

## DOENÇA RENAL POLICÍSTICA DO ADULTO: UMA ATUALIZAÇÃO

## ADULT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE: AN UPDATE

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 por progressivo desenvolvimento e crescimento de cistos renais, que culminam com a falência renal terminal na meia-idade. Outras manifestações clínicas associadas incluem cistos hepáticos e pancreáticos, hipertensão, aneurismas cerebrais e defeitos cardiovasculares. Aspectos celulares e moleculares dos mecanismos de cystogênese envolvem proliferação e apoptose celular, remodelamento da matriz extracelular, secreção e acúmulo de fluidos. Geneticamente heterogênea, na maioria dos casos (aproximadamente 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% das mutações, ambos já seqüenciados e caracterizados. Existem evidências da interação comum das proteínas policísticas 1 e 2 em rotas de eventos de adesão extracelular e transporte iônico, possibilitando a regulação do fluxo de  $Ca^{++}$  transmembrana. Inúmeros trabalhos vêm tentando correlacionar o genótipo mutado ao fenótipo expresso em termos da progressão e severidade da *autosomal dominant polycystic kidney disease*. A análise das mutações *autosomal dominant polycystic kidney disease* é fundamental para a compreensão dos mecanismos de atuação envolvidos na doença. Métodos de detecção baseados na reação em cadeia da polimerase têm sido amplamente empregados, como a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, *protein truncation test*, *single-strand conformational polymorphism* e *denaturing high performance liquid chromatography*, importantes ferramentas que auxiliam no seqüenciamento e caracterização dessas mutações.

**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 result in terminal renal failure in middle age. 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 evidence of the common interaction of polycystins 1 and 2 in pathways of extracellular adhesion and ionic transportation events, which promotes the regulation of transmembrane  $Ca^{++}$  flow. Several studies have tried to correlate the mutant genotype with the phenotype expressed in terms of progression and severity of the autosomal dominant polycystic kidney disease. Analyzing mutations in the autosomal dominant polycystic kidney disease is crucial for understanding the action mechanisms involved in this disease. Detection methods based on the polymerase chain reaction have been widely used, such as the reverse transcriptase polymerase chain reaction, protein truncation test, single-strand conformational polymorphism, and denaturing high performance liquid chromatography. They are important tools that help sequencing and characterizing those mutations.

**Keywords:** Polycystic kidney disease, molecular biology, PKD1 gene.

## INTRODUÇÃO

Conhecida como uma das nefropatologias hereditárias monogênicas mais comuns que afetam os humanos, a *autosomal dominant polycystic kidney disease* (ADPKD) tem uma prevalência de 1/400 a 1/1.000 (1). Estima-se que, no mundo, cerca de 12,5 milhões de pessoas sofram dessa doença, independentemente de sexo, idade, raça ou origem étnica.

Só nos EUA, são mais de 600.000 pacientes, sendo considerada a quarta causa de falência renal, levando 5% dessa população à diálise e conseqüente transplante renal (2).

Em estudos realizados em uma população de 975 adultos, 75 deles apresentavam ADPKD como primeira causa de falência renal crônica, correspondendo a 7,6% de pacientes em diálise na cidade de Porto Alegre, Região Sul do Brasil (3).

A ADPKD é ainda responsável por 6 a 9% de casos de doença renal em estágio terminal na América do Norte e Europa (4).

Caracterizada basicamente pelo progressivo crescimento e desenvolvimento de cistos renais que acabam por comprometer o correto funcionamento do órgão, pode manifestar-se também no fígado e pâncreas, além de estar intimamente associada a hipertensão, defeitos cardiovascu-

lares e aneurismas aórticos e cerebrais. Outras manifestações clínicas incluem infecções do trato urinário, hematuria, litíase renal e diverticulose intestinal. Dor abdominal é o sintoma mais comum ao paciente, podendo ser contínua ou intermitente, além de cefaléia, devido à hipertensão, onde a atividade do sistema renina-angiotensina representa um papel crucial na sua regulação (5).

Agentes terapêuticos para hipertensão, como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduzem a pressão sanguínea e a resistência vascular renal. Devido a esses efeitos na hemodinâmica renal, inibidores da ECA são válidos especialmente na fase inicial, sendo que a função renal deve ser constantemente monitorada para detectar qualquer declínio ao longo do curso da doença (6).

Geneticamente heterogênea, a maioria dos casos (aproximadamente 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, e ocorrendo ainda em um terceiro gene, PKD3, porém ainda pouco estudado.

