteriormente, a depleção de K⁺ estimula a produção e secreção de renina, com consequente aumento da Ang II plasmática que exerce seu efeito principalmente via AT1R. O efeito crônico da depleção de K⁺ sobre a expressão de AT1R já foi avaliado em alguns tecidos e os resultados são controversos.

LeHoux et al. (1994) mostraram que a expressão da proteína e do mRNA de AT1R estavam aumentadas na zona glomerulosa do córtex da adrenal em animais submetidos a sobrecarga de K^+ por sete dias (57). Por outro lado, células adrenocorticais humanas (H295R) cultivadas em meio com K^+ alto mostraram redução do RNAm de AT1R de maneira tempo e dose dependente, o que parece se dever a um efeito mediado por canais sensíveis a voltagem e vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} e/ou adenilil ciclase (58).

Burns, em 1998, mostram que a depleção de K^+ induz aumento de aproximadamente 45 % no RNAm de AT1R em coelhos com depleção de K^+ por 14 dias; e células de túbulos em cultura primária, expostas a meio sem K^+ por 24 h, mostravam aumento de praticamente 100 % nos níveis de RNAm de AT1R após 4 h, voltando ao normal em 24 horas. O aumento na expressão de AT1R não foi observado no fígado dos coelhos depletados de K^+ (59).

Jin, em 2009, mostraram aumento da produção de superóxidos, ativação de cSrc, ERK e p38 MAPK em rins de ratos submetidos a depleção de K^+ , efeitos que eram revertidos com o uso de losartan, evidenciando o envolvimento de AT1R nessas alterações (60).

2.10 Angiotensina II na Modulação das WNKs em Néfron Distal

Existem situações fisiológicas, como a contração do volume extracelular com normo- ou hipocalemia, em que a reabsorção de Na^+ no néfron distal deve estar dissociada da secreção de K^+ . Para isso, a reabsorção de Na^+ deve ser desviada para túbulo convoluto distal (TCD), onde a reabsorção de Na^+ não é eletrogênica e não está associada à secreção de K^+ . Simultaneamente, a secreção de K^+ via canal para K^+ ROMK deve estar diminuída. Nas situações em que há sobrecarga de K^+ (o que estimula fortemente a secreção de aldosterona), sem alteração do volume extracelular, a reabsorção de Na^+ deve ocorrer principalmente em segmento de conexão e ducto coletor cortical (DCC), onde a reabsorção de Na^+ é eletrogênica, via canal epitelial para Na^+ , ENaC. A reabsorção de Na^+ via ENaC despolariza a membrana apical das células principais, afastando o potencial de membrana do potencial de equilíbrio do K^+ , o que favorece a saída deste íon da célula para a luz tubular. Os canais para K^+ , ROMK, devem estar mais ativos. Na primeira situação, usualmente observa-se níveis plasmáticos de Ang II elevados, com níveis plasmáticos de aldosterona apenas levemente aumentados, na segunda situação, os níveis de plasmáticos de aldosterona estão muito aumentados e os níveis de Ang II estão baixos (61).

A comutação da reabsorção de Na^+ de TCD para DCC depende das proteínas WNK (*with no lysine* - K), principalmente de WNK4, e a ativação de AT1R por Ang II parece ser importante nesse processo. Existem 4 tipos de WNKs (WNK1-4). Nos rins é observada a expressão de WNK1, WNK3 e WNK4, além de uma forma truncada de WNK1, a KS-WNK1 (*kidney specific WNK1*, resultante de um promotor alternativo do gene WNK1), sem domínio catalítico e que funciona como dominante negativo de WNK1.

Não há indícios de que as WNKs fosforilem diretamente os transportadores, mas sim que elas fosforilem outras cinases, como a SPAK (*proline alanine-rich kinase*) e ORS1 (*oxidative stress responsive protein type 1*) que, em seguida, modulam a função dos transportadores fosforilando-os. Outra cinase que está relacionada à ação das WNKs é SGK1. A SGK1, uma cinase cujo promotor é precocemente ativado por aldosterona, estimula a secreção de K^+ por aumentar a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, além da expressão e atividade dos canais para Na^+ (ENaC) em membrana apical de células principais. SGK1 ativa WNK1 fosforilando-a na treonina 58, e WNK1 ativada ativa SGK1, num ciclo de retroalimentação positiva. Além disso, tanto SGK1 quanto WNK1 fosforilam WNK4, inativando-a. Os efeitos dessas WNKs sobre os transportadores em néfron distal podem ser resumidos como se segue:

NCC é ativado por WNK1 indiretamente, porque esta fosforila SPAK, que então fosforila NCC e o ativa. Se houver aumento da expressão de KS-WNK1, que se expressa exclusivamente em TCD, à ativação de NCC por WNK1 não acontece. WNK3 é um potente ativador de NCC (62).

ENaC é ativado por WNK1 e inibido por WNK4 não fosforilada. WNK3 não parece modular ENaC. ROMK1 é inibido tanto por WNK1 como por WNK3 e WNK4 não fosforilada.

Em condições basais, parece existir uma ação tônica inibitória sobre NCC, ENaC, ROMK1, além de redução da condutância da via paracelular a Cl^- . Em situações de hipercalemia, em que há aumento dos níveis séricos de aldosterona (K^+ é um potente estimulador da secreção de aldosterona), mas não de renina e Ang II (hipercalemia inibe a liberação de renina), WNK4 fosforilada por SGK1 deixa de inibir ROMK1 e ENaC, que passam a estar mais ativos. WNK1 em TCD, por sua vez, está inibida pelos níveis elevados de KS-WNK1, tipicamente observados na hipercalemia. Como WNK1 está inibida em TCD, a fosforilação de SPAK está diminuída, com consequente menor fosforilação de NCC, que é tanto mais ativo, quanto mais fosforilado estiver. Assim, a reabsorção de Na^+ é parcialmente desviada de TCD para segmento de conexão e ducto coletor cortical. Nas situações de

contração de volume, os níveis plasmáticos de aldosterona estão apenas levemente aumentados e os níveis de Ang II estão elevados, há desfosforilação de WNK4 por *protein phosphatase 1* (PP1), que desfosforilada inibe ROMK1 e ativa SPAK. Além disso, SGK1 e WNK1 ativam SPAK. SPAK fosforila NCC, ativando-o. Na hipovolemia, a KS-WNK1 em TCD não é muito expressa, liberando WNK1 (63). A Ang II aumenta a fosforilação de NCC em células de TCD em cultura (64). A Figura 12 resume os efeitos do aumento da aldosterona ou da Ang II em néfron distal.

Figura 12 - Esquema das vias envolvidas na comutação entre a ativação de ENaC e ROMK, com inibição de NCC, e a inibição de ENaC e ROMK, com ativação de NCC. WNK4 está no centro desta comutação, embora em TCD a expressão ou não de KS-WNK1 também pareça importante nesse processo. (Rebouças NA)

Fonte: Modificado de Lin et al. (2012).

Estes dados sugerem que muitos efeitos da Ang II são dependentes da via de sinalização de AT1R. Os efeitos fisiológicos encontrados por outros trabalhos com animais com depleção de K^+ e que apresentam ativação do SRAA com alteração na expressão do AT1R motivou o desenvolvimento deste trabalho. Com isso resolvemos investigar: a expressão de AT1R, a expressão da proteína que parece modular negativamente o AT1R a ATRAP, e a ativação das cinases WNKs no modelo de depleção de K^+ . Tanto AT1R como a ATRAP como as WNKs são importantes na ação da Ang II sobre a reabsorção de fluidos e eletrólitos e regulação da PA.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram avaliar a expressão de AT1R e ATRAP, bem como a ativação da via das WNKS frente à depleção de K^+ . Os objetivos gerais foram alcançados com o auxílio de objetivos específicos, a saber:

- avaliar a função renal frente à depleção de K^+ ;
- verificar os níveis plasmáticos de Ang II frente à depleção de K^+ ;
- verificar a expressão de AT1R e ATRAP nas frações de Proteínas Totais, Membranas Totais, Membrana Apical e Extrato Nuclear de córtex renal de ratos depletados de K^+ ;
- quantificar RNAm de AT1R, ATRAP e alguns transportadores renais como NHE3 e CFEX;
- verificar a expressão de AT1R e ATRAP na glândula adrenal e compará-la ao padrão de expressão renal destas proteínas no modelo estudado;
- verificar o efeito da depleção nas vias de sinalização das WNKS, c-SRC, ERK 1/2 e p38 MAPK.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Lista de Reagentes

O anticorpo monoclonal para β - actina foi comprado da Calbiochem (San Diego, California, EUA), anticorpo para ATRAP foi comprado da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EUA), anticorpo para AT1R foi comprado da Millipore (Billerica, Massachusetts, os anticorpos para c-SRC, ERK 1/2 e p38 foram comprados da Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, EUA). Os anticorpos secundários, kit para obtenção do cDNA e PCR foram comprados da Life Technologies Corporation (Carlsbad, California, EUA). Os kits utilizados no PCR em Tempo Real foram obtidos da Life Technologies (Grand Island, New York, EUA). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, Missouri, EUA) a menos que seja especificado de outra maneira.

4.2 Plano Geral da Experimentação

Utilizamos ratos Wistar machos com peso entre 150 e 250 g provenientes do biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas.

Os animais foram submetidos às seguintes condições de tratamentos por 7 dias:

- 1) Dieta controle (RHOSTER, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil): dieta com concentração de potássio normal (0,36% - 3,6 g por Kg de dieta);
- 2) Dieta sem potássio (0% potássio).

