

# Uma variante do gene *WNK4* está associada à osteoporose mas não à hipertensão na população Portuguesa

Ana Isabel Mendes<sup>1</sup>, Mario R. Mascarenhas<sup>2</sup>, Sónia Matos<sup>1</sup>, Inês Sousa<sup>1</sup>, Joana Ferreira<sup>2</sup>, Ana Paula Barbosa<sup>2</sup>, Manuel Bicho<sup>2</sup> e Peter Jordan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa



# Doenças hereditárias raras da homeostase electrolítica

<i>Doença</i>	<i>Mutação/Tipo de canal</i>	<i>Fenótipos da doença</i>
<b>Doença de Liddle</b>	Canal epitelial de Na <sup>+</sup> ENaC	<b>Hipertensão</b> Absorção excessiva de Na <sup>+</sup> no nefrónio distal
<b>Pseudohipoaldosteronismo tipo I (PHA-1)</b>	Canal epitelial de Na <sup>+</sup> ENaC	Hipotensão desperdício renal de sais e ausência de resposta à aldosterona
<b>Síndrome de Gitelman</b>	co-transportador Na/Cl NCC	Hipotensão hipocalciúria, hipomagnesaemia, alcalose hipokalémica
<b>Síndrome de Bartter tipo I</b>	co-transportador NKCC2	
<b>Pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHA-2)</b>	<b>WNK4, WNK1</b> (regulam ROMK, NCC, fluxo para-celular de Cl <sup>-</sup> )	<b>Hipertensão, (Hipercaleiúria)</b> hiperkaliémia, acidose hiperclorémica
<b>Doença de Dent</b>	Canal de Cl <sup>-</sup> CLC-5	Formação de pedras renais, proteinúria
<b>Síndrome de Bartter tipo III</b>	Canal de Cl <sup>-</sup> ClC-Kb,	<b>Hipercaleiúria</b> , Desperdício renal de sais, alcalose hipokalémica
<b>Síndrome de Bartter tipo II</b>	Canal de K <sup>+</sup> ROMK1	<b>Hipercaleiúria</b> , Desperdício renal de sais, alcalose hipokalémica

