

GENES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DO RIM

GENES INVOLVED IN THE CONTROL OF EARLY KIDNEY DEVELOPMENT

Liana Bertolin Rossato, Daniela Copetti Santos, Vagner Milani, Cristiane Bastos de Mattos, Daiana Benck Porsch, Elvino José Guardão Barros, Ane Cláudia Fernandes Nunes

RESUMO

As doenças renais humanas são uns dos maiores problemas de saúde, e vários genes que controlam a nefrogênese estão associados com essas doenças. Os principais genes envolvidos no desenvolvimento inicial do rim são PAX2, EYA1, SIX1 E 2, SALL1, FOXC1, WT1, HOX11, e a maioria dos fatores transcricionais desses genes é importante na regulação do gene GDNF. Esses genes interagem uns com os outros, formando uma espécie de rede genética. O estudo dessas interações genéticas é essencial para o entendimento das bases moleculares das malformações do desenvolvimento renal, que é necessário para a prevenção e tratamento dessas desordens.

Unitermos: Expressão gênica, desenvolvimento renal, biologia molecular.

ABSTRACT

Renal human diseases are among the leading health problems and many genes that control nephrogenesis are associated with these diseases. The main genes involved in early kidney development are PAX2, EYA1, SIX1 and 2, SALL1, FOXC1, WT1, HOX11, and the majority of their transcriptional factors are relevant to the regulation of GDNF. Those genes interact with one another to create a genetic network. The study of such genetic interactions is crucial for understanding the molecular basis of kidney development malformations, which is necessary for the prevention and treatment of these disorders.

Keywords: Genic expression, kidney development, molecular biology.

Grupo de Estudos em Nefrogenética (GEN), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.

Correspondência: Ane Nunes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Hemodiálise, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS. Tel.: (51) 2101.8295, Fax: (51) 2101.8121. E-mail: ane.nunes@terra.com.br.

INTRODUÇÃO

O rim é composto, inicialmente, por dois tecidos primários, o mesênquima metanéfrico e o epitélio uretérico, e é através de interações recíprocas entre esses dois tecidos que os néfrons – as unidades funcionais dos rins – são formados (1).

Caminhos genéticos identificados em estudos dos mecanismos indutivos mesenquimais-epiteliais em outros órgãos têm muita importância para o conhecimento desses processos no desenvolvimento renal (2).

Novas descobertas têm sido realizadas a respeito da

genética molecular do desenvolvimento renal (3). Recentemente, muitos genes que controlam o desenvolvimento inicial de órgãos, como o rim, por exemplo, têm sido identificados através do estudo de ratos mutantes (1,4). As doenças renais são uns dos maiores problemas de saúde, e muitos dos reguladores do desenvolvimento inicial do rim estão ligados a doenças humanas renais (1).

Os principais genes envolvidos no desenvolvimento inicial do rim são PAX2, EYA1, SIX1 E 2, SALL1, FOXC1, WT1 e HOX11, e a maioria dos fatores transcricionais desses genes é importante na regulação do gene GDNF (tabela 1) (1).

Tabela 1. Principais genes envolvidos no desenvolvimento inicial do rim, os tecidos onde são expressos, o fenótipo, as alterações moleculares e as doenças decorrentes do seu *knockout*

Gene	Tecidos expressos	Fenótipo	Alterações moleculares	Doença	Referências
GDNF	MM	Não ocorre o crescimento do BU, e o MM sofre apoptose	PAX2 normal		1
GDF11	MM	Não ocorre o crescimento do BU	Perda do GDNF		5
PAX2	BU, MM	Deficiência no crescimento do BU, e MM não é induzido	Perda do GDNF	Coloboma renal	1, 4
EYA1	MM	Não ocorre o crescimento do BU, e o MM sofre apoptose	Perda do GDNF, SIX1 e SIX2	Síndrome de BOR e síndrome de BO	1, 4, 9
SIX1	MM	Não ocorre o crescimento do BU, e o MM sofre apoptose	Perda do SIX2, SALL1 e PAX2 EYA1, WT1 e GDNF normais		7
SALL1	MM	Não ocorre o crescimento do BU	Redução da expressão do GDNF, EYA1, WT1 e PAX2	Síndrome de Townes-Brocks	1
FOXC1	MM	Rins <i>duplex</i> e BU duplos	GDNF e EYA1 expandidos		1
WT1	MM	Não ocorre o crescimento do BU, e o MM sofre apoptose	SIX2, GDNF e PAX2 normais	Síndrome de Denys-Drash, síndrome de Frasier e tumor de Wilms	1, 4, 16

BU = broto uretérico; MM = mesênquima metanéfrico; EYA1 = gene eyes absent; FOXC1 = gene forkhead box; GDF11 = fator de crescimento e diferenciação 11; GDNF = fator neurotrófico derivado da glia; PAX2 = gene paired box; SALL1 = gene sal-like; SIX 1 e 2 = gene sine oculis; WT1 = gene supressor do tumor de Wilms 1.

Fator neurotrófico derivado da glia (GDNF)

O GDNF é um membro da família do fator de crescimento transformante beta. O GDNF é expresso no mesênquima metanéfrico e atua como um ligante para o c-Ret receptor da tirosina quinase, que localiza-se no ducto de Wolffian (figura 1A). A partir dessa ligação, ocorre o início da formação do broto uretérico, que cresce em direção ao mesênquima metanéfrico (figura 1B) e, posteriormente, condensa-se a ele (figura 1C). Foi observado que ratos com o GDNF inativado morrem logo após o nascimento por agenesia renal (1).