No sexto dia de tratamento os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast S.p.A, Buguggiate, Italy) para o controle da ingestão de água e produção de urina por 24 hs, para posterior análise da função renal.

No sétimo dia, os animais foram anestesiados com Quetamina (0,2 mL/g), Acepran (0,1 mL/g) e Xilazina (0,1 mL/g). O sangue foi coletado em tubos sem heparina, centrifugado para obtenção do plasma, o qual foi congelado à -20 °C para análise posterior da concentração de creatinina, Na^+ , K^+ e osmolaridade. Após o clampeamento dos vasos renais, os rins foram removidos e imediatamente processados de acordo com as metodologias de extração de proteínas ou extração de RNA descritas abaixo.

Todos os procedimentos adotados estavam de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP.

4.2.1 Medida de Clearance e Fração de Excreção

Após os ratos em tratamento permanecerem 24 hs em gaiolas metabólicas, o consumo de água e o volume de urina produzido foram medidos e as concentrações de Na⁺, K⁺ e creatinina urinária foram analisados.

No dia do sacrifício, os animais foram sedados e foi realizada a coleta de sangue da veia cava inferior em tubos sem heparina. O sangue foi centrifugado para obtenção do plasma. O fluxo urinário, em ml/min, foi obtido dividindo-se o volume médio urinário total pelo intervalo de tempo de permanência na gaiola metabólica (24 hs), em minutos, entre o início de armazenamento da urina e o momento de sua coleta, demonstrado pela equação abaixo:

$$\overline{V} = \frac{V}{t}$$

Onde:

$\overline{V}$ = Fluxo, ml/min

V = volume de urina total, ml

t = tempo, min

A partir do valor do fluxo urinário foi determinado o ritmo de filtração glomerular, através do clearance de creatinina, em ml/min. O clearance de creatinina é obtido multiplicando-se o fluxo urinário, em ml/min, pela concentração urinária de creatinina (em mg/L) e dividindo-se o resultado desta multiplicação pela concentração plasmática de creatinina (mg/L), como descrito na equação abaixo:

$$C_{\text{Creat}} = \frac{\overline{V} \times U_{\text{Creat}}}{P_{\text{Creat}}}$$

Onde:

C_{Creat} = Clearance de Creatinina, ml/min

$\overline{V}$ = Fluxo urinário, ml/min

U_{Creat} = concentração urinária de Creatinina, mg/L

P_{Creat} = concentração plasmática de Creatinina, mg/L

Ao determinarmos os valores de Na^+ e K^+ plasmáticos e urinários foi possível calcular a fração de excreção de sódio e potássio. A fração de excreção é a razão entre a quantidade excretada e filtrada da substância em questão. Para tanto, divide-se a carga excretada pela carga filtrada da substância. A carga excretada é obtida multiplicando-se o fluxo urinário (em ml/min) pela concentração urinária (mM ou mEq/L) da substância. A carga filtrada é obtida multiplicando-se a concentração plasmática (mM ou mEq/L) da substância pelo ritmo de filtração. A equação abaixo demonstrada representa o cálculo da fração de excreção de uma substância X:

$$FE_X = \frac{\overline{V}_X \times U_X}{RFG \times P_X}$$

Onde:

FE_X = Fração de excreção da substância X (mmol ou mEq/min)

$\overline{V}$ = fluxo urinário (ml/min)

U_X = concentração urinária de X (mmol ou mEq/L)

RFG = ritmo de filtração glomerular (ml/min)

P_X = concentração plasmática de X (mmol ou mEq/L)

A creatinina urinária foi analisada, para a obtenção dos dados relacionados acima, utilizando-se o método de Jaffé, através da leitura colorimétrica em espectrofotômetro no comprimento de onda 520 nm. A mensuração de Na^+ e K^+ urinários foram realizados por fotometria de chama e as medidas séricas no 9180 *Electrolyte Analyzer* (Roche, Mannheim, Germany).

4.2.2 Análise da Concentração Plasmática de Ang II e Aldosterona

Os níveis plasmáticos de aldosterona foram avaliados utilizando-se o *Aldosterone ELISA Kit* (Enzo Life Science, Nova York, EUA) e para a determinação da concentração plasmática de Ang II foi utilizado o *Angiotensin II EAI Kit* (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

4.2.3 Extração de RNA Total

A porção cortical dos rins foi separada da medular e processada no homogeneizador *Polytron* em 1 ml de solução gelada de isotilcianato de guanidina (GIT) 4 M e 8 µl de β-mercaptoetanol, para cada rim. Esta solução previne a atividade de RNAses presentes na amostra que podem degradar o RNA.

Para a extração do RNA foram adicionados 100 µl de Acetato de Sódio 2M, pH 4,0 e 600 µl de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamil (25:24:1) pH 4,7 e posteriormente foram bem homogeneizadas e deixados por 15 min no gelo. Após os 15 min as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4 °C a 14.000 rpm. O sobrenadante foi colocado em tubo limpo e adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado, em seguida foram homogeneizados e deixados por 1 hora no freezer a -80 °C.

As amostras foram centrifugadas por 10 min a 4 °C a 14.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 200 µl de solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 0,5% em água DEPC. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio/álcool isoamil (24:1), homogeneizados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C. Ao sobrenadante foram acrescentados 1 vez o volume de Acetato de Sódio 2M pH 5,0 e igual volume de isopropanol gelado e as amostras foram levadas ao freezer a -80 °C por 30 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 500 µl de etanol 75% gelado, posteriormente foi centrifugado e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos, invertidos, foram deixados no gelo por alguns minutos para o etanol evaporar e o pellet foi ressuscitado em 50 µl de água DEPC (0,1% dietilpirocarbonato) autoclavada.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e estocadas a -80 °C. Para a análise da qualidade das amostras, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2.4 Tratamento do RNA Total com DNase

A purificação das amostras de RNA com o intuito de eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante foi feita primeiramente pelo tratamento das amostras com RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany) , sendo estas em seguida purificadas em

colunas de sílica-gel do Rneasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as especificações do fabricante.

4.2.5 Síntese de cDNA

Dois µg de RNA purificado foram utilizados para síntese de cDNA por transcrição reversa. Foram utilizados *primers* randômicos (Life Technologies Corporation) e a enzima transcriptase reversa *Super Script III* (Life Technologies Corporation).

4.2.6 Quantificação Relativa por PCR em Tempo Real

O cDNA foi amplificado no sistema de detecção ABI Prism 7300 (Life Technologies Corporation). As reações foram feitas utilizando-seo kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Life Technologies Corporation), 2 µl de cDNA e primers para os genes ATRAP, AT1R e GAPDH. Para os ensaios de PCR com corante *Syber Green* foi utilizado o kit *SYBER GREEN-PCR Core Reagents* (Life Technologies Corporation). A eficiência dos ensaios de amplificação foi calculada de acordo com a equação:

$$E=10^{(-1/\text{slope})}-1$$

O RNA mensageiro (RNAm) dos genes estudados foi quantificado após 7 dias de tratamento com sobrecarga e depleção de potássio e comparado com a quantidade de RNAm do grupo controle. O gene GAPDH foi utilizado como controle interno.

Os parâmetros dos ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial do cDNA à 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação à 95 °C por 15 s e anelamento e extensão à 60 °C por 60 s. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Os níveis de expressão do gene foram calculados de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o ΔCt é a diferença entre o *threshold cycle* dos genes (Ct)_{gene de interesse} de cada amostra e o *threshold cycle* do controle interno da mesma amostra (Ct)_{controle interno}; $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre o ΔCt de cada amostra experimental e a média do ΔCt das amostras controle (calibrador). A curva de dissociação foi utilizada apenas nos experimentos com *Syber Green*.

4.2.7 Quantificação Relativa por PCR do Gene da WNK1

A WNK1 foi quantificada por PCR comum. Primeiramente foi realizada uma curva de padronização para avaliar os ciclos de saturação e assim determinar o ciclo que seria utilizado na quantificação, o qual deveria estar antes do platô de amplificação. Neste teste foi determinado que 25 ciclos para o controle interno (β - actina) e 30 ciclos para a WNK1 eram as melhores opções. Os iniciadores específicos utilizados para amplificar os genes analisados neste trabalho estão descritos na Tabela 1. São eles o gene de NHE3, PAT1/CFEX, WNK1, KS-WNK1 e WNK4.

Tabela 1- Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes descritos e respectivos tamanhos dos produtos amplificados.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3'
NHE3	Sense	GCATGGCCGGGCTTTCGACC
	Antisense	TGAAGGCCAGGGACCCACGG
WNK1	Sense	TGGGGAACAAGCCGTTGTAG
	Antisense	AAGCGACCGTCATTGGACAT
KS-WNK1	Sense	AAGTCTGTTTTGCCTTTTCTGATG
	Antisense	ACAATCCTTTTGAGAACAGCAGC
WNK4	Sense	CCGGGAGATTATCCAGCGAG
	Antisense	TCTCTGGAGCTCTTCATCGGA
PAT1/CFEX	Sense	CGTGGACGTTGACCGCCTCATC
	Antisense	CCTTGGTGCACCTTGGCCTCAG
β - Actina	Sense	CTCCATCGTGGGCCGCCCTA
	Antisense	CTCCTGCTTGCTGATCCACAT

Os parâmetros do ciclo de amplificação foram: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 min, seguida por 25 ou 30 ciclos à 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s 72 °C por 30 s, sendo finalizado por 1 ciclo à 72 °C por 7 min. Após a PCR as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2% e foi realizada a densitometria das bandas.

