

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria**

FÁBIO LUIZ FERNANDES ROSA

**Estudo funcional das mutações p.R947X e p.L848P e
estudo de efeito fundador da mutação p.R947X no gene
do receptor do mineralocorticoide**

**Ribeirão Preto
Novembro de 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fábio Luiz Fernandes Rosa

**Estudo funcional das mutações p.R947X e p.L848P e
estudo de efeito fundador da mutação p.R947X no gene
do receptor do mineralocorticoide**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Medicina**

**Área de Concentração: Saúde da Criança e do
Adolescente**

Orientador: Sonir Roberto Rauber Antonini

**Ribeirão Preto
Novembro de 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes-Rosa, Fábio Luiz

Estudo funcional das mutações p.R947X e p.L848P e estudo de efeito fundador da mutação p.R947X no gene do receptor do mineralocorticóide

106 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/

USP ó Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Antonini, Sonir Roberto Rauber.

1. Pseudohipoaldosteronismo tipo 1 2. Receptor do mineralocorticóide. 3. Aldosterona. 4. Mutação.

RESUMO

A forma renal do pseudohipoaldosteronismo tipo 1 (PHA1) caracteriza-se por perda de sal no período neonatal secundária a uma resistência renal à ação dos mineralocorticóides. A forma renal do PHA1 ocorre por mutações inativadoras no gene do receptor do mineralocorticóide (MR). No presente estudo avaliamos a possibilidade de um efeito fundador para a mutação MR p.R947X em famílias turcas e uma família brasileira com PHA1. A análise de marcadores flanqueando o gene do MR mostrou diferentes haplótipos segregando com a mutação em cada família. Excluimos, portanto, a possibilidade de efeito fundador desta mutação, caracterizando o primeiro *hot spot* mutacional no gene do MR. Avaliamos, também, se os polimorfismos MR c.-2G>C, α ENaC p.C618F e β ENaC p.G442V poderiam influenciar os diferentes fenótipos observados nos indivíduos brasileiros portadores da mutação MR p.R947X. Todos os indivíduos estudados foram homocigotos para os alelos mais frequentes destes polimorfismos, descartando-se a participação destes polimorfismos na variabilidade fenotípica destes indivíduos. Realizamos o estudo funcional das mutações MR p.R947X e da mutação MR p.L848P, encontrada em outra família com PHA1. A análise transcricional, realizada em culturas de células RCSV3 transfectadas com o MR nativo ou com os receptores mutantes evidenciou a ausência de atividade transcricional induzida pela aldosterona para a mutação p.R947X e transativação significativamente reduzida do receptor mutante MR P848. Adicionalmente, estudamos a expressão de genes responsivos à aldosterona (*SGK1*, *SCNN1A* e *GILZ*), em células HK transfectadas com os MR nativo e os mutantes MR X947 e MR P848. Nas células transfectadas com os receptores mutantes, o padrão de expressão destes genes foi diferente do padrão observado com o MR nativo, não tendo sido observado incremento significativo da expressão gênica com os receptores mutados. Desta forma, a atividade transcricional reduzida observada nos receptores mutantes MR X947 e MR P848, comprova a participação destas mutações no fenótipo do PHA1.

Summary

The renal form of pseudohypoaldosteronism type 1 (PHA1) is a rare genetic disease characterized by neonatal renal salt wasting resulting from a renal resistance to aldosterone. Loss-of-function mutations in the mineralocorticoid receptor (MR) gene are associated with the renal form of PHA1. In this study, we investigated the presence of a founder effect for the mutation MR p.R947X in Brazilian and Turkey families with PHA1. The analysis of microsatellites flanking the MR gene locus and intragenic MR polymorphisms showed different haplotypes segregating with the MR p.R947X mutation in each family. Therefore, we excluded the possibility of a founder effect for this mutation and we described the first mutational hot spot in the MR gene. We studied the association among the polymorphisms MR c.-2G>C, α ENaC p.C618F and β ENaC p.G442V with large phenotypic variability observed in the carriers of the MR p.R947X mutation. All subjects were homozygous for the common alleles of these polymorphisms. Therefore, these polymorphisms were not associated with the different phenotypes observed. We performed the functional analysis of the mutation MR p.R947X and the mutation MR p.L848P, found in another family with PHA1. We observed impaired transcriptional activity of the mutant MR P848 and abolished transactivation of the mutant MR X947 in comparison with the wild type receptor in transfected RCSV3 cells. In addition, we analyzed the expression of responsive genes to aldosterone (SGK1, SCNN1A e GILZ) in HK cells transfected with either the wild type MR or the mutants MR X947 and MR P848. The pattern of genetic expression observed in cells transfected with the mutants MR was significantly different of the pattern observed in wild type ones. The expression of SGK1, GILZ and SCNN1A did not increase after the aldosterone stimulation in cells transfected with the mutants MR. In conclusion, the reduced transcriptional activity observed for the mutants MR X947 and MR P848 supports the major role of these mutations in the phenotype of PHA1.

Lista de abreviaturas

11 β -HSD2: 11 beta hidroxisteróide desidrogenase tipo 2

A: adenina

A: alanina

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

C: citosina

CHIF: fator indutor de canal

C-terminal: Carbóxi-terminal

DBD: Domínio de ligação ao DNA

del : deleção

DNA: ácido desoxirribonucléico

ECA: enzima conversora da angiotensina I

ENaC: canal de sódio sensível à amilorida

G: guanina

GILZ: *glucocorticoid induced leucine zipper protein*

GR: receptor do glicocorticóide

hsp: proteínas de choque térmico

I: Isoleucina

KiRasA: proteína Kirsten-Ras tipo 2 A

L: Leucina

LBD: domínio de ligação ao hormônio

MR: receptor do mineralocorticóide

NaCl: cloreto de sódio

Na/K ATPase: bomba de sódio e potássio ATP dependente

NDRG2: *N-myc downstream-regulated gene 2*

NES: sinal de exportação nuclear

NSL1: região de sinalização nuclear

N-terminal: Amino-terminal

P: Prolina

pb: pares de base

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PHA1: Pseudohipoaldosteronismo tipo 1

PR: receptor de progesterona

PRA: Atividade de renina plasmática

qPCR: PCR quantitativa

R: Arginina

RNA: Ácido ribonucléico

RNAm: RNA mensageiro

ROMK: canal secretor de potássio

SRE: elementos responsivos aos esteróides

SGK-1: *serum and glucocorticoid-induced kinase* tipo 1

T: timina

V: valina

X: códon de parada prematura

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática da estrutura do hMR apresentando o gene do *MR*, RNAm, proteína, domínios funcionais e modificações pós traducionais-----16
- Figura 2.** Modelo de ação genômica da aldosterona em célula epitelial----- 21
- Figura 3.** A: Cromatograma representativo do éxon 9 do *MR* em sua seqüência de referência (CGA) da região do códon 947. B: Cromatograma representativo do éxon 9 *sense*, mostrando a mutação R947X-----26
- Figura 4.** A: Cromatograma representativo do éxon 7 do *MR* em sua seqüência de referência (CTA) da região do códon 848. B: Cromatograma representativo do éxon 7 mostrando a mutação L848P-----28
- Figura 5.** Família brasileira com portadores da mutação MR p.R947X-----34
- Figura 6.** Família brasileira com portadores da mutação MR p.L848P-----37
- Figura 7.** Representação esquemática do *locus* do gene do hMR no cromossomo 4-----38
- Figura 8.** Fotos representativas de gel de agarose com produtos de PCR-----53
- Figura 9.** Heredograma representando a segregação de haplótipos na família brasileira-----54

Figura 10. Heredograma representando a segregação de haplótipos na família turca 1-----	55
Figura 11. Heredograma representando a segregação de haplótipos na família turca 2-----	56
Figura 12. Haplótipos segregando com a mutação MR p.R947X na família brasileira e nas famílias turcas-----	57
Figura 13. Foto de gel SDS-PAGE 8% mostrando o resultado da transcrição/tradução <i>in vitro</i> de plasmídios codificando o MR nativo e os mutantes MR P848 e MR X947-----	59
Fig 14. Transfecção do plasmídio repórter MMTV-luciferase-----	60
Fig 15. Transfecção do plasmídio repórter GRE2-luciferase-----	61
Figura 16. Expressão do gene <i>SGK1</i> em células HK transfectadas com MR, MR P848 e MR X947 nos tempos 0, 1 hora e 2 horas após a adição de aldosterona 10^{-8} M-----	62
Figura 17. Expressão do gene <i>SCNN1A</i> em células HK transfectadas com MR, MR P848 e MR X947 nos tempos 0, 1 hora e 2 horas após a adição de aldosterona 10^{-8} M-----	63

Figura 18. Expressão do gene *GILZ* em células HK transfectadas com MR, MR P848 e MR X947 nos tempos 0, 1 hora e 2 horas após a adição de aldosterona 10^{-8} M-----64

Lista de tabelas

Tabela 1. Correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X -----	26
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para o estudo de microssatélites do gene hMR--	39
Tabela 3. Oligonucleotídios utilizados para amplificação da região codificadora do fragmento B do exon 2 do gene do <i>MR</i> -----	41
Tabela 4. Polimorfismos Analisados e seus respectivos ensaios de discriminação alélica -----	43
Tabela 5. Seqüência de primers utilizados na PCR quantitativa-----	50

SUMÁRIO

Introdução	13
Objetivos	30
Materiais e Métodos	32
1-Indivíduos	33
1.A- Análise do Efeito Fundador	33
1.B- Família brasileira portadora da mutação MR p.L848P	36
2- Métodos	37
2.1- Análise do efeito fundador	37
2.2- Análise dos polimorfismos no MR e alfa e beta ENaC	41
2.3- Análise Funcional	44
3- Análise Estatística	50
Resultados	52
1- Análise de Efeito Fundador	53
2- Análise dos Polimorfismos	58
3- Análise funcional	58
3.1- Transcrição/tradução <i>in vitro</i>	58
3.2- Análise da atividade transcricional	59
3.3- Análise da expressão de genes responsivos à aldosterona	61
Discussão	65
Conclusões	81
Referências Bibliográficas	83

Introdução

Os mineralocorticóides são hormônios esteróides envolvidos na regulação de sódio e água, por meio da regulação do transporte de sódio nos tecidos epiteliais. A aldosterona é o principal mineralocorticóide humano e desempenha um papel crucial na regulação da pressão arterial e da homeostase eletrolítica. Sua ação principal ocorre pela interação com um receptor intracelular específico, o receptor do mineralocorticóide (MR) (Booth *et al.*, 2002; Sartorato, 2003; Geller, 2005). O MR é reconhecido como um fator de transcrição atuante em vários processos fisiológicos.

A presença de receptores específicos mediando a ação da aldosterona e outros esteróides adrenais na bexiga de sapos foi descrita originalmente em 1964 (Porter & Edelman, 1964). Estudos de ligação de aldosterona marcada com trício caracterizaram um receptor com afinidade elevada pela aldosterona, que atuava como regulador maior da reabsorção renal de sódio (Funder *et al.*, 1972). Analisando tecido renal de ratos, dois tipos de receptores de corticoesteróides foram descritos e identificados como tipo I (MR) e tipo II (receptor do glicocorticóide ou GR) (Marver *et al.*, 1974). O DNA complementar (cDNA) do receptor do mineralocorticóide humano (hMR) foi clonado em 1987 a partir de uma biblioteca de cDNA renal (Arriza *et al.*, 1987) e posteriormente foi clonado e caracterizado em diferentes espécies de anfíbios, aves, peixes e mamíferos (Pattel *et al.*, 1989; Greenwood *et al.*, 2003, Pryce *et al.*, 2005). Na última década foram identificados co-reguladores que medeiam a ação do MR sobre a transcrição de genes-alvo (Fuse *et al.*, 2000; Zennaro *et al.*, 2001; Pascual Le Tallec *et al.*, 2003; Obradovich *et al.*, 2004).

Estrutura Molecular do MR

O MR pertence à superfamília dos receptores nucleares, da qual fazem parte os outros receptores de hormônios esteróides (glicocorticóides, progesterona, estrogênio e androgênios), o receptor dos hormônios tireoidianos, o receptor do ácido retinóico, o receptor da vitamina D e os chamados receptores nucleares órfãos cujos ligantes ainda não foram identificados (Evans, 1988; Danielian *et al.*, 1992). O MR age como um fator de transcrição dependente da ligação ao hormônio (aldosterona), exercendo seus efeitos por meio da indução ou repressão de genes-alvo específicos (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

O gene do *MR* está localizado no cromossomo 4q31.1 e possui aproximadamente 450 quilobases (kb), sendo é composto por dez exons (Figura 1). Os éxons 1α e 1β correspondem à seqüência 5' não traduzida, onde estão localizadas duas regiões promotoras distintas. A proteína é codificada pelos exons 2 a 9 e, à semelhança de todos os membros da superfamília dos receptores nucleares, o MR possui três domínios funcionais maiores: domínio amino-terminal (NTD), domínio central de ligação ao DNA (DBD) e um domínio carboxi-terminal de ligação ao hormônio (LBD). O NTD do MR é codificado pelo éxon 2, que contém 2 pares de bases da região 5' não transcrita e 1757 pares de bases de seqüência codificada. Dois exons pequenos, 3 e 4, codificam os dois dedos de zinco do DBD. O LBD é codificado pelos exons 5 a 9 (Figura 1) (Zennaro *et al.*, 1995, Pascual-Le Tallec & Lombès, 2005).

O NTD do MR possui 602 aminoácidos cuja seqüência apresenta pouca homologia com os outros receptores esteróides. Entre diferentes espécies, entretanto, o NTD do MR é bastante conservado e apresenta mais de 50% de

homologia, sugerindo especificidade funcional. Dois domínios funcionais de ativação AF1-a e AF1-b, compreendendo os resíduos 1 a 167 e 445 a 600, respectivamente e um domínio central de inibição (resíduos 163 a 437) foram descritos recentemente (Pascual-Le Tallec *et al.*, 2003). Estes domínios do NTD recrutam diferentes co-reguladores responsáveis por modular seletivamente a atividade transcricional do MR, sendo, desta forma, determinantes importantes da especificidade do receptor (Pascual-Le Tallec *et al.*, 2005).

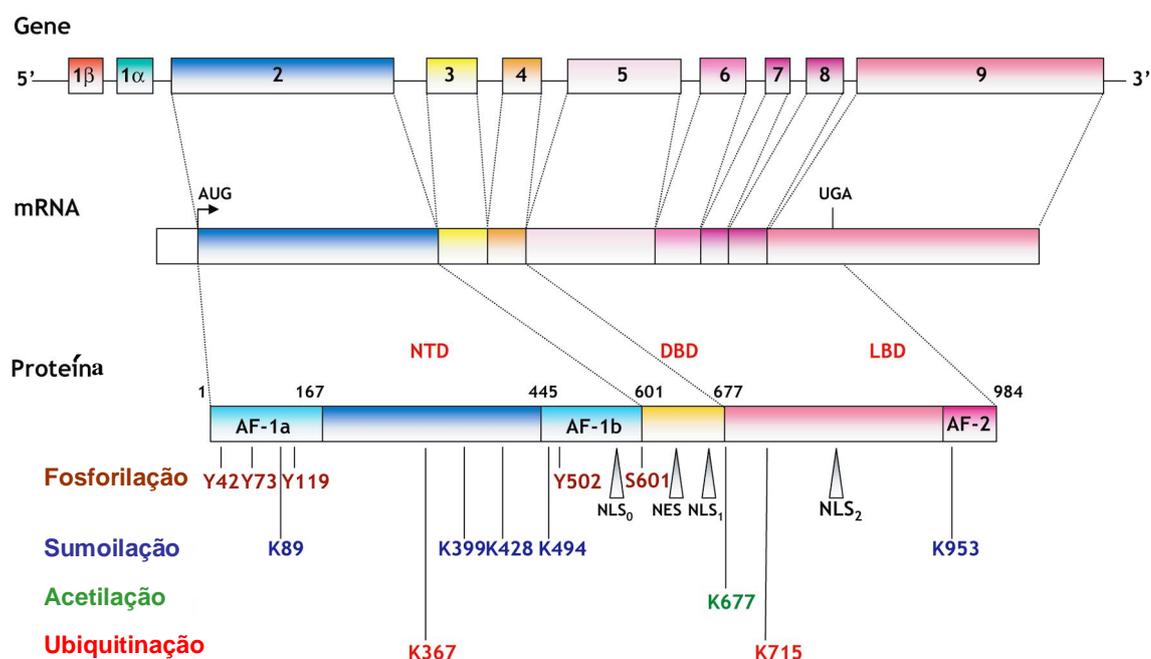


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do hMR apresentando o gene do MR, RNAm, proteína, domínios funcionais e modificações pós traducionais. As localizações de aminoácidos-alvo para fosforilação, acetilação, sumoilação e ubiquitinação são indicadas. AF: domínio de ativação funcional. NLS: sinal de localização nuclear. NES: sinal de exportação nuclear. (modificado de Viengchareun *et al.*, 2007).

O DBD do MR possui 66 aminoácidos, é altamente conservado e apresenta cerca de 90% de homologia entre os receptores esteróides. Caracteriza-se estruturalmente por duas α -hélices perpendiculares,

coordenadas por um íon zinco que interage com quatro resíduos cisteína (dedos de zinco). O primeiro dedo de zinco possui uma região conhecida por *Box+* que é responsável pela interação com elementos responsivos ao hormônio (HRE) no DNA dos genes-alvo. No segundo dedo de zinco está localizada a região *box+*, responsável pela dimerização do receptor (Liu *et al.*, 1995). Regiões de sinalização nuclear (NSL1) e de exportação nuclear (NES) também foram identificadas na região carboxi-terminal do DBD e entre os dedos de zinco, respectivamente (Black *et al.*, 2001). Existe uma grande similaridade estrutural e funcional entre o DBD do MR e o DBD do GR. Desta forma, mecanismos complexos de recrutamento de co-reguladores estão envolvidos na diferenciação de suas atividades transcricionais (Pascual-Le Tallec & Lombés, 2005).

O LBD do hMR é um domínio complexo e multifuncional composto por 251 resíduos e apresenta 60% de homologia com outros receptores esteróides e mais de 85% de homologia com o MR de outras espécies (Pascual-Le Tallec & Lombés 2005). Sua ação consiste em ligação hormonal específica e tradução da mensagem hormonal em respostas transcricionais específicas. A estrutura tridimensional do LBD do MR foi descrita recentemente e é caracterizada por onze α -hélices e uma β -fita, formando três camadas antiparalelas (Bledsoe *et al.*, 2005; Fagart *et al.*, 2005). Na ausência do ligante, o LBD apresenta sítios de interação com proteínas de choque térmico (HSP) como HSP 90, HSP 70 e imunofilinas (Binart *et al.*, 1991, Pratt *et al.*, 1997). Ao se ligar à aldosterona, estas interações são perdidas, sendo exposto o sinal de localização nuclear (NLS2) que é responsável pela translocação do receptor ativado (Lombés *et al.*, 1994; Nishi *et al.*, 2001). Adicionalmente à descrição da estrutura

cristalográfica, foram caracterizados os resíduos responsáveis pela interação do LBD à aldosterona. Os resíduos Glicina 776 na α -hélice H3 e Arginina 817 no final da α -hélice H5 mantêm contato direto com o grupo 3-cetona da aldosterona. O resíduo Asparagina na α -hélice H3 estabiliza o grupo 18-hidroxila do esteróide e outros resíduos nas α -hélices H6, H7 e H10 mantêm contato direto com a aldosterona (Rogerson *et al.*, 2007; Viengchareun *et al.*, 2007).