# **Pseudo-hipoaldosteronismo tipo 2**

**ou: Síndrome de Gordon**

**ou: Hipertensão hiperkalémica familiar (FHH)**

- **doença familiar, autossômica dominante**

**causa: mutações nos genes *WNK1* ou *WNK4***

- **hipertensão média ou alta (sensível a doses baixas de tiazidas)**

**níveis normais de aldosterona, níveis baixos de renina**

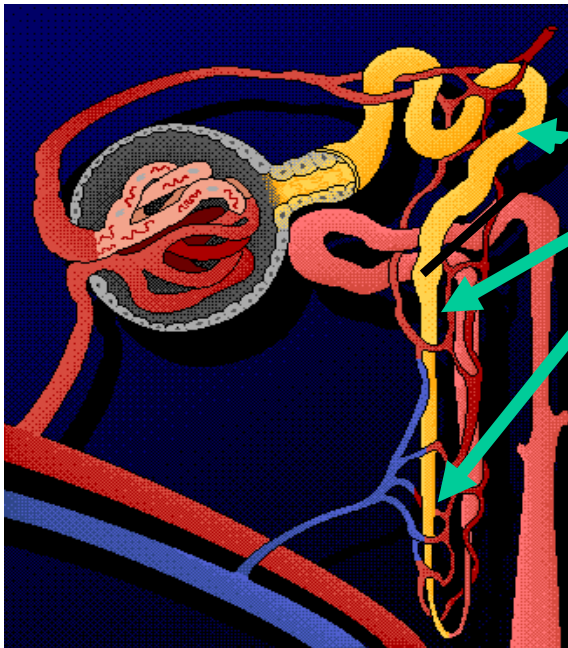
**filtração glomerular normal**

**hiperkaliémia (plasma  $>5.5$  mmol/l)**

**hipercalciúria (só *WNK4*)**

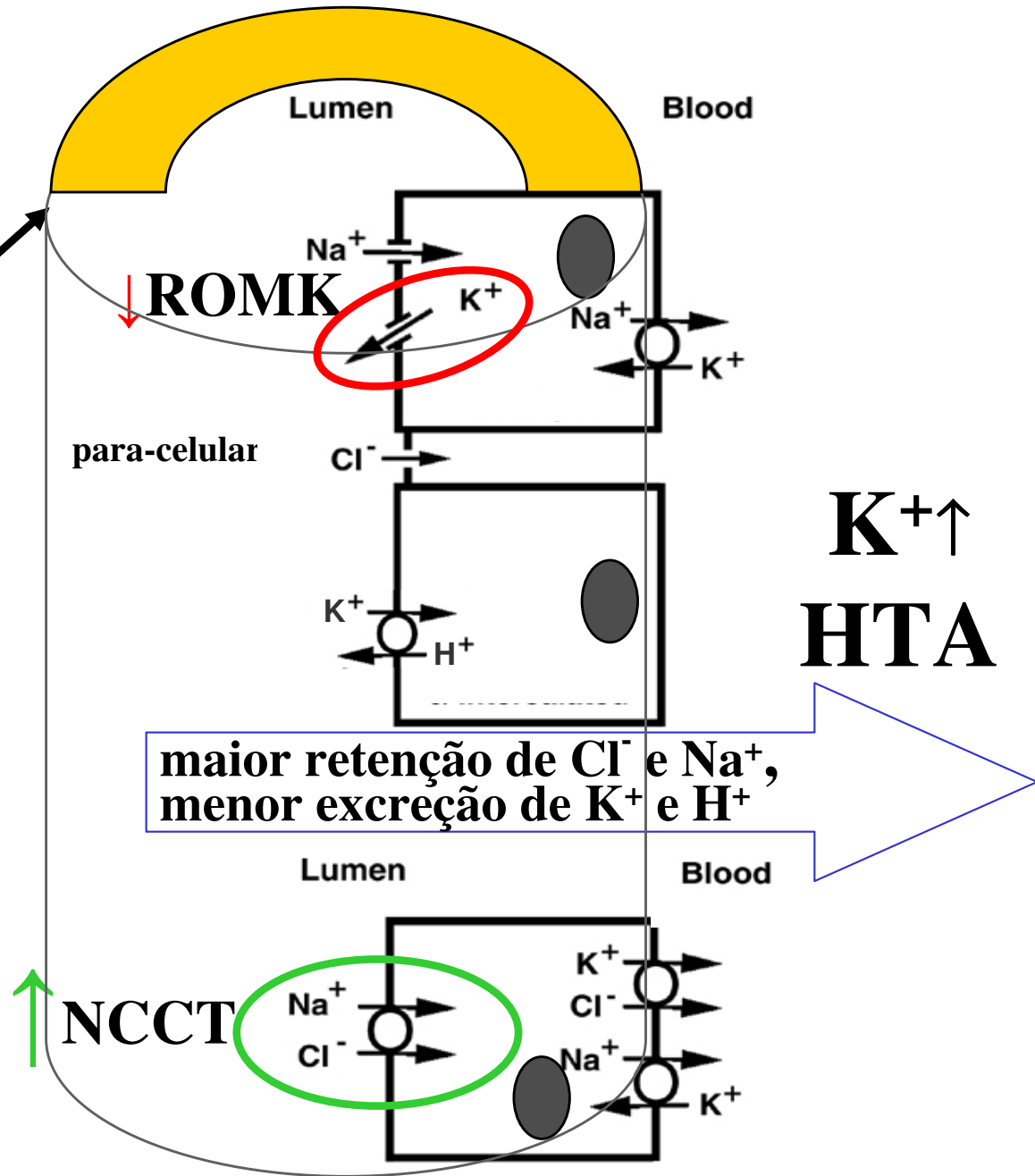
# Modelo da fisiopatologia renal em doentes PHA2