Não existem testes laboratoriais ou critérios físicos para o diagnóstico da ADPKD, especialmente em sujeitos assintomáticos até a meia-idade. A ultra-sonografia tem sido utilizada preferencialmente pelo fato de não necessitar agentes de contraste nem envolver radiação, aliado à facilidade e segurança, sendo que a tomografia computadorizada e 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 histórico da doença, e, ultimamente, inúmeros trabalhos procuram utilizar marcadores moleculares como ferramentas no diagnóstico precoce da ADPKD (7).

#### ASPECTOS MOLECULARES DO GENE PKD1

O gene PKD1 está associado a um quadro clínico mais severo da doença (insuficiência renal terminal, em média, aos 53 anos de idade, quando comparados aos 69 anos do gene PKD2). Corresponde a aproximadamente 52 kb de DNA, genômico, possuindo 46 éxons que codificam uma transcrição de cerca de 14 kb, traduzidos em uma proteína com 4.303 aminoácidos, chamada policistina 1.

A policistina apresenta um sinal peptídico de NH<sub>2</sub> e uma porção terminal carboxílica (COOH) intracelular. Entre as duas regiões da proteína, ocorre uma variedade de domínios protéicos característicos (repetições de leucina, lectina C, unidades similares de imunoglobulinas, fibronectina III) e áreas homólogas com outras proteínas. Dois terços de seqüências genômicas próximas à região 5' do gene PKD1 (50.000 pares de bases, incluindo éxons e íntrons) são duplicados inúmeras vezes, com mais de 95% de seqüências similares à PKD1. Apenas cerca de 3,5 kb da região final 3' do gene transcrito são codificados por uma região de cópia única. O fato dessas regiões homólogas recombinarem-se inúmeras vezes torna a detecção de mu-

tações especialmente difícil, podendo comprometer a capacidade de distinguir quando se tratam de mutações ou polimorfismos (8).

Até o momento, 212 mutações no gene PKD1 já foram descritas na literatura, sendo que 110 tratam-se de substituições (9).

A substituição de um nucleotídeo que não provoca uma mudança na seqüência de aminoácidos de determinada proteína é chamada de mutação silenciosa. Por outro lado, quando ocorrem a alteração na seqüência de aminoácidos e o comprometimento funcional da proteína, são denominadas mutações de sentido alterado ou *missense mutations* (10).

Outras substituições de nucleotídeos também podem provocar o surgimento de um códon de terminação prematuro, de maneira que todos os aminoácidos codificados por códons posteriores à mutação não serão incorporados na proteína mutante, gerando proteínas com baixa ou mesmo nenhuma atividade, sendo esse processo denominado *nonsense mutation* ou mutação sem sentido (11).

Das outras mutações relatadas, 53 tratam-se de pequenas deleções, 18 são *splicings*, 16, pequenas inserções, 11, deleções grosseiras, duas são duplicações/inserções, e duas, rearranjos/inversões (9).

#### ASPECTOS DA CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO

Inúmeros trabalhos vêm tentando correlacionar o genótipo mutado com o fenótipo expresso em termos da progressão e severidade da ADPKD. Alguns sugerem que o polimorfismo de inserção/deleção do gene ECA possa ser um fator relacionado à progressão clínica de determinadas nefropatias e ao haplótipo DD; porém, outros estudos não encontraram resultados significativos na associação de insuficiência renal terminal entre pacientes com rins policísticos (12,13).

De forma geral, todos relatam a alta variabilidade da doença, devido a uma mutação do alelo PKD1 normal ou à sua interação com outros genes modificadores. A heterogeneidade genética pode ser considerada fator parcial da variabilidade fenotípica para ADPKD, onde evidências consistentes da variação clínica entre indivíduos já foram descritas, porém sem mutações caracterizadas para PKD1, sendo que essas diferenças de expressão da doença não explicam as variabilidades clínicas inter e intrafamiliares observadas (14).

Outro fator de considerável importância diz respeito ao comprometimento de regiões adjacentes do gene PKD1/TSC2 (esclerose tubular), sendo sugerido que a inativação do alelo PKD1, combinada com deleções do gene TSC2, tenha um efeito fenotípico característico.

Extensas deleções da região terminal de gene PKD1 parecem estar intimamente associadas a um fenótipo mais severo, por alterar a porção C-terminal, envolvida nos componentes intracelulares e no citoesqueleto protéico da policistina, onde a fosforilação desse local afeta a propriedade de adesão da proteína à membrana (15).

A posição da mutação no gene PKD1 também possui correlação com a severidade da doença renal policística. Os efeitos da posição da mutação são significativos quando relacionados à idade dos indivíduos ao atingirem insuficiência renal terminal, com diferenças de 2 a 5 anos entre populações com mutações na região 5' (valores médios de 49 anos de idade) e na região 3' do gene (valores médios de 52 anos de idade). Esses dados deram suporte à hipótese de que uma posição ao longo de 7 a 8 kb do gene, próxima à porção média, marcaria um ponto determinante da expressão precoce ou tardia e mais severa ou amena da doença (16).

## ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE DE MUTAÇÕES

A análise e caracterização das mutações ADPKD são fundamentais para a compreensão dos mecanismos de atuação envolvidos na doença, sua relação com outros fatores de predisposição, estudos de ligação genética evolutiva, aconselhamento genético familiar e desenvolvimento de novas tecnologias capazes de auxiliar na triagem e seqüenciamento de mutações gênicas.

Os métodos atualmente utilizados baseiam-se nos seguintes princípios: especificidade, fornecendo uma resposta verdadeiramente positiva para a mutação; sensibilidade, permitindo a identificação de uma mutação a partir de quantidades muito pequenas de determinada amostra, possibilitada pela amplificação de seqüências do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR); e simplicidade, aplicando um ensaio para mutação eficiente, eficaz e de baixo custo à rotina laboratorial.

A detecção de mutações em genes humanos é caracterizada pelo fato da seqüência de nucleotídeos de um gene em indivíduos afetados diferir da seqüência do mesmo gene em indivíduos com fenótipo normal (17).

### *Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)*

A partir do RNA total extraído do tecido que expressa o gene da doença, são sintetizadas as fitas de DNA complementar utilizando a técnica de PCR aliada à enzima transcriptase reversa, visando obter o produto final correspondente aos éxons transcritos e traduzidos. A RT-PCR tem sido rotineiramente empregada em inúmeros trabalhos e recentemente aplicada em conjunto com o teste da proteína truncada (8,15,17,18).

### *Protein truncation test (PTT)*

Esse teste detecta mutações sem sentido, deleções e inserções fora do molde, deleções no molde maiores que 25 pb e alterações nos sítios dos rearranjos que revelem um éxon maior que 25 pb.

A proteína sintetizada marcada com um aminoácido radioativo ou biotilado é separada por eletroforese (SDS-PAGE) e detectada por auto-radiografia ou quimiluminiscência. Se o gene apresenta uma deleção interna maior do que 25 pb, uma mutação sem sentido ou uma mutação junção/rearranjo, a proteína resultante é menor (truncada).

O seqüenciamento do DNA é realizado para estabelecer a natureza da alteração que deu origem à proteína truncada (8,17,18).

### *Single-strand conformational polymorphism (SSCP)*

A análise conformacional da fita simples tem sido comumente utilizada e se baseia na análise da estrutura conformacional da molécula de DNA de indivíduos afetados e não-afetados. Depois da amplificação via PCR, os produtos de cada reação são desnaturados, resfriados e assumem uma conformação tridimensional, conseqüência do pareamento de bases intrafitas e da formação de outras bandas. As diferentes conformações possuem diferentes velocidades de migração quando submetidas à eletroforese.

Esse método localiza a alteração do nucleotídeo em uma região ou éxon específico do gene, podendo detectar cerca de 90% das mutações em um único par de bases nos produtos de PCR com 200 pb ou menos; no entanto, não revela a natureza da mutação. Essa informação pode ser fornecida pelo seqüenciamento do DNA (1,8,14,15,17,19,20).

### *Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)*

Outro protocolo semi-automatizado se baseia na análise de fragmentos por cromatografia líquida, através de um sistema de absorção diferencial de homo e heterodúplex e matrizes hidrofóbicas em uma coluna cromatográfica, que detecta mudanças de bases provocadas por diferentes agentes mutacionais, possuindo um bom nível de reprodutibilidade e sensibilidade e demonstrando ser uma eficiente ferramenta para diagnóstico molecular de ADPKD (18-20).

### *Seqüenciamento de DNA*

Os ensaios para detecção de mutações identificam os polimorfismos em nucleotídeos simples, que não apresentam efeitos comprometedores, assim como também detectam mutações deletérias. Em geral, os polimorfismos são encontrados em indivíduos afetados e normais; todavia, alguns indivíduos podem ser portadores de uma mutação em um gene que, eventualmente, poderia ser confundida com um polimorfismo ou vice-versa. Nesses casos, a distinção entre polimorfismo e mutação é feita pelo seqüenciamento do DNA, onde os resultados da substituição do nucleotídeo podem ser avaliados (17).

Existem basicamente dois métodos adotados para o seqüenciamento de DNA: um enzimático, envolvendo a terminação de cadeia com didesoxirribonucleosídeo trifosfato, desenvolvido por Fred Sanger, atualmente o mais utilizado; e o método de degradação química de DNA, desenvolvido por Maxam & Gilbert.

O método enzimático envolve a incorporação de um didesoxinucleotídeo (ddNTP), análogo na cadeia recém-sintetizada, que impede a progressão da síntese, pois possui um hidrogênio na posição 3' do carbono da pentose. As moléculas são, então, detectadas pela inclusão de um *primer* marcado radioativamente ( $P^{32}$ ). São realizadas quatro reações individuais, com quantidades limitadas de um dos

quatro “didesoxis” (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) incluídos. A interpretação é feita pelo tamanho e posição dos quatro produtos “didesoxi” em gel de poliacrilamida, sendo possível determinar cerca de 200 a 500pb.

O segundo método envolve a degradação química do DNA pela marcação e clivagem das bases que ocorrem em G, G + A, T + C e C, sendo então removidos por um tratamento com piperidina. Os produtos submetidos à clivagem são também analisados em géis de poliacrilamida.

O seqüenciamento automatizado possibilitou a otimização da técnica a partir da aplicação de *softwares* especializados, que analisam as seqüências de DNA incorporadas. A grande vantagem desse método é que não requer a confecção de géis para eletroforese, geralmente envolvendo produtos tóxicos. A leitura é feita pela fluorescência específica emitida pelo nucleotídeo marcado, podendo analisar fragmentos de 200 a 500 pb, dependendo do modelo de seqüenciador (17).

### **Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real time)**

Com o advento da bioinformática, automação de dados e bancos de genes, uma nova tecnologia chamada PCR em tempo real (PCR *real time*) permite medir e quantificar a reação durante a fase exponencial, monitorando pequenas mudanças na temperatura, na qual 50% das fitas estão desnaturadas através do uso de moléculas fluorescentes, e disponibilizando esses dados instantaneamente pela chamada *Melt Curve*. Essa tecnologia tem sido amplamente utilizada para inúmeros usos – entre eles a detecção de mutações, discriminação alélica, análise de patógenos, doenças infecciosas e seqüenciamento de polimorfismos de nucleotídeos simples – e, assim como no seqüenciamento automático, dispensa a necessidade da eletroforese (17).

## **CONCLUSÕES**

O reconhecimento de um gene ADPKD mutante através de ferramentas moleculares pode efetivamente auxiliar o aconselhamento genético na definição de estratégias preventivas para indivíduos pré-dispostos à formação de rins policísticos, viabilizando um diagnóstico de tratamento terapêutico e adotando medidas de controle para o desenvolvimento da doença e elucidação dos mecanismos atuantes da citogênese.

## **REFERÊNCIAS**

1. Afzal AR, Hand M, Ternes-Pereira E, Saggae-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. 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):2686-87.
4. 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.
5. Calvet JP, Grantham JJ. The genetics and physiology of polycystic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2001;21(2):107-23.
6. Watson ML, Macnicol AM, Allan PL, Wright AF. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors in adult polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 1992;41(1):206-10.
7. Gabow PA, Grantham JJ. Polycystic kidney disease. In: Schrier RW, Gottschalk CW, editors. *Disease of the kidney.* Boston: Little Brown and Company; 1997. Pp. 521-60.
8. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, et al. Mutation analysis of the entire *PKD1* gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):46-63.
9. Human Gene Mutation Database (HGMD). Disponível em: <http://uwcmm1s.uwcm.ac.uk>
10. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. Seven gene mutations. In: Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. *Modern genetics analysis.* New York: W. H. Freeman and Company; 1991. Pp. 197-234.
11. Netto LES, Menck CFM. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: Matioli SR, editor. *Biologia molecular e evolução.* Ribeirão Preto: Holos; 2001. Pp. 40-9.
12. Yoshida H, Kon V, Ichikawa I. Polymorphism of the renin-angiotensin system genes in progressive renal disease. *Kidney Int.* 1996;50(3):732-44.
13. Baboolal K, Daniels J, Ravine D, Coles GA, Williams JD. ACE gene polymorphism in patients with PKD1 autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *J Am Soc Nephrol.* 1996;7 Suppl 9:183-97.
14. Badenas C, Torra R, San Millan JL, et al. Mutation analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Int.* 1999;55(4):1225-33.
15. Peral B, San Millan JL, Ong AC, et al. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet.* 1996;58(1):86-96.
16. Rossetti S, Burton S, Strmecki L, et al. The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(5):1230-7.
17. Pasternak, JJ. *Genética molecular humana: mecanismos das doenças hereditárias.* São Paulo: Manole; 2002. Pp. 207-15.
18. Sessa A, Ghiggeri GM, Turco AE. Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *J Nephrol.* 1997;10(6):295-310.
19. Mizoguchi M, Tamura T, Yamaki A, Higashihara E, Shimizu Y. Mutations of the PKD1 gene among Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients, including one heterozygous mutation identified in members of the same family. *J Hum Genet.* 2001;46(9):511-7.
20. 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