O MR possui um domínio de ativação funcional (AF2) que é ativado após a ligação da aldosterona à bolsa hidrofóbica do LBD. Esta bolsa hidrofóbica é constituída pelas α -hélices H3, H4, H5 e H12. O AF2 é composto por 30 aminoácidos na α -hélice H12, sendo esta seqüência capaz de recrutar a maquinaria transcricional (Hollenberg & Evans, 1988; Pascual Lê-Tallec & Lombés, 2005). Este domínio funcional é altamente conservado entre os receptores esteróides. Após a ligação ao hormônio, ocorre uma alteração conformacional do receptor, com rotação da α -hélice H12. Esta rotação leva à oclusão da bolsa de ligação e posterior rearranjo das α -hélices H3, H5 e H11, expondo um sulco hidrofóbico na superfície do LBD. Este sulco hidrofóbico atua como uma superfície de ancoragem para co-ativadores transcricionais que possuem um *MR Box+* definido pela seqüência de aminoácidos LXXLL (L=leucina e X= qualquer aminoácido) (Heery *et al.*, 1997).

A iniciação da transcrição alternativa do éxon 1 α ou 1 β gera duas isoformas de RNAm, MR α e MR β , que são expressas em tecidos onde há ação da aldosterona (Zennaro *et al.*, 1996). As duas isoformas correspondem a proteínas de 107 kDa e presumidamente apresentam diferenças na

estabilidade de transcrição ou eficiência de tradução. Entretanto, a função exata destas isoformas ainda não está elucidada (Pascual-Le Tallec & Lombés, 2005). Outras variantes de *splice* codificando diferentes proteínas do MR já foram descritas. Uma variante com inserção de quatro resíduos entre os dedos de zinco do DBD não apresenta diferença transcricional em relação ao MR nativo (Bloem *et al.*, 1995). Outro receptor variante, com interrupção da tradução no códon 807 e ausência de resposta à aldosterona, foi evidenciado em tecido renal humano (Zhou *et al.*, 2000). Adicionalmente, foi descrita uma variante com perda da tradução dos *exons* 5 e 6. Esta isoforma é expressa em vários tecidos e apresenta a capacidade de ativação independente do ligante (Zennaro *et al.*, 2001).

Ações do MR

O efeito principal da aldosterona é mediado pela sua ligação ao MR e promove, em tecidos epiteliais, a reabsorção de sódio e a secreção de potássio e hidrogênio. O transporte de sódio pela membrana apical nos tecidos epiteliais dos túbulos renais distais, cólon distal, glândulas sudoríparas e salivares é regulado pelo canal de sódio sensível a amilorida (ENaC). O ENaC representa o passo limitante no transporte iônico regulado pela aldosterona (Zennaro & Lombès, 2004). O transporte ativo pela membrana basolateral é catalisado pela bomba de sódio e potássio ATP dependente (Na/K ATPase) (Pearce *et al.*, 2003). A ligação ao hormônio induz diferentes modificações: mudança conformacional do receptor, dissociação do complexo hétero-oligomérico e fosforilação (Farman & Rafestin-Oblin, 2001; Booth *et al.*, 2002; Zennaro & Lombès, 2004).

Após a ligação ao hormônio, o MR forma homodímeros e transloca-se até o núcleo onde se liga a elementos específicos do DNA, localizados em regiões regulatórias de genes alvos. Os genes codificadores das subunidades das proteínas Na/K ATPase e do ENaC foram identificadas como genes responsivos à aldosterona (Verrey *et al.*, 2000). Outros genes responsivos à aldosterona no epitélio renal foram descritos recentemente: *serum and glucocorticoid-induced kinase type 1 (Sgk-1)*, *Kirsten-Ras type 2A gene (Ki-Ras-A)*, *corticosteroid hormone induced factor (CHIF)*, *N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2)* e *glucocorticoid induced leucine zipper protein (GILZ)*. As proteínas codificadas por estes genes estão implicadas na fase rápida de transporte de sódio estimulado pela aldosterona (Spindler *et al.*, 1997; Naray-Fejes-Toth *et al.*, 1999; Bhargava *et al.*, 2001; Robert Nicoud *et al.*, 2001; Boulkron *et al.*, 2002; LE Menuet *et al.*, 2004). Na figura 2 está representado o modelo de ação genômica da aldosterona.

A resposta do ENaC à aldosterona pode ser dividida em três fases: fase latente, que dura aproximadamente 45 minutos e não há efeito discernível na atividade do canal; a fase rápida que dura de 45 minutos a 3 horas e a fase tardia, com duração de 3 horas a vários dias. Embora a fase tardia esteja associada a um aumento no RNAm da subunidade α do ENaC, na fase precoce ocorre a reabsorção de sódio e água precedendo a acumulação de RNAm do ENaC. Este fato sugere que a aldosterona induza ou reprima genes envolvidos na inserção do ENaC na superfície celular ou nas suas propriedades. Os genes *SGK1* e *Ki-Ras-A*, responsivos à aldosterona, parecem estar envolvidos nesse processo (Gormley *et al.*, 2003).

A aldosterona apresenta um mecanismo de ação não-genômico que também é mediado pelo MR em tecidos epiteliais, vascular e cardíaco. Os efeitos desta ação não-genômica são semelhantes à ação genômica, porém ocorrem significativamente mais rápidos (Funder, 2005). Recentemente foi proposto que a aldosterona ativa a proteína quinase D (PKD) por meio da interação do MR com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). A ativação da PKD por esta via poderia modular o tráfego de subunidades do ENaC pré-expressas e, desta forma, mediar à fase rápida de ação da aldosterona sobre o transporte de sódio (Thomas *et al.*, 2008).

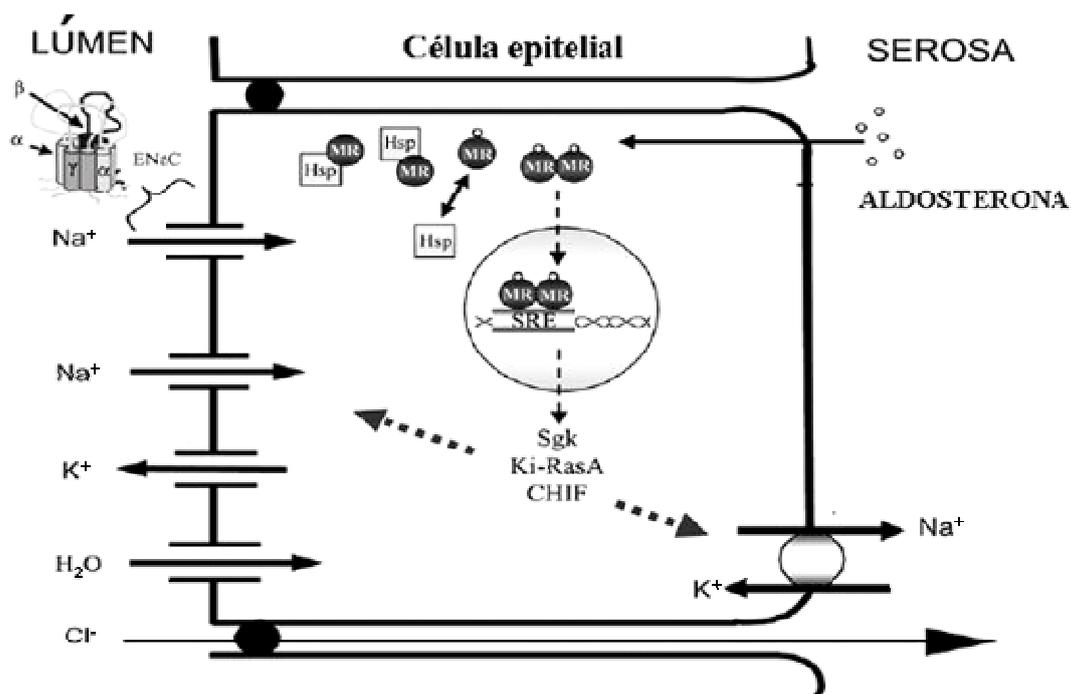


Figura 2. Modelo de ação genômica da aldosterona em célula epitelial. A aldosterona se liga ao MR, o qual se dissocia do complexo com Hsp, dimeriza-se e transloca-se até o núcleo onde se liga aos elementos responsivos aos esteróides, induzindo a síntese de proteínas, entre elas a SGK, Ki-RasA e CHIF. Estas proteínas aumentam a ação do ENaC durante a fase rápida de ação. Posteriormente o MR induz a síntese de subunidades do ENaC e de componentes da bomba Na/K ATPase. Hsp: proteína de choque térmico, ENaC: canal de sódio sensível a amilorida; MR: receptor do mineralocorticoide; SRE: elementos responsivos aos esteróides (modificado de BOOTH *et al.*, 2002).

O MR também possui afinidade elevada de ligação aos glicocorticóides. As concentrações de glicocorticóides são cerca de cem vezes maiores do que as concentrações de aldosterona, o que seria suficiente para manter o MR ativado constantemente. A especificidade de ligação é garantida em três níveis: pré-receptor, receptor e pós-receptor.

O mecanismo de especificidade pré-receptor é conferido pela ação da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2) que converte glicocorticóides em 11-esteróides inativos. Esta enzima é expressa conjuntamente com o MR em tecidos epiteliais, garantindo a especificidade da ligação do MR à aldosterona nestes tecidos. Em outros tecidos, a 11 β -HSD2 não está expressa e o MR liga-se aos glicocorticóides e aldosterona, indistintamente (Farman & Rafestin-Oblin, 2001).

Diferenças conformacionais entre a aldosterona e o cortisol são responsáveis pela seletividade do receptor. A ligação da aldosterona ao MR promove uma maior transativação do que a ligação com o glicocorticóide (Arriza *et al.*, 1987; Lim-tio *et al.*, 1997), além de resultar em uma conformação mais estável do que a ligação ao glicocorticóide, o que poderia influenciar a interação com coativadores (Farman & Rafestin-Oblin, 2001). O mecanismo de especificidade pós-receptor é efetuado pela ligação de co-reguladores específicos ao NTD do MR, que possui domínios de ativação e repressão funcional diferentes dos outros receptores esteróides (Pearce & Yamamoto, 1993; Pascual-Le Tallec & Lombés, 2005).

Pseudohipoaldosteronismo tipo 1 (PHA1)

O hipoaldosteronismo ocorre em várias síndromes clínicas e pode ser classificado em três grandes categorias, de acordo com a sua fisiopatologia: defeito na estimulação da secreção de aldosterona (hipoaldosteronismo hiporreninêmico congênito ou adquirido), defeitos primários na síntese de aldosterona (hiperplasia adrenal congênita por deficiência de CYP21A2 e 3 β -HSDII, deficiência do DAX-1) e resistência à aldosterona (PHA1).

O PHA1 é uma doença rara, descrita em 1958 caracterizada por perda de sal no período neonatal, desidratação, hipotensão, hipercalemia e acidose metabólica, apesar de concentrações plasmáticas elevadas de aldosterona e de renina plasmática (Cheeck & Perry, 1958; Geller *et al.*, 1998). No PHA1 existe um defeito no transporte de sódio no néfron distal, secundário a uma resistência de órgãos-alvo à ação dos mineralocorticóides. Existem duas formas de PHA1, uma forma com padrão de herança autossômico recessivo e uma forma com padrão de herança autossômico dominante (Kuhnle *et al.*, 1990; Armanini *et al.*, 1991; Hanukoglu, 1991; Hanukoglu *et al.*, 1994).

A forma autossômica recessiva do PHA1 (OMIM #264350), também chamada de forma sistêmica, é a mais grave, pois ocorre perda de sal em diversos órgãos e tecidos como glândulas salivares, glândulas sudoríparas, epitélio colônico, rins e pulmão. Os sintomas persistem por toda a vida e há a necessidade de reposição de grande quantidade de sódio. Nas formas mais graves ocorrem infecções pulmonares de repetição, podendo assemelhar-se à fibrose cística (Oberfield *et al.*, 1979; Savage *et al.*, 1982; Bosson *et al.*, 1986). A forma sistêmica do PHA1 é causada por mutações nos genes das subunidades α , β e γ do ENaC (Chang *et al.*, 1996; Strautnieks *et al.*, 1996;

Arai *et al.*, 1999; Adachi *et al.*, 2001). O ENaC é composto por três subunidades homólogas (α , β e γ) e cada subunidade apresenta dois domínios hidrofóbicos altamente conservados (H1M1 e H2M2). Mutações nos genes codificadores das subunidades do ENaC resultam em falência na absorção de sódio em cada órgão-alvo, com conseqüente perda de sal sistêmica e concentrações plasmáticas elevadas de aldosterona e renina. Os pais das crianças afetadas (heterozigotos para mutações no gene do ENaC) apresentam concentrações plasmáticas de aldosterona e renina normais (Chang *et al.*, 1996; Strautnieks *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 1999; Adachi *et al.*, 2001).

A forma renal do PHA1 (OMIM #177735), também denominada forma autossômica dominante, é caracterizada por uma resistência predominantemente renal à ação da aldosterona. Os pacientes com a forma renal do PHA1 apresentam melhora clínica importante com a reposição de 1 a 2 gramas ao dia de cloreto de sódio (NaCl) durante o primeiro ano de vida. Após este período, a suplementação da NaCl pode ser suspensa e o paciente permanece clinicamente assintomático, a despeito das concentrações de aldosterona e atividade de renina plasmática (PRA) elevarem-se significativamente (Oberfield *et al.*, 1979). A forma renal do PHA1 é secundária, na maioria dos casos, a mutações inativadoras no gene do *MR* (Geller *et al.*, 1998; Sartorato *et al.*, 2003). Em estudos de famílias com mutações no *MR*, alguns indivíduos carreadores da mesma mutação que o caso-índice, são clinicamente assintomáticos embora apresentem concentrações elevadas de aldosterona e da PRA (Sartorato *et al.*, 2003; Riepe *et al.*, 2004).

Até o momento, cerca de 50 mutações inativadoras do tipo *missense*, *frameshift*, *nonsense* ou em sítio de *splice*, no gene do *MR*, foram descritas em pacientes com PHA1. A maioria destes casos foi familiar, porém casos esporádicos também foram descritos. Estas mutações no gene do *MR* levam a codificação de receptores com ação diminuída ou proteínas anômalas (Geller *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 2000; Viemann *et al.*, 2001; Riepe *et al.* 2003, Sartorato *et al.*, 2003; Nystrom *et al.*, 2004; Riepe *et al.*, 2004, Riepe *et al.*, 2006; Geller *et al.*, 2006; Pujo *et al.*, 2007; Bellot *et al.*, 2008). Adicionalmente às mutações descritas no gene do *MR*, recentemente foi descrita, em duas pacientes de uma mesma família com PHA1, uma deleção de parte do éxon 2, em heterozigose no gene do *MR*, verificada através do estudo de marcadores intragênicos (Sartorato *et al.*, 2004).

Somente mutações em heterozigose foram descritas em humanos, sugerindo que o estado homozigoto possa ser letal já no período intra-uterino. A presença de um alelo mutado resulta em haploinsuficiência, suficiente para ocasionar sintomas de PHA1 (Geller *et al.*, 2005).

PHA1 em famílias brasileiras

Estudamos previamente o gene do *MR* em duas famílias brasileiras com a forma renal do PHA1. Nas duas famílias encontramos mutações em heterozigose no gene do *MR* (Fernandes-Rosa & Antonini, 2007). Na primeira família encontramos uma substituição de citosina por timina na posição c.2839 (c.2839C>T) (figura 3). Esta substituição resulta na troca de códon codificador de Arginina por um códon de terminação prematura na posição 947 (MR

p.R947X). Esta mutação *nonsense* foi encontrada em três gerações desta família, havendo uma grande variação fenotípica entre os indivíduos carreadores das mutações (tabela 1).

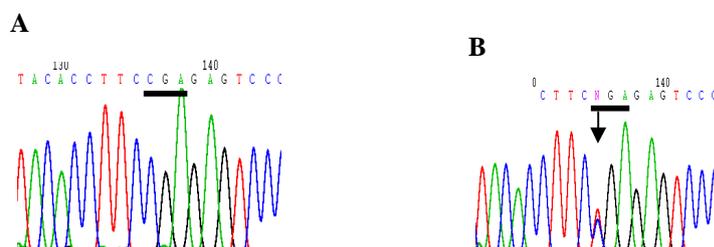


Figura 3. A: Cromatograma representativo do éxon 9 do *MR* em sua seqüência de referência (CGA) da região do códon 947. B: Cromatograma representativo do éxon 9 *sense*, mostrando a mutação R947X. Troca em heterozigose, no códon 947, da base citosina pro timina (seta), levando a introdução de um códon de terminação prematuro.

Tabela 1. Correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X.

Indivíduos Afetados	Desidratação no período neonatal	Avidez por sal	Aldosterona plasmática em ortostase (ng/dL) (VN: <28 ng/dL)
Caso-índice	Sim	Sim	296,0
Mãe	Sim	Sim	34,0
Avó	Não	Não	66,0
Tio materno 1	Não	Não	7,0
Tio materno 2	Não	Não	11,0
Primo materno 1	Não	Não	38,2
Primo materno 2	Não	Não	28,7

A mutação MR p.R947X foi descrita previamente por Riepe *et al.* (2004) em dois indivíduos de uma família turca com a forma renal do PHA1, porém o estudo funcional desta mutação não foi realizado (Riepe *et al.*, 2004). Mais recentemente, na análise do gene do *MR* em dois indivíduos de uma segunda família turca com PHA1, também foi encontrada a mutação MR p.R947X (comunicação verbal, Dr Felix Riepe, Universidade de Kiel, Alemanha). A

recorrência de uma mesma mutação em diferentes famílias com PHA1 não havia sido descrita até o momento.

A população brasileira é formada por diferentes origens étnicas, incluindo origem da região mediterrânea e de regiões árabes previamente colonizadas pelo Império Otomano (populações de origem turca). Desta forma, a origem comum (efeito fundador) da mutação MR p.R947X nestas três famílias era uma possibilidade plausível, embora pouco provável. Caso não fosse caracterizada a presença de efeito fundador desta mutação entre estas 3 famílias, o códon 947 poderia ser considerado como o primeiro *hot spot* para mutações neste gene.

Nas três famílias descritas com a mutação MR p.R947X houve variação fenotípica entre os indivíduos portadores da mutação (Riepe *et al.*, 2004; Fernandes-Rosa & Antonini, 2007). Na análise de toda a região codificadora do *MR*, também verificamos, no caso-índice da família brasileira um polimorfismo caracterizado por uma substituição de adenina por guanina na posição c.538, resultando na substituição de isoleucina por valina no códon 180 (Fernandes-Rosa & Antonini, 2007). Este polimorfismo (MR p.I180V; rs5522) foi encontrado em todos os portadores da mutação nesta família não sendo, portanto, responsável pela variação fenotípica encontrada. Nenhum estudo de frequência populacional deste polimorfismo havia sido realizado em indivíduos brasileiros até o momento. Polimorfismos na região não codificadora do gene do *MR* bem como polimorfismos nos genes das subunidades do ENaC poderiam estar envolvidos nos diferentes fenótipos apresentados pelos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X (Arai *et al.*, 1999; Riepe *et al.*, 2003).

No caso-índice de uma segunda família brasileira com PHA1, encontramos uma substituição em heterozigose de timina por citosina na posição c.2543, resultando na troca de leucina por prolina no resíduo 848 (MR p.L848P) (figura 4). A mutação MR p.L848P foi encontrada no caso-índice e em sua mãe, indicando padrão de herança autossômico dominante. Nenhum outro familiar materno apresentou a mutação esta mutação, sugerindo uma mutação *de novo*. Em função de limitações éticas, esta possibilidade não pôde ser confirmada.

