

AUMENTO NA O-GLCNAÇILÇÃO RENAL INDUZ PROTEÍNURIA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Rodrigo P. da S. de Aguiar^{1*}, Nathália C. F. Bezerra¹, Miguel C. dos S. Lucena², Christina M. Takiya², Roberto T. Sudo³, Gisele Z. Sudo³, Wagner B. Dias^{2,4}, Celso C. Neves^{2,4,5}.

1. Estudante de IC do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

2. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

3. Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

4. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ / Orientador

5. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Medicina Regenerativa

Resumo:

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a O-GlcNAcilação está alterada no tecido renal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e sua possível correlação com a proteinúria. Animais SHR possuem maior O-GlcNAcilação no córtex renal, com aumento da expressão de GFAT e OGT. Existe uma correlação positiva entre O-GlcNAcilação e a expressão de GFAT e proteinúria, porém não foi observado correlação com a pressão arterial. Estes dados indicam que o aumento da O-GlcNAcilação está associado com a proteinúria. Esta hipótese é favorecida pela observação que o tratamento dos animais SHR com inibidor de GFAT (DON) diminui a O-GlcNAcilação e a proteinúria. O aumento da O-GlcNAcilação de megalina em animais SHR induz sua internalização promovendo uma diminuição na reabsorção de albumina.

Juntos nossos resultados mostram que o aumento de O-GlcNAcilação da megalina no túbulo proximal é um dos mecanismos envolvidos com a proteinúria observada em animais SHR.

Autorização legal: Número de registro IBCCF186-05/16.

Palavras-chave: O-GlcNAc, Proteinúria e Megalina.

Apoio financeiro: CNPQ, CAPES e FAPERJ

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFRJ

Introdução:

Hipertensão arterial afeta aproximadamente 22% da população mundial com idade acima de 18 anos. Pacientes hipertensos tem maior chance de desenvolver doença renal, caracterizada por perda

progressiva da função renal. Os mecanismos moleculares envolvidos com a progressão da doença renal em pacientes que apresentam hipertensão arterial não foram completamente descritos. A falta deste conhecimento se reflete nas poucas estratégias terapêuticas disponíveis para o tratamento desta doença.

Tem sido mostrado que a proteinúria, historicamente considerada apenas um marcador de lesão renal, pode *per se* induzir a progressão da doença. Dados epidemiológicos demonstraram que albuminúria, presença de albumina na urina, é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e está correlacionada com mortalidade em pacientes hipertensos. Como ocorre o desenvolvimento de proteinúria em indivíduos hipertensos, entretanto, é uma pergunta a ser respondida.

A O-GlcNAcilação é uma modificação pós traducional dinâmica importante para a homeostase celular. É caracterizada pela adição do grupo N-Acetil-Glucosamina através de ligação β a resíduos de serina e treonina de proteínas nucleares e citoplasmáticas. Duas proteínas estão envolvidas com esta modificação: O-GlcNAc Transferase (OGT), responsável por transferir o GlcNAc para proteínas alvo; e a O-GlcNAcase (OGA), responsável por remover essa modificação. Os níveis de O-GlcNAcilação também são modulados pela disponibilidade do substrato da OGT UDP-GlcNAc, produzido pela via das hexosaminas, rota biosintética lateral a via glicolítica. A taxa de síntese de UDP-GlcNAc é controlada principalmente pela enzima limitante glutamina-frutose aminotransferase (GFAT).

Dados da literatura mostram que o aumento crônico de O-GlcNAcilação participa do desenvolvimento de diversas doenças, como diabetes, câncer e insuficiência cardíaca. Contudo, o possível envolvimento da O-GlcNAcilação no desenvolvimento da doença renal em indivíduos hipertensos ainda

não foi elucidado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a O-GlcNAcilação está alterada no tecido renal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e sua possível correlação com a proteinúria.

Metodologia:

Modelo animal: Ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensivos, SHR, machos, foram utilizados com idade de 14 semanas. Quando indicado, ratos Wistar e SHR foram tratados com 1 dose diária de PBS como veículo ou inibidor de GFAT 6-diazo-5-oxo-norleucina, DON, na concentração de 0,5 mg/mL/Kg, durante 3 dias. A administração foi por via intraperitoneal. Os animais foram obtidos pelo biotério do Programa de Desenvolvimento de Fármacos, ICB/UFRJ. Sua utilização foi aprovada pelo comitê de ética em uso de animais, CEUA, sob o número de registro IBCCF186-05/16. A utilização dos animais respeitou protocolos internacionais. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso a comida e água, em sala com temperatura controlada, entre 22°C e 24°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Anestesia e eutanásia foi realizada com 80 mg/Kg de Quetamina e 5 mg/Kg de Xilazina.

Cultura de células: Células LLC-PK1, um modelo de células epiteliais de túbulo proximal, foram mantidas em meio DMEM com 10% soro fetal bovino/1% de penicilina/streptomomicina a 37°C e 5% de CO₂. Após atingirem cerca de 95% de confluência, células foram starvadas e tratadas com vetor adenoviral codificando GFP ou OGT por 24h. Procedimento de imunodeteção foi aplicado em seguida.