nefrónio



Ducto Colector

WNK1  
WNK4

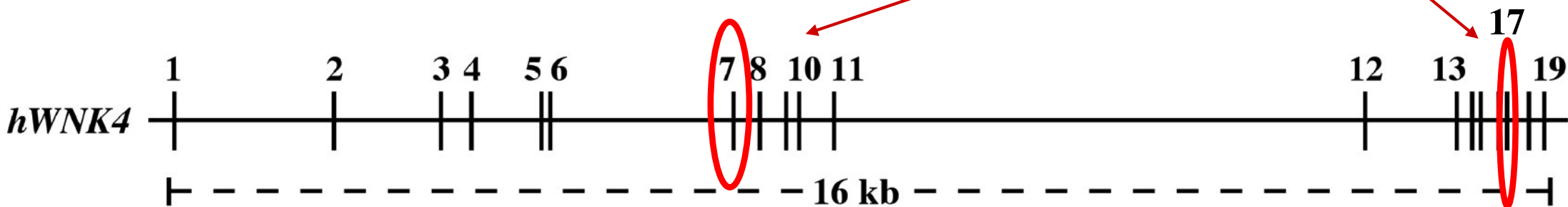
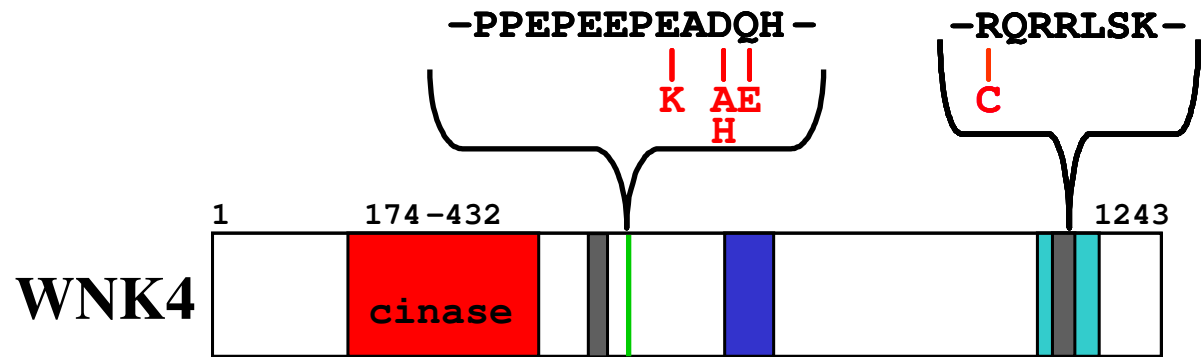


# Hipótese

---

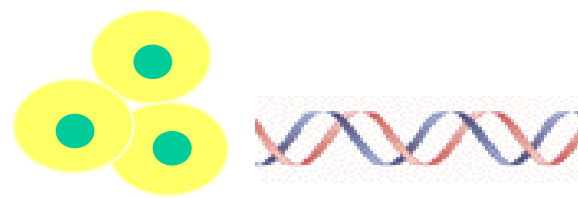
**Variantes polimórficas de *WNK4* na população geral  
contribuem para uma predisposição genética  
à hipertensão essencial ou à osteoporose**

# As mutações no *WNK4* em doentes PHA2



→ **PCR + dHPLC + sequenciação**  
WNK4 ex 7 e 17

# Material Biológico



DNA

Clinica Endocrinologia e Laboratório de Genética, FML Lisboa

- 271 indivíduos saudáveis (grupo controlo)
- 153 indivíduos normotensos com osteopenia
- 88 indivíduos normotensos com osteoporose
- 317 indivíduos hipertensos
- 69 indivíduos hipertensos com osteopenia
- 62 indivíduos hipertensos com osteoporose

## Totais:

448 hipertensos - 512 normotensos,  
372 DMO baixa - 381 DMO normal

# Resultados

Dez variantes genéticas

Exão/Intrão	Nucleótido	Proteína	SNP	Frequência	
IVS6	c.1477(-13)A>G	n. a.	rs61754357	6/601	1.0%
7	c.1523G>A	R508H	rs5599715	1/601	0.2%
7	c.1524 T>C	R508R	rs55879206	2/601	0.3%
7	c.1598T>C	L533P	não designada	1/601	0.2%
<b>7</b>	<b>c.1641C&gt;T</b>	<b>A547A</b>	<b>rs9916754</b>	<b>15/601</b>	<b>2.5%</b>
7	c.1653C>T	P551P	rs55751736	8/601	1.3%
7	c.1664C>G	P555R	rs57737815	4/601	0.7%
7	c.1719 C>T	H573H	rs56243382	2/601	0.3%
IVS16	c.3448(-20)T>C	n. a.	rs61755630	4/960	0.4%
<b>17</b>	<b>c.3610C&gt;T</b>	<b>R1204C</b>	<b>rs56116165</b>	<b>9/960</b>	<b>0.9%</b>