Esta mutação *missense* não havia sido descrita previamente em nenhum paciente com PHA1 e é a primeira descrita no éxon 7 do *MR*, região que codifica o LBD, ocorrendo entre as α -hélices H6 e H7. A função específica dessas duas α -hélices ainda não foi completamente elucidada. Em estudos populacionais do gene do *MR* e na análise de famílias com PHA1 em estudos multicêntrico europeus esta mutação não foi descrita, bem como qualquer polimorfismo acometendo o éxon 7 do gene do *MR* (Arai *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1998; Sartorato *et al.*, 2003).

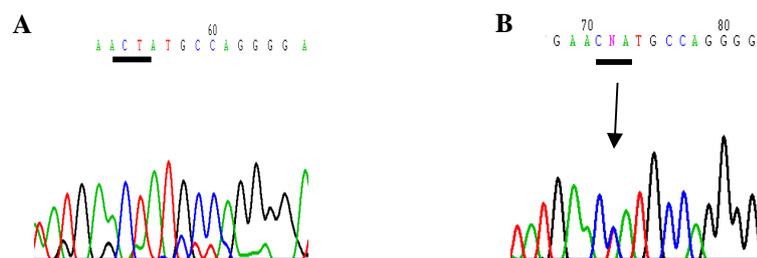


Figura 4. A: Cromatograma representativo do éxon 7 do *MR* em sua seqüência de referência (CTA) da região do códon 848. B: Cromatograma representativo do éxon 7 mostrando a mutação L848P. Troca em heterozigose, no códon 848, da base timina por citosina (seta) na posição c.2543, levando a substituição do aminoácido leucina por prolina.

Justificativa do presente estudo

O PHA1 é uma doença rara, com aspectos fisiopatológicos ainda desconhecidos. Novos estudos são necessários para o entendimento da história natural da doença visando uma intervenção terapêutica mais precoce, evitando dessa forma episódios graves de desidratação no período neonatal. O estudo funcional das mutações encontradas pode ajudar no conhecimento das funções específicas de regiões do receptor com ações ainda não estabelecidas, bem como os mecanismos moleculares de ação da aldosterona e seu receptor. Adicionalmente, a presença de polimorfismos na região não codificadora do *MR* bem como nos genes das subunidades do *ENaC* pode explicar, pelo menos em parte, a variação fenotípica encontrada nos indivíduos portadores de mutações no gene do *MR*.

Objetivos

Objetivos

- 1- Analisar a existência de possível efeito fundador entre a família brasileira e famílias turcas com a mutação MR p.R947X.
- 2- Verificar a presença dos polimorfismos c.-2G>C no gene do *MR*, p.C618F no gene da subunidade alfa do ENaC e p.G442V no gene da subunidade beta do ENaC nos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X e possível associação com a variação fenotípica.
- 3- Realizar a análise funcional das mutações MR p.R947X e MR p.L848P.

Materiais e Métodos

1- Indivíduos

1A- Indivíduos Estudados na Análise de Efeito Fundador da Mutação MR p.R947X

Família Brasileira

O caso-índice é uma criança do sexo masculino, branco, procedente de Passos-MG, filho de pais não consangüíneos, nascido a termo com peso de nascimento 3250g. Apresentou letargia, sucção débil, vômitos e desidratação a partir de duas semanas de vida. Tais sintomas regrediam parcialmente com a administração de soluções de rehidratação oral. Durante episódio de desidratação foi detectado hiponatremia (Na=126 mEq/L) e hipercalemia (K=6,3 mEq/L). A genitália externa era masculina, com testículos palpáveis na bolsa escrotal e sem a presença de hipospádia. Exames laboratoriais mostraram concentrações normais de 17-OH-progesterona (47,0 ng/dL), ACTH (25,3 pg/mL) e cortisol (9,5 µg/dL) e excluíram o diagnóstico de insuficiência adrenal. Apresentava sódio urinário elevado (244 mmol/L; VN<40 nmol/L), sódio no suor normal e concentrações plasmáticas muito elevadas de aldosterona (296 ng/dL; VR em lactentes= 6,0 a 90,0 ng/dL) bem como de PRA (7,3 ng/mL/h, VR em dieta normossódica= 0,3 a 1,6 ng/mL/h). Esta avaliação foi realizada estando o paciente com dieta sem adição de sal. Desta forma foi confirmado o diagnóstico de PHA1 forma renal. O paciente apresentou normalização eletrolítica e ganho pômbero-estatural adequado com a administração de 2g de NaCl por dia, bem como normalização da concentração plasmática da aldosterona (66,0 ng/dL). Aos 10 meses de vida, a suplementação de NaCl foi suspensa, sendo o paciente monitorizado clínica e

laboratorialmente. Houve aumento nos valores de aldosterona plasmática (121,8 ng/dL) e da PRA (e 14,8 ng/mL/h), porém a pressão arterial, o crescimento pômbero-estatural e as concentrações plasmáticas de sódio e potássio permaneceram normais.

Além do probando, foram avaliados 12 familiares, sendo seis portadores da mutação p.R947X e 4 familiares sem a mutação (figura 5).

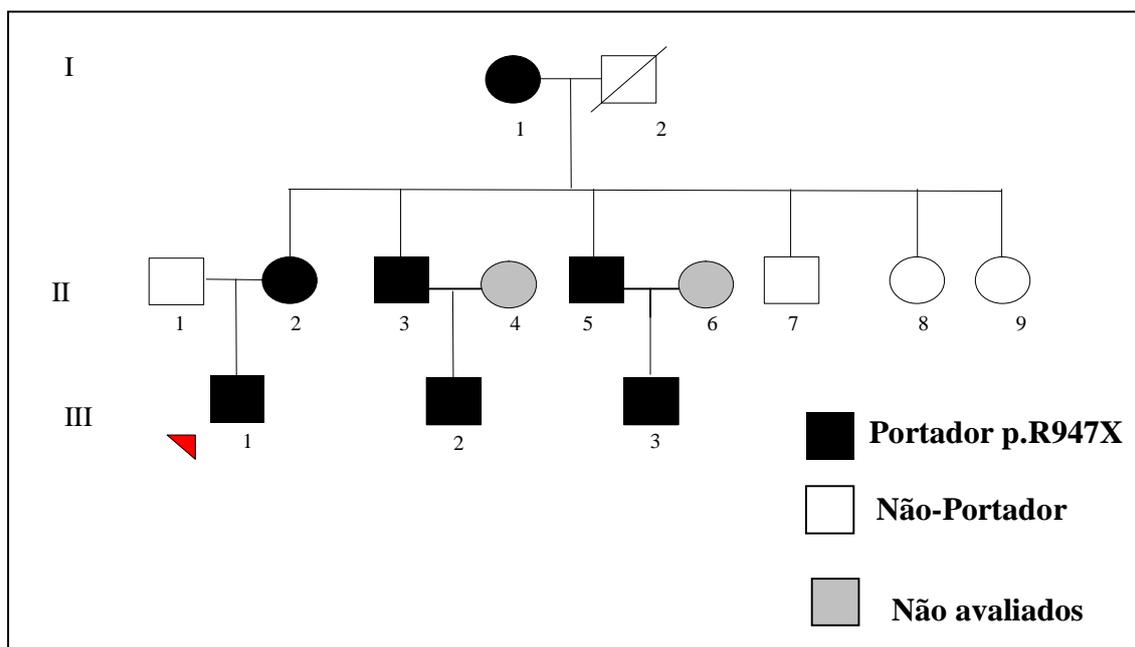


Figura 5. Família brasileira com portadores da mutação MR p.R947X.

Família Turca 1

O caso-índice era uma criança do sexo masculino, filho de pais consangüíneos (primos em primeiro grau), nascido a termo com peso de 3310g. Necessitou de internação aos 4 meses de vida devido a vômitos recorrentes e baixo ganho ponderal (peso de 3210g). Na admissão apresentava hiponatremia (129 mEq/L) e hipercalemia (6,4 mEq/L), mas sem acidose metabólica. As concentrações de aldosterona plasmática (2554 pg/mL,

VR= 150-1050 pg/mL) e PRA (>40 ng/mL·h, VR= 1.5. 10.2 ng/mL/h) estavam elevadas enquanto que as concentrações de 17-OH-progesterona, ACTH, cortisol e sódio no suor eram normais. A criança apresentou recuperação pôndero-eststural após terapia com NaCl oral (3. 8 mmol/kg·dia). Os eletrólitos plasmáticos permaneceram normais durante a terapia com NaCl e após a interrupção do tratamento aos 24 meses de idade, porém houve persistência de concentrações elevadas de aldosterona plasmática (1395 pg/mL; VR= 100. 880 pg/mL). Foram avaliados o pai, portador assintomático da mutação MR p.R947X e a mãe, não portadora da mutação (Riepe *et al.*, 2004).

Família turca 2

O caso-índice era uma criança do sexo masculino, filho de pais não consangüíneos, nascida a termo e com peso de 3600g. Foi admitida no hospital com 2 semanas de vida em função do ganho ponderal baixo e de vômitos. Foram evidenciados hiponatremia (Na=129 mEq/L) e hipercalemia (K=5,8 mEq/L), enquanto que as concentrações plasmáticas de 17-OH-progesterona e de cortisol plasmático estavam normais. As concentrações plasmáticas de aldosterona (212 ng/dL) e renina (8676 ng/L) estavam elevadas. Após a suplementação de NaCl (4 mmol/kg_dia) houve normalização do ganho ponderal e dos eletrólitos plasmáticos. A suplementação foi interrompida aos 18 meses e a criança permaneceu assintomática. Seu pai, portador assintomático da mutação MR p.R947X e sua mãe, não portadora da mutação, também foram avaliados.

1B- Família Brasileira com a mutação MR p.L848P (Figura 6)

Caso-índice

O caso-índice era uma criança do sexo feminino, branca, procedente de Carmo do Paranaíba-MG, filha de pais não consangüíneos. Aos 40 dias de vida começou a apresentar episódios de vômitos freqüentes, baixo ganho ponderal e desidratação. Apresentava genitália externa feminina, sem fusão de rafe ou clitoromegalia. Durante um episódio de desidratação apresentou instabilidade hemodinâmica. As avaliações clínica e laboratorial foram realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e evidenciaram hiponatremia (124 mEq/L) e hipercalemia (8,3 mEq/L). Não houve melhora com a administração de hidrocortisona e o quadro clínico estabilizou-se com reposição de NaCl. Apresentava concentrações plasmáticas normal de cortisol (22,6 ug/mL) e concentração de 17 OH-Progesterona (439 ng/dL) não compatível com o diagnóstico da forma clássica de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase. Apresentava concentração plasmática elevada de aldosterona (422 ng/dL), confirmando o diagnóstico de PHA1. A criança permaneceu assintomática com a reposição de NaCl (2g/dia), apresentando crescimento pôndero-estatural e desenvolvimento neuropsicomotor adequados.

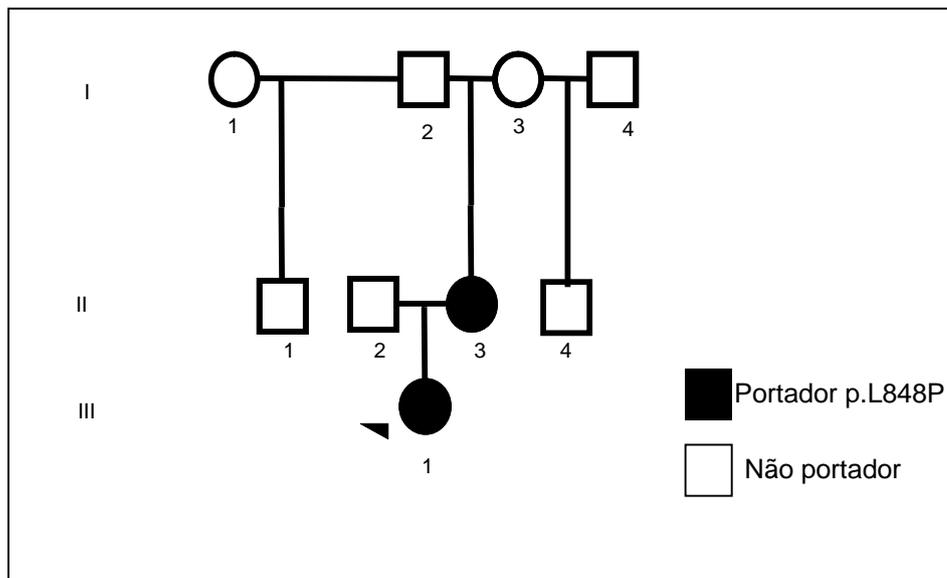


Figura 6. Família brasileira com portadores da mutação MR p.L848P

2- Métodos

2.1- Análise de efeito fundador da mutação MR p.R947X entre a família brasileira e as famílias turcas com a forma renal do PHA1.

Para esta análise foram escolhidos 3 microssatélites centroméricos ao gene do *MR*, D4S3014, D4S3031 e D4S1586, localizados a uma distância de 0,2 cM, 0,3 cM e 2 cM respectivamente em relação ao gene e o marcador telomérico D4S3008 com distância de 0,9 cM ao gene do *MR* (NR3C2). Esses microssatélites foram selecionados por serem os únicos marcadores polimórficos na região do gene do *MR* e por apresentarem uma distância de até 2,0 cM do gene do *MR*, visto que com essa distância gênica a possibilidade de

recombinação se torna pouco provável. Estudamos também 2 polimorfismos intra-gênicos de substituição simples do gene do *MR* (figura 7).

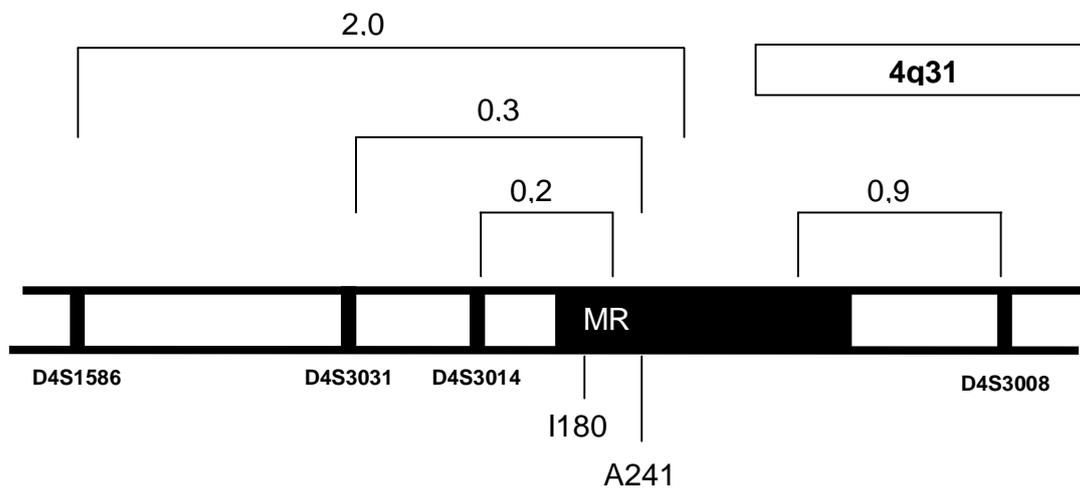


Figura 7. Representação esquemática do *locus* do gene do *hMR* no cromossomo 4, mostrando a distância em cM dos microssatélites e a localização dos polimorfismos I180V e A241V.

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit *QIAamp Blood Kit+* (QIAGEN, CA, USA). Em tubo de 1,5 mL foram adicionados 200 μ L de sangue total e 20 μ L de Proteinase K para lise celular. Após incubação a 56°C por 10 minutos, adicionou-se etanol 100%. A solução foi então aplicada na coluna *QIAamp spin column+* e centrifugada a 8000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e as colunas foram novamente centrifugadas após adição tampão de lavagem. O DNA extraído foi eluído em TE e estocado a -20°C. Alíquotas das amostras extraídas foram aplicadas em gel de agarose de 1% e coradas com brometo de etídio (0,5 μ L/100ml de gel) sendo posteriormente submetidas à eletroforese para verificação da eficiência de extração. O gel foi observado em transiluminador com luz ultravioleta (BioRad Laboratories Inc.) e fotografado digitalmente por meio do Electrophoresis Documentation and Analysis system

(EDAS 290 Kodak, Earstman Kodak Company, New Haven, USA) Todas essas amostras foram quantificadas no espectrofotômetro Biophotometer plus (Eppendorf, Hambourg, Germany) e foram estocadas a uma concentração final de 50 µg/µL para posterior análise.

Foi realizada a análise de segregação de haplótipos dos quatro marcadores, cujo tamanho difere entre indivíduos, de acordo com o número de repetições (CA)_n. Os *primers* (tabela 2) foram marcados na posição 5q com fluorescência 6-FAM pela Invitrogen (Invitrogen corp., MD, USA). No protocolo de amplificação do produto de reação em cadeia de polimerase (PCR) foram usados 10 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5U Taq Polymerase (Applied Biosystems, New Jersey, USA), e 100 µM de dNTP em 50 µL de reação. A PCR foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação a 94° C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C ou 56° C, e extensão a 72° C por 2 minutos; extensão final a 72° C por 10 a 15 min.

Tabela 2 *Primers* utilizados para o estudo de microssatélites do gene *hMR*

	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>
D4S3014	5'- ATTGATTGGGCCGCTG - 3'	5'- TGCTATACCTCAGTGATGTTGTAAT - 3'
D4S3031	5'- TGGTAAGCCCCAAAGC -3'	5'- AGAATGCAAAGCGCCT -3'
D4S3008	5'- TAACTGAATGGATTTGAGACTACC -3'	5'- GCTTGATCTTGCCTTGA -3'
D4S1586	5'- GCATGTACCATTGCCAGG -3'	5'- CCCAGAGTGCTGATGTGTG -3'

Em todas as amplificações, foi incluído um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA). As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1 a 3% e marcadas com brometo de etídio (0,5 μ L/100ml de gel) sendo posteriormente submetidas à eletroforese. O gel foi observado em transiluminador com luz ultravioleta (BioRad) e fotografado digitalmente por meio do Kodak EDAS 290 e por meio do programa Kodak 1D v.3.6.2. (Eastman Kodak Company, New Haven, USA).

Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese em capilar no sequenciador ABI 310, utilizando-se o polímero POP4 e o padrão de tamanho molecular ROX-500 (PE Applied Biosystems). A análise do sinal e a determinação do genótipo foram realizadas com os softwares GENESCAN 3.0 (PE Applied Biosystems) e GENOTYPER 2.5 (PE Applied Biosystems).

Verificamos também a presença dos polimorfismos p.A241V e p.I180V no MR nos indivíduos das 3 famílias. Realizamos a amplificação do fragmento desejado através de PCR. A seqüência dos *primers* está descrita na tabela 3. No protocolo de amplificação do produto por PCR foram usados 10 ng de DNA genômico, 20 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5U Taq Polymerase (Applied Biosystems, New Jersey, USA), e 100 μ M de dNTP em 50 μ L de reação. A PCR foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 54° C , e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos. Em todas as amplificações, foi incluído um controle negativo. As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose de 1 a 3% e marcadas com brometo de

etídio (0,5µL/100ml de gel) sendo posteriormente submetidas à eletroforese. O gel foi observado em transiluminador com luz ultravioleta (BioRad Laboratories Inc.) e fotografado digitalmente por meio do Kodak EDAS 290 e por meio do programa Kodak 1D v.3.6.2. (Earstman Kodak Company, New Haven, USA).