4.2.8 Extração de Proteínas Totais de Córtex Renal

Após a separação da medula, o córtex foi imediatamente colocado em tampão K-HEPES (Manitol 200 mM pH 8,0, HEPES 80 mM, KOH 41 mM, pH7,5) contendo coquetel de inibidores de proteases (ROCHE, Basel, Switzerland) e inibidores de fosfatases (5 mM EDTA, 5 mM EGTA e ortovanadato de sódio). O tecido foi fragmentado em pedaços pequenos e homogeneizado de 15 a 20 vezes pela haste de homogeneização do *Douncer Homogenizer*.

O homogenato foi transferido para um tubo de polipropileno e centrifugado a 4.500 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante contendo proteínas totais foi salvo, quantificado e aplicado em gel SDS-PAGE 12 ou 8%.

4.2.9 Extração de Membranas Totais

O homogenato de córtex total foi transferido para um tubo de polipropileno e centrifugado a 4.500 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi salvo e submetido a mais uma ultracentrifugação a 36.000 rpm por 1 h a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 100- 500 µl de tampão K-HEPES contendo inibidores de proteases.

4.2.10 Extração de Membrana Apical

Após a obtenção do homogenato de córtex renal mencionado nos protocolos anteriores, seguimos o protocolo específico para obtenção da fração enriquecida com proteínas da membrana apical. Em um tubo de polipropileno com o homogenato em K-HEPES foi adicionado gluconato de magnésio $MgCl_2$ que precipita as proteínas de membrana apical. Este foi incubado no gelo por 15 min, o protocolo consiste de ultracentrifugações de alta (16.000 rpm) e baixa (4.500 rpm) rotação com tempos variados entre as rotações. Os tubos contendo as proteínas foram deixados no gelo por 15 min com a mesma solução de K-HEPES com $MgCl_2$ entre os períodos de centrifugação. Na última centrifugação de 16.000 rpm o pellet foi ressuspensionado na solução de K-HEPES, depois quantificado e submetido a SDS-PAGE.

4.2.11 Extração de Proteínas Nucleares

Para obtenção das proteínas nucleares de córtex renal foi utilizado o kit de Extração Nuclear (Chemicon/Millipore) de acordo com as especificações do fabricante. Um coquetel de inibidores de proteases (Roche) também foi adicionado durante as extrações.

As amostras foram quantificadas utilizando-se o reagente *Bicinchoninic* comercialmente vendido (Sigma) seguindo as especificações do fabricante. Os cálculos foram feitos com base em uma curva padrão de BSA.

Após a quantificação, 200 µg de proteínas foram homogeneizadas em *Laemmli sample buffer* (azul de bromofenol 0.05%, SDS 2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 2%, Tris-HCl 5 mM, pH 6,8). Depois aquecidas a 95 °C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 % para análise de ATRAP e 8% para AT1R. Os anticorpos primários e secundários utilizados estão descritos na Tabela 2.

4.2.12 Transferência das Proteínas do Gel Para Membrana de PVDF

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas foram transferidas para membrana PVDF (Immobilon - Millipore) por 3 h com a utilização do sistema de transferência (Semidry – OWL). As membranas contendo as proteínas foram coradas com Ponceau S 5% para a avaliação da eficiência da transferência, depois lavadas em água destilada e secas a temperatura ambiente.

4.2.13 Coloração dos Géis com Coomassie Blue

A coloração dos géis foi feita como controle de pipetagem para as amostras que não conseguimos uma boa quantificação do controle interno. Logo após a transferência das proteínas para a membrana de PVDF, os géis foram colocados na solução de fixação (50% metanol; 2% ácido fosfórico) por 1 h a TA sob leve agitação. A solução de fixação foi trocada pela solução de *Coomassie Blue* coloidal na qual o gel permaneceu *overnight* sob leve agitação de acordo com o protocolo modificado de Candiano et al. Essa solução é chamada de *Blue Silver Micellar Solution* (2% H₃PO₄; 10% (NH₄)₄SO₄; 20 % metanol; 0,1% Coomassie G-250). O Excesso do corante foi removido apenas com enxágue com água destilada (65).

4.2.14 Imunoblot

A avaliação dos níveis de expressão das proteínas de interesse foi feita por “*immunoblotting*”. Para evitar possíveis ligações inespecíficas do anticorpo as membranas contendo as proteínas transferidas foram inicialmente incubadas em uma solução de bloqueio (PBS, pH 7,4, 0,1% tween 20, 5% de leite em pó desnatado) por 1 h à temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida, foram incubadas *overnight* à 4 °C na mesma solução contendo os anticorpos primários (tabela 2).

No dia seguinte as membranas foram lavadas 5 vezes com a solução de bloqueio e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase (*horseradish peroxidase*). As bandas foram detectadas incubando-se as membranas com o reagente “*ECL-enhanced chemiluminescence*” (Amersham Biosciences) que contém o substrato da peroxidase, por até 5 min e expondo-as em filme especial para a detecção de quimioluminescência (BioMax-Kodak, Rochester, NY, USA). As imagens foram capturadas no equipamento ImageScanner (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom).

Para os *immunoblottings* das proteínas fosforiladas seguimos as orientações dos fabricantes. As membranas foram bloqueadas em solução contendo 5% de albumina em TBS (Tris Buffer Saline, pH 7,4) e 0,1% de Tween 20 (TBST) por 1 h à TA sob agitação leve, depois incubadas com os anticorpos primários *overnight*. No dia seguinte foram lavadas 3 vezes por 10 min com a solução de bloqueio TBS-T, e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários por 1 h a TA. Após a incubação com o anticorpo secundários foram novamente lavadas 3 vezes com a solução de TBS-T por 10 min e finalmente foi lavada uma última vez em solução TBS sem Tween 20 para em seguida ser feita a detecção das bandas.

Tabela 2- Anticorpos utilizados nos experimentos de *imunoblotting*.

Anticorpos	Fabricante	Diluição
Primários	rabbit anti AT1R	Millipore
	mouse anti ATRAP	Santa Cruz
	mouse anti β -Actina	Merck
	rabbit anti p38 fosforilada	Cell Signaling
	mouse anti c-Src fosforilada	Abcam
	rabbit anti ERK1/2 fosforilada	Cell Signaling
Secundários	goat anti rabbit IgG (AT1R)	Millipore
	goat ant mouse IgG (ATRAP)	Invitrogen
	goat anti mouse IgM (β -actina)	Invitrogen

4.2.15 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o software *Graph Pad Prism* (*Graph Pad Software Inc.*, San Diego, Ca, USA) versão 5.0. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. A diferença entre as médias dos grupos estudados foram analisados por teste “*t*” de *Student*. Os respectivos valores de p dos grupos de tratamento comparados ao grupo controle foram colocados em cada gráfico.

5 RESULTADOS

5.1 Peso Corporal e Peso Renal dos Animais Submetidos à Depleção de K^+

Como já previamente relatado na literatura, nossos animais com depleção de K^+ apresentaram ganho de peso 59% menor que os animais controles $p < 0.0001$ ($51,82 \pm 3,748$ vs $21,22 \pm 3,071$) como ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Análise do ganho de peso corporal em gramas dos animais controles (22) e dos animais com depleção de K^+ (23). *** $p < 0.0001$ (teste “*t*” de Student)

Como o menor ganho de peso observado no grupo com depleção de K^+ pudesse ser decorrente de uma menor ingestão de ração por estes animais, analisamos também a quantidade de ração ingerida diariamente em ambos os grupos. Como pode ser observado na Figura 14, os animais que receberam dieta sem K^+ ingeriram uma quantidade de ração 24% menor que os animais controles ($18,25 \pm 1,548$ vs $13,830 \pm 1,376$).

Figura 14 – Quantidade de ração consumida em 24 horas pelo grupo controle (6) e pelo grupo com depleção de K^+ (6). * $p < 0.020$ (teste “ t ” de Student)

Na Figura 15, apresentamos a variação do peso renal, em miligramas, em ambos os grupos de animais. Também, como já previamente observado em outros laboratórios, os animais com depleção de K^+ apresentaram peso relativo dos rins 26% maior que dos animais controles após 7 dias de dieta, indicando hiperplasia/hipertrofia renal ($0,0035 \pm 0,00040$ vs $0,00506 \pm 0,0001$).

Figura 15 – Peso Relativo dos rins direito (A) e esquerdo (B) dos animais do grupo controle (14) e do grupo com depleção de K^+ (11). Rim direito ** $p < 0.0040$ e rim esquerdo *** $p < 0.0001$ (teste “ t ” de Student)

5.2 Avaliação da Função Renal dos Animais

Os ratos tratados com a dieta controle e depleção ($0\% K^+$) foram colocados no 6º dia de tratamento por 24 horas em gaiolas metabólicas para a coleta da urina e posterior análise do volume e fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular (RFG), fração de excreção de Na^+ (FE Na^+) e fração de excreção de K^+ (FE K^+). A coleta do sangue arterial foi realizada no 7º dia de tratamento.

Na Figura 16, é apresentado o fluxo urinário de 24 horas, em $\mu L/min$. Podemos observar que os animais com depleção de K^+ apresentaram poliúria acentuada, com aumento do fluxo urinário de 108% ($9,968 \pm 0,9666$ vs $20,74 \pm 1,526$). O aumento do fluxo urinário nos animais com depleção de K^+ , como esperado, estava associado à redução da osmolaridade urinária ($857,4 \pm 51,97$ vs $391,1 \pm 27,38$ mOsm/L) (Figura 17).

