

CISTOGÊNESE E A EXPRESSÃO DAS POLICISTINAS NOS RINS POLICÍSTICOS

CYSTOGENESIS AND POLYCYSTIN EXPRESSION IN POLYCYSTIC KIDNEYS

Vagner Milani, Cristiane Mattos, Daiana Porsch, Liana Rossato, Elvino Barros, Ane Nunes

RESUMO

A doença renal policística do adulto é uma desordem genética de caráter autossômico dominante, caracterizada pelo progressivo desenvolvimento e crescimento de cistos renais, que podem levar à doença renal terminal durante a fase adulta do indivíduo. Outras manifestações clínicas associadas incluem cistos hepáticos e pancreáticos, hipertensão, aneurismas cerebrais e alterações cardiovasculares. Aspectos celulares e moleculares dos mecanismos de cistogênese envolvem proliferação e apoptose celular, remodelamento da matriz extracelular, secreção e acúmulo de líquidos. Geneticamente heterogênea, na maioria dos casos (~ 85%) são mutações no gene PKD1, localizado no cromossomo 16p13.3, com o segundo gene, PKD2, localizado nos intervalos do cromossomo 4q13-q23, respondendo por 15% de mutações, ambos já seqüenciados e caracterizados, ocorrendo ainda um terceiro gene, PKD3, porém ainda pouco estudado. Existem evidências da interação comum das proteínas policistinas 1 e 2, associadas com proteínas ciliares em rotas de eventos de adesões extracelulares e transportes iônicos, possibilitando a regulação do fluxo de Cl⁻ e Ca²⁺ transmembrana.

Unitermos: Doença renal policística do adulto, biologia molecular, gene PKD1.

ABSTRACT

Adult polycystic kidney disease is an autosomal dominant genetic disorder, characterized by progressive development and growth of renal cysts, which may lead to terminal renal failure during adulthood. Other associated clinical manifestations include hepatic and pancreatic cysts, hypertension, cerebral aneurysms and cardiovascular disorders. Cellular and mononuclear aspects of the mechanisms of cytogenesis comprehend cellular proliferation and apoptosis, remodeling of the extracellular matrix, secretion and accumulation of fluids. This disease is genetically heterogeneous; in most cases (approximately 85%), the gene involved is PKD1, which is located on chromosome 16p13.3. In the remaining cases (15%), the disease is caused by mutational changes in another gene (PKD2), which is located at chromosome intervals 4q13-q23. Both genes have been sequenced and characterized. There is also a third gene, PKD3, which has been little studied. There is evidence of the common interaction of polycystins 1 and 2, associated with ciliary proteins in pathways of extracellular adhesion and ionic transportation events, which promotes the regulation of Cl⁻ and transmembrane Ca²⁺ flow.

Keywords: Adult polycystic kidney disease, molecular biology, PKD1 gene.

INTRODUÇÃO

Os rins policísticos podem ter diversas etiopatogenias. O distúrbio mais conhecido é a doença renal policística autossômica dominante – *autosomal dominant polycystic kidney disease* (ADPKD) –, que tem uma prevalência de 1/600 a 1/1.000. Nos EUA, são mais de 600.000 pacientes, sendo considerada a quarta causa de doença renal terminal, levando 5% dessa população à diálise e ao transplante renal. Estima-se que a ADPKD seja responsável por 6 a 9% de casos de doença renal em estágio terminal na América do Norte e Europa (1-3).

No Brasil, mais especificamente em Porto Alegre, foi realizado um estudo em 975 pacientes de diferentes unidades de hemodiálise. Dos pacientes investigados, 7,6% apresentavam ADPKD como primeira causa de insuficiência renal (4).

A ADPKD se caracteriza basicamente pelo crescimento e desenvolvimento progressivo de cistos renais. Pode manifestar-se também no fígado e pâncreas, além de estar intimamente associada à hipertensão, defeitos cardiovasculares e aneurismas aórticos e cerebrais. Outras manifestações clínicas incluem infecções do trato urinário, hematuria, litíase renal e diverticulose intestinal. Dores abdominais são os sintomas mais comuns nesses pacientes, podendo ser contínuas ou intermitentes, além de cefaléia, devido à hipertensão, onde a atividade do sistema renina-angiotensina representa um papel crucial na sua regulação (5).

Geneticamente heterogênea, na maioria dos casos (80-85%) envolve mutações no gene PKD1, localizado no cromossomo 16p13.3, com o segundo gene, PKD2, localizado nos intervalos do cromossomo 4q13-q23, respondendo por 15% de mutações, ambos já seqüenciados e caracterizados, ocorrendo ainda um terceiro gene, PKD3, ainda pouco estudado (6).