Tabela 3. Oligonucleotídios utilizados para amplificação da região codificadora do fragmento B do exon 2 do gene do *MR*

EXON 2 - FRAGMENTO B	
<i>sense</i>	5'- AAAGTGGAGCTGGAATCTAAGGAAC -3q
<i>antisense</i>	5q ATTATTGGGACTGGAGACTGGAG -3q

Para eliminar o excesso de reagentes presentes (*primers* e dNTPs), foi realizada a purificação dos fragmentos de PCR a serem seqüenciados, por meio de digestão enzimática. Foram realizadas as reações com 10 µL do produto de PCR, 1 unidade (U) de exonuclease (Exonuclease I . Amersham Pharmacia Biotech) e 1 U de fosfatase alcalina (Shrimp alkaline phosphatase . Amersham). Essa reação foi incubada em um termociclador a 37°C durante 15 minutos e, posteriormente, a 80°C durante 15 minutos.

O DNA amplificado por PCR foi seqüenciado pelo método de seqüenciamento automático (ABI Prism 310 Genetic Analyser, PE Apllied Biosystems), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, utilizando-se o kit ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase (PE Apllied Biosystems). A reação de seqüenciamento foi realizada em um termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). O volume final da reação foi de 20 µL, sendo 5

a 10 ng do produto de PCR após purificação, 4 μ L do tampão do kit, contendo, além do tampão, dNTPs e ampli Taq polimerase, 5 pmol do *primer sense* ou *antisense* e água DEPC. Essas amostras foram submetidas a 25 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 240 segundos.

Após a reação de seqüenciamento as amostras foram purificadas utilizando-se isopropanol. Depois de purificados esses produtos foram liofilizados e então ressuspensos em 20 μ L de TSR (Template Supression Reagent ABI Prism), desnaturados durante 5 minutos a 95°C e após, imersos em gelo por mais 5 minutos, quando então foram submetidos à eletroforese no seqüenciador automático.

Após o seqüenciamento os cromatogramas foram comparados com a seqüência normal do gene *MR*, depositadas no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) pelos códigos de acesso NR3C2, AF068816 (éxon 2).

2.2- Análise de polimorfismos nos genes do *MR* e das subunidades do *ENaC*.

A análise dos polimorfismos foi realizada por ensaio de discriminação alélica TaqManTM em PCR em tempo real. No sistema TaqManTM, a sonda se hibridiza na região complementar do DNA entre os sítios de ligação delimitados pelos primers. Sondas específicas para cada alelo são marcadas na extremidade 5' com fluoróforo repórter específico (VIC ou FAM). Um aumento no sinal de um dos fluoróforos indica homozigose do alelo correspondente e aumento de ambos os sinais indica heterozigose. Após a reação de PCR, é realizada uma análise de fluorescência do aparelho subtraindo o sinal de

fluorescência inicial e separando as amostras de acordo com a fluorescência encontrada (*post read*).

Os polimorfismos no gene do *hMR* e nos genes codificadores das subunidades α e β do ENaC selecionados para o presente estudo estão listados na tabela 4. Para cada polimorfismo, seqüências de *primers* e sondas foram determinadas com o auxílio do *Applied Biosystems design service* e do software File Builder 3,0. Os ligantes fluorogênicos utilizados foram FAM e VIC e a referência passiva ROX.

A PCR em tempo real foi realizada no equipamento *Real Time 7500 System* (Applied Biosystems) com 3,125 μ l de *TaqMan 2x universal master mix* (Applied Biosystems, CA), 0,19 μ l de *primer-sonda* (470 nM e 100 μ M, respectivamente) e 3 μ l de DNA, em um volume total de 6,25 μ L por reação. DNA com genótipo conhecido foi usado como controle positivo e água como controle negativo em cada corrida.

Tabela 4. Polimorfismos Analisados e seus respectivos Ensaio de discriminação alélica (*Applied Biosystems*).

Polimorfismo	Referência Fabricante	Seqüência -Fluoróforo: (VIC / FAM)
MR -2C>G (rs2070951)	C_1594392_10	ACTGTGGTAGCCTTTGGTCTCCATC[C/G]CTAACAAATAAATTTACATTAAAAA
ENaC p.C618F (rs3741913)	C_25603868_10	CAAGGACAGAGACATGGGGTGGGGG[A/C]AGAAGTGGGAAGGAGGGGAGGATGC
ENaC p.G442V (rs16940050)	C_9610682_20	GTGGCGCAGAGAGACCTGCATTG[G/T]CATGTGCAAGGAGTCCTGCAAGTGA

2.3- Análise Funcional das mutações MR p.L848P e MR p.R947X

A- Mutagênese sítio-dirigida

Cada mutação foi obtida artificialmente utilizando-se o *kit QuickChange site directed mutagenesis* (Stratagene) e o plasmídeo recombinante pcDNA3-hMR, contendo um fragmento de 3 kb de hMR XmaII-AflII inserida no pcDNA3.

Os seguintes *primers* sense foram utilizados com seus oligonucleotídeos antisense correspondentes:

Mutação MR p.L848P: CTGCCATGTATGAAC**C**ATGCCAGGGGATGCAC

Mutação MR p.R947X: CTGCTTCTACACCTT**C**TGAGAGTCCCATGCGC

A PCR foi realizada em um volume final de 50 uL. Os componentes das reações foram:

pcDNA3 hMR: 50ng, *primer* sense: 125 ng, *primer* antisense: 125ng, dNTP 10 mM: 1uL, Tampão 10x: 5 uL, Pfu-turbo DNA polimerase: 1µL e H₂O qsp 50 uL. A PCR foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 95°C por 30 segundos, 12 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 68°C por 6 minutos. Após a PCR os produtos foram submetidos a ação da enzima *DpnI* para digestão do DNA de dupla fita.

A seguir foi realizada a transformação de células supercompetentes XL1-blue (Stratagene). Em 50 µL de células XL1 foi adicionado 1 µL de produto de PCR. As células foram mantidas no gelo por 30 minutos, a 45°C por 42 segundos e novamente no gelo por 2 minutos. Posteriormente foi adicionado 500 µL de meio S.O.C. (Invitrogen) e a reação foi incubada a 37° C por 1 hora. Em seguida

as células foram distribuídas em placas LB-ampi e mantidas a 37° C por 16 horas.

As mutações de interesse foram identificadas por seqüenciamento direto e após a identificação dos clones mutantes, para verificar a presença ou não de mutações randômicas. Fragmentos de hMR foram então separados por meio de restrição enzimática (*HindIII* e *XhoI*) e subclonados em um vetor de expressão pcDNA3.

Transcrição/Tradução in vitro

Para a realização dos experimentos de transcrição/tradução *in vitro* foi utilizado o kit TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). A 1 µg do plasmídeo MR ou mutante foram adicionados 40 µL de TNT® Quick Máster Mix, [³⁵S]Metionina (1000Ci/mmol a 10mCi/ml) e água sem nuclease para um volume final de reação de 50 µL. A reação foi incubada a 30°C por 90 minutos. Posteriormente 5 µL da reação foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 8%.

Cultura celular e transfecção

Células RCSV3, derivadas do ducto coletor cortical renal de coelhos e células HK, derivadas de linhagem renais humanas, foram mantidas em cultura no seguinte meio:

Dubecco's MEM high glucose (Invitrogen), F12 Nutrient mixture + L-glutamine (Invitrogen), Penicilina/ Streptomicina : 100 UI/mL/100 ug/mL, HEPES: 20 mM; Soro bovino fetal sem esteróides: 2% e Dexametasona: 50 nM

As células foram semeadas em placas de seis poços a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, 24 horas antes dos procedimentos de transfecção, em meio de cultura sem adição de esteróides. Para todos os experimentos de transfecção, as células RCSV3 e HK foram utilizadas entre as passagens 35 e 40. No dia seguinte foi realizada a transfecção usando-se Lipofectamina (Invitrogen) em meio ~~serum-free~~ + Opti-MEM (Invitrogen).

Estudo da atividade transcricional

Em células RCSV3 foram transfectados 0,3 µg dos plasmídios pcDNA3-hMR ou dos plasmídios codificando os receptores mutantes MR P848 e MR X947, na presença de 0,8 µg do plasmídio MMTV-luciferase ou GRE2-luciferase repórteres. Para controle e normalização da eficiência da transfecção foi realizada a co-transfecção de 0,16 µg do plasmídio pSV -Gal (Clontech). Os procedimentos foram realizados em triplicata e foram realizadas duas transfecções para cada receptor mutante.

No dia seguinte à transfecção, concentrações crescentes de aldosterona (entre 10^{-11} M a 10^{-8} M) foram adicionadas por 24 horas. A seguir as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado o tampão de lise (Glicilglicina pH 7,8: 25mM; EDTA: 1mM; MgSO₄: 8mM; 1% Triton 10X; 15% Glicerol; Dithiothreitol: 1mM). O extrato celular foi mantido a 4°C por 5 minutos e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. Para a verificação da eficiência de transfecção (atividade de -Gal), em 100 µL do lisado celular foram adicionados 100 µL do tampão de lise, 150 µL do tampão Z (60mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl e 50 mM mercaptoetanol) e 75 µL de ONPG. A

reação foi mantida a 37°C até obter-se coloração amarelada. Foram adicionados 150 µL de Na₂CO₃ para interromper a reação. Após foi realizada, a leitura em um espectrofotômetro, a 420 nm.

Para a dosagem da atividade de luciferase, em 100 µL do lisado celular foram adicionados 100 µL de substrato para luciferase (10 mg de luciferina, 140 mL de tampão de lise e 710 µL ATP 200 mM) sendo a leitura efetuada em aparelho Gliomax (Promega). Os resultados foram padronizados para eficiência de transfecção e expressos como a razão entre a atividade de luciferase e a atividade da *-Gal*, em unidades arbitrárias.

Estudo da expressão de genes responsivos à aldosterona

Em células HK (*human kidney*) foram transfectados 0,3 µg dos plasmídios pcDNA3-hMR ou plasmídios codificando os receptores mutantes MR P848 e MR X947. Foi realizada a co-transfecção de 0,16 µg do plasmídio pSV *-Gal* (Clontech) para controle e normalização da eficiência da transfecção. No dia seguinte à transfecção, adicionou-se meio de cultura com ou sem aldosterona em uma concentração de 10⁻⁸ M. As amostras foram obtidas nos tempos zero, 60 e 120 minutos após a adição do meio, para análise da expressão gênica. Os procedimentos foram realizados em triplicata e foram realizadas duas transfecções para cada receptor mutante.

Extração do RNA

Após a transfecção de células HK e a administração de esteróides por 60 ou 120 minutos, foi realizada a extração de RNA destas células segundo o seguinte protocolo: as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e foi

adicionado 1mL de Trizol[®] por poço, sendo o produto transferido para um tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio por tubo e a seguir foi realizada a centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos (4°C). A fase aquosa foi recuperada em um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de isopropanol e a reação foi mantida a -20°C por uma hora. Realizou-se então a centrifugação por 10 min a 13000 rpm (4°C) e o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 1 mL de etanol 75% e foi feita nova centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos (4°C). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi resuspenso em 30 µL de água DEPC. Posteriormente foi realizada a incubação a 60°C por 10 minutos, seguida por resfriamento em gelo por 5 minutos. Fez-se então a quantificação do RNA em espectrofotômetro (absorbância a 260 nm) e a eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA.

Tratamento com DNase I

A 1 µg de RNA foram adicionados 1 µL de tampão 10x, 1µL de DNase Amplification Grade (Invitrogen) e H₂O DEPC para completar 10 µL de reação. Esta reação permaneceu em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e a reação foi incubada por 10 minutos a 65°C. Realizou-se, então nova quantificação do RNA utilizando-se o Quant-iT[®] RiboGreen[®] RNA Assay Kit (Invitrogen).

Reação de Transcrição Reversa

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript II (Invitrogen). A 500 ng de RNA tratados com DNase I foram adicionados 1 µL de *primers* randômicos (125 ng), em 11 µL de volume. Esta reação foi incubada a 70°C por 10 minutos.

Posteriormente foram adicionados à reação 4 μL de tampão 5x, 2 μL de DTT (0,1 M) e 1 μL de dNTP (10 mM). A reação foi mantida 10 minutos a 25°C e posteriormente foi adicionado 1 μL de Superscript II (transcriptase reversa). Foram realizadas, a seguir, uma incubação a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi então estocado a -20°C.

PCR Quantitativa

A PCR quantitativa (qPCR) em tempo real foi realizada no aparelho *Chromo 4 PCR detection system* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), utilizando-se qPCR MasterMix Plus para SYBR® green I (Eurogentec, Seraing, Belgium), e analisada com o programa *Opticon Monitor 3*.

O ensaio da qPCR foi efetuado em um volume final de 25 μL , contendo 12.5 ng de c.DNA, 300 nM de cada primer sense e antisense e 12,5 μL de *MasterMix*. As seqüências dos primers utilizados na PCR estão descritas na tabela 5.

Os parâmetros da reação foram: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C, 15 s e 60°C, 1 minuto. Controles de RNA não submetidos à transcriptase reversa e controles sem DNA foram incluídos para verificar se a fluorescência não foi superestimada por amplificação de DNA genômico residual ou formação de *primer-dimer*.

RNA ribossômico 18S foi utilizado para normalização segundo à qualidade e à quantidade do RNA e eficiência da PCR. Para a normalização segundo a eficiência de transfecção, a expressão da β -galactosidase foi utilizada.

A quantificação foi realizada por meio do método de curva padrão. Curvas-padrão foram originadas de diluições sucessivas de um plasmídeo linearizado contendo o *amplicon* específico para cada gene compreendendo 6 ordens de magnitude, com um coeficiente de correlação de ao menos 0,98 em todos os experimentos. Para todos os experimentos a eficiência da PCR foi próxima a 1.

Tabela 5. Sequência de primers utilizados na PCR quantitativa

Gene	Primer sense	Primer antisense
SCNN1A	tcatcttcgacctcctggcatc	tctgtgcttggaaggcagtg
SGK1	aagagcacatcctcctctcag	accaacggctctgactgac
GILZ	ccaagcgtcatctcatgtg	ggagcatattggcattcc
18S	accgcagctaggaataatgga	gcctcagttccgaaaacca

4- Análise Estatística

Para a comparação dos resultados de transativação, foi utilizado o teste de ANOVA em duas vias o MR nativo como controle.

Para a comparação entre a expressão em células transfectadas com MR nativo e células transfectadas com os recptores mutantes p.P848 e p.X947, bem como entre a expressão nos tempos 60 minutos e 120 minutos, foi utilizado o teste de ANOVA para comparações múltiplas.

Valores de $p < 0,05$ foram consideradoa estatisticamente significantes.

Os resultados dos experimentos de transativação são apresentados como a porcentagem de transativação em relação à estimulação do MR nativo com a concentração de aldosterona a 10^{-8} M.

Os resultados da avaliação da expressão dos genes responsivos à aldosterona são apresentados em relação à expressão gênica basal (tempo

zero do estímulo com aldosterona). Para a comparação entre a expressão em células transfectadas com MR nativo e células transfectadas com os recptores mutantes p.P848 e p.X947, bem como entre a expressão nos tempos 60 minutos e 120 minutos, foi utilizado o teste de ANOVA para comparações múltiplas.

Resultados

1- Análise de Efeito Fundador

Após a amplificação por PCR dos microssatélites e dos polimorfismos no gene do *MR*, foi verificado em gel de agarose o tamanho esperado dos fragmentos amplificados (figura 8). Em seguida, foi realizado o sequenciamento automático dos polimorfismos e a genotipagem dos microssatélites com a utilização dos softwares GENESCAN 3.0 e GENOTYPER 2.5 (PE Applied Biosystems). Foram construídos, então, haplótipos associados à mutação *MR* p.R947X para investigar a presença de um cromossomo ancestral comum responsável pela recorrência da mesma mutação nas três famílias.

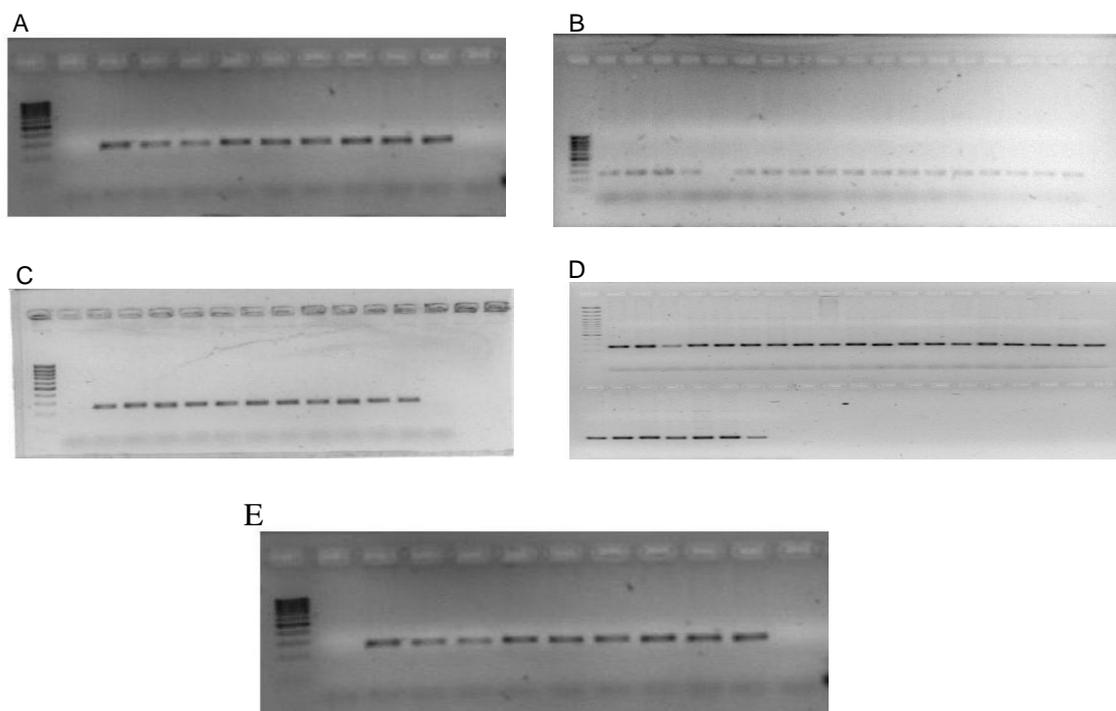


Figura 8. Fotos representativas de gel de agarose com produtos de PCR. A: amplificação do marcador D4S1586. B: Amplificação do marcador D4S3031. C: Amplificação do marcador D4S3038. D: Amplificação do marcador D4S3014. E: amplificação do fragmento do éxon 2 do gene do *MR* onde estão localizados os polimorfismos I180V e A241V.

Na família brasileira, todos os indivíduos, portadores ou não da mutação MR p.R947X, eram homocigotos para o alelo de 272 pb do marcador D4S3031 e para o polimorfismo MR p.A241V. O alelo de 248 pb do marcador D4S3014, o alelo com 266 pb do marcador D4S3008, o alelo com 107 pb do marcador D4S1586 e a variante valina do polimorfismo MR p.I180V segregaram com a mutação nos indivíduos portadores. Encontramos, portanto, um mesmo haplótipo segregando com a mutação MR p.R947X nesta família, conforme demonstrado na figura 9.