Figura 16 - Fluxo Urinário de 24 horas, em $\mu L/min$, de animais controles (17) e de animais com depleção de K^+ (19). *** $p < 0.001$ (teste “*t*” de Student)

Figura 17 - Osmolaridade urinária dos animais controles (11) e dos animais com depleção de K^+ (15). *** $p < 0.001$ (teste “ t ” de Student)

O ritmo de filtração glomerular (RFG), expresso em mL/min.100g peso corporal, mostrado na Figura 18, foi avaliado por meio do clearance de creatinina. Observamos certa tendência a redução do RFG nos animais depletados de K^+ , mas essa diferença não chegou a ser significativa ($0,012 \pm 0,002$ vs $0,010 \pm 0,015$).

Figura 18 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), em mL/min.100 g de peso corporal, de animais controle (14) e com depleção de K^+ (15). $p > 0,05$ (teste “ t ” de Student)

Finalmente, analisamos a fração de excreção de K^+ (FE_K) e a fração de excreção de Na^+ (FE_{Na}) em ambos os grupos de animais. Como esperado, a FE_K foi reduzida a quase zero nos animais depletados de K^+ , enquanto os animais controles apresentaram redução de ~86% na FE_K ($29,24 \pm 6,51$ vs $4,03 \pm 0,98$), como mostrado na Figura 19. Observamos também considerável redução (39%) na FE_{Na} nos animais com K^+ baixo (Figura 20), o que se deve à menor ingestão de dieta, já que ambas as dietas, controle e sem K^+ , possuíam a mesma quantidade de NaCl. Além disso, esses animais poderiam estar com certa depleção de volume, em decorrência do balanço negativo de Na^+ que deve ter ocorrido nos primeiros dias do tratamento.

Figura 19 - Fração de excreção de K^+ , em %, dos animais controle (9) e dos animais com depleção de K^+ (11). *** $p < 0.0006$, como indicado pelo teste “ t ” de Student.

Figura 20 - Fração de excreção de Na^+ , em %, dos animais controles (8) e dos animais com depleção de K^+ (12). *** $p < 0.001$ (teste “ t ” de Student)

Tabela 3- Resumo dos parâmetros fisiológicos dos animais Controle e Depleção de K⁺.

Parâmetros	Controle	Depleção de K ⁺
Peso corporal, g		
Antes do tratamento	177,0±4,93	176,8±4,65
Depois do tratamento	226,8±5,38	195,6±195,6*
Consumo de ração/ 24hs	18,25±1,54	13,83±1,37*
Osmolaridade do plasma	305,5±4,01	293,9±3,68
Creatinina Plasmática	0,646±0,01	0,677±0,05
Na ⁺ Plasmático, meq/L	149,1±2,90	136,4±1,61***
K ⁺ Plasmático, meq/L	5,188±0,49	3,140±0,49*
Volume Urinário, mL/dia	13,59±1,14	29,59±1,58*
Osmolaridade Urinária	869,5±44,99	393,4±23,02*
Fração de excreção de Na ⁺	0,589± 0,03	0,359± 0,04**
Fração de excreção de K ⁺	29,24±6.51	4,036±0,98***

*(p<0.005) ***(p<P<0.0001) apresentaram alterações estatisticamente significantes em relação ao controle, como indicado no teste “t” de *Student*.

5.3 Análise dos Níveis Plasmáticos de Ang II e Aldosterona nos Animais com Depleção de K⁺

Para avaliar se a depleção de K⁺ de nossos animais era suficiente para estimular a produção de renina/angiotensina, avaliamos também os níveis plasmáticos de Ang II em ambos os grupos de animais. Os animais depletados de K⁺ mostraram aumento de 32% nos níveis plasmáticos de Ang II (9,218 ± 0,4730 vs 12,20 ± 0,8372), como mostrado na Figura 21. A elevação dos níveis de Ang II não foi acompanhada de aumento da aldosterona, o que era esperado. Não observamos alteração significativa dos níveis plasmáticos de aldosterona (figura não demonstrada).

Figura 21 - Níveis plasmáticos de Ang II nos animais controles (4) e nos animais tratados com depleção de K^+ (5). * $p < 0.0237$ (teste “*t*” de Student)

5.4 Efeito da Depleção de K^+ sobre a Expressão de AT1R e ATRAP no Córtex Renal

5.4.1 Expressão de AT1R e ATRAP em Lisado Celular Total

A expressão de AT1R em **lisado celular total** do córtex renal dos animais com depleção de K^+ aumentou em 477% ($p < 0.0257$) em relação ao grupo controle, enquanto a expressão de ATRAP aumentou em 124% ($p < 0.0028$). Os *western-immunoblots* com as respectivas densitometrias estão apresentados na Figura 22. Como o aumento de AT1R Foi muito expressivo observamos uma redução de 61% na razão ATRAP/AT1R.

Figura 22 - Quantificação por *western-immunoblots* de AT1R e ATRAP em amostras de lisado total de córtex renal de ratos controles ou com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas dos *western-immunoblots* de AT1R, ATRAP e β -actina. β -actina foi utilizada como controle interno. **B)** Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pela β -actina, expressas em relação ao controle. * $p < 0.0257$, ** $p < 0.0028$ (teste “*t*” de Student)

5.4.2 Expressão de AT1R e ATRAP em Membranas Totais, Sem os Núcleos Celulares

Na fração de **membranas totais**, observamos nos animais com depleção de K^+ aumento de 50% na expressão de AT1R em relação ao controle não significativo (1.000 ± 0.1432 vs 1.501 ± 0.2581). A expressão de ATRAP nesta fração celular aumentou em 129% nos animais com depleção (1.000 ± 0.03549 vs 2.292 ± 0.2883) (Figura 21). A razão ATRAP/AT1R nesta fração celular aumentou 53%, pois o aumento da ATRAP foi mais pronunciado que a expressão do receptor (Figura 23).

Figura 23 - Quantificação por *western-immunoblots* de AT1R e ATRAP em amostras de membranas totais de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas dos *western-immunoblots* de AT1R, ATRAP e β -actina. **B)** Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pela β -actina. *** $p < 0.0008$ para ATRAP (teste “*t*” de Student)

5.4.3 Expressão de AT1R e ATRAP em Membrana Apical

Outra fração estudada do córtex renal foi à **membrana apical**. Utilizamos como controle interno deste experimento a β - actina, sendo que este não é considerado o melhor controle para este tipo de fração e observamos que ocorreu variação na expressão entre os tratamentos. Outra tentativa foi incubar a membrana com um anticorpo contra a dipeptidil peptidase IV (DPPIV), esta proteína é expressa em células epiteliais, mas sua expressão renal é restrita apenas na membrana apical de túbulo proximal. E podemos observar que o tratamento com depleção alterou a expressão, com este resultado esta proteína também não pode ser usado como controle interno para este experimento. Outra técnica utilizada como controle interno e como controle de pipetagem foi corar o gel com *Coomassie Blue* coloidal de acordo com o protocolo modificado de Candiano et al. (2004), esta solução diferenciada de *coomassie* é chamada *Blue Micellar solution* (H_3PO_4 2%, $(NH_4)_2SO_4$ 10%, metanol 20%, *Coomassie* G-250 0,1%) o gel foi incubado overnight a temperatura ambiente e depois descorado com água destilada para a remoção do excesso de corante (65).

A expressão de AT1R no modelo de hipocalemia aumentou significativamente nesta fração celular ~125% ($p < 0.0179$). Enquanto que o aumento do nível de expressão de ATRAP neste modelo aumentou apenas 24% estatisticamente insignificante ($p < 0.1679$). Ao analisarmos a razão do nível da expressão da ATRAP/AT1R observamos uma redução de 45% nesta fração (Figura 24).

Figura 24 - Quantificação por *western-immunoblots* de AT1R e ATRAP em amostras de membrana apical de córtex renal de ratos controles ou com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas dos *western-immunoblots* de AT1R, ATRAP, β -actina, DPPIV e *Commassie Blue*. **B)** Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pelo *Commassie Blue*, expressas em relação ao controle. * $p < 0.0179$ (teste “*t*” de Student)

5.4.4 Expressão de AT1R e ATRAP em Extrato Nuclear

Para esta fração celular não conseguimos um bom controle interno. Testamos anticorpos anti-RNA Polimerase, anti-Histona 3 e anti-Nucleoporina, mas nenhum deles foi adequado. Tanto a RNA Polimerase como a Histona 3 variaram com o tratamento, além disso, observamos bandas com peso molecular muito abaixo do predito. Para demonstrar a homogeneidade na quantidade de proteína nas diversas linhas, coramos o gel de eletroforese com *Coomassie Blue* coloidal, de acordo com o protocolo modificado de Candiano, G., et al (2004) (65). Na fração de extrato nuclear, observamos aumento significativo na expressão de AT1R em ~ 206 % animais tratados com K⁺ baixo, e observamos aumento de 123% na expressão de ATRAP (Figura 25). Nesta fração celular a razão ATRAP/AT1R diminuiu 27%.

Figura 25 - Quantificação por *western-immunoblots* de AT1R e ATRAP em amostras de extrato nuclear de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas dos *western-immunoblots* de AT1R, ATRAP e gel de eletroforese corado com *coomassie*, usado como normalizador. **B)** Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP. * $p < 0.0240$ para AT1R e *** $p < 0.0001$ para ATRAP (teste “*t*” de Student)

Na tabela 4, apresentamos um resumo do que foi observado nos *western-immunoblots* para AT1R e ATRAP em ambos os grupos de animais.

Tabela 4- Variação na expressão de AT1R e ATRAP nas diferentes frações celulares de córtex renal de rins de ratos com depleção de K^+ . ns: sem alteração.

	AT1R	ATRAP	Razão ATRAP/AT1R
	Depleção de K^+	Depleção de K^+	Depleção de K^+
Lisado Total	↑ 477 %	↑ 124%	- 61%
Membranas Totais	n.s.	↑ 129%	53%
Membrana Apical	↑ 125%	n.s.	- 45%
Extrato Nuclear	↑ 206%	↑ 123 %	- 27%

5.5 Análise da Expressão de AT1R e ATRAP em Córtex Adrenal

Tendo observado variação tão significativa na expressão de AT1R e ATRAP no tecido renal dos animais depletados de K^+ , decidimos avaliar a expressão dessas proteínas também na glândula adrenal, que é estimulada por Ang II, via AT1R, para produção de aldosterona. Nós observamos aumento de 77% ($p < 0.0154$) na expressão de AT1R nos animais com depleção de K^+ , comparados com os controles (Figura 26). No entanto, a mudança na expressão de ATRAP não foi significativa.

Figura 26 - Quantificação por western-immunoblots de AT1R e ATRAP em amostras de adrenal dos ratos controles e com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas dos western-immunoblots de AT1R, ATRAP e β - actina. **B)** Densitometria das bandas correspondentes a AT1R e ATRAP, normalizadas pela β - actina, expressas em relação ao controle. * $p < 0.0154$ (teste “ t ” de *Student*)

4.6 Análise das Quantidades de RNAm de AT1R, ATRAP e dos transportadores NHE3, PAT1 (CFEX)

A quantidade de RNA mensageiro, ao contrário das proteínas, não se alterou de forma significativa, nem para AT1R, nem para ATRAP, embora tenhamos observado uma tendência à redução (Figura 27). Nossos dados sugerem, portanto, que a depleção de K^+ modifique a

quantidade das proteínas AT1R e ATRAP não por ativação da transcrição, mas, provavelmente, por alterar de algum modo a meia vida dessas proteínas.

Figura 27 - Quantificação dos RNAm de AT1R e ATRAP por RT-PCR em tempo real, normalizado pelo RNAm de GAPDH. Os gráficos de barra mostram a expressão dos RNAm de AT1R e ATRAP, normalizados por GAPDH e em relação ao controle, $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

É sabido que a expressão da proteína-NHE3 aumenta em animais com depleção de K⁺, enquanto transportadores de porções mais distais do néfron como NKCC2, NCC e ROMK, se mostram diminuídos. Nós analisamos também a quantidade de RNAm dos transportadores iônicos NHE3 e cloreto/formato *exchanger* (CFEX ou PAT1), abundantes na membrana apical de túbulos proximais. Nós não observamos alteração nas quantidades de RNAm correspondentes a essas proteínas, no entanto, não avaliamos a expressão das mesmas por *western-immunoblot* (Figura 28).

Figura 28 - Quantificação dos RNAm de NHE3 e PAT1 por RT-PCR em tempo real, normalizado pelo RNAm de GAPDH. Os gráficos de barras mostram a expressão dos RNAm de NHE3 e PAT1, normalizados por β -actina e em relação ao controle, $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.7 Análise de Algumas Vias de Sinalização Eventualmente Ativadas ou Inibidas na Depleção de K^+

5.7.1 Análise da Ativação de c-Src

As vias de sinalização que resultam em fosforilação e ativação da proteína c-Src são importantes para inibição da secreção de K^+ em células de ductos coletores. Nós avaliamos a quantidade total da proteína c-Src e a quantidade de c-Src fosforilada (p-c-Src) nos animais com depleção de K^+ . Como pode ser visto na Figura 29, não houve alteração na quantidade total de proteína nos animais depletados de K^+ , mas a forma fosforilada aumentou significativamente (53%).

Figura 29 - Quantificação por *western-immunoblot* de c-Src e p-c-SRC em amostras de lisado total de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas dos *immunoblots* da proteína c-Src total e fosforilada e da β -actina, utilizada como controle interno. **B)** O gráfico de barras mostra a densitometria das bandas de cSrc e p-cSrc, normalizadas por β -actina e expresso em relação ao controle, correspondentes a todos os experimentos * $p < 0.0151$ (teste “*t*” de Student)

5.7.2 Análise da Ativação de ERK1/2 e p38-MAPK

A principal via de sinalização ativada por Ang II via AT1R é aquela que gera DAG e liberação de Ca^{+} do retículo endoplasmático, o que resulta em ativação de proteínas cinases C (PKC). A ativação da PKC zeta ($\text{PKC}\zeta$), resulta em ativação da proteína Ras, e esta ativa a via das MAP cinases (MAPK). Esta via tem como efeito final a fosforilação de ERK1/2. Essa mesma via pode também ser ativada, um pouco mais tardiamente (30 min) pela PKC gama ($\text{PKC}\gamma$), que depende da p-c-Src para sua ativação. Tendo isso em vista, analisamos também a expressão e o nível de fosforilação das MAP cinases ERK1/2 e p38-MAPK. Observamos duas bandas para a proteína ERK1/2 fosforilada, na posição esperada de acordo com o *data sheet* do anticorpo. E observamos na Figura 30 um aumento em torno de 220% da banda mais alta no grupo de depleção, quando comparado com o grupo controle ($p < 0.0131$), e a banda de menor peso molecular apresentou um aumento não significativo estatisticamente quando os animais foram tratados com 0% de K^{+} durante 7 dias.

Figura 30 - Quantificação por *western-immunoblot* de ERK1/2, pERK1/2 em amostras de lisado total de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas da proteína ERK1/2 total e fosforilada e da β -actina utilizada como controle interno. **B)** Os gráficos de barras mostram a análise densitométrica das bandas de ERK1/2 fosforilada, normalizada por β -actina e expressa em relação ao controle, correspondentes a todos os experimentos. * $p < 0.0131$ (teste “*t*” de Student)

Fomos avaliar o nível de fosforilação da proteína p38 visto que ela também é modulada pelos níveis de Ang II. E observamos um aumento de 31% quando os animais eram submetidos à depleção de K^+ ($p < 0.0217$) (Figura 31).

Figura 31 - Quantificação da p38 MAPK em lisado total de córtex renal dos ratos controles e com depleção de K^+ . **A)** Bandas representativas da proteína p38 MAPK total e fosforilada e da β -actina, utilizada como controle interno. **B)** O gráfico de barras mostra a análise densitométrica das bandas de p38 MAPK total e fosforilada, normalizada por β -actina, correspondente a todos os experimentos. * $p < 0.0217$ (teste “ t ” de *Student*)

Tabela 5 - Resumo das variações na expressão das proteínas c-Src, ERK1/2 e p38 MAPK fosforiladas em animais tratados com baixo K^+ .

	Depleção de K^+
Src fosforilada	Aumento de 54%
ERK 1/2 fosforilada	Aumento de 131%
p38 fosforilada	Aumento de 31%

5.8 Efeito da Depleção K^+ na Expressão das Cinases WNKS

Devido a importante participação das cinases WNKS nas respostas renais em situações onde encontramos aumento do nível plasmático da Ang II, tivemos interesse em avaliar o nível de expressão das WNKS no modelo de depleção de K^+ . Não obtivemos sucesso nas análises por *immunoblot* das proteínas WNKS, o que já é bem descrito na literatura sobre a falta de especificidade dos anticorpos comerciais. Então para avaliar a expressão destas cinases optamos por PCR em tempo real para os genes WNK4 e KS-WNK1. Apenas a WNK1 foi avaliada por PCR comum, em fase de não saturação da amplificação. Após a transcrição reversa o cDNA obtido foi incubado com os iniciadores específicos e foi realizado o PCR como descrito anteriormente nos métodos. Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% para quantificar o nível de expressão da WNK1 e da β - actina utilizando o *software ImageJ*. A expressão da WNK1 aumentou significativamente nos animais com depleção de K^+ como observado na Figura 32.

Figura 32 - Quantificação relativa do RNAm da WNK1 nos animais controle (n= 6) e depletados de K^+ (n=6). **A)** Figura representativa das bandas da WNK1 e da β - actina utilizada como controle interno. **B)** Análise densitométrica das bandas de WNK1 e β - actina correspondentes a todos os experimentos representados em gráfico de barras. *** $p < 0.0009$, como indicado no teste “*t*” de *Student*.

Também tivemos interesse em avaliar a expressão da forma curta da WNK1 a KS-WNK1 que parece modular negativamente a WNK1 nos modelos de hipercalemia onde observamos um aumento do nível plasmático de aldosterona. NCC é ativado por WNK1, mas se houver aumento da expressão de KS-WNK1 a ativação de NCC por WNK1 não acontece. O que podemos observar no modelo de depleção é uma redução significativa na expressão da KS-WNK1 (Figura 33), pois neste modelo encontramos um aumento do nível plasmático de

Ang II que reduz a expressão da KS-WNK1 com aumento da expressão e liberação da WNK1 que ativa a SPAK e fosforila NCC aumentando a reabsorção de Na^+ sem afetar a excreção de K^+ .

Figura 33 - Efeito da depleção de K^+ sobre a quantidade de RNAm da KS-WNK1. Os valores de expressão de KS-WNK1 apresentados como % do controle já foram normalizados pelos valores de expressão de β - actina e estão apresentados como média. * $p < 0.0198$, como indicado no teste “*t*” de *Student*.

Também tivemos interesse em avaliar o nível de expressão da WNK4, pois ela inibe NCC e no estado basal a WNK4 age como inibidora de ROMK, assim como WNK1 e WNK3. No modelo de depleção de K^+ observamos na Figura 34 um aumento pronunciado da WNK4 ~120% quando comparado ao controle.