Não existem testes laboratoriais ou achados clínicos para o diagnóstico da doença renal policística, especialmente em sujeitos assintomáticos até a meia idade. A ultra-sonografia, como exame de imagem, tem sido utilizada preferencialmente pelo fato de não necessitar agentes de contraste nem envolver radiação, aliado à facilidade e segurança. A tomografia computadorizada e as imagens por ressonância magnética do abdômen também são técnicas rotineiramente empregadas para a detecção dos cistos renais. Outras possibilidades incluem análises de ligação genética de famílias que apresentam históricos da doença, e, ultimamente, inúmeros trabalhos procuram utilizar marcadores moleculares como ferramentas no diagnóstico precoce da ADPKD (7).

ASPECTOS CELULARES DA CISTOGÊNESE

Na evolução clínica da ADPKD, há a dilatação progressiva de segmentos tubulares e glomerulares. A perda da morfogênese tubular normal em pacientes com ADPKD necessita da atividade coordenada de diferentes elementos, a maioria deles envolvida no crescimento celular, remodelamento da matriz extracelular e secreção de fluidos. A combinação desses mecanismos potenciais da cistogênese leva aos diferentes estágios da doença. A proliferação celular e mudanças extracelulares são, provavelmente, as causas de predisposição, dando início à dilatação das estruturas tubulares. Sem a secreção de fluidos, a proliferação celular dá origem, preferencialmente, à formação de tumores sólidos, nos quais cistos e carcinomas renais coexistem. Por outro lado, mudanças na composição da matriz extracelular resultaram no bloqueio da cistogênese *in vitro*, sugerindo uma interação célula/célula e/ou célula/matriz extracelular. Interações célula/matriz extracelular também são vitais em funções regulatórias e na manutenção da integridade tecidual (8,9).

Estudos da proliferação celular sustentam o conceito de que a predisposição de transformação do epitélio tubular é coordenada pela atividade de outros fatores ambientais necessários para o processo inicial da cistogênese, além de fatores genéticos intrínsecos, como mutações somáticas adicionais ou perda de heterozigossidade.

Aparentemente, o metabolismo da adenosina monofosfato cíclico (cAMP) é o componente central da formação, estimulação de secreção e acúmulo de fluidos císticos. Nas células renais normais, a proliferação celular é inibida pela cAMP; diferentemente, nas células ADPKD, ocorre estimulação de proliferação celular. Há evidências de que a cAMP e fatores de crescimento epiteliais atuam como efeitos complementares na progressão da doença (10).

Níveis consideráveis de RNA mensageiro para colágeno e laminina foram encontrados em rins de camundongos CPK/CPK (CPK = *congenital polycystic kidney*), o modelo animal para PKD recessivo. Em analogia, células PKD em cultura produziram níveis elevados de compostos de colágeno, sugerindo que células epiteliais em matrizes de colágeno podem mudar sua orientação e tipos de formas de interações celulares, envolvendo a polaridade e localização de transportadores de solutos e água.

Outro potencial mediador de secreção de fluidos e solutos em cistos no paciente ADPKD é a Na,K ATPase. O monitoramento dessa enzima nos diferentes estágios de cistogênese em camundongos CPK/CPK

mostrou um aumento circunstancial durante o desenvolvimento de cistos (11).

EXPRESSÃO GÊNICA DAS POLICISTINAS

Os produtos protéicos produzidos pelos genes PKD, policistina-1 e policistina-2, apresentam semelhanças em domínios transmembrana e adesão extracelular, possuindo uma ligação heterodimérica entre ambas através de uma região α -hélice, localizada na porção C-terminal das proteínas. Existem evidências da interação comum em rotas de eventos de adesão extracelular e transporte iônico, possibilitando a regulação do fluxo de Ca^{2+} transmembrana (12).

Ensaio realizado a partir do DNA complementar de toda a extensão do gene PKD1 demonstraram a expressão da policistina *in vitro*. Anticorpos policlonais direcionados contra domínios específicos, extra e intracelulares, precipitaram a policistina-1, permitindo o uso desse grupo de anticorpos para determinar a localização dessa proteína no epitélio renal e em células endoteliais, além de tecidos fetais, adultos e de origem cística. Em rins adultos e néfrons fetais maduros normais, a expressão de policistina é restrita às células epiteliais do néfron distal e células endoteliais vasculares. A expressão no néfron proximal foi observada apenas quando a injúria na proliferação celular foi induzida. Em outros órgãos, a expressão da policistina-1 é limitada ao ducto epitelial no fígado, pâncreas, coração e células específicas do cérebro. Estes indicam que a policistina-1 também desempenha funções de diferenciação epitelial e maturação celular (13).

Um ponto bastante interessante é o fato de a policistina-1 ser menos abundante em tecidos adultos do que em epitélio fetal e sua expressão ser significativamente maior em cistos ADPKD, sugerindo um *feedback* positivo devido a compostos alterados.

Existe uma hipótese de consenso de que as diferentes expressões da doença envolvem os genes PKD1, PKD2 e PKD3 (apesar de este último ainda ter sido alvo de poucos estudos) e resultam de defeitos na interação de fatores envolvidos em uma mesma rota metabólica, provavelmente atuando como cascatas de sinalização na morfogênese tubular. Qian et al. descreveram um domínio *coiled-coil* na porção C-terminal da policistina-1 que se liga especificamente com a porção C-terminal da policistina-2. Quando alguma mutação patogênica ocorre em um dos genes, essa associação física *in vivo* é comprometida (14).

ADPKD tem sido considerada como uma desordem recessiva em nível celular, sendo ambos os alelos PKD1

necessários para sua inativação, onde o primeiro mecanismo desencadeador seria uma mutação germinativa, seguida, então, por uma mutação somática (12).

Atualmente, muitos estudos têm se concentrado na sinalização mecanossensitiva através de cílios primários. A conexão entre estruturas ciliares e ADPKD foi observada a partir de dois modelos animais com rins policísticos de caráter autossômico recessivo, conhecidos como *Oak Ridge polycystic kidney* (ORPK) e CPK. Nos camundongos ORPK homocigotos para uma mutação no gene *Inv*, que codifica a proteína inversina, foi observada a expressão acentuada de cílios primários no epitélio renal (15). Camundongos ORPK afetados por mutação em outro gene, o *Tg737*, codificam uma nova proteína chamada *polaris*, localizada em corpos ciliares basais e no axonema, que apresentam defeitos no desenvolvimento e assimetria ciliar (16). No segundo modelo animal estudado, mutações no gene CPK deram origem à proteína cistina, co-localizada com as proteínas *polaris* e tubulina em células epiteliais renais (17,18).

Trabalhos mais recentes sugerem que o canal policistina-1/policistina-2 está ligado à associação de proteínas microtubulares em cílios primários. A função sensociliar atuaria como evento sinalizador que leva à proliferação e à ativação para transporte de íons. Sinais intracelulares mediados pelas policistinas também incluem regulação de proteínas *G-protein-coupled-receptor proteolysis site* e cascatas de ativação de quinases. Ainda que sejam hipóteses e inferências, parece essencial a presença de proteínas ciliares no mecanismo sensitivo das policistinas (19).

Chaveut et al. relatam rotas alternativas e/ou paralelas atuando a partir de estímulos ciliares e que, através de eventos proteolíticos, clivam as porções N-terminal extracelular e C-terminal intracelular. Esse fragmento de cerca de 200 aminoácidos se transloca ao núcleo, ativando rotas de sinalização celular (quinases e fosfatases) e atuando como modulador de expressão gênica (20,21).

De fato, as policistinas possuem uma ampla atividade relacionada com sinalização de moléculas e rotas metabólicas, assim como vasta distribuição em organismos de todo o reino animal, com exceção apenas de seres unicelulares. Classificadas quanto à estrutura molecular, as chamadas PKD1Like (PKD1, PKD1L1-3 e PKDREJ) possuem uma extensa porção extracelular, 11 domínios transmembrana e curta porção intracelular. A porção REJ (*receptor for egg-jelly*) tem papel crucial nos eventos de sinalização celular e, paralelamente, como pré-requisito na exocitose da vesícula acrossomal por processos de concentração Na^+/Ca^{2+} (22,23).

Outros estudos com o nematódeo *Caenorhabditis elegans* revelaram a expressão da *lov-1* (*location of vulva*),

proteína homóloga às policistinas 1 e 2 na diferenciação e comportamento sexual dessa espécie. Cílios primários neurais localizados na cabeça e na cauda desempenham ainda funções tácteis do ambiente e resposta ao meio. Correlacionando-se com fenótipos císticos renais em mamíferos, esse verme parece ser mais um bom modelo para a ADPKD, além dos murinos, caninos e felinos já estudados (24-28).

Evidências apontam cada vez mais a associação das policistinas 1 e 2 com a formação do canal iônico e a participação de subunidades protéicas na sinalização para o acoplamento estrutural e ativação de rotas metabólicas. Essas ativações, por sua vez, determinam eventos como crescimento, diferenciação, apoptose e remodelamento tecidual, em especial durante a cistogênese (29).

CONCLUSÕES

As terapias propostas se baseiam em protocolos para neoplasias, a partir dos estudos com modelos animais. Até o momento, busca-se a associação de uma mutação genotípica e os processos celulares ocorridos a um quadro clínico e, conseqüentemente, a novos tratamentos com agentes específicos.

Trabalhos experimentais sustentam essa hipótese também durante a progressão da doença, observando as respostas de inibição envolvendo modulação de dieta, suplementação de sódio e potássio, bloqueadores do sistema renina-angiotensina, *receptores ErbB* e *inibidores da tirosina-quinase*, taxol (paclitaxel), agentes antiinflamatórios, *inibidores MMP* (enzimas zinco-dependentes), modulação da expressão do protooncogene *c-myc* e drogas como lovastatina, inibidor da hidroximetilglutaril-CoA redutase e OPC31260, um receptor antagonista da vasopressina-2 (30,31).

REFERÊNCIAS

1. Afzal AR, Hand M, Ternes-Pereira E, Sagar-Malik A, Taylor R, Jeffery S. Novel mutations in the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene. *Hum Genet.* 1999;105(6):648-53.
2. Polycystic Kidney Disease Foundation. Disponível em: <http://www.pkdcure.org>.
3. Parfrey PS, Bear JC, Morgan J, et al. The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 1990;323(16):1085-90.
4. Nunes A, Roisenberg I, Picolli E, et al. Adult polycystic kidney disease in patients on haemodialysis in the south of Brazil. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(12):2686-7.
5. Calvet JP, Grantham JJ. The genetics and physiology of polycystic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2001;21(2):107-23.
6. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, et al. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int.* 2002;61(5):1588-99.
7. Gabow PA, Grantham JJ. Polycystic kidney disease. In: Schrier RW, Gottschalk CW, editors. *Disease of the kidney.* Boston: Little Brown; 1997. Pp. 521-60.
8. Grantham JJ, Geiser JL, Evan AP. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic disease. *Kidney Int.* 1987;31(5):1145-52.
9. Sessa A, Ghiggeri GM, Turco AE. Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *J Nephrol.* 1997;10(6):295-310.
10. Grantham JJ. The Jeremiah Metzger Lecture. Polycystic kidney disease: old disease in a new context. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2002;113:211-24; discussion 224-6.
11. Candiano G, Gusmano R, Altieri P, et al. Extracellular matrix formation by epithelial cells from human polycystic kidney cysts in culture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1992;63(1):1-9.
12. Grantham JJ. The etiology, pathogenesis, and treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances. *Am J Kidney Dis.* 1996;28(6):788-803.
13. Ibraghimov-Beskrovnya O, Dackowski WR, Foggstein L, et al. Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(12):6397-402.
14. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet.* 1997;16(2):179-83.
15. Morgan, D, Turnpenny L, Goodship J, et al. Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the inv mouse. *Nat Genet.* 1998;20(2):149-56.
16. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol.* 2002;12(11):R378-80.
17. Hou X, Mrug M, Yoder BK, et al. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest.* 2002;109(4):533-40.

18. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(10):2508-16.
19. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003;33(2):129-37.
20. Guay-Woodford LM. RIP-ed and ready to dance: new mechanisms for polycystin-1 signaling. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1404-6.
21. Chauvet V, Tian X, Husson H, et al. Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1433-43.
22. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, et al. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(26):16981-6.
23. Mengerink KJ, Moy GW, Vacquier VD. suREJ proteins: new signalling molecules in sea urchin spermatozoa. *Zygote.* 2000;8 Suppl 1:S28-30.
24. Jauregui AR, Barr MM. Functional characterization of the *C. elegans* nephrocystins NPHP-1 and NPHP-4 and their role in cilia and male sensory behaviors. *Exp Cell Res.* 2005;305(2):333-42.
25. Hou X, Mrug M, Yoder BK, et al. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest.* 2002;109(4):533-40.
26. Young AE, Biller DS, Herrgesell EJ, Roberts HR, Lyons LA. Feline polycystic kidney disease is linked to the PKD1 region. *Mamm Genome.* 2005;16(1):59-65.
27. Ong AC, Wheatley DN. Polycystic kidney disease—the ciliary connection. *Lancet.* 2003;361(9359):774-6.
28. Zhang Q, Taulman PD, Yoder BK. Cystic kidney diseases: all roads lead to the cilium. *Physiology (Bethesda).* 2004;19:225-30.
29. Delmas P, Padilla F, Osorio N, Coste B, Raoux M, Crest M. Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322(4):1374-83.
30. Guay-Woodford LM. Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(6):1034-49.
31. Ong AC, Harris PC. Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex. *Kidney Int.* 2005;67(4):1234-47.