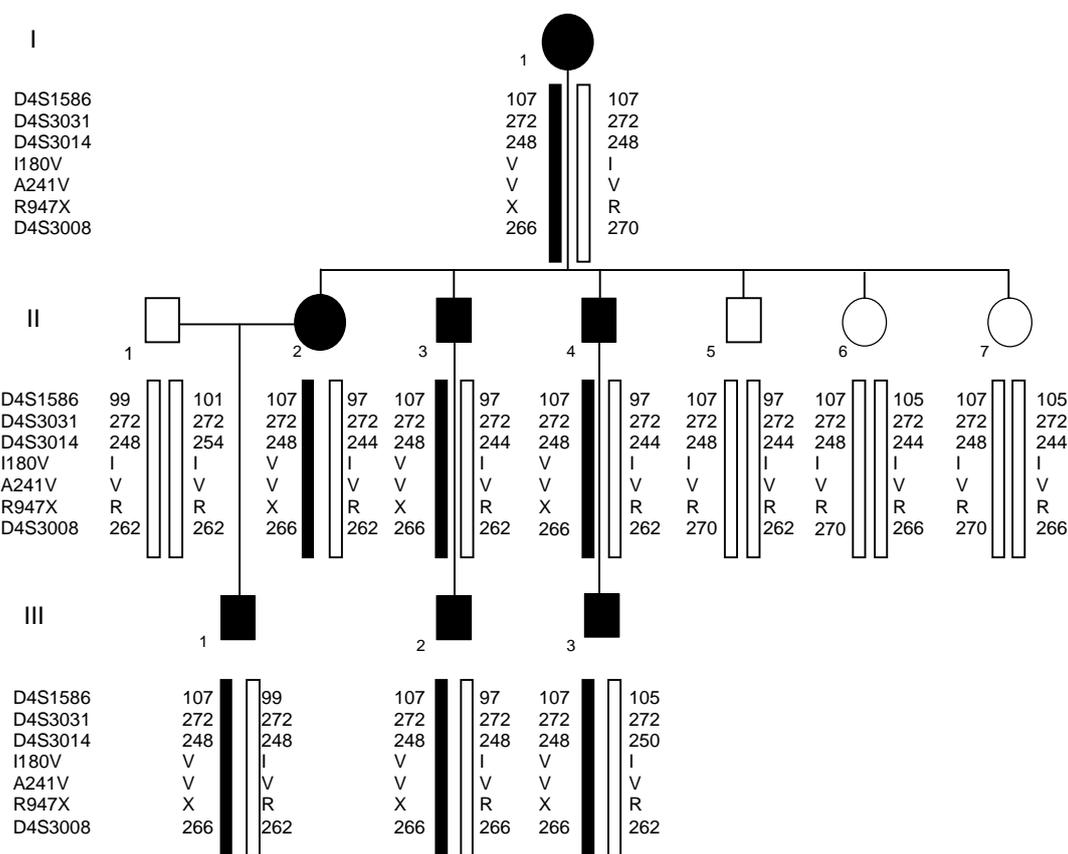


Figura 9. Heredograma representando a segregação de haplótipos na família brasileira. Indivíduos portadores são indicados por símbolos preenchidos. Os genótipos para os marcadores D4S1586, D4S3031, D4S3014 e D4S3008, os polimorfismos I180V e A241V e a mutação R947X são apresentados em relação ao gene do hMR. O haplótipo associado à doença é indicado por barras pretas.

Encontramos o alelo de 272 pb do marcador D4S3031 e a variante valina do polimorfismo MR p.A241V em homozigose nos três indivíduos estudados na primeira família turca. O alelo com 248 pb do marcador D4S3014, o alelo com 270 pb do marcador D4S3008, o alelo com 99 pb do marcador D4S1586 e o variante valina do polimorfismo MR p.I180V segregaram com a mutação MR p.R947X. Desta forma, encontramos um haplótipo comum aos portadores da mutação MR p.R947X nesta família (figura 10).

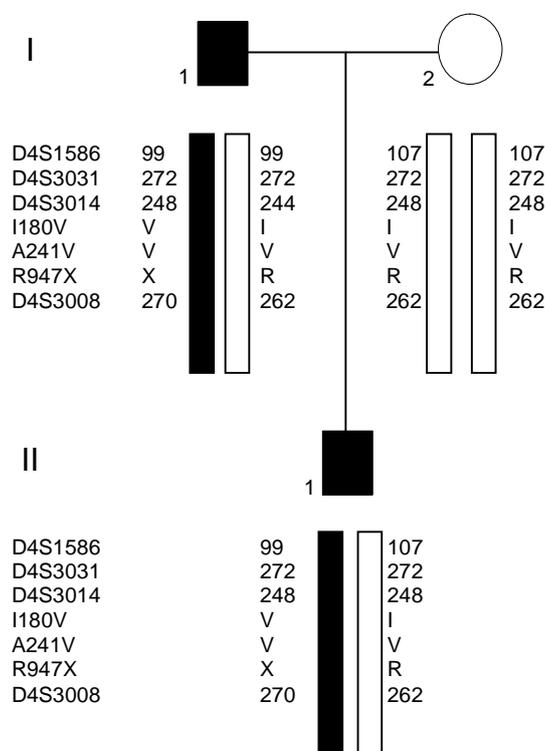


Figura 10. Heredograma representando a segregação de haplótipos na família turca 1. Indivíduos carreadores são indicados por símbolos preenchidos. Os genótipos para os marcadores D4S1586, D4S3031, D4S3014 e D4S3008, os polimorfismos I180V e A241V e a mutação R947X são apresentados em relação ao gene do hMR. O haplótipo associado à doença é indicado por barras pretas.

Na segunda família turca, encontramos o alelo de 272 pb do marcador D4S3031 e a variante valina do polimorfismo MR p.A241V em homozigose nos três indivíduos estudados. O alelo com 248 pb do marcador D4S3014, o alelo com 272 pb do marcador D4S3008, o alelo com 97 pb do marcador D4S1586 e o alelo nativo isoleucina do polimorfismo MR p.I180V segregaram com a mutação MR p.R947X. Encontramos, portanto, um haplótipo comum aos portadores da mutação MR p.R947X nesta família (fig 11).

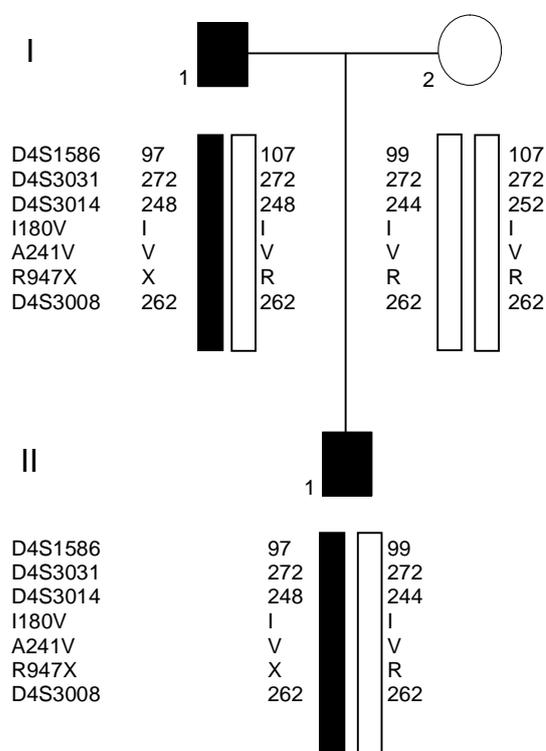


Figura 11. Heredograma representando a segregação de haplótipos na família turca 2. Indivíduos carreadores são indicados por símbolos preenchidos. Os genótipos para os marcadores D4S1586, D4S3031, D4S3014 e D4S3008, os polimorfismos I180V e A241V e a mutação R947X são apresentados em relação ao gene do hMR. O haplótipo associado à doença é indicado por barras pretas.

Ao analisarmos o haplótipo segregando com a mutação em cada família, verificamos que o alelos dos marcadores D4S1586, D4S3008 e o polimorfismo MR p.I180V não são concordantes entre as 3 famílias estudadas. Esses resultados mostraram que o haplótipo co-segregando com a mutação MR p.R947X foi diferente em cada família (figura 12). Como a chance de recombinação é improvável devido à pequena distância gênica dos marcadores em relação à mutação, pode-se inferir que a possibilidade de a existência de um efeito fundador para esta mutação é muito remota. Desta maneira, descrevemos pela primeira vez uma mesma mutação no gene do *MR* acometendo 3 famílias não relacionadas com PHA1, caracterizando, dessa forma, o primeiro *hot spot* mutacional no gene do *MR*.

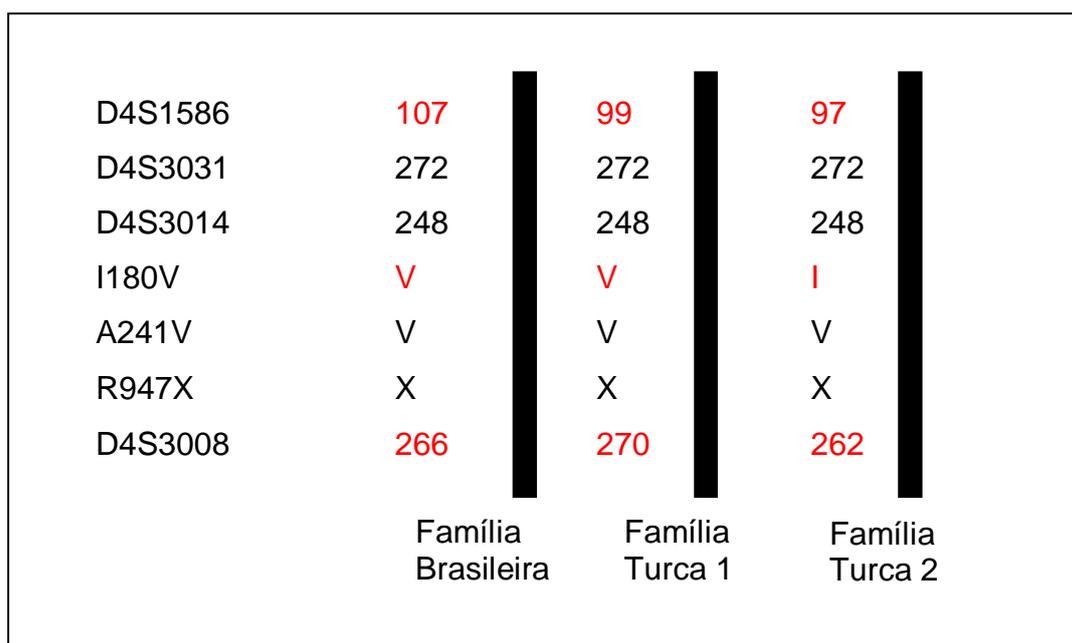


Figura 12. Haplótipos segregando com a mutação MR p.R947X na família brasileira e nas famílias turcas.

2-Análise dos Polimorfismos nos genes do *MR* e das subunidades *ENaC* e *ENaC*.

Verificamos a presença dos polimorfismos MR c.-2G>C, ENaC p.C618F e ENaC p.G442V nos indivíduos brasileiros carreadores da mutação MR p.R947X para avaliar sua possível associação com a variação fenotípica observada nesta família.

Todos os indivíduos portadores da mutação MR p.R947X foram homocigotos para o alelo mais comum (G442) do polimorfismo p.G442V, para o alelo p.C618 do polimorfismo ENaC p.C618F e para o alelo c.-2C do polimorfismo MR c.-2G>C. Portanto, não houve variação genotípica em relação a estes três polimorfismos nos indivíduos carreadores da mutação MR p.R947X, independente da apresentação fenotípica.

3- Análise funcional das mutações MR p.R947X e MR p.L848P

A- Transcrição/ Tradução *in vitro*

Experimentos de transcrição/tradução *in vitro* foram realizados para verificarmos o tamanho em kDa das proteínas geradas pelos plasmídios codificando o MR nativo e os mutantes MR P848 e MR X947. Como apresentado na figura 13, os MR mutantes foram traduzidos com a mesma eficácia do MR nativo. A tradução do MR nativo gerou uma proteína com tamanho aproximadamente de 107 kDa, o mesmo ocorrendo com o mutante missense MR P848. O fragmento gerado pelo mutante nonsense MR X947 também apresentou tamanho entre 100 e 110 kDa (perda dos últimos 37 aminoácidos e tamanho esperado de 102 kDa).

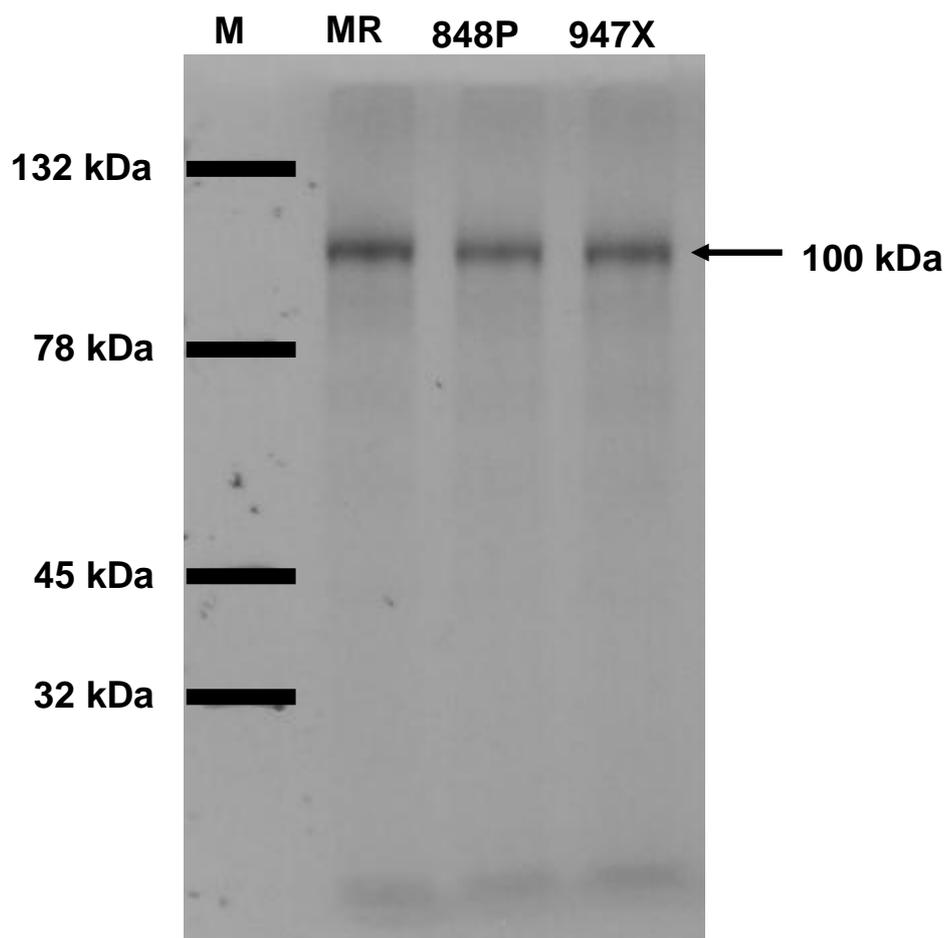


Figura 13. Foto de gel SDS-PAGE 8% mostrando o resultado da transcrição/tradução *in vitro* de plasmídios codificando o MR nativo e os mutantes MR P848 e MR X947. M: marcador de tamanho molecular.

B-Análise da atividade transcricional

A capacidade das proteínas hMR mutantes ativarem a transcrição de genes repórteres foi avaliada por ensaios de transfecção transitória em células RCSV3. Vetores de expressão dos receptores mutantes (P848 e X947) e do receptor nativo foram co-transfectadas com plasmídio repórter MMTV-luciferase ou GRE2-luciferase na presença de concentrações de aldosterona variando de 10^{-11} M a 10^{-8} M.

A análise da transativação do MR utilizando-se o gene repórter MMTV-luciferase seguiu um padrão dose-resposta, atingindo resposta máxima a uma concentração de 10^{-8} M de aldosterona e posterior *plateau*. O mutante MR

P848 apresentou início de resposta à aldosterona na concentração de 10^{-9} M, atingindo uma resposta máxima correspondente a 14,3%, significativamente inferior à resposta observada com o receptor nativo ($p < 0.01$). O mutante MR X947, também induziu uma resposta máxima de luciferase (2%) significativamente menor que à atividade transcricional do receptor nativo ($p < 0,01$) (figura 14).

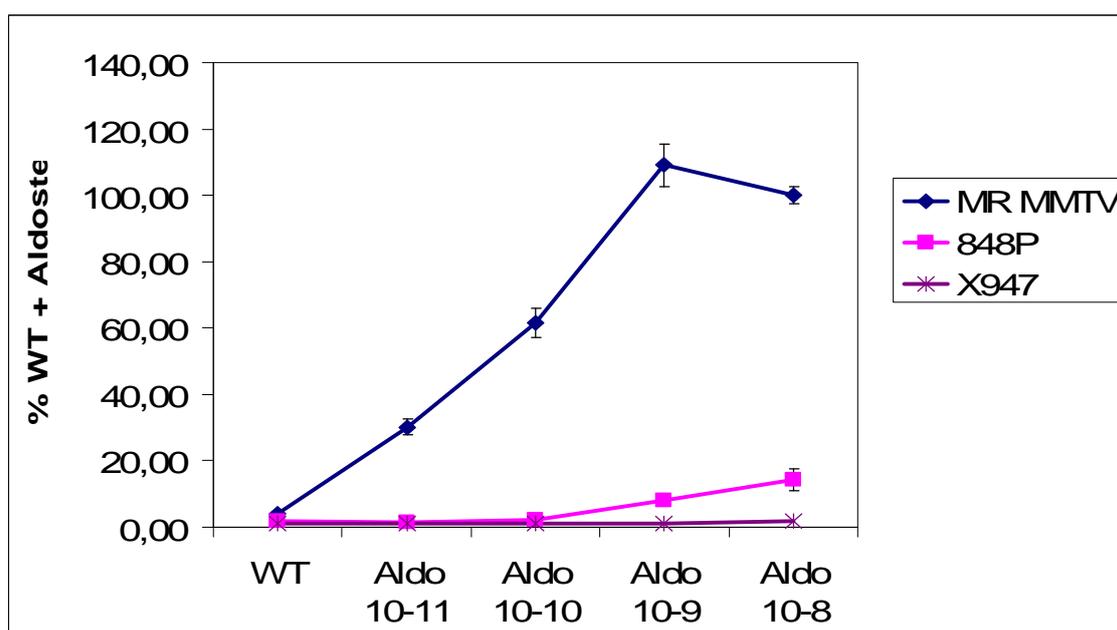


Fig 14. Transfecção do plasmídio repórter MMTV-luciferase. Curva dose-resposta à aldosterona para o receptor hMR nativo e mutantes P848 e X947. A indução transcricional relativa é representada à indução máxima observada para cada receptor.

Nos experimentos utilizando-se o plasmídio GRE2-luciferase como repórter, a aldosterona aumentou a transativação do MR seguindo um padrão dose-resposta, porém sem atingir um *plateau*. A atividade de luciferase máxima induzida pelo receptor mutante MR P848 foi 11%, significativamente menor que a resposta observada com o MR nativo em concentração de aldosterona a 10^{-8} M ($p < 0,01$). O receptor mutante MR X947 induziu a uma atividade máxima de luciferase significativamente menor que em relação à atividade induzida pelo

receptor nativo (2% vs. 100%; $p < 0,01$), não apresentando um padrão de dose-resposta (figura 15).