Figura 34 - Efeito da depleção de K^+ sobre a quantidade de RNAm da WNK4. Os valores de expressão de WNK4 apresentados como % do controle já foram normalizados pelos valores de expressão de β -actina e estão apresentados como média. ** $p < 0.0029$, como indicado no teste “ t ” de *Student*.

6 DISCUSSÃO

A modulação do transporte tubular renal por Ang II e aldosterona vem sendo amplamente estudada há várias décadas. A Ang II, além de induzir alterações na hemodinâmica renal, modula o transporte tubular em túbulos proximais, ativando NHE3, NBC1 e Na^+/K^+ -ATPase. Recentemente, no entanto, tem sido observado que o efeito direto da Ang II no néfron distal, sensível a aldosterona, também é importante. A descoberta de que o receptor AT1 interage com outras proteínas que podem modular seus mecanismos de sinalização, como ATRAP, adicionou mais complexidade ao sistema. As evidências são de que a expressão renal de ATRAP é importante para a homeostase pressórica, já que camundongos com *knockout* de ATRAP mostram aumento do volume extracelular e da pressão arterial. Além disso, animais com hiperexpressão de ATRAP restrita a túbulos distais não desenvolvem hipertensão, nem aumento da expressão de NCC e ENaC, em resposta a Ang II (45).

Já havia sido observado por Tsurumi et al. (2006) que animais submetidos a dieta com baixo teor de sódio mostravam redução na expressão renal de ATRAP e de AT1R. A depleção de sódio, com consequente contração do volume extracelular, é uma situação que estimula o sistema SRAA, resultando em aumento tanto de Ang II como de aldosterona no plasma (39). Perguntamo-nos, então, como estaria a expressão ATRAP na depleção de K^+ , uma condição que, embora associada a aumento da renina, não está associada a aumento da aldosterona.

Em nossos experimentos, utilizamos ratos que foram tratados com dieta sem K^+ ou com dieta controle, com 3,6 g/kg (0,36%) de K^+ , ambas com a mesma composição no que se refere à NaCl e teor calórico. As alterações renais que observamos nos animais com depleção de K^+ tais como hipertrofia renal, redução na fração de excreção de K^+ , redução na osmolaridade urinária e aumento do fluxo urinário, indicavam que os animais estavam depletados de K^+ . Associado a isso, observamos redução na concentração plasmática de K^+ de 4,8 para 2,9 mM, elevação dos níveis plasmáticos de Ang II, sem alteração nos níveis de aldosterona.

Além da depleção de K^+ , esses pareciam também ter passado por um período de balanço negativo de Na^+ , seja por menor ingestão de ração, seja por mais excreção de Na^+ nos primeiros dias, decorrente dos efeitos da privação de K^+ sobre mecanismos de transporte de Na^+ , especialmente em segmento espesso da alça de Henle. Isso explicaria a significativa redução na fração de excreção de Na^+ observada nesses animais. A menor reabsorção de NaCl

no segmento espesso explica também a isotonicidade medular, responsável pela redução da osmolaridade urinária e poliúria. A poliúria pode ser consequência também da redução na expressão de aquaporina 2 (AQP2), associada à depleção de K^+ (14). Como relatado por Jeon et al. em 2007, os animais hipocalemicos mostram redução do fator de transcrição TonEBP (Tonicity-responsive Enhancer), que estimula o promotor do gene da AQP2. Este fator de transcrição é da família dos fatores de transcrição NFAT. A hipótese proposta é que animais com hipocalcemia desenvolvem hipotonicidade medular, essa hipotonicidade leva a menor expressão de TonEBP e, conseqüentemente, redução na transcrição e expressão de AQP2 nos ductos coletores corticais e medulares (66). Em nossos animais, não observamos alterações na concentração Na^+ nem na osmolaridade plasmáticas.

Tsurumi et al. em 2006 analisaram animais submetidos à depleção de Na^+ e observaram redução de ~ 70% em AT1R, e redução de ~30% em ATRAP (39). Essas observações em relação à expressão de AT1R, no entanto, não estão de acordo com o observado por Cheng, e col (1995), que descreveram aumento da expressão de AT1R em túbulos proximais de coelhos submetidos à restrição de sal (67).

Wang et al. (2010) já haviam relatado aumento na expressão de AT1R em tecido renal em ratos e camundongos submetidos à depleção de K^+ (dieta com 0,1% de K^+) (68). Em nossos animais depletados de K^+ , que possivelmente também tivessem alguma depleção de volume extracelular, nós observamos que a expressão de AT1R em lisado celular total de córtex renal aumentou 5,7 vezes, enquanto a expressão de ATRAP aumentou 2,2 vezes. Em membranas apicais, AT1R aumentou 2,3 vezes, enquanto ATRAP aumentou 1,2 vezes. O aumento de AT1R em extrato nuclear também foi maior (3,1 vezes) que o de ATRAP (2,2). O aumento na quantidade de proteína não foi acompanhado de aumento na quantidade de RNAm.

Assim, nas frações celulares analisadas, a proporção entre AT1R e ATRAP aumentou significativamente. Se realmente ATRAP é um modulador negativo de AT1R, talvez o aumento da razão ATRAP/AT1R explique porque não houve inibição da sinalização de AT1R, como aumento da fosforilação de c-Src, ERK1/2 e p38 MAP cinase, cuja ativação já havia sido descrita em outros laboratórios em animais com depleção de K^+ .

No entanto, é possível que essa hipótese de que ATRAP funcione apenas como modulador negativo de AT1R seja excessivamente simplificadora. O aumento de ATRAP associado a aumento de AT1R poderia ter outras funções reguladoras, tais como aumentar a reciclagem de PIP2 para a membrana plasmática que se depleta deste componente quando

AT1R é ativado por Ang II. Essa reposição de PIP2 poderia envolver RdgB β , um translocador de fosfoinositóis que interage com ATRAP. Em retina, já foi observado que *knockout* de ATRAP reduz a sinalização de Ca²⁺ mediada por AT1R/Ang II.

Verificamos também a expressão de AT1R e ATRAP nas glândulas adrenais de animais com depleção de K⁺. Também neste tecido houve aumento da expressão de AT1R nos animais com baixo K⁺, mas a elevação em ATRAP não chegou a ser significativa. Embora não mostrado, animais com sobrecarga de K⁺ apresentaram redução significativa de ATRAP em adrenal, ao lado de redução não significativa em AT1R. Neste tecido, assim como em rins, as variações na expressão de AT1R são acompanhadas de variações de ATRAP na mesma direção.

Não foi possível ainda identificar em quais segmentos tubulares houve aumento da expressão de ATRAP, o que poderia auxiliar no esclarecimento da função de ATRAP nos mecanismos adaptativos renais à depleção de K⁺.

Em experimentos de *patch-clamp* realizados em membrana apical de células principais de ductos coletores (dissecados e abertos), Wei, e col. (2007) observaram que Ang II inibe os canais para K⁺ ROMK (Kir1.1), de forma dose dependente, em ductos coletores de animais depletados de K⁺, mas não em animais controles. Esse efeito era mediado por AT1R, uma vez que era inibido por losartan (69). A inibição de ROMK era dependente de NADPH oxidase, PKC e cinases de tirosinas (PTKs – *protein tyrosin kinases*). PTKs mostraram-se ativadas em nossos animais com depleção de K⁺, entre elas a c-Src, que é ativada por radicais peróxidos gerados por NADPH oxidase. NADPH oxidase, por sua vez, é ativada por PKC, a principal via dependente de proteína G ativada por Ang II.

A hipertrofia renal desencadeada pela restrição de K⁺ é um fenômeno já conhecido e pode ser devido às ações da Ang II. A Ang II tem efeito hipertrófico em outros tecidos, como miócitos cardíacos e células musculares lisas de vasos. A hipertrofia renal desencadeada pela restrição de K⁺ pode ser abolida por bloqueadores de AT1R, como já referido na introdução. A hipertrofia de células de túbulos proximais induzida por Ang II parece ser dependente de p27^{kip21}, um inibidor de cinases dependentes de ciclinas (CDKs), cuja expressão é induzida por Ang II, por mecanismos dependentes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de ERK1/2, resultando em interrupção do ciclo celular em G1 (70). No entanto, embora p27^{kip21} seja um pré-requisito para a hipertrofia mediada por Ang II, a simples hiperexpressão de p27^{kip21} não é suficiente para induzir hipertrofia, sugerindo que Ang II desencadeie outros efeitos necessários para hipertrofia, não dependentes de p27^{kip21}. É possível que a ativação de

fatores de transcrição da família dos NFATs tenha algum papel nessa hipertrofia tubular, mas isso precisa ser avaliado. ATRAP interfere com a ativação de calcineurina pela Ang II, o que é dependente de CAML, outra proteína que interage com ATRAP. *Knockdown* de ATRAP em células HEK293 aumenta a ativação de NFAT e a superexpressão de ATRAP reduz ativação de NFAT mediada por Ang II ou CAML. Seria importante avaliar essa via em células tubulares renais.

Outra modificação funcional que ocorre em túbulos proximais de animais com depleção de K^+ é o aumento da produção de NH_4^+ pela ativação do metabolismo da glutamina, o que é usualmente atribuído à redução do pH intracelular observada em situações de hipocalemia, embora outros mecanismos possam estar envolvidos (71).

A redução na drástica na fração de excreção de K^+ deve à inibição da secreção de K^+ em túbulo distal final, segmento de conexão e ductos coletores, muito provavelmente associada ao aumento da atividade da $H^+-K^+-ATPase$, que promove reabsorção de K^+ , em células intercaladas alfa de ductos coletores.