Análise de proteínas por imunodeteção: Proteínas presentes na amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de PVDF. O-GlcNAc total foi detectado com anticorpo primário CTD 110.6. Anticorpos primários anti-OGT, anti-OGA, anti-GFAT, anti-GAPDH, anti-Albumin e anti-GFP comerciais foram utilizados em concentrações recomendadas pelo fabricante. Anticorpos secundários anti-chicken, anti-rabbit e anti-mouse IgM acoplados a HRP foram utilizados para detecção. A detecção foi realizada com kit ECL Plus e imagens obtidas no aparelho ImageQuant LAS 4000.

Análises histológicas: Rim foi perfundido com solução fixadora de Paraformaldeído 4%. Amostras foram embebidas em parafina e cortes de 5 micrometros de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo Cut 5062 e

adicionadas em lâminas polilisinadas. Após baterias de desparafinização e bloqueios de ligações inespecíficas, imunofluorescência foi aplicada utilizando-se anticorpo primário anti-megalina na diluição 1:200, e anticorpo secundário anti-rabbit Alexa-546, na diluição 1:400. A marcação do núcleo foi realizada com DAPI. Fotos foram adquiridas em microscópio confocal.

Análises estatísticas: Foram realizados 3 grupos experimentais distintos, totalizando um número amostral N=8 para ratos 14 semanas, N= 3 ou 4 para ratos Wistar e SHR tratados com DON. Gráficos e análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando valor de P < 0,05 após análise por teste t de Student. Coeficiente de correlação foi obtido através do coeficiente de Pearson e análise do coeficiente de determinação através da regressão linear.

Resultados e Discussão:

Observamos um aumento de 2 vezes nos níveis de O-GlcNAcilação de proteínas no tecido cortical renal de ratos SHR, quando comparados a ratos Wistar. Interessantemente, os níveis de O-GlcNAcilação se correlacionaram positivamente com a (UP:Cr) (Razão Proteinúria:Creatinina urinária) ($\rho = 0,7705$ e $r^2 = 0,5937$), mas não com a pressão sistólica ($\rho = 5653$, $r^2 = 0,3196$) nestes animais. O aumento de O-GlcNAcilação foi acompanhado por aumento de 2,5 vezes na expressão da proteína O-GlcNAc transferase (OGT). Mais ainda, observamos um aumento de 10x na expressão de glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT), enzima limitante da via das hexosaminas, responsável por produzir o substrato da O-GlcNAcilação UDP-GlcNAc.

O tratamento de ratos SHR com DON (0,5 mg/Kg), inibidor de GFAT, durante 3 dias, promoveu uma diminuição nos níveis de O-GlcNAcilação de proteínas no tecido cortical renal. Essa redução foi acompanhada por redução nos níveis de UP:Cr, proteinúria de médio e baixo peso molecular, e albuminúria. Esse dado se mostra interessante, visto que albuminúria é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e está correlacionada com níveis elevados de mortalidade.

Observamos que ratos SHR possuem menor capacidade de reabsorver proteínas no túbulo proximal. Interessantemente, células LLC-PK1, modelo de túbulo proximal, quando transfectadas com um vetor viral que aumenta a expressão de OGT, possuem perfil

semelhante ao observado em ratos SHR, ou seja, diminuição do *uptake* de albumina. Observamos que ratos SHR apresentam internalização de megalina no túbulo proximal, observado por microscopia confocal. Este processo se correlacionou com elevados níveis de O-GlcNAcilação de megalina, analisada por imunoprecipitação. Corroborando dados anteriores, tratamento com inibidor de GFAT, DON, restaura a localização apical de Megalina e diminui seus níveis de O-GlcNAcilação.

Conclusões:

Nossos resultados mostram uma correlação entre proteinúria e o aumento de O-GlcNAcilação de megalina no córtex renal em ratos SHR. Estes dados abrem novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na proteinúria em pacientes hipertensos o que pode vir a se tornar um interessante alvo terapêutico para o tratamento de pacientes com hipertensão essencial.

Referências bibliográficas

World Health Organization; **World Health Statistics 2015**; http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/ (Acessado em dezembro de 2016);

Udani S., Lazich I., Bakris G.L.; **Epidemiology of hypertensive kidney disease**; Nat Rev Nephrol, 7, 11-21, 2011

Abbate M., Zoja C., Remuzzi G.; **How does proteinuria cause progressive renal damage?**; J Am Soc Nephrol, 17, 2974-84, 2006

Christensen E.I. et. al.; **Endocytic receptors in the renal proximal tubule**; Physiology, 27, 227-36, 2012

Böhm M. et. al., **Association of cardiovascular risk factors with microalbuminuria in hypertensive individuals: the i-SEARCH global study**; Journal of Hypertension, 25:11, 2317-24, 2007

Bond M.R., Hanover J.A; **A little sugar goes a long way: The cell biology of O-**

GlcNAc; J Cell Biol, 208 (7), 869-80, 2015

Lunde I.G., Aronsen J.A., Kvaloy H., Qvigstad E., Sjaastad I., Tonnessen T., Christensen G., Gronning-Wang L.M., Carlson C.R.; **Cardiac O-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure**; Physiol Genomics, 44: 162-72, 2012.

Zeng Q. et. al.; **O-Linked GlcNAcylation elevated by HPV E6 mediates viral oncogenesis**; Proc Natl Acad Sci USA, 113(33), 9333-38, 2016

Erickson J.R. et. al., **Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation**; Nature, 502(7471), 372-6, 2013