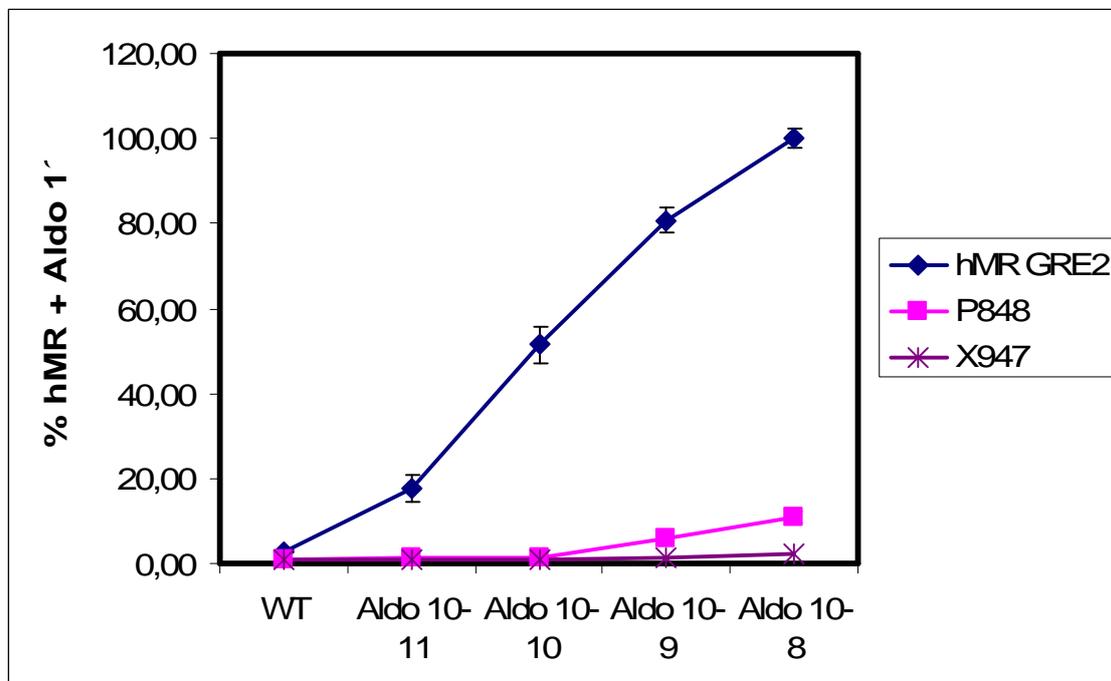


Fig 15. Transfecção do plasmídeo repórter GRE2-luciferase. Curva dose-resposta à aldosterona para o receptor hMR nativo e mutantes P848 e X947. A indução transcricional relativa é representada à indução máxima observada para cada receptor.

C- Análise da expressão de genes responsivos à aldosterona

Células HK transfectadas com o plasmídeo codificador do MR nativo ou plasmídios codificadores dos mutantes MR P848 e MR X947 foram tratadas com aldosterona em uma concentração de 10^{-8} M por 1 a 2 horas ou com meio sem esteróides (controle). O RNA destas células foi extraído e a expressão de genes responsivos à aldosterona foi avaliada por meio de Q-PCR.

SGK1

O tratamento das células transfectadas com o receptor nativo com aldosterona levou a um aumento significativo da expressão do *SGK1* ($2,4 \pm 0,6$ vezes, $p < 0,01$) após 60 minutos com posterior decréscimo da expressão em 2 horas ($0,4 \pm 0,2$ vezes, $p < 0,01$).

Nas células transfectadas com o mutante MR P848 verificamos um aumento da expressão do *SGK1* 1 hora após o tratamento com aldosterona ($1,4 \pm 0,4$ vezes, $p = 0,03$), porém este incremento foi significativamente menor do que o observado com o receptor nativo ($p < 0,01$).

Nas células transfectadas com o mutante MR X947 não houve aumento na expressão do *SGK1* após a administração de aldosterona (figura 16).

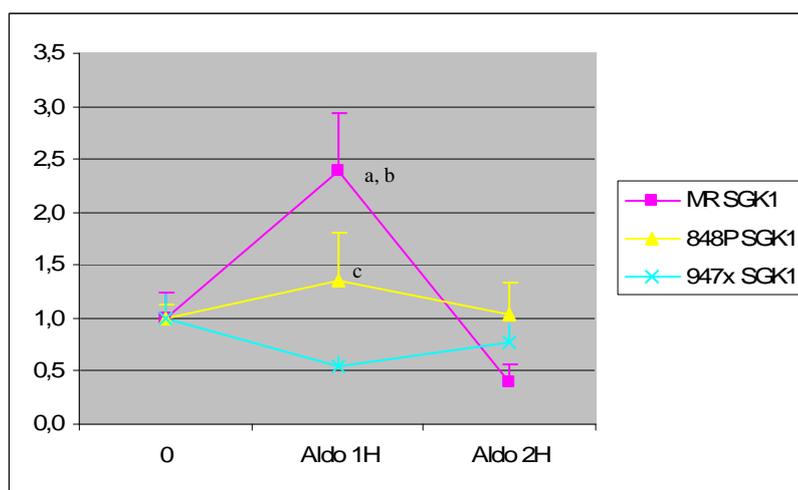


Figura 16. Expressão do gene *SGK1* em células HK transfectadas com MR, MR P848 e MR X947 nos tempos 0, 1 hora e 2 horas após a adição de aldosterona 10^{-8} M. Os resultados são descritos em relação à expressão basal (tempo 0). a: $p < 0,01$ vs expressão MR tempo 0; b: $p < 0,01$ vs expressão MR P848 1 hora e MR X947 1 hora; c: $p = 0,03$ vs X947 0.

SCNN1A (-ENaC)

A expressão do gene *SCNN1A* (-ENaC) nas células transfectadas com o receptor nativo aumentou gradativamente após a adição de aldosterona ($1,7 \pm$

0,3 vezes em uma hora, $p=0,04$ e $2,4 \pm 0,8$ em 2 horas, $p<0,01$). Nas células transfectadas com o receptor P848 não houve aumento significativo da expressão do *SCNN1A* após 1 hora de tratamento ($1,19 \pm 0,17$ vezes, $p=0,14$), porém houve tendência à redução da expressão após 2 horas ($p=0,05$).

Nas células transfectadas com o receptor X947, também não houve aumento da expressão do *SCNN1A* após 1 hora ($1,02 \pm 0,4$ vezes, $p=0,9$) ou 2 horas de tratamento com aldosterona ($1,5 \pm 0,3$ vezes, $p=0,1$) (figura 17).

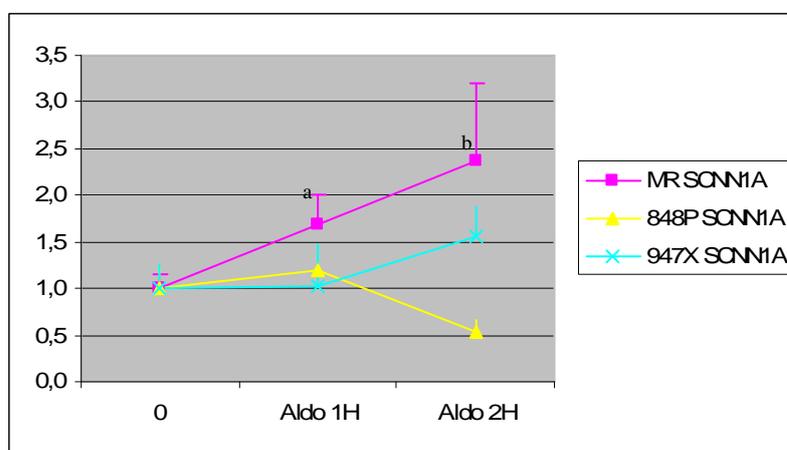


Figura 17. Expressão do gene *SCNN1A* em células HK transfectadas com MR, MR P848 e MR X947 nos tempos 0, 1 hora e 2 horas após a adição de aldosterona 10^{-8} M. Os resultados são descritos em relação a expressão basal (tempo 0). a: $p<0,04$ vs MR tempo 0; b: $p<0,01$ vs Mr tempo zero.

GILZ

Houve um aumento significativo na expressão do gene *GILZ* nas células transfectadas com o MR nativo ($3,0 \pm 0,8$ vezes, $p=0,03$) após 2 horas administração da aldosterona 10^{-8} M. Não houve aumento significativo da expressão deste gene nas células transfectadas com os mutantes P848 e X947 após a administração de aldosterona (figura 18).

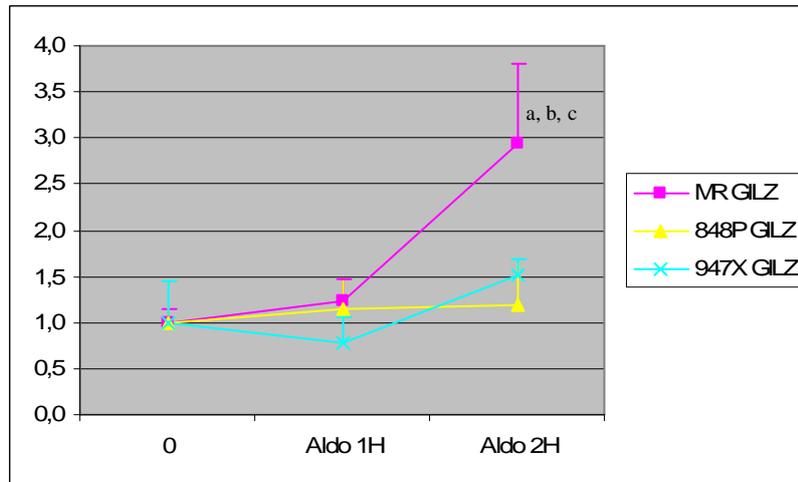


Figura 18. Expressão do gene *GILZ* em células HK transfectadas com MR, MR P848 e MR X947 nos tempos 0, 1 hora e 2 horas após a adição de aldosterona 10^{-8} M. Os resultados são descritos em relação a expressão basal (tempo 0). a: $p < 0,01$ vs MR tempo 0 e 1 hora; b: $p < 0,01$ vs MR P848 2 horas; c: $p < 0,01$ vs X947 2 horas.

Discussão

A forma renal do PHA1 é uma doença genética rara, transmitida por padrão de herança autossômico dominante ou esporádico, caracterizada por perda urinária de sal no período neonatal, vômitos, desidratação e baixo ganho pômbero-estatural. Os pacientes afetados apresentam hiponatremia, hipercalemia, aumento da PRA e concentrações muito elevadas de aldosterona plasmática, secundários a uma resistência renal à aldosterona. As alterações clínicas e eletrolíticas regridem com a reposição oral de sódio, porém a concentração de aldosterona plasmática e a PRA continuam elevadas (Oberfield *et al.*, 1979).

Mutações inativadoras do gene do MR estão associadas à forma renal do PHA1 em várias famílias afetadas cujo padrão de herança é autossômico dominante bem como em casos esporádicos. Até o momento, foram descritas aproximadamente 50 mutações no gene do *MR* em famílias com PHA1 (Viengchareun *et al.*, 2007). Todos os casos-índices apresentaram manifestação clínica grave e houve grande variação fenotípica para a mutação dentro da mesma família (Geller *et al.*, 2005). Em alguns pacientes com PHA1, entretanto, a análise do gene do MR não evidenciou mutações nos oito éxons transcritos (Geller *et al.*, 1998; Viemann *et al.*, 2001; Sartorato *et al.*, 2003).

Estudamos, previamente, o gene do MR em duas famílias brasileiras com indivíduos afetados por PHA1. Encontramos duas mutações em heterozigose no gene do *MR*, uma mutação *nonsense* (p.R947X) em três gerações de uma família e uma nova mutação *missense* (p.L848P) em dois indivíduos da segunda família. As duas mutações encontradas nas famílias brasileiras com PHA1 estão localizadas na região do gene do *MR* que codifica o LBD.

A mutação MR p.R947X havia sido descrita por Riepe *et al.* (2004) em uma família de origem turca, cujo caso-índice apresentara quadro clássico de PHA1, enquanto seu pai, também carreador da mutação era assintomático. Este mesmo grupo de pesquisadores alemães, estudando uma segunda família de origem turca com indivíduos portadores do PHA1, verificou mais uma vez a ocorrência da mutação MR p.R947X.

A recorrência de uma mesma mutação no gene do MR em indivíduos de famílias não-relacionadas não havia sido previamente descrita. A recorrência de uma mutação pode ser explicada de duas maneiras. Primeira, o nucleotídeo pode ser área de risco elevado ou *hot spot* para mutações. Alternativamente, a recorrência desta mutação pode ser devida ao um efeito fundador de uma mutação que ocorreu em um ancestral comum.

No presente estudo, duas das famílias afetadas eram originárias da Turquia, enquanto que a família brasileira era proveniente da região sudeste do Brasil e não conhecia a sua ascendência. Sabe-se que a população brasileira é formada por diferentes grupos étnicos, incluindo muitos descendentes de imigrantes sírio-libaneses. Essa região do Oriente Médio foi colonizada durante cinco séculos pelo Império Otomano que deu origem a atual Turquia. Assim, embora pouco provável, a possibilidade da existência de um ancestral comum entre as famílias turcas e a família brasileira não poderia ser, *a priori*, descartada.

Para verificar esta hipótese realizamos a análise haplotípica usando quatro microssatélites adjacentes ao gene do *MR*, cobrindo uma região de 3,2 *centimorgans* (cM) ao redor deste gene. Estes microssatélites representam todos os marcadores polimórficos a uma distância de até 2cM do gene do *MR*.

Como a distância de 1cM é equivalente a chance de recombinação gênica de 1%, optamos por estudar marcadores com distância até 2cM em relação ao gene do *MR*. Utilizamos como marcadores adicionais os polimorfismos intragênicos p.I180V e p.A241 no *MR*. A possibilidade de recombinação entre estes marcadores é bastante improvável, devido à pequena distância gênica entre eles e a mutação *MR* p.R947X.

Para confirmarmos a existência de um efeito fundador para a mutação R947X no gene do *MR*, todos os microssatélites deveriam ser idênticos nos indivíduos carreadores da mutação e os indivíduos carreadores deveriam apresentar os mesmos genótipos em relação aos polimorfismos intragênicos de substituição simples. Nossos resultados mostraram, entretanto, que indivíduos afetados pela mutação apresentavam haplótipos comuns dentro de uma mesma família, porém, esses haplótipos eram distintos entre as famílias. Além de diferirem em relação ao genótipo de um dos polimorfismos intragênicos, dois dos quatro microssatélites analisado foram diferentes entre as diferentes famílias portadoras da mutação *MR* p.R947X. Estes resultados permitiram excluir a possibilidade de efeito fundador para esta mutação.

Desta forma, descrevemos 3 famílias com *PHA1* apresentando a mesma mutação inativadora. Como as famílias não são relacionadas e não há um efeito fundador, nossos dados demonstraram que o códon 947 representa uma *hot spot* para mutações no gene do *MR*. Esta foi a primeira demonstração de recorrência de mutações no gene do *MR* e, provavelmente, de uma área de *hot spot* neste gene (Fernandes-Rosa *et al.*, 2006).

O códon 947 do *MR* contém uma seqüência de dinucleotídeo CG que está localizado numa região rica em CG na extremidade 3' deste gene (Hellal-Levy

et al., 2000). A recorrência de mutações nesse códon sugere um mecanismo mutacional envolvendo deaminação do nucleotídeo citosina. Este mecanismo de deaminação de 5-metilcitosina em timina em sítios CpG representa o mecanismo molecular mais freqüente de mutações na espécie humana, sendo responsável por mais de 20% de todas as substituições de bases nitrogenadas que dão origem a doenças genéticas (Krawczak *et al.*, 1998).

Outro objetivo do presente estudo foi avaliar se a presença de determinados polimorfismos nos genes do MR, α -ENaC e β -ENaC poderia explicar a ampla variação fenotípica observada nos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X.

Na família brasileira a mutação p.R947X foi encontrada, em heterozigose, no caso-índice, na sua mãe, na sua avó materna, em dois tios maternos e em dois primos maternos em primeiro grau, evidenciando padrão de herança autossômico dominante e segregação dessa mutação com o PHA1 na família materna. Houve grande variação fenotípica entre os indivíduos afetados, tanto na apresentação clínica como nas concentrações plasmáticas de aldosterona.. Essa variação fenotípica já havia sido descrita em outras famílias com a forma renal do PHA1 (Riepe *et al.*, 2003; Sartorato *et al.*, 2003; Nystrom *et al.*, 2004; Riepe *et al.*, 2004).

Arai *et al.* (2003) sugeriram que os polimorfismos p.I180V e p.A241V possam alterar a ação do MR e, portanto, poderiam contribuir para a variabilidade fenotípica observada em pacientes com PHA1. Neste estudo os autores demonstraram uma menor atividade dos receptores polimórficos MR V180 e MR V241 comparados ao receptor nativo. Em estudo recente, entretanto, a análise funcional do MR V180 mostrou que não há redução da

atividade transcricional do receptor polimórfico em relação ao receptor nativo quando estimulado com aldosterona. Entretanto, quando o ligante era um glicocorticóide, se observou redução significativa no padrão transcricional (de Rijk *et al.*, 2006). Apesar do possível papel funcional destes polimorfismos, os mesmos parecem não estar associados à variação fenotípica na família brasileira, visto que todos os indivíduos portadores da mutação MR p.R947X apresentavam genótipo semelhante para os polimorfismos MR p.I180V e MR p.A241V. Testamos, então, a possível participação de um polimorfismo na região de Kozak do MR (c.-2G>C) e de polimorfismos nas subunidades (p.C618F) e (p.G442V) do *ENaC* na variação fenotípica encontrada.

O polimorfismo MR c.-2G>C foi relacionado à manifestação clínica de PHA1 quando em associação a outros polimorfismos no gene do MR, sugerindo que este polimorfismo possa alterar a função do receptor. A análise funcional desse polimorfismo mostrou uma menor capacidade de transativação do alelo C em relação ao alelo G (Arai *et al.*, 2003). Como a região codificadora do alelo variante não difere da região codificadora do receptor nativo, podemos inferir que os domínios funcionais das proteínas geradas sejam os mesmos.

O polimorfismo MR c.-2G>C está localizado em uma região caracterizada por uma seqüência consenso em eucariotas (seqüência de Kozak), que apresenta papel crucial na iniciação da tradução (Kozak, 1987). Diversos estudos têm demonstrado que substituições ou deleções de nucleotídeos na seqüência de Kozak levam a alteração na capacidade de tradução de diferentes genes, estando envolvidas na fisiopatologia de doenças humanas (Kanaji *et al.* 1998; Afshar-Kharghan *et al.* 1999; De Angioletti *et al.*, 2004;

Jacobson *et al.*, 2007). A substituição do nucleotídeo G por C na posição -2, portanto, poderia alterar a capacidade de tradução do MR e contribuir para a variação fenotípica encontrada entre os portadores da mutação MR p.R947X. Em nosso estudo, todos os indivíduos portadores da mutação MR p.R947X foram também homocigotos para o alelo C do polimorfismo MR c.-2G>C. Excluímos, então, a participação desse polimorfismo na variação fenotípica encontrada.

O polimorfismo α ENaC p.C618F, descrito em 1999, é localizado em uma região altamente conservada entre mamíferos (Ambrosius *et al.*, 1999). Estudo funcional deste polimorfismo demonstrou uma maior atividade do ENaC, provavelmente pelo aumento do número de canais na membrana plasmática (Tong *et al.*, 2005). Este aumento da atividade do ENaC pode ser consistente com alterações do transporte de sódio e da pressão arterial. A presença do polimorfismo α ENaC p.C618F, portanto, poderia contribuir para a variação fenotípica observada nos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X. Nenhum dos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X, entretanto, era portador do polimorfismo α ENaC p.C618F. Este polimorfismo, portanto, não está associado à variabilidade fenotípica encontrada na família brasileira.

O polimorfismo β ENaC p.G442V foi descrito em indivíduos hipertensos franceses em 1998 (Persu *et al.*, 1998). Este polimorfismo foi associado à menor excreção de potássio e menores concentrações plasmáticas de aldosterona em crianças e adolescentes saudáveis (Ambrosius *et al.*, 1999). A análise funcional desse polimorfismo, entretanto, não mostrou alterações na corrente de Na^+ em células expressando o β ENaC polimórfico (Persu *et al.*,

1998; Ambrosius *et al.*, 1999). Nos indivíduos portadores da mutação MR p.R947X nós não observamos a presença do alelo polimórfico β ENaC p.V442. Portanto, o polimorfismo β ENaC p.G442V também não está associado à variabilidade fenotípica observada.

A comparação dos genótipos de todos os indivíduos brasileiros afetados pela mutação MR p.R947X sugere que nenhum dos três polimorfismos no MR (c.-2G>C, p.I180V ou p.A241V), ou os polimorfismos α ENaC p.C618F e β ENaC p.G442V contribuem na variabilidade fenotípica observada. É possível que polimorfismos em outros genes regulados pelo MR como os genes *SGK1*, *CHIF*, *GILZ*, *NDRG2* ou em outros genes associados ao transporte epitelial de sódio, como os genes *NEDD4-2* e *WNK1* possam influenciar a apresentação clínica do PHA1. Até o momento, portanto, a explicação para esta variabilidade ainda não é conhecida.

O terceiro objetivo do presente estudo foi verificar as conseqüências funcionais das mutações MR p.R947X e MR p.L848P. A mutação MR p.R947X resulta na tradução de uma proteína sem os últimos 37 aminoácidos do MR. Ao realizarmos a transcrição/tradução *in vitro* deste mutante verificamos, conforme esperado, a tradução de uma proteína de aproximadamente 100 kDa, menor que o receptor nativo, cujo peso molecular 107 kDa.

Ao analisarmos a capacidade da proteína hMR mutante 947X em ativar a transcrição dos genes repórteres MMTV-luciferase e GRE2-luciferase, verificamos a ausência da atividade transcricional. Este resultado corrobora os achados de estudos prévios que haviam demonstrado que a região C-terminal é crítica para a ligação da aldosterona ao MR (Couette *et al.*, 1998; Hellal-Levy

et al., 2000). Couette *et al.* (1998) demonstraram que a perda dos últimos três aminoácidos do MR levam à diminuição de 95% da sua capacidade de ligação e a perda dos últimos quatro aminoácidos leva à abolição total da capacidade de ligação deste receptor à aldosterona.

O códon 947 está localizado na α -hélice H11 do LBD, portanto a mutação R947X leva à perda das α -hélices H11 e H12 do LBD do MR. Auxiliada por outros fatores, como a proteína de choque térmico hsp90, a alça H11-H12 mantém o receptor em um estado aberto, capaz de se ligar a ligantes, sejam agonistas ou antagonistas. Adicionalmente, a α -hélice H11 é importante para o recrutamento de co-ativadores, a α -hélice H12 faz parte da bolsa hidrofóbica onde ocorre a ligação da aldosterona ao receptor além de conter o domínio de transativação dependente do ligante (Hellal-Levy *et al.*, 2000; Pascual-Le Tallec & Lombés 2005; Viengchareun *et al.*, 2007). Desta forma, podemos sugerir que a perda da capacidade de ativar a transcrição do mutante p.947X ocorra pela abolição da ligação da aldosterona ao MR, por alterações no recrutamento de coativadores e também pela perda da capacidade de transativação dependente do ligante do MR.

Na segunda família brasileira encontramos uma substituição em heterozigose de uma base nitrogenada timina por citosina na posição 2543 (c2543T>C) no gene do *MR*. Essa substituição leva a troca, no códon 848, de um aminoácido leucina por prolina (MR p.L848P). A mutação MR p.L848P está localizada no éxon 7 do gene do MR, região que codifica as α -hélices H6 e H7 do LBD, cuja função ainda não está bem esclarecida. Nenhuma mutação nessa região do receptor havia sido descrita previamente.

Como esperado, a transcrição/tradução do mutante MR p.L848P resultou em proteína com o mesmo peso molecular da proteína nativa. Ao analisarmos a atividade transcricional induzida pela aldosterona sobre o receptor mutante MR-P848, verificamos uma atividade correspondente a 11% do receptor nativo para os genes repórteres GRE2-luciferase e MMTV-luciferase. Estes achados ressaltam a importância do resíduo leucina na posição 848 do MR.

Os aminoácidos leucina e prolina são hidrofóbicos e possuem cadeia lateral apolar, pertencendo à mesma classe funcional de aminoácidos. A leucina é conservada no códon 848 do MR de diversas espécies como *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, *Tupaia belangeri*, *Mus musculus* e *Gallus gallus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Por outro lado, entre os outros receptores nucleares, somente o PR e o receptor do ácido retinóico apresentam o aminoácido leucina no códon 848. O GR e o receptor de andrógenos apresentam o aminoácido glicina no códon 848 e o receptor de estrógenos apresenta o aminoácido isoleucina no códon 848 (Fagart *et al.*, 1998). Como o aminoácido leucina no códon 848 do MR é conservado entre espécies e há variação do aminoácido presente no códon 848 dos outros receptores esteróides, pode-se sugerir que o aminoácido leucina no códon 848 exerça uma função importante e específica para o MR. Desta forma, mutações nesse códon poderiam levar a alterações conformacionais do LBD do MR, prejudicando sua função.

Análises funcionais de mutações *missenses* em regiões codificadoras do LBD do gene do MR, incluindo duas substituições de leucina por prolina em outros códons, mostraram alterações na atividade do receptor (Tajima *et al.*, 2000; Sartorato *et al.*, 2003; Riepe *et al.*, 2006).

Tajima *et al.* (2000) descreveram a mutação MR p. L929P, localizada no éxon 8. Esta mutação acometia 3 indivíduos de uma família japonesa com a forma renal do PHA1. A análise funcional dessa mutação mostrou que o receptor mutante P929 não era capaz de ativar a expressão gênica na presença de aldosterona. Estes autores sugeriram que o aminoácido leucina na posição 929 seja crítico para a dimerização.

Em estudo multicêntrico europeu foram descritas duas mutações *missenses* também em regiões codificadoras do LBD do MR, uma no éxon 5 (p.Q776R) e uma no éxon 9 (p.L979P) do gene do *MR*. A análise funcional dessas mutações através de estudo de ligação do receptor mutante à aldosterona mostrou menor afinidade de ligação do mutante MR p.Q776R (cerca de 30% da capacidade do receptor nativo) à aldosterona e perda completa da capacidade de ligação do receptor mutante MR p.L979P à aldosterona. A análise da capacidade de transativação das proteínas mutantes revelou que a atividade de transcrição máxima induzida pelo receptor mutante R776 foi 80% da observada com o receptor nativo. Já o mutante P979 perdeu completamente a atividade de transcrição dependente do ligante (Sartorato *et al.*, 2003; Sartorato *et al.*, 2004).

Recentemente, em novo estudo multicêntrico europeu, as mutações MR p.S818L e MR p.E972G, ambas no LBD do MR, foram descritas em pacientes com PHA1. A análise funcional da proteína mutante MR p.S818L mostrou diminuição da capacidade de ligação à aldosterona, abolição da capacidade de transcrição e alteração da translocação até o núcleo. O mutante MR p.E972G apresenta menor afinidade à aldosterona que o receptor nativo e

aproximadamente 9% da atividade transcricional observada com o MR (Riepe *et al.*, 2006).

Em tecidos epiteliais o MR regula a homeostase hidro-salina pela estimulação direta da expressão de transportadores iônicos na membrana celular: o ENaC na membrana apical (Canessa *et al.*, 1994; Rossier *et al.*, 2002) e a bomba Na/K ATPase na membrana baso-lateral (Horisberger *et al.*, 1991; Jorgensen, 1986). Estes transportadores são responsáveis pelo transporte unidirecional de sódio do lúmen para o interstício.

Na última década foram descritos vários genes responsivos à aldosterona com ação sobre o transporte de sódio. Eles incluem as subunidades do ENaC (Bens *et al.*, 1999; Epple *et al.*, 2000; Masilamani *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2006), subunidades da bomba Na/K ATPase (Kolla & Litwack, 2000), CHIF, que regula a atividade da bomba Na/K ATPase no cólon (Wald *et al.*, 1996; Brennan & Fuller, 1999) e K-ras2 gene cuja expressão é estimulada pela aldosterona no cólon (Brennan & Fuller, 2006). O *SGK1*, também é induzido precocemente pela aldosterona e apresenta papel crucial na homeostase do sódio (Bhargava *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1999; Naray-Fejes-Toth *et al.* 1999). Adicionalmente, Robert-Nicoud *et al.* (2001) demonstraram que o gene *GILZ*, também responsivo à aldosterona, estimula, em conjunto com o *SGK1*, o transporte de sódio mediado pelo ENaC nos rins.

A expressão *in vitro* destes genes responsivos à aldosterona ainda não havia sido caracterizada na presença de MR mutados encontrados em pacientes com PHA1. No presente estudo analisamos a expressão dos genes *SCNN1A*, *SGK1*, e *GILZ*, responsivos à aldosterona, em culturas celulares transfectadas com plasmídios codificando o receptor nativo ou os receptores

mutantes. O padrão de expressão gênica foi significativamente diferente nas células transfectadas com os plasmídios codificadores dos receptores mutantes P848 e X947 em relação ao receptor nativo.

Houve um aumento progressivo da expressão do gene *SCNN1A* nas células transfectadas com o receptor nativo após o tratamento com aldosterona o que não foi observado nas células transfectadas com o receptor mutante P848. Nas células transfectadas com o receptor mutante X947 houve um aumento não significativo da expressão do *SCNN1A* somente 2 horas após a adição de aldosterona no meio de cultura. Dijkink *et al* (1999) mostraram aumento significativo na expressão do *SCNN1A* somente 3 a 6 horas após a adição de aldosterona no meio de cultura. Este estudo, entretanto, foi realizado com cultura de células derivadas de ducto coletor de coelho, enquanto no presente estudo trabalhamos com linhagem celular derivada de tecido renal humano.

Estudo prévio demonstrou que genes codificadores dos canais de sódio (ENaC e Na/K-ATPase) são induzidos lentamente e provavelmente apresentam maior relevância fisiológica na fase de consolidação, mais tardia, da resposta à aldosterona (Verrey, 1999). O estudo da expressão de genes associados à fase rápida de ação da aldosterona, como os genes *SGK1* e *GILZ*, é de grande relevância no entendimento da fisiopatologia do PHA1.

Houve um aumento da expressão do *SGK1* uma hora após a adição de aldosterona em células transfectadas com o plasmídio pcDNA-MR e decréscimo da expressão em 2 horas. Este padrão de expressão não foi observado com os receptores mutantes. A proteína SGK1 está envolvida na fase rápida de ação da aldosterona, sendo encontrada em células tratadas com

aldosterona antes da detecção do mRNA das subunidades do ENaC (Chen *et al.*, 1999; Naray-Fejes-Toth & Fejes-Toth, 2000). Em células derivadas de ductos coletores e em tecido renal de ratos, os níveis de RNAm do *SGK1* elevaram-se aproximadamente entre 30 a 45 minutos após tratamento com a aldosterona (Chen *et al.*, 1999). Em tecido renal de ratos adrenalectomizados, foi demonstrado um aumento da expressão do SGK1 uma hora após o tratamento com aldosterona com posterior decréscimo à expressão basal duas horas após a adição do esteróide (Brennan & Fuller, 2000). Desta forma, nossos dados estão em acordo com dados prévios de estudos com cultura celular e demonstram a menor capacidade transcricional dos receptores mutantes.

Estudos prévios demonstraram que o SGK1 aumenta a expressão do ENaC na superfície celular e concomitantemente o transporte de sódio (Alvarez de la Rosa *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). O papel do SGK1 no transporte de sódio foi confirmado em estudos com modelos animais. Ratos *knockout* para o gene *SGK1* apresentaram concentrações elevadas de aldosterona e deficiência na conservação de Na⁺ quando submetidos a dietas com baixa ingestão de sal (Wulff *et al.*, 2002). O SGK1 é estimulado, também, pela insulina via fosfatidilinositol 3qkinase (PI3K) (Park *et al.*, 1999; Bhalla *et al.*, 2006) sendo um ponto de convergência de dois sinais extracelulares (aldosterona e insulina) (Wang *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2005).

No contexto do transporte de sódio, a interação mais estudada do SGK1 se faz com a proteína NEDD4-2. O NEDD4-2 é um ligante da ubiquitina E3 caracterizado por apresentar domínios ricos em triptofano (WW) (Tzivion & Avruch, 2002; Bhalla *et al.*, 2006). O NEDD4-2 é expresso em tecidos renais

sendo capaz de se ligar ao ENaC por interação direta dos domínios WW a sítios específicos prolina-tirosina (PY) no ENaC, favorecendo a sua ubiquitinação, endocitose e degradação proteossomal (Abriel *et al.*, 1999; Kamynina *et al.*, 2001; Gormley *et al.*, 2003). O aumento da expressão do SGK1 resulta em fosforilação e degradação do NEDD4-2 e, conseqüentemente, diminuição da inibição do ENaC, indiretamente estimulando um aumento no transporte de Na⁺ (Debonneville *et al.*, 2001). Desta forma, uma menor expressão do *SGK1*, como observada nas células transfectadas com os receptores mutantes, pode estar relacionada a uma menor fosforilação do NEDD4-2 e, portanto, desempenhar papel relevante na fisiopatologia do PHA1.

Nós observamos um aumento significativo da expressão do gene *GILZ* duas horas após o tratamento com aldosterona em células transfectadas com o plasmídeo codificador do MR nativo. Entretanto, esse aumento não foi observado em células transfectadas com os receptores mutantes P848 e X947. O aumento da expressão do *GILZ* com o receptor nativo observado em nosso estudo está em acordo com dados anteriores da literatura que evidenciaram um aumento significativo da expressão do *GILZ* em células de ducto coletor nativo ou cultura de células derivadas de ducto coletor com pico até 4 horas após o tratamento celular com aldosterona (Robert-Nicoud *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2003).

A proteína *GILZ* representa um importante mediador das ações da aldosterona, agindo em paralelo com o SGK1 para facilitar a presença do ENaC na membrana plasmática (Soundararajan *et al.*, 2005). Em cultura celular, o *GILZ* inibiu a produção de interleucina 2 (IL-2) ao inibir a sinalização

de proteínas quinases reguladoras extracelulares (ERK) (Ayroldi *et al.*, 2002). Nas células do ducto coletor, a sinalização da via ERK exibe um efeito inibitório importante sobre a atividade do ENaC (Zetner *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2002). A inibição do ENaC mediada por ERK é caracterizada pela fosforilação do canal de sódio, favorecendo sua interação com NEDD4-2 (Shi *et al.*, 2002). Esta interação ocasiona uma diminuição da expressão do ENaC na membrana plasmática e sua posterior degradação (Hendron *et al.*, 2002). Desta forma, assim como o SGK1, o GILZ aumenta a expressão do ENaC na membrana plasmática ao diminuir a inibição do canal.

Verificamos, portanto, uma expressão diferencial de genes responsivos à aldosterona em células transfectadas com o MR ou os receptores mutantes. A expressão reduzida dos genes *SGK1*, *GILZ* e *SCNN1A*, observada nos receptores mutantes p.X947 e p.P848, pode diminuir o transporte de sódio mediado pela aldosterona em tecidos epiteliais e, conseqüentemente, contribuir para as alterações bioquímicas e clínicas observadas em pacientes com PHA1.

Conclusões

1- Excluimos um efeito fundador para a mutação MR p.R947X, encontrada em uma família brasileira e em duas famílias turcas com PHA1. A recorrência da mutação MR p.R947X em famílias não relacionadas sugere a presença de um *hot spot* mutacional no códon 947 do MR.

2- Os indivíduos portadores da mutação MR p.R947X foram homocigotos para o alelo mais comum dos polimorfismos MR c.-2G>C, α -ENaC p.C618F e β -ENaC G442V. Desta forma, estes polimorfismos não estão relacionados à variação fenotípica observada nos indivíduos portadores desta mutação.

3- O receptor mutante P848 apresenta uma atividade transcricional de 11% em relação ao receptor nativo e o receptor mutante X947 apresenta uma abolição da capacidade de transativação, demonstrando diminuição da atividade funcional dos receptores mutantes.

4- Os receptores mutantes MR P848 e MR X947 promovem uma menor expressão dos genes SGK1, SCNN1A e GILZ após o estímulo com aldosterona do que o MR nativo. Esta expressão gênica diferencial pode comprometer o transporte de sódio em tecido epitelial renal e estar relacionada às alterações bioquímicas e clínicas observadas nos pacientes com PHA1.

Referências Bibliográficas

1- Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D, and Staub O. Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103: 667. 673, 1999.

2- Adachi M, Tachibana K, Asakura Y, Abe S, Nakae J, Tajima T, Fujieda K. Compound heterozygous mutations in the gamma subunit gene of ENaC (1627delG and 1570-1G-->A) in one sporadic Japanese patient with a systemic form of pseudohypoaldosteronism type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan;86(1):9-12, 2001.

3- Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, López JÁ. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood.* Jul 1;94(1):186-91, 1999

4-Alvarez de la Rosa D, Zhang P, NÁray-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G, Canessa CM. The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* Dec 31;274(53):37834-9. 1999

5- Ambrosius WT, Bloem LJ, Zhou L, Rebhun JF, Snyder PM, Wagner MA, Guo C, Pratt JH. Genetic variants in the epithelial sodium channel in relation to aldosterone and potassium excretion and risk for hypertension. *Hypertension.* Oct;34(4 Pt 1):631-7. 1999

6- Arai K, Tsigos C, Suzuki Y, Irony I, Karl M, Listwak S, Chrousos GP. Physiological and molecular aspects of mineralocorticoid receptor action in pseudohypoaldosteronism: a responsiveness test and therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct;79(4):1019-23, 1994

7- Arai, K.; Zachman, K.; Shibasaki, T.; Chrousos, G. P. Polymorphisms of amiloride-sensitive sodium channel subunits in five sporadic cases of pseudohypoaldosteronism: do they have pathologic potential? *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 2434-2437, 1999.

8- Arai K, Nakagomi Y, Iketani M, Shimura Y, Amemiya S, Ohyama K, Shibasaki T. Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *Hum Genet.* Jan;112(1):91-7, 2003.

9- Armanini D, Wehling M, Da Dalt L, Zennaro M, Scali U, Keller U, Pratesi C, Mantero F, Kuhnle U. Pseudohypoaldosteronism and mineralocorticoid receptor abnormalities. *J Steroid Biochem Mol Biol.*;40(1-3):363-5, 1991.

10- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* Jul 17;237(4812):268-75, 1987.

11- Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, and Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol* 22: 7929-7941, 2002

12- Belot A, Ranchin B, Fichtner C, Pujo L, Rossier BC, Liutkus A, Morlat C, Nicolino M, Zennaro MC, Cochat P. Pseudohypoaldosteronisms, report on a 10-patient series. *Nephrol Dial Transplant*. May;23(5):1636-41. 2008

13- Bens, M.; Vallet, V.; Cluzeaud, F.; Pascual-Letallec, L.; Kahn, A.; Rafestin-Oblin, M. E.; Rossier, B. C.; Vandewalle, A. Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line. *J Am Soc Nephrol*.;10:923-34. 1999

14- Bhalla V, Soundararajan R, Pao AC, Li H, Pearce D. Disinhibitory pathways for control of sodium transport: regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *Am J Physiol Renal Physiol*. Oct;291(4):F714-21. 2006

15- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ. The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*. Apr;142(4):1587-94, 2001.

- 16- Binart, N.; Lombes, M.; Rafestin-Oblin, M. E.; Baulieu, E. E. Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;88:10681. 5. 1991
- 17- Black, B. E.; Holaska, J. M.; Rastinejad, F.; Paschal, B. M. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol.*;11:1749. 58, 2001.
- 18- Bledsoe, R. K.; Madauss, K. P.; Holt, J. A.; Apolito, C. J.; Lambert, M. H.; Pearce, K. H.; Stanley, T. B.; Stewart, E. L.; Trump, R. P.; Willson, T. M.; Williams, S. P. A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem.*;280:31283. 93. 2005
- 19- Bloem LJ, Guo C, Pratt JH. Identification of a splice variant of the rat and human mineralocorticoid receptor genes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Nov;55(2):159-62, 1995.
- 20- Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ.* Dec;26(1-4):8-20, 2002.
- 21- Bosson D, Kuhnle U, Mees N, Ramet J, Vamos E, Vertongen F, Wolter R, Armanini D. Generalized unresponsiveness to mineralocorticoid hormones: familial recessive pseudohypoaldosteronism due to aldosterone-receptor deficiency. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 279:376-80, 1986.

22- Boulkroun S, Fay M, Zennaro MC, Escoubet B, Jaisser F, Blot-Chabaud M, Farman N, Courtois-Coutry N. Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J Biol Chem.* Aug 30;277(35):31506-15. 2002.

23- Brennan, F. E.; Fuller, P. J. Acute regulation by corticosteroids of channel-inducing factor gene messenger ribonucleic acid in the distal colon. *Endocrinology.*;140:1213. 8. 1999

24- Brennan FE, Fuller PJ. Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol.* Aug 30;166(2):129-36. 2000

25- Brennan, F. E.; Fuller, P. J. Mammalian K-ras2 is a corticosteroid-induced gene *in vivo* . *Endocrinology.*;147:2809. 16. 2006

26- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature.* Feb 3;367(6462):463-7. 1994.

27- Chang, S. S.; Grunder, S.; Hanukoglu, A.; Rosler, A.; Mathew, P. M.; Hanukoglu, I.; Schild, L.; Lu, Y.; Shimkets, R. A.; Nelson-Williams, C.; Rossier, B. C.; Lifton, R. P. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause

salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nature Genet.* 12: 248-253, 1996.

28- Cheek DB, Perry JW. A salt wasting syndrome in infancy. *Arch Dis Child.* Jun;33(169):252-6. 1958.

29- Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 2;96(5):2514-9. 1999.

30- Couette B, Jalaguier S, Hellal-Levy C, Lupo B, Fagart J, Auzou G, Rafestin-Oblin ME. Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* Jun;12(6):855-63. 1998.

31- Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* Mar;11(3):1025-33. 1992.

32- De Angioletti M, Lacerra G, Sabato V, Carestia C. Beta+45 G --> C: a novel silent beta-thalassaemia mutation, the first in the Kozak sequence. *Br J Haematol.* Jan;124(2):224-31. 2004

33- Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, and Staub

O. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *EMBO J* 20: 7052-7059, 2001

34- DeRijk RH, Wüst S, Meijer OC, Zennaro MC, Federenko IS, Hellhammer DH, Giacchetti G, Vreugdenhil E, Zitman FG, de Kloet ER. A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec;91(12):5083-9. 2006

35- Dijkink L, Hartog A, Deen PM, van Os CH, Bindels RJ. Time-dependent regulation by aldosterone of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in rabbit kidney. *Pflugers Arch.* Aug;438(3):354-60. 1999

36- Epple, H. J.; Amasheh, S.; Mankertz, J.; Goltz, M.; Schulzke, J. D.; Fromm, M. Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G718. 24. 2000

37- Evans WH, Bergeron JJ. Nuclear receptors: a re-evaluation. *Trends Biochem Sci.* Jan;13(1):7-8. 1988.

38- Fagart, J.; Huyet, J.; Pinon, G. M.; Rochel, M.; Mayer, C.; Rafestin-Oblin, M. E. Crystal structure of a mutant mineralocorticoid receptor responsible for hypertension. *Nat Struct Mol Biol.* 12:554. 5. 2005

39- Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* Feb;280(2):F181-92. 2001.

40- Fernandes-Rosa FL, de Castro M, Latronico AC, Sippell WG, Riepe FG, Antonini SR. Recurrence of the R947X mutation in unrelated families with autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: evidence for a mutational hot spot in the mineralocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep;91(9):3671-5. 2006

41- Fernandes-Rosa FL, Antonini SR. [Mineralocorticoid resistance: pseudohypoaldosteronism type 1] *Arq Bras Endocrinol Metabol.* Apr;51(3):373-81. 2007

42- Flores SY, Loffing-Cueni D, Kamynina E, Daidie D, Gerbex C, Chabanel S, Dudler J, Loffing J, and Staub O. Aldosterone-induced serum and glucocorticoid-induced kinase 1 expression is accompanied by Nedd4-2 phosphorylation and increased Na⁺ transport in cortical collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* 16: 2279. 2287, 2005.

43- Funder J. W., Feldman D., Edelman I. S. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J Steroid Biochem.*;3:209. 18. 1972

44- Funder J. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev.* May;26(3):313-21. 2005.

45- Fuse H, Kitagawa H, Kato S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol Endocrinol.* Jun;14(6):889-99. 2000.

46- Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Vallo Boado A, Schifter S, Bayer M, Chang SS, Lifton RP. Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat Genet.* Jul;19(3):279-81. 1998.

47- Geller DS. Mineralocorticoid resistance. *Clin Endocrinol (Oxf).* May;62(5):513-20. 2005.

48- Geller DS, Zhang J, Zennaro MC, Vallo-Boado A, Rodriguez-Soriano J, Furu L, Haws R, Metzger D, Botelho B, Karaviti L, Haqq AM, Corey H, Janssens S, Corvol P, Lifton RP. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J Am Soc Nephrol.* May;17(5):1429-36. 2006

49- Gormley K, Dong Y, Sagnella GA. Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem J.* Apr 1;371(Pt 1):1-14. 2003.

50- Greenwood A. K., Butler P. C., White R. B., DeMarco U., Pearce D., Fernald R. D. Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct

sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology*.144:4226. 36. 2003

51- Hanukoglu A. Type I pseudohypoaldosteronism includes two clinically and genetically distinct entities with either renal or multiple target organ defects. *J Clin Endocrinol Metab*. Nov;73(5):936-44. 1991.

52- Hanukoglu A, Bistrizter T, Rakover Y, Mandelberg A. Pseudohypoaldosteronism with increased sweat and saliva electrolyte values and frequent lower respiratory tract infections mimicking cystic fibrosis. *J Pediatr*. Nov;125(5 Pt 1):752-5. 1994.

53- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733. 736. 1997

54- Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Crucial role of the H11-H12 loop in stabilizing the active conformation of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*. Aug;14(8):1210-21. 2000.

55- Hendron E, Patel P, Hausenfluke M, Gamper N, Shapiro MS, Booth RE, and Stockand JD. Identification of cytoplasmic domains within the epithelial Na⁺ channel reactive at the plasma membrane. *J Biol Chem* 277: 34480. 34488, 2002.

56- Hollenberg SM, Evans RM Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55:899. 906. 1988

57- Horisberger, J. D.; Lemas, V.; Kraehenbuhl, J. P.; Rossier, B. C. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 53:565. 84. 1991

58- Jacobson EM, Huber AK, Akeno N, Sivak M, Li CW, Concepcion E, Ho K, Tomer Y. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun.* Apr;8(3):205-14. 2007

59- Jorgensen, P. L. Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney. *Kidney Int.* 29:10. 20. 1986

60- Kamynina E, Tauxe C, and Staub O. Distinct characteristics of two human Nedd4 proteins with respect to epithelial Na⁺ channel regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F469. F477, 2001.

61- Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, Niho Y. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood.* Mar 15;91(6):2010-4. 1998

62- Kolla, V.; Litwack, G. Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Biochem.* 204:35-40. 2000

63- Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* Oct 26;15(20):8125-48. 1987

64- Krawczak M, Ball EV, Cooper DN Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes. *Am J Hum Genet* 63:474-48. 1998

65- Kuhnle U, Nielsen MD, Tietze HU, Schroeter CH, Schlamp D, Bosson D, Knorr D, Armanini D. Pseudohypoaldosteronism in eight families: different forms of inheritance are evidence for various genetic defects. *J Clin Endocrinol Metab.* Mar;70(3):638-41. 1990.

66- Le Menuet D, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Zennaro MC, Lombes M. Expression and function of the human mineralocorticoid receptor: lessons from transgenic mouse models. *Mol Cell Endocrinol.* Mar 31;217(1-2):127-36. 2004.

67- Lim-Tio SS, Keightley MC, Fuller PJ. Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor. *Endocrinology.* Jun;138(6):2537-43. 1997.

68- Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 19;92(26):12480-4. 1995

69- Lombes M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem J*. Aug 15; 302 (Pt 1):191-7 . 1994.

70- Ludwig M, Bolkenius U, Wickert L, Bidlingmaier F. Common polymorphisms in genes encoding the human mineralocorticoid receptor and the human amiloride-sensitive sodium channel. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Mar;64(5-6):227-30. 1998

71- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. Dec 15;83(6):835-9. 1995.

72- Masilamani, S.; Kim, G. H.; Mitchell, C.; Wade, J. B.; Knepper, M. A. Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*. 104:R19. 23. 1999

73- Muller OG, Parnova RG, Centeno G, Rossier BC, Firsov D, and Horisberger JD. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between α ENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *J Am Soc Nephrol* 14: 1107-1115, 2003.

74- Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na⁺ channels. *J Biol Chem*. Jun 11;274(24):16973-8. 1999.

75- Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G. The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int*. Apr;57(4):1290-4. 2000.

76- Nishi M, Ogawa H, Ito T, Matsuda KI, Kawata M. Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: in comparison with glucocorticoid receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral variants. *Mol Endocrinol*. Jul;15(7):1077-92. 2001.

77- Nystrom AM, Bondeson ML, Skanke N, Martensson J, Stromberg B, Gustafsson J, Anneren G. A novel *nonsense* mutation of the mineralocorticoid receptor gene in a Swedish family with pseudohypoaldosteronism type I (PHA1). *J Clin Endocrinol Metab*. Jan;89(1):227-31. 2004.

78- Oberfield SE, Levine LS, Carey RM, Bejar R, New MI. Pseudohypoaldosteronism: multiple target organ unresponsiveness to mineralocorticoid hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* Feb;48(2):228-34. 1979.

79- Obradovi D, Tirard M, Némethy Z, Hirsch O, Gronemeyer H, Almeida OF. DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells--toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors? *Mol Pharmacol.* Mar;65(3):761-9. 2004

80- Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, and Hemmings BA. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18: 3024. 3033, 1999.

81- Pascual-Le Tallec L. , Kirsh O., Lecomte M. C., Viengchareun S., Zennaro M. C., Dejean A., Lombes M. Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol Endocrinol.* 17:2529. 42. 2003

82- Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombès M. The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is

a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol.* May;19(5):1158-69. 2005

83- Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* Sep;19(9):2211-21. 2005.

84- Patel P. D., Sherman T. G., Goldman D. J., Watson S. J. Molecular cloning of a mineralocorticoid (type I) receptor complementary DNA from rat hippocampus. *Mol Endocrinol.* 3:1877. 85. 1989

85- Pearce D, Yamamoto KR. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science.* Feb 19;259(5098):1161-5. 1993

86- Pearce D, Bhargava A, Cole TJ. Aldosterone: its receptor, target genes, and actions. *Vitam Horm.*;66:29-76. 2003.

87- Persu A, Barbry P, Bassilana F, Houot AM, Mengual R, Lazdunski M, Corvol P, Jeunemaitre X. Genetic analysis of the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in essential hypertension. *Hypertension.* Jul;32(1):129-37. 1998

88- Porter GA, Edelman IS. The action of aldosterone and related corticosteroids on sodium transport across the toad bladder. *J Clin Invest.* Apr;43:611-20. 1964

89- Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* Jun;18(3):306-60. 1997.

90- Pryce C. R., Feldon J., Fuchs E., Knuesel I., Oertle T., Sengstag C., Spengler M., Weber E., Weston A., Jongen-Relo A. Postnatal ontogeny of hippocampal expression of the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the common marmoset monkey. *Eur J Neurosci.* 2005.

91- Pujol L, Fagart J, Gary F, Papadimitriou DT, Claës A, Jeunemaître X, Zennaro MC. Mineralocorticoid receptor mutations are the principal cause of renal type 1 pseudohypoaldosteronism. *Hum Mutat.* Jan;28(1):33-40. 2007

92- Riepe FG, Krone N, Morlot M, Ludwig M, Sippell WG, Partsch CJ. Identification of a novel mutation in the human mineralocorticoid receptor gene in a german family with autosomal-dominant pseudohypoaldosteronism type 1: further evidence for marked interindividual clinical heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab.* Apr;88(4):1683-6. 2003.

93- Riepe FG, Krone N, Morlot M, Peter M, Sippell WG, Partsch CJ. Autosomal-dominant pseudohypoaldosteronism type 1 in a Turkish family is associated with a novel *nonsense* mutation in the human mineralocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* May;89(5):2150-2. 2004.

94- Riepe FG, Finkeldei J, de Sanctis L, Einaudi S, Testa A, Karges B, Peter M, Viemann M, Grötzinger J, Sippell WG, Fejes-Toth G, Krone N. Elucidating the underlying molecular pathogenesis of NR3C2 mutants causing autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* Nov;91(11):4552-61. 2006

95- Robert-Nicoud M, Flahaut M, Elalouf JM, Nicod M, Salinas M, Bens M, Doucet A, Wincker P, Artiguenave F, Horisberger JD, Vandewalle A, Rossier BC, Firsov D. Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 27;98(5):2712-6. 2001.

96- Rogerson, F. M.; Yao, Y. Z.; Elsass, R. E.; Dimopoulos, N.; Smith, B. J.; Fuller, P. J. A critical region in the mineralocorticoid receptor for aldosterone binding and activation by cortisol: evidence for a common mechanism governing ligand binding specificity in steroid hormone receptors. *Mol Endocrinol.* 21:817. 28. 2007

97- Rossier, B. C.; Pradervand, S.; Schild, L.; Hummler, E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol.*64:877. 97. 2002

98- Sartorato P, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Khaldi Y, Salomon R, Abadie V, Di Battista E, Naselli A, Racine A, Bosio M, Caprio M, Poulet-Young V, Chabrolle JP, Niaudet P, De Gennes C, Lecornec MH, Poisson E, Fusco AM, Loli P, Lombes M, Zennaro MC. Different inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in fourteen families affected by type I pseudohypoaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;88(6):2508-17. 2003.

99- Sartorato P, Cluzeaud F, Fagart J, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC. New naturally occurring missense mutations of the human mineralocorticoid receptor disclose important residues involved in dynamic interactions with deoxyribonucleic acid, intracellular trafficking, and ligand binding. *Mol Endocrinol.* Sep;18(9):2151-65. 2004.

100- Savage MO, Jefferson IG, Dillon MJ, Milla PJ, Honour JW, Grant DB. Pseudohypoaldosteronism: severe salt wasting in infancy caused by generalized mineralocorticoid unresponsiveness. *J Pediatr.* Aug;101(2):239-42. 1982.

101- Shi H, Asher C, Chigaev A, Yung Y, Reuveny E, Seger R, and Garty H. Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 13539-13547, 2002.

102- Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, and Pearce D. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* 280: 39970-39981, 2005.

103- Spindler B, Mastroberardino L, Custer M, Verrey F. Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflugers Arch.* Jul;434(3):323-31. 1997.

104- Strautnieks, S. S.; Thompson, R. J.; Gardiner, R. M.; Chung, E. A novel splice-site mutation in the gamma subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families. *Nature Genet.* 13: 248-250. 1996.

105- Tajima, T.; Kitagawa, H.; Yokoya, S.; Tachibana, K.; Adachi, M.; Nakae, J.; Suwa, S; Katoh, S.; Fujieda, K. A novel missense mutation of mineralocorticoid receptor gene in one Japanese family with a renal form of pseudohypoaldosteronism type 1. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 4690-4694. 2000.

106- Teixeira, M.; Viengchareun, S.; Butlen, D.; Ferreira, C.; Cluzeaud, F.; Blot-Chabaud, M.; Lombes, M.; Ferrary, E. Functional IsK/KvLQT1 potassium channel in a new corticosteroid-sensitive cell line derived from the inner ear. *J Biol Chem.* 281:10496-507. 2006

107- Thomas W, McEneaney V, Harvey BJ. Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron. *Steroids.* Oct;73(9-10):979-84. 2008

108- Tong Q, Menon AG, Stockand JD. Functional polymorphisms in the alpha-subunit of the human epithelial Na⁺ channel increase activity. *Am J Physiol Renal Physiol.* Apr;290(4):F821-7. 2006

109- Tzivion G and Avruch J. 14-3-3 Proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 3061-3064, 2002

110- Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol.* Sep;277(3 Pt 2):F319-27. 1999

111- Verrey F, Pearce D, Pfeiffer R, Spindler B, Mastroberardino L, Summa V, Zecevic M. Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. *Kidney Int.* Apr;57(4):1277-82. 2000.

112- Viemann, M.; Peter, M.; Lopez-Siguero, J. P.; Simic-Schleicher, G.; Sippell, W. G. Evidence for genetic heterogeneity of pseudohypoaldosteronism type 1: identification of a novel mutation in the human mineralocorticoid receptor in one sporadic case and no mutations in two autosomal dominant kindreds. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 2056-2059. 2001.

113- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal.* Nov 30;5:e012. 2007

114- Wald, H.; Goldstein, O.; Asher, C.; Yagil, Y.; Garty, H. Aldosterone induction and epithelial distribution of CHIF. *Am J Physiol.*;271:F322. 9. 1996

115- Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL, and Pearce D. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F303. F313, 2001.

116- Wulff P, Vallon V, Huang DY, Völkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlünz M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bösl MR, Lang F, Kuhl D. Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest.* Nov;110(9):1263-8. 2002

117- Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem.* Sep 8;270(36):21016-20. 1995

118- Zennaro, M. C.; Le Menuet, D.; Lombes, M. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol Endocrinol.* 10:1549. 60. 1996

119- Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S, Poisson E, Lombes M. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol Endocrinol.* Sep;15(9):1586-98.2001.

120- Zennaro MC, Lombes M. Mineralocorticoid resistance. *Trends Endocrinol Metab.* Aug;15(6):264-70. 2004.

121- Zentner MD, Lin HH, Wen X, Kim KJ, and Ann DK. The amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is transcriptionally down-regulated in rat parotid cells by the extracellular signal-regulated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 273: 30770. 30776, 1998

122- Zhou MY, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP. An alternatively spliced rat mineralocorticoid receptor mRNA causing truncation of the steroid binding domain. *Mol Cell Endocrinol.* Jan 25;159(1-2):125-31. 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)