Como já comentado na introdução, na vigência de restrição de K^+ , o transporte de Na^+ é desviado de segmento de distal final e coletor cortical, para distal inicial, onde a reabsorção de Na^+ não está acoplada à secreção de K^+ . O mesmo ocorre quando há depleção de volume, e o oposto, quando há sobrecarga de K^+ , condição em que a reabsorção de Na^+ deve ser desviada para ducto coletor, onde a reabsorção de Na^+ está indiretamente acoplada à secreção de K^+ . Como em ambas as situações, depleção de volume e sobrecarga de K^+ , ocorre aumento da produção de aldosterona, esse fenômeno é denominado paradoxo da aldosterona. O paradoxo poderia ser explicado pelo aumento da Ang II na depleção de volume, e redução desta na sobrecarga de K^+ .

A cinase WNK4 parece ser a chave que faz conversão dos rins perdedores de K^+ em poupadores de K^+ . Nos animais depletados de K^+ observamos aumento tanto do RNAm de WNK1 como de WNK4, enquanto o RNAm de KS-WNK1 diminuiu.

WNK4 constitui a principal via de ativação de NCC, como demonstrado recentemente por Takahashi et al. (2014) em camundongos com inativação de WNK4 ($WNK4^{-/-}$). Embora, em experimentos com oócitos, NCC tenha sido inibido por WNK4, os resultados de Takahashi mostram que WNK4 nunca induz inibição de NCC no animal in vivo; além disso, a ativação de NCC por estímulos como Ang II, depleção de K^+ e insulina, não é observada em animais $WNK4^{-/-}$ (72). O mesmo foi observado por Castañeda-Bueno et al. (2012) (73). Em animais $WNK4^{-/-}$ há considerável aumento de WNK1, que aumenta ainda mais em animais

WNK4^{-/-} com depleção de K⁺ (72). O aumento de WNK1 é suficiente para aumentar a fosforilação de SPAK, mas ainda assim não há ativação de NCC, cujos níveis de fosforilação permanecem indetectáveis.

Van der Lubbe et al. (2013), mostraram que o NCC desfosforila em 15 minutos após ingestão de K⁺. Esses autores mostram aumento discreto de WNK4 em animais com sobrecarga de K⁺, e redução de WNK4 naqueles com sobrecarga de K⁺ e injeção de Ang II (74). Por outro lado, Castañeda-Bueno et al. (2012) mostraram aumento de 379% na fosforilação de NCC e de 217% na fosforilação de SPAK em animais *wild-type* após infusão de Ang II (73). Essas observações parecem contraditórias. É mais provável que sobrecarga de K⁺ reduza WNK4, e Ang II aumente.

Embora WNK4 e WNK1 não inibam NCC, ambas as cinases inibem ROMK. A inibição de ROMK nos estados de depleção de K⁺ se deve, pelo menos em parte, à ativação de PTKs da família c-Src que fosforilam diretamente ROMK que, fosforilado, sofre endocitose (75). WNK1 e WNK4 também aumentam a internalização de ROMK.

Utilizando a técnica de *patch-clamp* em membrana apical de células principais de ductos coletores de ratos submetidos à dieta normal ou com K⁺ baixo, Wei, e col (2007) mostraram que Ang II inibe ROMK, de forma dose dependente, em ductos coletores de animais com depleção de K⁺, mas não naqueles sem depleção. Esse efeito da Ang II dependia de AT1R e desaparecia na presença de inibidores de PLC e PKC, assim como com inibidores de NADPH oxidase (69). Yue et al. (2011), utilizando células HEK293 expressando AT1R de forma estável e transfectadas com ROMK1, mostraram que ROMK1 não era inibido por WNK4 na presença de SGK1, mas o efeito inibitório de WNK4 podia ser restaurado pela ativação de AT1R por Ang II, de forma dependente de PTK e PKC, mesmo quando o canal era mutado no sítio de fosforilação por c-Src (76). Esses experimentos mostram que Ang II é fundamental para que haja inibição de ROMK por WNK4 e, interessante, o efeito da Ang II na inibição de ROMK é observado apenas em ductos coletores de animais depletados de K⁺.

Lin et al. (2012) identificaram em WNK4 dois sítios de ligação da fosfatase PP1, aminoácidos 695-699 e 1211-1215. WNK4 com deleção desses aminoácidos era capaz de inibir ROMK tão bem como a WNK4 normal. No entanto, a expressão de c-Src podia restaurar o efeito inibitório da WNK4 normal e com deleção dos aminoácidos 1211-1215 na presença de SGK1, mas não da WNK4 com deleção dos aminoácidos 695-699; além disso c-Src diminuía a fosforilação da Ser-1196 de WNK4 por SGK1 em células transfectadas com

WNK4 com deleção dos aminoácidos 1211-1215 (75). Essas observações sugerem que c-Src module a interação de WNK4 com SGK1 por meio da ativação de uma fosfatase que se liga aos aminoácidos 695-699 e diminui a fosforilação de WNK4, restaurando sua capacidade de inibir ROMK. A inibição de tirosina-cinases da família c-Src aumenta a atividade de ROMK em ductos coletores de animais com depleção de Na^+ e, portanto, com depleção de volume, evidenciando que a ativação dessas cinases é fundamental para a preservação de K^+ nessas circunstâncias.

O que faz com que Ang II iniba ROMK em ductos coletores isolados de animais com depleção de K^+ , mas não naqueles com dieta normal? A Ang II não aumenta a ativação de c-Src em animais sem depleção de K^+ ? Isso muito provavelmente está relacionado ao aumento do número de receptores AT1, mas também poderia se dever ao aumento concomitante de ATRAP, que contribuiria para a ativação sustentada de PKC, devido à reposição de PIP2 na membrana plasmática, possibilitando a ativação da NADPH oxidase e a subsequente ativação de c-Src.

7 CONCLUSÕES

- 1 - Ratos com depleção de K^+ por 7 dias apresentaram hipertrofia renal e alterações funcionais renais já previamente descritas para essa condição: déficit na capacidade de concentrar a urina, poliúria e redução na FE de K^+ e FE de Na^+ .
- 2- A depleção de K^+ aumentou o nível plasmático de Ang II sem alterar o nível de aldosterona.
- 3 - A restrição de K^+ induziu aumento da expressão de AT1R, em todas frações estudadas, especialmente em lisado total.
- 4 - A restrição de K^+ induziu aumento de ATRAP em fração de membranas, especialmente em membrana total, além de acentuado aumento na fração nuclear.
- 5 - A razão ATRAP/AT1R mostrou-se reduzida na depleção de K^+ .
- 6 - A depleção de K^+ não altera significativamente a taxa de transcrição de AT1R, ATRAP, NHE3 e CFEX.
- 7 - O padrão de expressão de AT1R na glândula adrenal se comportou como no rim com aumento significativo o que não foi observado no padrão de expressão da ATRAP.
- 8 - A restrição de K^+ levou a ativação das vias das MAPKs com aumento do nível de fosforilação da c-Src, ERK1/2 e p38.
- 9 - A restrição de K^+ induziu aumento na expressão de WNK1 e WNK4, e diminuição de KS-WNK1, o que parece ser essencial para a inibição da secreção de K^+ em néfron distal.

REFERÊNCIAS¹

1. Giebisch GH, Wang WH. Potassium transport--an update. *J Nephrol.* 2010;23 Suppl; S97-104.
2. Wang WH, Giebisch G. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch.* 2009;458:157-68.
3. He FJ, MacGregor GA. Beneficial effects of potassium on human health. *Physiol Plant.* 2008;133:725-35.
4. Lee H, Lee J, Hwang SS, Kim S, Chin HJ, Han JS, Heo NJ. Potassium intake and the prevalence of metabolic syndrome: the Korean national health and nutrition examination survey 2008-2010. *PLoS One.* 2013;8:e55106.
5. Coruzzi P, Brambilla L, Brambilla V, Gualerzi M, Rossi M, Parati G, Di RM, Tadonio J, Novarini A. Potassium depletion and salt sensitivity in essential hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2857-62.
6. Geleijnse JM, Witteman JC, Bak AA, den Breeijen JH, Grobbee DE. Reduction in blood pressure with a low sodium, high potassium, high magnesium salt in older subjects with mild to moderate hypertension. *BMJ.* 1994;309:436-40.
7. Lawton WJ, Fitz AE, Anderson EA, Sinkey CA, Coleman RA. Effect of dietary potassium on blood pressure, renal function, muscle sympathetic nerve activity, and forearm vascular resistance and flow in normotensive and borderline hypertensive humans. *Circulation.* 1990;81:173-84.
8. Matthesen SK, Larsen T, Vase H, Lauridsen TG, Pedersen EB. Effect of potassium supplementation on renal tubular function, ambulatory blood pressure and pulse wave velocity in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012;72:78-86.
9. Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290:546-52.
10. Elger M, Bankir L, Kriz W. Morphometric analysis of kidney hypertrophy in rats after chronic potassium depletion. *Am J Physiol.* 1992;262:F656-67.
11. Ray PE, Suga S, Liu XH, Huang X, Johnson RJ. Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats. *Kidney Int.* 2001;59:1850-8.
12. Walter SJ, Shore AC, Shirley DG. Effect of potassium depletion on renal tubular function in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1988;75:621-8.

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

13. Mennitt PA, Frindt G, Silver RB, Palmer LG. Potassium restriction downregulates ROMK expression in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278:916-24.
14. Marples D, Frokiaer J, Dorup J, Knepper MA, Nielsen S. Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest.* 1996;97:1960-8.
15. Elkjaer ML, Kwon TH, Wang W, Nielsen J, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283:1376-88.
16. Buffin-Meyer B, Marsy S, Barlet-Bas C, Cheval L, Younes-Ibrahim M, Rajerison R, Doucet A. Regulation of renal Na⁺,K⁺-ATPase in rat thick ascending limb during K⁺ depletion: evidence for modulation of Na⁺ affinity. *J Physiol.* 1996;490:623-32.
17. McDonough AA, Magyar CE, Komatsu Y. Expression of Na⁺-K⁺-ATPase alpha- and beta-subunits along rat nephron: isoform specificity and response to hypokalemia. *Am J Physiol.* 1994;267:901-8.
18. Vander AJ. Direct effects of potassium on renin secretion and renal function. *Am J Physiol.* 1970;219:455-9.
19. Sealey JE, Clark I, Bull MB, Laragh JH. Potassium balance and the control of renin secretion. *J Clin Invest.* 1970;49:2119-27.
20. Brunner HR, Baer L, Sealey JE, Ledingham JG, Laragh JH. The influence of potassium administration and of potassium deprivation on plasma renin in normal and hypertensive subjects. *J Clin Invest.* 1970;49:2128-38.
21. Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension.* 1994;24:531-7.
22. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:415-72.
23. Kim J, Ahn S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2009;284:11953-62.
24. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alpha11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem.* 1998;273:19772-7.
25. Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Ling BN, Bernstein KE. Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* 1996;8:21-6.
26. Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y, Inagami T. Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at

Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J Biol Chem.* 1999;274:36843-51.

27. Giannoni E, Chiarugi P. Redox circuitries driving Src regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20:2011-25.

28. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-23.

29. Block K, Eid A, Griendling KK, Lee DY, Wittrant Y, Gorin Y. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J Biol Chem.* 2008;283:24061-76.

30. Xi G, Shen XC, Wai C, Clemmons DR. Recruitment of Nox4 to a plasma membrane scaffold is required for localized reactive oxygen species generation and sustained Src activation in response to insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem.* 2013;288:15641-53.

31. Kim EJ, Jung YW, Kwon TH. Angiotensin II AT1 receptor blockade changes expression of renal sodium transporters in rats with chronic renal failure. *J Korean Med Sci.* 2005;20:248-55.

32. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 2001;53:1-24.

33. Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res.* 2001;11:165-80.

34. Zimmerman B, Beaudrait A, Aguila B, Charles R, Escher E, Claing A, Bouvier M, Laporte SA. Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal.* 2012;5:ra33.

35. Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* 2003;546:65-72.

36. Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griesse DP, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem.* 1999;274:17058-62.

37. Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ. The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol Biol Cell.* 2003;14:5038-50.

38. Cockcroft S, Garner K. 14-3-3 protein and ATRAP bind to the soluble class IIB phosphatidylinositol transfer protein RdgBbeta at distinct sites. *Biochem Soc Trans.* 2012;40:451-6.

39. Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y, Koide Y, Sakai M, Yabana M, Noda Y, Hashimoto T, Kihara M, Hirawa N, Toya Y, Kiuchi Y, Iwai M, Horiuchi M, Umemura S. Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. *Kidney Int.* 2006;69:488-94.
40. Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, Wakui H, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Tanaka Y, Sakai M, Matsuda M, Hashimoto T, Ishigami T, Lopez-Ilasaca M, Umemura S. Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2007;50:926-32.
41. Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Tamura K, Daviet L, Horiuchi M. ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:938-41.
42. Oppermann M, Gess B, Schweda F, Castrop H. Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:468-77.
43. Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga A, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299:991-1003.
44. Oshita A, Iwai M, Chen R, Ide A, Okumura M, Fukunaga S, Yoshii T, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Attenuation of inflammatory vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor-associated protein. *Hypertension.* 2006;48:671-6.
45. Wakui H, Tamura K, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Fujita M, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Matsuda M, Kitamura K, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nagahama K, Yamashita A, Umemura S. Enhanced angiotensin receptor-associated protein in renal tubule suppresses angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension.* 2013;61:1203-10.
46. Bram RJ, Crabtree GR. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature.* 1994;371:355-8.
47. Holloway MP, Bram RJ. A hydrophobic domain of Ca²⁺-modulating cyclophilin ligand modulates calcium influx signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1996;271:8549-52.
48. Guo S, Lopez-Ilasaca M, Dzau VJ. Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) as transducer of angiotensin II-mediated nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation. *J Biol Chem.* 2005;280:12536-41.
49. Ni YG, Berenji K, Wang N, Oh M, Sachan N, Dey A, Cheng J, Lu G, Morris DJ, Castrillon DH, Gerard RD, Rothermel BA, Hill JA. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation.* 2006;114:1159-68.
50. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 2000;275:8719-25.

51. Min LJ, Mogi M, Tamura K, Iwanami J, Sakata A, Fujita T, Tsukuda K, Jing F, Iwai M, Horiuchi M. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein prevents vascular smooth muscle cell senescence via inactivation of calcineurin/nuclear factor of activated T cells pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:798-809.
52. Garner K, Li M, Ugwuanya N, Cockcroft S. The phosphatidylinositol transfer protein RdgBbeta binds 14-3-3 via its unstructured C-terminus, whereas its lipid-binding domain interacts with the integral membrane protein ATRAP (angiotensin II type I receptor-associated protein). *Biochem J.* 2011;439:97-111.
53. Barro-Soria R, Stindl J, Muller C, Foeckler R, Todorov V, Castrop H, Strauss O. Angiotensin-2-mediated Ca²⁺ signaling in the retinal pigment epithelium: role of angiotensin-receptor-associated-protein and TRPV2 channel. *PLoS One.* 2012;7:e49624.
54. Wang W, Huang Y, Zhou Z, Tang R, Zhao W, Zeng L, Xu M, Cheng C, Gu S, Ying K, Xie Y, Mao Y. Identification and characterization of AGTRAP, a human homolog of murine Angiotensin II Receptor-Associated Protein (Agtrap). *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:93-102.
55. Adams DR, Ron D, Kiely PA. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal.* 2011;9:22.
56. Parent A, Laroche G, Hamelin E, Parent JL. RACK1 regulates the cell surface expression of the G protein-coupled receptor for thromboxane A(2). *Traffic.* 2008;9:394-407.
57. LeHoux JG, Bird IM, Rainey WE, Tremblay A, Ducharme L. Both low sodium and high potassium intake increase the level of adrenal angiotensin-II receptor type 1, but not that of adrenocorticotropin receptor. *Endocrinology.* 1994;134:776-82.
58. Bird IM, Mason JI, Rainey WE. Hormonal regulation of angiotensin II type 1 receptor expression and AT1-R mRNA levels in human adrenocortical cells. *Endocr Res.* 1995;21:169-82.
59. Burns KD, Smith IB. Potassium depletion stimulates mRNA expression of proximal tubule AT1 angiotensin II receptors. *Nephron.* 1998;78:73-81.
60. Jin Y, Wang Y, Wang ZJ, Lin DH, Wang WH. Inhibition of angiotensin type 1 receptor impairs renal ability of K conservation in response to K restriction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296:1179-84.
61. Vallon V, Schroth J, Lang F, Kuhl D, Uchida S. Expression and phosphorylation of the Na⁺-Cl⁻ cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium, and SGK1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297:704-12.
62. San-Cristobal P, Ponce-Coria J, Vazquez N, Bobadilla NA, Gamba G. WNK3 and WNK4 amino-terminal domain defines their effect on the renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295:1199-2006.
63. McCormick JA, Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev.* 2011;91:177-219.

64. Melnikov S, Mayan H, Uchida S, Holtzman EJ, Farfel Z. Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:1113-20.
65. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25:1327-33.
66. Jeon US, Han KH, Park SH, Lee SD, Sheen MR, Jung JY, Kim WY, Sands JM, Kim J, Kwon HM. Downregulation of renal TonEBP in hypokalemic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293:408-15.
67. Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC. Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J Clin Invest*. 1995;95:2012-19.
68. Wang ZJ, Sun P, Xing W, Pan C, Lin DH, Wang WH. Decrease in dietary K intake stimulates the generation of superoxide anions in the kidney and inhibits K secretory channels in the CCD. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298:1515-22.
69. Wei Y, Zamilowicz B, Satlin LM, Wang WH. Angiotensin II inhibits the ROMK-like small conductance K channel in renal cortical collecting duct during dietary potassium restriction. *J Biol Chem*. 2007;282:6455-62.
70. Wolf G, Jablonski K, Schroeder R, Reinking R, Shankland SJ, Stahl RA. Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1. *Kidney Int*. 2003;64:71-81.
71. Abu HS, Chaudhry FA, Zahedi K, Siddiqui F, Amlal H. Cellular and molecular basis of increased ammoniogenesis in potassium deprivation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301:969-78.
72. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep*. 2014;34.
73. Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez LG, Vazquez N, Uribe N, Kantesaria S, Morla L, Bobadilla NA, Doucet A, Alessi DR, Gamba G. Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:7929-34.
74. Van der Lubbe N, Moes AD, Rosenbaek LL, Schoep S, Meima ME, Danser AH, Fenton RA, Zietse R, Hoorn EJ. K⁺-induced natriuresis is preserved during Na⁺ depletion and accompanied by inhibition of the Na⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305:1177-88.
75. Lin DH, Yue P, Rinehart J, Sun P, Wang Z, Lifton R, Wang WH. Protein phosphatase 1 modulates the inhibitory effect of With-no-Lysine kinase 4 on ROMK channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303:110-9.
76. Yue P, Sun P, Lin DH, Pan C, Xing W, Wang W. Angiotensin II diminishes the effect of SGK1 on the WNK4-mediated inhibition of ROMK1 channels. *Kidney Int*. 2011;79:423-31.