# Resultados

Amostra	Grupo de doentes	Exão/intrão	Nucleótido	Proteína	Frequência
201	Normal Control	Ex 7	c.1641C>T	A547A	15/601
261	Normal Control				
D4	Normal Control				
D45	Normal Control				
D109	Normal Control				
1MF	Essential Hypertension				
7MF	Essential Hypertension				
47MF	Essential Hypertension				
66MF	Essential Hypertension				
273	Essential Hypertension				
67G	Pregnancy-induced hypertension				
92G	Pregnancy-induced hypertension				
172	Low BMD + Hypertension				
182	Low BMD + Hypertension				
25	Osteoporosis				
420	Normal Control	Ex 17	c.3610C>T	R1204C	9/960
150	<b>Osteoporosis + Hypertension</b>				
317	<b>Osteoporosis + Hypertension</b>				
699	<b>Osteoporosis + Hypertension</b>				
70	<b>Osteoporosis+ Hypertension</b>				
104	<b>Low BMD</b>				
606	<b>Osteoporosis</b>				
2	<b>Osteoporosis</b>				
514	<b>Osteoporosis</b>				

Grupos comparados	Fisher's exact test			Logistic regression model		
	logOR	IC	<i>P</i> -value	logOR	IC	<i>P</i> -value
Hipertensos <i>versus</i> Controlos	0.38	(-0.70; 2.10)	0,650	0.89	(-1.30; 3,08)	0.428
<b>DMO baixo <i>versus</i> DMO normal</b>	0.92	(0.04; 2.60)	<b>0,020</b>	2.1.2	(0.04; 4.20)	<b>0.046</b>

Resultados significativos estão assinalados em letra gorda.

Abreviaturas: DMO, densitada mineral óssea; IC, intervalo de confiança; logOR, logaritmo odds ratio.

# O resíduo de arginina R1204 é altamente conservado

Espécie	Sequência peptídica da WNK4
Man ( <i>Homo sapiens</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPPGP-
Chimp ( <i>Pan troglodytes</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPPGP-
Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPPGP-
Orangutan ( <i>Pongo pygmaeus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPPGP-
Horse ( <i>Equus caballus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPPGT-
Hedgehog ( <i>Erinaceus europaeus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPLGP-
Cow ( <i>Bos taurus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPLGP-
Pig ( <i>Sus scrofa</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPLGP-
Dog ( <i>Canis familiaris</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPLGP-
Rabbit ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRSEPLGP-
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRS <sup>R</sup> DLPGP-
Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	-SKGSFPTSRRNSLQRS <sup>R</sup> DLPGP-

# Resultados

- 1) Variantes genéticas do gene *WNK4* são raras na população estudada
- 2) Não se verificou nenhuma associação entre variantes do gene *WNK4* e o fenótipo de hipertensão essencial na população estudada
- 3) Foi identificada, na população portuguesa, uma variante rara num resíduo arginina conservado que está associada à osteoporose  
→ Predisposição genética à osteoporose

(poder estatístico, outra população)

# Como poderá a variante *WNK4* predispor à osteoporose ?

- *WNK4* tem uma função fisiológica na homeostase renal de  $\text{Ca}^{2+}$ :  
ratinhos transgênicos de PHA2 desenvolvem hipercalciúria;
- Reflexo da relação inversa entre a absorção renal de  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$

## Canais renais regulados por *WNK4*

Canal	especificidade	efeito
NCC	cotransporte $\text{Na}^{+}$ $\text{Cl}^{-}$	membrana
NKCC2	cotransporte $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}/2\text{Cl}^{-}$	atividade
KCC3	cotransporte $\text{K}^{+}/\text{Cl}^{-}$	atividade
ENaC	canal epitelial de $\text{Na}^{+}$	membrana
ROMK	canal de $\text{K}^{+}$	membrana
TRPV4,5	canais de $\text{Ca}^{2+}$	membrana

→ Estudos funcionais da proteína variante

# Agradecimentos

**Ana Mendes**

**Sónia Matos**

**Inês Sousa**

– Instituto Nacional de Saúde

**Joana Ferreira, Prof. Dr. Manuel Bicho** – Laboratório de Genética, FMUL

**Dra Ana Paula Barbosa, Prof. Dr. Mario Rui Mascarenhas** –  
Serviço de Endocrinologia, HSM e Clínica de Endocrinologia, Diabetes e  
Metabolismo de Lisboa, Lda

**FCT**

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR