

FERNANDO ROMARIZ FERREIRA

**ESTUDO DE LIGAÇÃO MOLECULAR DO RIM
POLICÍSTICO DO ADULTO (ADPKD) COM PRIMERS
DO CROMOSSOMO 16 (PKD1) E 4 (PKD2)**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão no Curso de Graduação em
Medicina.

FLORIANÓPOLIS

1998

FERNANDO ROMARIZ FERREIRA

**ESTUDO DE LIGAÇÃO MOLECULAR DO RIM
POLICÍSTICO DO ADULTO (ADPKD) COM PRIMERS
DO CROMOSSOMO 16 (PKD1) E 4 (PKD2)**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão no Curso de Graduação em
Medicina.**

Presidente do Colegiado do Curso de Medicina - UFSC: Dr. Edson J. Cardoso

Orientadora: Dra. Eliana Ternes Pereira, PhD

Co-orientadora: Dra. Tânia Lúcia Viana Dias

FLORIANÓPOLIS

1998

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Eliana Ternes Pereira, pelos ensinamentos e experiências repassadas a mim, assim como pelo exemplo de pessoa humana.

Aos meus pais, que no instigar da vida sempre me apoiaram, educando e instruindo o máximo possível.

Aos meus amigos, Filipinho e Felipão, que de uma maneira ou de outra, nunca me deixaram na mão.

Por fim, àquela que me apoiou, mais do que ninguém, em todos os momentos da minha história junto a ela. Àquela cujo coração é compartilhado comigo. Àquela cuja vida está para passar comigo até a eternidade, Rafaela.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO.....	14
3. MÉTODO.....	15
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS.....	26
8. Normas Adotadas.....	32
9. RESUMO.....	33
10. SUMMARY.....	34
11. APÊNDICE.....	35

1. INTRODUÇÃO

A Doença Autossômica Dominante do Rim Policístico (ADPKD), também conhecida como Doença Renal Policística do Adulto, é uma das mais frequentes desordens monogênicas. A prevalência estimada dessa condição, na população caucasiana, é da ordem de 1:1000 indivíduos^{1,2,3,4}; e cerca de 8 a 10 % dos casos de insuficiência renal terminal têm como causa a ADPKD^{3,5,6}.

A ADPKD caracteriza-se por ser uma desordem cujo acometimento é sistêmico^{1,2,3,4,7,8}, podendo ocorrer em qualquer momento da vida, incluindo intra útero^{8,9}. É caracterizada pela formação de cistos em órgãos ductais, particularmente rins e fígado, associado a anormalidades gastrointestinais, cardiovasculares e musculoesqueléticas^{2,4}, principalmente nos tecidos conectivos¹⁰.

O principal órgão afetado é o rim, onde podemos encontrar anormalidades estruturais, funcionais e endócrinas, podendo ainda apresentar complicações.

A alteração renal principal é na sua estrutura, com a formação dos cistos, os quais variam em tamanho, número e aspecto. Ocorre um aumento do tamanho renal, podendo atingir até 8 kg de peso².

Funcionalmente, o rim perde sua capacidade de concentração osmótica, evoluindo para insuficiência renal na maioria dos pacientes.

São descritas pelo menos duas alterações endócrinas, ligadas aos rins: o aumento da secreção de renina, ativando o sistema renina-angiotensina-aldosterona¹¹, e uma manutenção dos níveis de eritropoetina, através de um aumento de secreção deste hormônio pelas células remanescentes no rim afetado².

Encontram-se ainda alterações extrarrenais, como formações de cistos em fígado, pâncreas, baço, sistema nervoso central, ovário, testículo e vesícula seminal².

Os cistos hepáticos, por sua vez, incidem em aproximadamente 50% dos pacientes em azotemia, atingindo cerca de 10% dos pacientes entre 20 e 29 anos e 75% dos paciente maiores de 60 anos de idade².

O aneurisma sacular intracraniano - cisto de aracnóide - parece ser mais freqüente em pacientes com ADPKD do que na população geral, mas alguns autores têm sugerido que não existe um fator de risco aumentado em relação a esta evidência, não havendo a necessidade de tratamento dos pacientes assintomáticos, portadores desta condição^{7,12}.

Dentre as alterações não císticas associadas à doença, temos as anormalidades de válvulas cardíacas, como o prolapso das válvulas mitral e/ou aortica, ou uma degeneração mixomatosa dessas válvulas².

O divertículo de cólon constitui a principal manifestação não cística no trato gastro-intestinal, determinando um risco de perfuração do cólon².

Os principais achados clínicos e suas respectivas freqüências são apresentadas na tabela 1.

TABELA 1

Frequência das Manifestações da ADPKD em adultos

EXTRARENAL	FREQUÊNCIA
GASTROINTESTINAL	
Cistos Hepáticos	+/- 50% (aumenta com idade)
Colangiocarcinoma	raro
Fibrose Hepática Congênita	raro
Cisto Pancreático	+/- 10%
Divertículo de cólon	80% dos pctes com IRCT
CARDIOVASCULAR	
Anormalidades valvulares	26%
Aneurismas intracranianos	5-10%
Aneurismas de Aorta	desconhecido
GENITAL	
Cistos ovarianos	desconhecido
Cistos testiculares	desconhecido
Cistos da vesícula seminal	desconhecido
OUTROS	
Cisto aracnóide	5%
Cisto pineal	raro
Cisto esplênico	raro
RENAL	
ANATÔMICOS	
Cistos renais	100%
Adenomas renais	21%
Calcificações de cistos	comum
FUNCIONAIS	
Diminuição capacidade concentração	potencialmente todos os adultos
Diminuição excreção de citrato	67%
Prejuízo à acidificação renal	desconhecido
HORMONAIS	
Aumento produção de renina	provavelmente todos adultos hipertensos
Manutenção produção de eritropoietina	provavelmente todos com IRCT
COMPLICAÇÕES	
Hipertensão	>80% pctes com IRCT e 30% crianças
Hematúria, hemorragia	50%
Dor aguda ou crônica	60%
Infecção do trato urinário	comum
Nefrolitíase	20%
Nefromegalia	100%
Insuficiência Renal	45% pctes > 60 anos

Modificado de Gabow et al., 1993²

A doença apresenta uma heterogeneidade clínica importante, tanto intra como inter-familiar¹³. Existe uma grande variabilidade na idade de instalação dos sinais e sintomas clínicos. O início da manifestação da doença geralmente ocorre em torno dos vinte a trinta anos de idade^{5,6,7,8}, com o aparecimento do aumento da pressão arterial, podendo ou não estar associado à hematúria, cefaléia, náuseas e vômitos, dor abdominal e lombar¹⁴. Em 45 a 50% dos pacientes o quadro culmina com a Insuficiência Renal Crônica Terminal (IRCT), tornando-se dependente de sessões de diálise (geralmente hemodiálise) e candidato a transplante renal¹⁴.

Existem ao menos três genes responsáveis pela origem desta doença: um no braço curto do cromossomo 16^{1,2,3,4,9,14,15,16,17}(16p13.3), outro no braço longo do cromossomo 4^{18,19} (4q21-23) e outro em local ainda não determinado¹⁰. Estes genes, quando mutados, originarão a doença.

O gene do cromossomo 16 (nomeado gene PKD1) foi identificado em 1985^{5,14,19}, como ligado ao gene da alfa-globina²⁰. Em 1994 o Consórcio europeu da ADPKD identificou uma translocação cromossomial associado ao ADPKD, o qual separou o gene PBP (ponto de quebra policístico), codificando um transcrito de 14 kilobases (kb), sendo identificado assim o gene PKD1^{21,22}. E em 1995, o Consórcio internacional da ADPKD descreveu a estrutura completa do gene PKD1, com 46 éxons, assim como a proteína originada desse gene - a policistina²³. A mutação deste gene é responsável por cerca de 85 % das famílias afetadas estudadas². Subsequentemente foram descritas várias famílias portadoras do ADPKD que, ao estudo de ligação gênica, não demonstravam serem ligadas ao cromossomo 16.

Em 1993, um segundo locus ADPKD, que foi descrito na região 4q13-q23. Peters et al, 1993 localizaram um 2º gene para ADPKD, ligado ao cromossomo 4, através da análise de ligação com marcadores deste cromossomo (D4S231 e D4S423)¹⁹. Kimberling et al, no mesmo ano - 1993, também localizaram o 2º

gene para ADPKD no braço longo do cromossomo 4, utilizando os marcadores D4S231 e D4S414. Foi definido um segmento de aproximadamente 9 cM - denominado PKD4¹⁸. Este gene foi clonado e caracterizado por Mochizuki et al, em 1996, consistindo num gene de 15 exons, com 2904 pares de base²⁴. Responsável por menos de 15% das famílias afetadas^{2,3,4,18,19}, admite-se que a mutação deste gene determine um curso clínico mais brando, com uma evolução dos sinais e sintomas mais lenta^{2,3,4}.

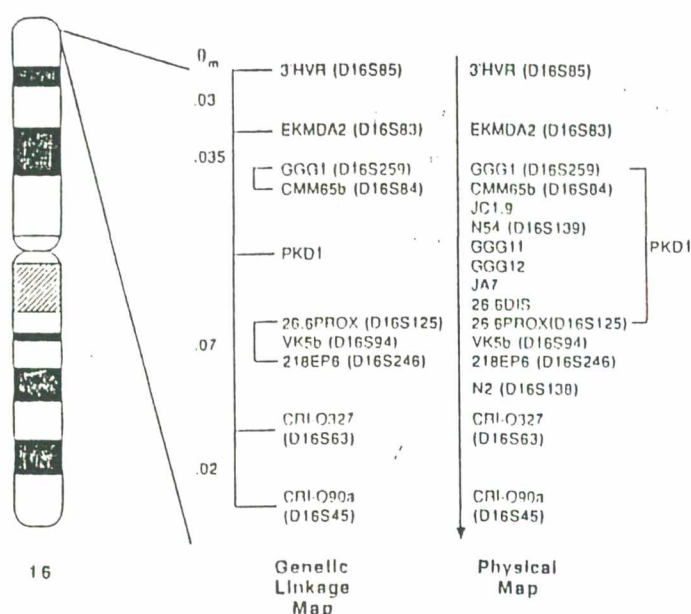


Figura 1: Crom. 16 e marcadores

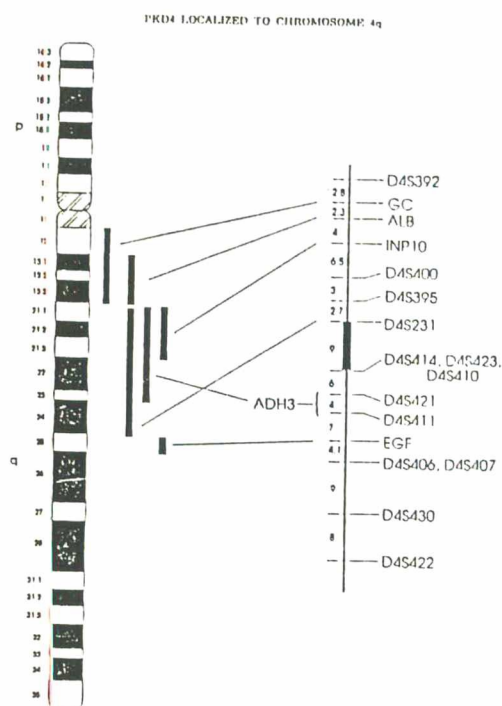


Figura 2: Crom. 4 e marcadores

Muitos autores têm descrito famílias apresentando uma forma mais branda de ADPKD onde o estudo de ligação para os cromossomos 16 e 4 não foram positivos, indicando que um 3º locus PKD está envolvido no desenvolvimento da doença^{25,26,27}. Devido ao baixo número de casos por famílias, sendo casos mais leves, levam a pensar que a frequência deve ser maior do que o indicado.

Através da técnica de Biologia Molecular, utilizando marcadores relacionados aos loci específicos do cromossomos 16 e 4, pode-se determinar a origem da anomalia na família e reconhecer o diagnóstico de portador ou não da mutação geradora da doença^{1,3,4,9,16,21,28}. Para isso, é necessária a execução de um estudo familiar, analisando os polimorfismos característicos do DNA de marcadores intragênicos ou que flanqueiam os genes em cada mutação^{1,4}.

Para o gene PKD1, apenas um pequeno número de mutações tem sido descrito no final 3' da cópia única deste gene^{29,30,31,32,33,34}, incluindo deleções^{21,35}, mutações em splicing^{21,35}, substituições³⁵, mutações em sentido contrário^{35,36,37} e mutações sem sentido^{35,36,37}.

Para o gene PKD4, Veldhuisen et al, 1997 descreveram 20 mutações ligadas ao cromossomo 4. A maioria das mutações parecem ser mutações únicas ocorrendo através do gene, sem evidência de agrupamento³⁸. Pequenas deleções, inserções e substituições³⁹ que levam a paradas prematuras em translação, uma substituição de aminoácido e cinco possíveis mutações em sítios de splicing foram encontradas³⁸.

Estes achados sugerem que o 1º passo para formação dos cistos no PKD2 é a perda de uma cópia fundamental da Policistina 2³⁸.

A patogênese da ADPKD permanece pouco compreendido⁴³. Existe uma grande variedade de anormalidades no desenvolvimento das células epiteliais, mas o mecanismo molecular envolvido permanece obscuro^{40,41}.

O gene PKD1 produz uma nova proteína - policistina 1- cuja estrutura é de uma grande glicoproteína (que contem 4302 aminoácidos) com domínios extracelulares e múltiplas regiões transmembrana, podendo estar envolvida nas interações célula - célula e célula - matriz⁴⁰.

Geng et al, 1996 encontrou esta proteína (com 460 nDa) no epitélio tubular renal, ductos hepáticos, ductos pancreáticos, assim como na pele, sendo super expresso na maioria, mas não em todos, dos cistos renais da ADPKD⁴².

Existe uma distribuição sistêmica da policistina, condizendo com a natureza sistêmica da ADPKD e a regra para células epiteliais na doença¹⁰.

Estudos recentes demonstraram que a policistina é detectada em células epiteliais de fetos normais, adultos e rins policísticos^{10,42}.

Qian et al, em 1997 descreveu o domínio final espiralado da policistina 1 e demonstrou que ela se liga especificamente ao C terminal da Policistina 2. Referiu ainda que uma mutação em um dos dois genes desfaz a associação entre as policistinas, demonstrando assim a interligação entre os dois genes da PKD^{43,44}.

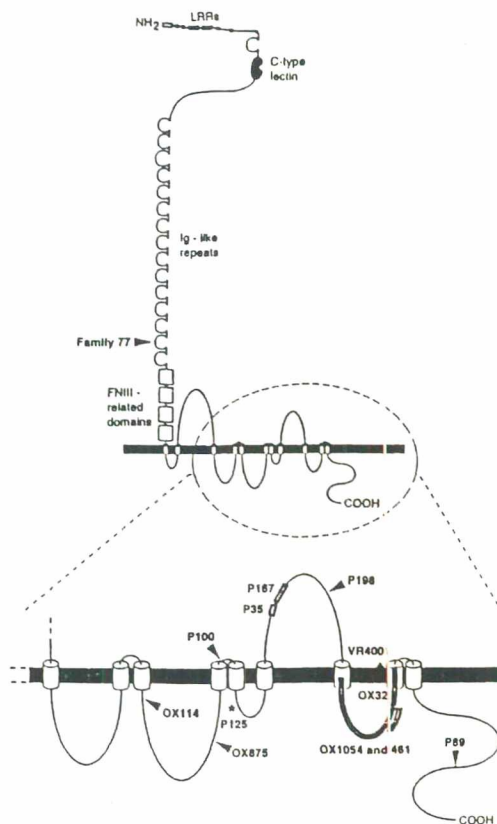


Figura 3: POLICISTINA

O reconhecimento das famílias afetadas e a possibilidade de investigação imediata das mutações gênicas, assume grande importância devido a variabilidade de evolução clínica da doença (de acordo com a mutação gênica)^{2,4,45}. Também permite o acompanhamento precoce do paciente e o aconselhamento genético adequado, visto que os métodos de imagem (ultrassonografia, urografia excretora, Tomografia Axial Computadorizada e Ressonância Nuclear Magnética) são métodos de diagnóstico precoce da doença, mas dificilmente são realizados antes de algum sintoma aparecer⁴⁶. Aliado a isto, temos que a ultrassonografia, melhor método de screening da doença, apresenta uma baixa especificidade, quando realizados em familiares com suspeita de ADPKD menores de 30 anos de idade⁴⁶. Assim, o estudo de ligação molecular assume importante papel no diagnóstico precoce da doença, assim como no diagnóstico de possíveis doadores renais⁴⁷.

O St. George's Hospital Medical School da Universidade de Londres, na Inglaterra, desenvolve há alguns anos uma pesquisa no estudo de haplotipos genéticos em famílias inglesas, utilizando as sondas de DNA específicas de cada locus responsável pela ADPKD.

Um trabalho paralelo, em colaboração, foi idealizado pela orientadora deste trabalho - Dra. Eliana Ternes Pereira. Com a aceitação de colaboração pelo Dr. Steve Jeffery (responsável pelo programa naquele hospital), aliado ao apoio científico-financeiro do CNPq, desenvolve-se um projeto de pesquisa visando a realização de um estudo clínico e molecular de famílias catarinenses portadoras de ADPKD, com possibilidade de expansão para todo o Brasil, no decorrer dos trabalhos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é apresentar um modelo de análise de ligação gênica na Doença Autosômica Dominante do Rim Policístico, descrevendo os métodos utilizados e analisando a interpretação dos resultados.

3. MÉTODO

O estudo molecular apresentado neste trabalho foi realizado em uma das 10 (dez) famílias com a Doença Autossômica Dominante do Rim Policístico do Adulto que estão sendo acompanhadas no Núcleo de Genética Clínica do Hospital Universitário, UFSC. O estudo é parte do projeto de pesquisa denominado “Estudo Clínico e Molecular de Pacientes portadores da Doença Autossômica Dominante do Rim Policístico”, apoiado pelo CNPq (processos números 530053/93-4 e 520856/95-3), sob orientação da professora Dra. Eliana Ternes Pereira. O autor do trabalho, Fernando Romariz Ferreira, é parte da pesquisa como aluno de iniciação científica do CNPq, participando de todas as etapas do mesmo.

As famílias foram indicadas para o atendimento através dos ambulatórios do HU ou encaminhadas do interior do Estado de Santa Catarina por médicos interessados.

Foi realizado o contato com a família a partir de um paciente do serviço de nefrologia do Hospital Universitário, o qual apresentou-se a este setor com o diagnóstico clínico de Doença Renal Policística do Adulto, sendo este realizado aos 45 anos de idade.

A família analisada neste trabalho foi encaminhada de Criciúma. Inicialmente foi confirmado o diagnóstico no paciente índice através do estudo ultrassonográfico do rim. Os pacientes foram considerados afetados pela doença quando o exame demonstrava a presença de pelo menos 5 cistos em cada rim. Os exames de função renal foram também avaliados.

A seguir, foi realizado o heredograma da família, sendo contatados os familiares interessados na investigação para avaliação, da mesma forma que no paciente índice.

Foi explicado para a família a origem da doença e a sua heterogeneidade genética e oferecido o estudo molecular aos indivíduos interessados.

Os interessados permitiram a coleta de sangue para estudo do DNA.

O acompanhamento clínico de rotina continuou sendo realizado nos indivíduos afetados pelo médico que fez a indicação da família para o HU.

Periodicamente a família foi avaliada pelo grupo de pesquisa para coleta de dados relacionados a evolução da doença, como parte da metodologia da pesquisa.

Realizou-se então o estudo molecular da família nuclear do probando

O processo de investigação molecular foi realizado em duas etapas:

.1^a Etapa: Isolamento do DNA de leucócitos sanguíneos, realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Hospital Universitário - UFSC, pelo autor deste trabalho, seguindo o método descrito por SAMBROOK et al. em 1989 (vide apêndice)⁵¹.

.2^a Etapa: Análise molecular, através do estudo dos haplotipos de cada indivíduo, com a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Foram utilizadas as sondas marcadoras de DNA, específicos de cada locus gênico.

Para o locus PKD1 (16p) foram utilizadas as sondas: KG8 (intragênico), CW4AC2.5 e SW7 (flanqueiam o gene e tem fração de recombinação zero).

Para o locus PKD4 (4q) foram utilizadas as sondas D4S1534 e D4S423.

As características de cada sonda pode ser observada nas tabelas 2 e 3, que seguem abaixo:

TABELA 2 - Características dos marcadores utilizados no trabalho.

Nome do marcador	Alelos Descritos	Comprimento (bp)	Heterozigose esperada	Referências
KG8	8	116 a 130	0.501	Snarey et al, 1994 ³⁸
SM7	11	81 a 107	0.62	Harris et al, 1991 ¹⁶
CW4AC2.5	10	154 a 170	0.79	Thompson et al, 1992 ³⁹
D4S1534	6	146 a 158	0.76	CEPH MAP, 1997 ¹⁹
D4S423	9	103 a 125	0.82	Peters et al, 1993 ¹⁸

TABELA 3 - Sequência dos indicadores utilizados no PCR

Nome do Marcador	Iniciador Dianteiro	Iniciador Reverso
KG8	5' CTCCCAGGGTGGAGGAACGTG	5' GCAGGACAGCCAGCTCCGAG
SM7	5' ACAAGAGTGAATCTCTGACAG	5' ACATATGTAGTCTTCTGCAGG
AC2.5	5' AAGGCTGGCAGAGGAGGGA	5' CTAATCGGCGGCGAGCTCTA
D4S1534	5' ATTCAGTTTCAGCCCCAT	5' ACCAGCCCAAGGTAGAGG
D4S423	5' TTGAGTAGTTCCTGAAGC	5' CAAAGTCCTCCATCTTGAGTG

Todas as amplificações foram realizadas com o primeiro ciclo de 95°C por minuto, seguido por um tempo de espera a 80°C para adição da enzima, reiniciando com um ciclo de 94°C por minuto, um ciclo final de extensão de 10 minutos a 72°C e 25 ciclos intermediários após como demonstrado abaixo, na tabela 4:

TABELA 4 - Condições do PCR

Nome do Marcador	Temperatura de desnaturação	Temperatura de annealing	Temperatura de extensão
KG8	94°C - 1 minuto	65°C - 1 minuto	72°C - 1 minuto
SM7	94°C - 1 minuto	60°C - 1 minuto	72°C - 30 segundos
AC2.5	94°C - 1 minuto	57°C - 1 minuto	72°C -30 segundos
D4S1534	94°C - 1 minuto	55°C - 30 segundos	72°C - 1 minuto
D4S423	94°C - 1 minuto	55°C - 30 segundos	72°C - 1 minuto

Esta etapa foi realizada no St. George's Hospital Medical School, pela orientadora deste projeto (em visita ao setor), sob supervisão do Dr. Steve Jeffery.

Após a obtenção do haplotipo de cada indivíduo, os dados foram digitados no programa MegaBASE e a análise de ligação foi realizada com o programa MLINK como descrito por Fenton e Sandkuijhl, 1992⁵⁰. Os programas utilizados são de propriedade da Unidade de Medicina Molecular do St. George's Hospital Medical School, da London University, com o qual a orientadora tem um trabalho de colaboração.

4. RESULTADOS

O probando foi um paciente que apresentou a primeira manifestação da doença renal policística - hematúria - aos 30 anos de idade, sem quaisquer outras queixas anteriormente. A partir daí, foi diagnosticado um quadro de hipertensão arterial sistêmica. Iniciando investigação para a nova condição, foram realizados exames de urografia excretora e ultrassonografia (USG), sendo visualizados vários cistos renais bilateralmente.

Aos 35 anos de idade o paciente apresentou úlcera duodenal, o qual foi controlado clinicamente.

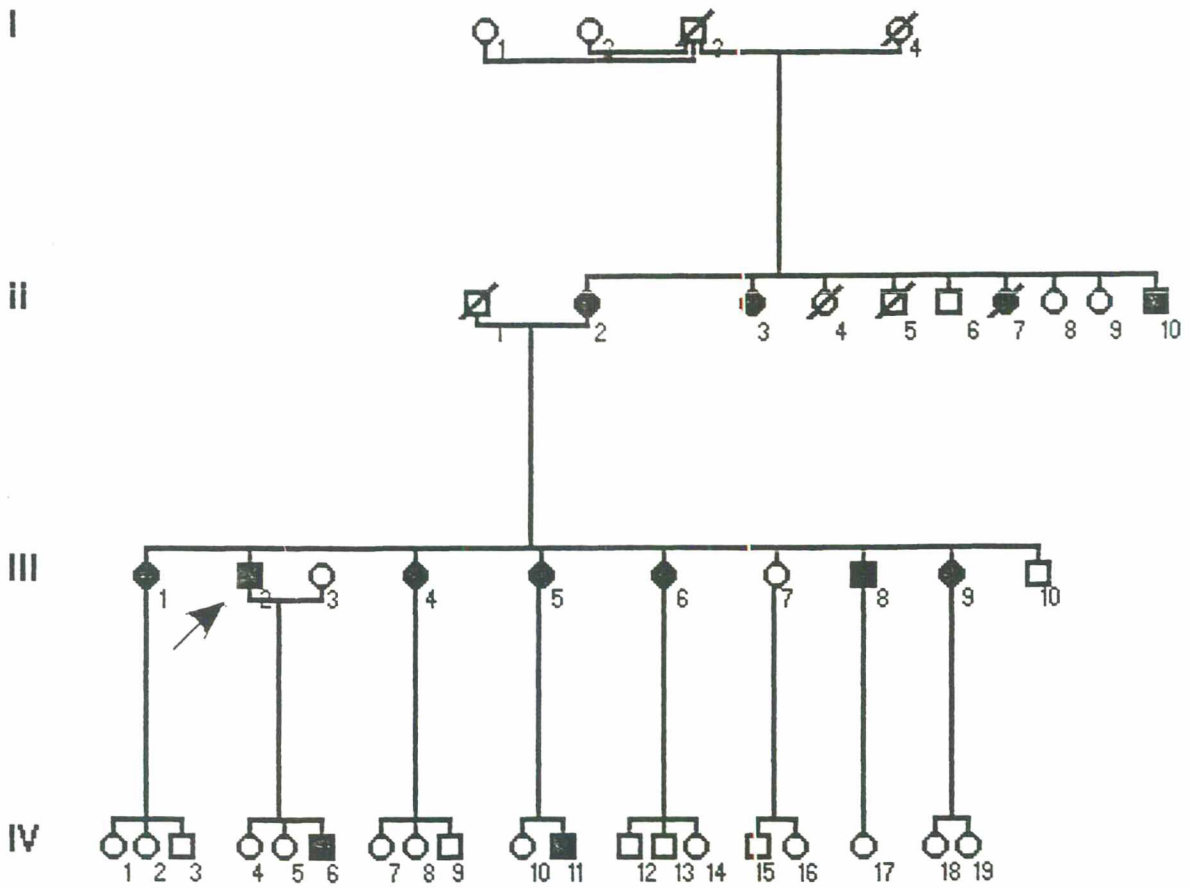
Aos 42 anos de idade, ainda sob tratamento para hipertensão arterial sistêmica, o paciente índice evoluiu com sintomas de náuseas e notou um aparecimento de massa abdominal em flancos.

Aos 43 anos de idade o paciente evoluiu com insuficiência renal crônica, iniciando o programa de hemodiálise e aguardando na fila para um possível transplante renal, o qual quase foi realizado por 2 vezes; não o sendo por falta de diagnóstico preciso do familiar, menor de 30 anos de idade, candidato a doador.

Realizou hemodiálise por mais 2 anos, havendo, aos 45 anos de idade, complicações dialíticas - SIC, indo a óbito.

O paciente apresentava, à ultrassonografia realizada aos 40 anos de idade, cerca de 10 cistos em cada rim, medindo entre 2 e 5 centímetros de diâmetro cada cisto. Associado ao quadro, apresentava alguns cistos hepáticos.

Figura 4: heredograma da família



Ao exame ultrassonográfico da família nuclear do probando, encontramos:

II₂ - USG +, com 1 cisto renal bilateral (+/-3cm), aos 44 anos de idade;

IV₄ - USG -, aos 20 anos de idade;

IV₅ - USG -, aos 17 anos de idade;

IV₆ - USG +, com 1 + 2 cistos renais (<2cm), aos 13 anos de idade.

Os descendentes do probando permaneceram assintomáticos.

A mãe do probando (II₂) diagnosticou hipertensão arterial sistêmica aos 27 anos de idade, sendo controlada apenas com tratamento clínico. Apresentou história de infecções do trato urinário de repetição (vários episódios), evidenciando dor abdominal e lombar durante as crises. Apresentou, ainda,

história de úlcera duodenal, tratada clinicamente. Paciente referiu diagnóstico de doença renal policística aos 46 anos de idade, por estudo de investigação familiar, apresentando ultrassonografia com 1 cisto renal bilateral, ambos maiores que 5 centímetros de diâmetro. O último exame de creatinina sérica realizado foi de 2,6 mg/dl (ref. 0,4 a 1,4 mg/dl).

O filho mais novo do probando (IV₆) manteve-se assintomático, com o último exame de creatinina sérica de 0,82 mg/dl (ref. 0,4 a 1,4 mg/dl).

Os resultados do heredograma nuclear e do padrão genotípico da família é demonstrado nas figuras 4 e 5, com os marcadores para os cromossomos 16 e 4, respectivamente.

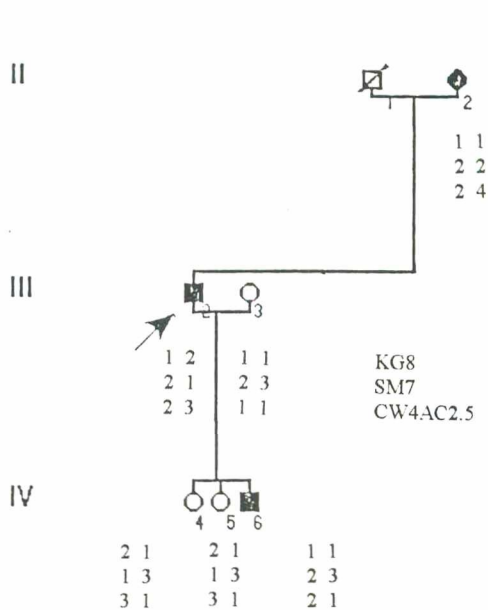


Figura 5: Marcadores PKD1 (16p)

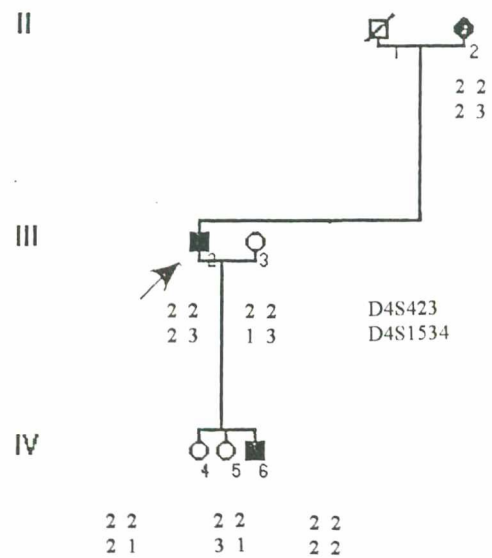


Figura 6: Marcadores PKD4 (4q)

Figuras 4 e 5: Heredogramas da família, demonstrando os genótipos definidos pelos marcadores ligados aos PKD1 (fig. 4) e PKD4 (fig 5). Os números junto à parte superior dos símbolos representam a idade dos indivíduos. Aos alelos são dados números arbitrários, arranjados de acordo com os haplotipos. Os símbolos hachurados representam os afetados.

Na análise de ligação ao gene PKD1, no programa MLINK, verificou-se:

Tabela 5: marcador KG8:

Fração (θ)	0,500	0,000	0,010
Recombinação			
Lod score (Z)	0,000	0,531	0,530

Tabela 6: marcador CW4AC2.5:

Fração (θ)	0,500	0,000	0,010
Recombinação			
Lod score (Z)	0,000	0,531	0,523

Tabela 7: marcador SM7:

Fração (θ)	0,500	0,000	0,010
Recombinação			
Lod score (Z)	0,000	0,531	0,523

Na análise de ligação ao gene PKD4, no mesmo programa, foram obtidos pontos negativos de lod score.

5. DISCUSSÃO

Os marcadores do cromossomo 4 utilizados não segregaram com a doença nessa família, fornecendo um lod score negativo, indicando que o gene alterado nessa família não é o PKD4.

Na figura 5, verificamos que o marcador D4S423 não foi informativo. O pai carreador era homocigoto para esse alelo.

Só o marcador D4S1534 foi o informativo por ser o pai heterocigoto.

A filha IV₄, não afetada e o filho IV₆ apresentaram o mesmo haplótipo paterno.

Sendo discordante em relação a doença, indica que o gene alterado não foi o PKD4.

Os marcadores do cromossomo 16 segregaram com a mutação do gene PKD1, nessa família, com lod score positivo, como demonstrado nas tabelas 5, 6 e 7.

O haplotipo comum nos pacientes afetados foi 1.2.2, respectivamente para os marcadores KG8, SM7 e CW4AC2.5.

O ideal seria obter lod score maior que 1,0. Entretanto, nessa família, não conseguimos coletar amostras de outros familiares afetados e não afetados.

Do ponto de vista clínico, o resultado molecular concordou com os dados da literatura, que refere que a forma PKD1 é mais precoce e evolui mais rapidamente para insuficiência renal

O probando (III₂), na idade de 43 anos, já iniciou as sessões de hemodiálise, e aos 45 anos foi a óbito por complicações relacionadas a condição.

Entretanto, na mãe do probando e no seu filho, a condição não parece ser grave. Nessa família, o estudo clínico continuará para termos mais informações.

Somente a avaliação sistemática de várias famílias portadoras do gene PKD1 e PKD4 poderão fornecer dados relevantes que confirmem a diferença de evolução clínica nas duas formas, como citado na literatura.

6. CONCLUSÃO

A importância do estudo molecular dos portadores de Doença Renal Policística do Adulto, assim como de seus familiares, reside no diagnóstico precoce, pois evidencia os portadores da doença mesmo antes do aparecimento dos cistos renais. A origem PKD1 ou PKD4 pode ter importância prognóstica (de acordo com a ligação gênica específica) da doença. Isso pode auxiliar na melhor orientação dos portadores da condição. O tratamento precoce visa minimizar a morbidade da mesma.

Concluimos sugerindo que, uma vez que não existe um tratamento específico para a doença do rim policístico, o tratamento dos sinais e sintomas iniciais, para evitar uma progressão mais agressiva da doença, como ocorre nos casos associados a hipertensão arterial sistêmica não tratada, é fundamental nesses pacientes.

Como a ADPKD evolui para a insuficiência renal terminal, concluímos que é de grande valia a determinação dos familiares não portadores do gene mutante, por este ser um potencial doador de rim.

Concluimos também que é importante o aconselhamento genético das famílias, para orientar as gerações futuras.

Finalmente, concluímos que somente a avaliação sistemática de várias famílias portadoras do gene PKD1 e PKD2 poderão fornecer dados relevantes que confirmem a diferença de evolução clínica entre as duas formas.

7. REFERÊNCIAS

01. Coto E, Aguiado S, Alvarez J, Diaz MJM, Larrea CL. Genetic and clinical studies in autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 (ADPKD). *Journal of Medical Genetic*, 1992, 29:243-246.
02. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, 1993, 329(5):332-343.
03. Parfrey PS, Bear JC, Morgan J, Cramer BC, McManamon PJ, Gault MH; et al. The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, 1990; 323(16): 1085-1090.
04. Ravien D, Walker RG, Gibson RN, Forrest SM, Richards RI, Friend K, et al. Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Lancet*, 1992; 340:1330-1333.
05. Bear JC, Parfrey PS, Morgan JM, Martin CJ, Cramer BC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: new information for genetic counselling. *American Journal of Medical Genetics*, 1992; 43:548-553.
06. Gabow PA, Chapman AB, Johnson AM, Tangel DJ, Duley IT, Kaehny WD, et al. Renal structure and hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney International*, 1990; 38:1177-1180.
07. Chapman AB, Rubinstein D, Hughes R, Stears JC, Earnest MP, Johnson AM, et al. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, 1992. 327(13): 916-920.
08. Ravine D, Gibson RN, Walker RG, Sheffield LJ, Smith PK, Danks DM. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *The Lancet*, 1994;343:824-827.
09. Breuning MH, Snijdwint FGM, Dauwese JG, Saris JJ, Bakker E, Pearson PL, et al. Two step procedure for early diagnosis of polycystic kidney disease

with polymorphic DNA markers on both side of the gene. *Journal of Medical Genetic*, 1990; 27:614-617.

10. Weston BS, Jeffery S, Jeffery I, Sharaf SFA, Carter N, Saggari-Malik A, et al. Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissue. *Histochemical Journal*, 1997; 29: 847-856.
11. Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, Schrier RW. The renin - angiotensin - aldosterone and autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, 1989, 323 (16): 1091.
12. Schievink WI, Huston III J, Torres VE, Marsh R. Intracranial cysts in autosomal polycystic kidney disease. *J. Neurosurg*, 1995, 83: 1004-1007.
13. Breuning MH, Devoto M, Romeo G. Polycystic kidney disease. *Contrib Nephrol. Basel, Karger*, 1992, 97: 128-139.
14. Gabow PA, Iklé DW, HOLMES JH. Polycystic kidney disease: prospective analysis of nonazotemic patients and family members. *Annals of Internal Medicine*, 1984; 101:238-247.
15. Grantham JJ, Davidow C, Foo I, Dirks JH. Forefronts in Nephrology: The molecular basis of renal cystic disease. *Kidney International*, 1995; 47:715-732.
16. Harris PC, Thomas S, Ratcliffe PJ, Breuning MH, Coto E, Larrea CL. Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *The Lancet*, 1991;338:1484-1487.
17. Germino GG, Weinstat-Saslow D, Himmelbauer H, Gillespie GAJ, Somlo S, Wirth B, et al. The gene for autosomal dominant polycystic kidney disease lies in a 750-kb CpG-rich region. *Genomics*, 1992, 13: 144-151.
18. Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Connolly CJ, Somlo S. Autosomal dominant polycystic kidney disease: Localization of the second gene to chromosome 4q13-23. *Genomics*, 1993;18:467-472.

19. Peters DJM, Spruit L, Saris D, Ravine LA, Sandkuijil R, Fossdal R, et al. Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genetics*, 1993; 5:359-362.
20. Reeders ST, Breuning MH, Davies MH, Nicholls KE, Jarman RD, Higgs AP, et al. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature*, 1985, 317: 542-544.
21. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell*, 1994; 77:881-894.
22. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM et al. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease - a contiguous gene syndrome. *Nature Genetics*, 1994, 8: 328-332.
23. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell*, 1995, 81: 289-298.
24. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 1996, 272: 1339-1342.
25. Almeida S, Almeida E, Peters D, Pinto JR, Távora I, Lavinha J et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum Genet*, 1995, 96: 83-88.
26. Ariza M, Alvarez V, Marin R, Aguado S, López-Larrea C, Alvarez J et al. A family with a milder form of adult dominant polycystic disease not linked to the PKD1 (16p) or PKD2 (4p) genes. *J. Med. Genet*, 1997, 34: 587-589.

27. Turco AE, Clementi M, Rosseti S, Tenconi R, Pignatti PF. An Italian family with autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to either the PKD1 or PKD2 gene. *American Journal of Kidney Diseases*, 28 (5): 759-761.
28. Grantham JJ. Polycystic kidney disease - There goes the neighborhood. *The New England Journal of Medicine*, 1995; 333(1):56-57.
29. Breuning MH, Snijderwint FGM, Brunner H, Verwest A, Ijdo JW, Saris JJ et al. Map of 16 polymorphic loci on the short arm of chromosome 16 close to the polycystic kidney disease gene (PKD1). *J. Med. Genet*, 1990, 27: 603-613.
30. Somlo S, Wirth B, Germino GG, Weinstat-Saslow D, Gillespie GAJ, Himmelbauer H et al. Fine genetic localization of the gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) with respect to physically mapped markers. *Genomics*, 1992, 13: 152-158.
31. Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular analysis. *Human Molecular Genetics*, 1995, 4: 1745-1749.
32. Peral B, Millian JLS, Ong ACM, Gamble V, Ward CJ, Strong C. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am. J. Genet.*, 1996, 58: 86-96.
33. Watnick TJ, Piontek KB, Cordal Tm, Weber H, Gandolph MA, Qian F, et al. An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of PKD1 is revealed by use of a novel strategy for mutation detection. *Human Molecular Genetic*, 1997, 6 (9): 1473-1481.
34. Turco AE, Rosseti S, Bresin E, Englisch S, Corra S, Pignatti PF. Three novel mutations of the PKD1 gene in Italian families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Human Mutation*, 1997, 10: 164-167.

35. Peral B, Ong ACM, Millian JL, Gamble V, Rees L, Harris PC. A stable, nonsense mutation associated with a case on infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Human Molecular Genetics*, 1996, 5 (4): 539-542.
36. Turco AE, Rosseti S, Bresin E, Corra S, Gammara L, Maschio G. A novel nonsense mutation in the PKD1 gene (C3817T) is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a large three-generation Italian family. *Human Molecular Genetic*, 1995, 4 (8): 1331-1335.
37. Rosseti S, Bresin E, Restagno G, Carbonara A, Corra S, De Prisco O, et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in exons 44 and 45 of the PKD1 gene. *American Journal of Medical Genetics*, 1996, 65: 155-159.
38. Veldhuisen B, Saris JJ, Haij S, Hayashi T, Reynolds DM, Mochizuki T et al. A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). *Am. J. Hum. Genet*, 1997, 61: 547-555.
39. Xenophontos S, Constantinides R, Hayashi T, Mochizuki T, Somlo S, Pierides A. A translation frameshift mutation induced by a cytosine insertion in the Polycystic Disease 2 gene (PKD2). *Human Molecular Genetics*, 1997, 6 (6): 949-952.
40. Sandford R, Sgotto B, Aparicio S, Brenner S, Vaudin M, Wilson RK et al. Comparative analysis of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals an integral membrane glycoprotein with multiple evolutionary conserved domains. *Human Molecular Genetics*, 1997, 6 (9): 1483-1489.
41. Brasler LJ, Henske EP. Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J. Clin. Invest*, 1997, 99 (2): 194-199.

42. Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F et al. Identification of Polycystin, the PKD1 Gene Product. *J. Clin. Invest.*, 1996, 98 (12): 2674-2682.
43. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 Interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature Genetics*, 1997, 16: 179-183.
44. Qian F, Watnick TJ, Nuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Cell*, 1996, 87: 979-987.
45. Pereira ET. Doença autossômica do rim policístico do adulto: heterogeneidade clínica e perspectivas futuras. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 1994, 23 (2): 139-142.
46. Bear JC, McManamon P, Morgan J, Payne RH, Lewis H, Gault MH. Age at clinical onset and at ultrasonographic detection of adult polycystic kidney disease: data for genetic counselling. *American Journal of Medical Genetics*, 1984, 18: 45-53.
47. Breuning MH, Snijdwint FGM, Dauwese JG, Saris JJ, Bakker E, Pearson PL, et al. Two step procedure for early diagnosis of polycystic kidney disease with polymorphic DNA markers on both sides of the gene. *J. Med. Genet.*, 1990, 27: 614-617.
48. Snarey A, Thomas S, Schneider MC, Pound SE, Barton N, Wright AF et al. Linkage disequilibrium in the region of the autosomal dominant polycystic kidney disease gene (PKD1). *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 55: 365-371.
49. Thompson AD, Shen Y, Holman K, Sutherland GR, Callen DF, Richards RI. Isolation and characterization of (AC)_n microsatellite genetic markers from human chromosome 16. *Genomics*, 1992, 13: 402-408.

50. Fenton I, Sandkuijl LA, Megabase/pkd: a genetic data base for polycystic kidney disease. *Contrib Nephrol*, 1992, 97: 118-127.
51. Sambrook J, et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Normas Adotadas:

Foram adotadas as normas da Convenção de Vancouver - Canadá, conforme a 5^a-edição dos “Requisitos Uniformes para Originais submetidos a Revistas Biomédicas”.

RESUMO

A Doença Autossômica Dominante do Rim Policístico (ADPKD) é uma das mais frequentes desordens monogênicas, com uma prevalência de 1:1000. Caracteriza-se pela formação de cistos em órgãos ductais (rins, fígado, entre outros). Existem ao menos 3 genes responsáveis pela origem da doença: um no cromossomo 16p13.3 (PKD1), outro no cromossomo 4q21-23 (PKD4) e outro em local ainda não determinado.

Apresentamos um modelo de estudo de ligação no ADPKD, analisando e interpretando os resultados encontrados em uma família portadora desta condição.

Obtivemos lod score positivo para a ligação ao gene PKD1 e lod score negativo para a ligação ao gene PKD4.

Do ponto de vista clínico, o resultado molecular concordou com os dados da literatura, onde o PKD1 é mais precoce e evolui mais rapidamente para a insuficiência renal.

A importância do estudo molecular, para determinação da origem gênica da doença, pode auxiliar na melhor orientação dos portadores da condição. Concluímos sugerindo que o tratamento dos sinais e sintomas iniciais é fundamental nos portadores da ADPKD. Concluímos ainda que é importante obter o resultado molecular para orientações para as gerações futuras e também poder estabelecer a diferença de evolução clínica das duas formas de ADPKD.

SUMMARY

The Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is one of the most frequent monogenic disorders, with a prevalence of 1:1000. The basic characteristic is the presence of cysts in ductal organs (kidneys, liver and others). There are at least 3 genes responsible for the development of the disease: one in the chromosome 16p13.3 (PKD1), other in the chromosome 4q21-23 (PKD4), and another in a unidentified locus.

We present a model of study of linkage in ADPKD, analysing and interpreting the results found in a family carrier of this condition.

We acquired a positive lod score to the linkage to the PKD1 gene and a negative lod score to the linkage to PKD4 gene.

In the clinic point of view, the molecular outcome agreed with the literature data, when the PKD1 is premature and develop earlier to end stage renal failure.

The importance of the molecular study, to determinate the disease's genetic cause, could help in the better orientation to the condition's carrier. We conclude suggesting that the earliest treatment of the signs and symptoms is fundamental in the carriers of ADPKD. We still conclude that it is important to obtain the molecular pattern to give the correct orientations to the next generations and to establish the real difference between the two forms of ADPKD.

APÊNDICE

ISOLAMENTO DE DNA DE SANGUE

(Sambrook et al., 1989)³⁷

- 1) Método para 10 ml de sangue coído com EDTA.
- 2) Antes de iniciar, agite o tubo várias vezes com movimentos de inversão para ter uma solução homogênea.
- 3) Diluir 10 ml de sangue com 35 ml de tampão de lise do sangue em um tubo de 50 ml.
- 4) A lise das células vermelhas ocorre em 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos (centrífuga CELME).
- 6) Desprezar o sobrenadante (colocar em solução de hipoclorito de sódio).
- 7) Lavar o tubo e o sedimento com tampão de lise do sangue (10 ml).
- 8) Centrifugar novamente a 1500 rpm por 10 minutos.
- 9) Desprezar o o sobrenadante.
- 10) Ressuspender o sedimento com 3 ml de tampão de lise nuclear (utilizar vortex).
- 11) Adicionar 100 ul de pronase e agitar o tubo levemente.
- 12) Adicionar 150 ul de SDS 20% e agitar o tubo levemente.
- 13) Incubar a 37⁰C por 48 hs. A solução deve estar clara e viscosa.
- 14) Adicionar 1 ml de NaCl saturado (6M).
- 15) Agitar o tubo vigorosamente por 15 segundos com movimentos de inversão.
- 16) Centrifugar por 15 minutos a 2500 rpm.
- 17) Transferir o sobrenadante para outro tubo. Enquanto o sobrenadante estiver turvo, repetir a etapa anterior.

- 18) Precipitar o DNA adicionando 2 volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Precipitar o DNA por 3 vezes para retirar o excesso de sal.
- 19) Dissolver o DNA em 400 a 1000 μ l de TE-4.
- 20) Incubar a 65⁰C (em banho maria) por 30 minutos para excluir qualquer contaminação com DNase.
- 21) Dissolver na geladeira por 2 dias, antes de utilizar para análise.

Soluções:

1) TAMPÃO DE LISE DO SANGUE:

155mM NH₄Cl10mM KHCO₃

1mM EDTA pH 7,4

2) TAMPÃO DE LISE DOS NÚCLEOS:

10mM Tris.Cl

400mM NaCl

2mM EDTA pH 8,2

3) SDS 20%

4) NaCl 6M

5) TE-4

**TCC
UFSC
CM
0343**

Ex.1

N.Cham. TCC UFSC CM 0343

Autor: Ferreira, Fernando

Título: Estudo de ligação molecular do r



972803490

Ac. 253497

Ex.1 UFSC BSCCSM