Muitos fatores transcricionais de genes, como o PAX, por exemplo, são importantes na regulação da expressão do GDNF no mesênquima metanéfrico. Um outro fator que recentemente também foi sugerido como regulador da expressão do GDNF é o GDF11 (fator de diferenciação e crescimento). O GDF11 é um membro

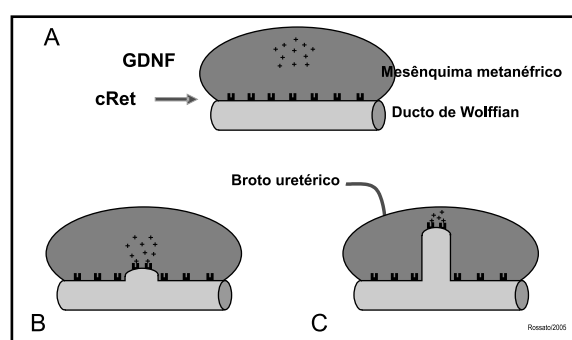


Figura 1. O GDNF é secretado pelo mesênquima metanéfrico e liga-se ao receptor cRet (tirosina quinase), que encontra-se no ducto de Wolffian (A); a partir dessa ligação, ocorre o início da formação do broto uretérico (B), que cresce em direção ao mesênquima metanéfrico e, posteriormente, condensa-se a ele (C).

GDNF = fator neurotrófico derivado da glia.

da família do fator de crescimento β . Ratos com deleção do GDF11 apresentam anormalidades renais, sendo que a maioria desses animais perde os dois rins, ocorrendo uma insuficiência na formação do broto uretérico para o estágio inicial do desenvolvimento metanéfrico (5).

Gene *paired box* (PAX2)

O PAX2 é um regulador transcricional da família *paired-box*, expresso durante o desenvolvimento do sistema urogenital, sendo requerido em vários passos durante a diferenciação do mesoderma intermediário (6).

Apesar de a formação do pro e mesonéfron ocorrer normalmente nos embriões com o PAX2 deficiente, o metanéfron e os traços genitais não se desenvolvem. Esse fato é demonstrado em embriões duplo-mutantes PAX2 e PAX8, nos quais o mesoderma intermediário sofre apoptose (1). A ausência do gene PAX2 parece não interferir nos genes SIX1 e EYA1, pois em embriões PAX2 $-/-$, a expressão do SIX1 e EYA1 é preservada (7).

O PAX2 interage com o WT1 (4). Inicialmente, acreditava-se que a proteína PAX2 era ausente no blastema metanéfrico de embriões nulos WT1; entretanto, um outro estudo demonstrou que a expressão do RNA PAX2 ocorria tanto no tipo selvagem quanto em embriões nulos WT1 (1). Evidências recentes sugerem que o PAX2 também controla a expressão do GDNF (4).

A expressão do PAX2 depende também da superfície ectodérmica, uma vez que, em um estudo no qual esta foi removida, observou-se níveis diminuídos da expressão do RNA mensageiro PAX2 nos progenitores do ducto néfrico mesenquimal, fato este que provoca a inibição da formação do ducto néfrico e, dessa forma, o desenvolvimento renal (8).

Gene *eyes absent* (EYA1)

O EYA1 é um gene homólogo ao gene da ausência de olhos da *Drosophila* (EYA). A haploinsuficiência desse gene provoca duas síndromes hereditárias autossômicas dominantes, a síndrome brânquio-oto-renal (BOR), caracterizada por anormalidades craniofaciais, perda de audição e malformações do rim e trato urinário, e a síndrome brânquio-oto (BO), caracterizada por anormalidades craniofaciais e perda auditiva (9).

Em estudos com ratos EYA1 inativados homozigóticos, o crescimento do broto uretérico não foi observado, ocorrendo, assim, uma falha na indução metanéfrica (9). Além disso, na ausência do EYA1, o GDNF não é expresso, apesar de a expressão do PAX2 continuar ativa. Em rins mutantes EYA1, o WT1 também continua ativo. Por outro lado, nos animais

mutantes EYA1, a expressão do SIX1 e SIX2 é perdida (figura 2) (1,4).

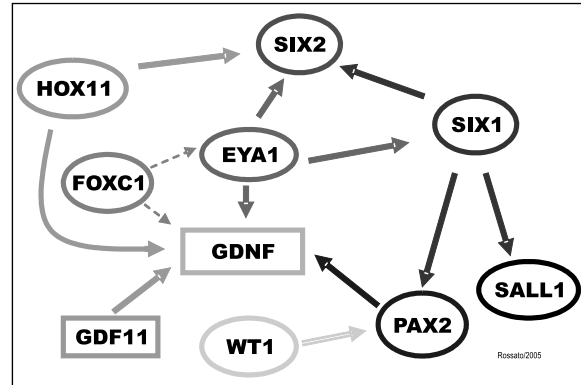


Figura 2. Rede de genes murinos envolvidos no desenvolvimento inicial do rim.

EYA1 = gene eyes absent; FOXC1 = gene forkhead box; GDF11 = fator de crescimento e diferenciação 11; GDNF = fator neurotrófico derivado da glia; HOX11 = gene da família paralogous; PAX2 = gene paired box; SALL1 = gene sal-like; SIX 1 e 2 = gene sine oculis; WT1 = gene supressor do tumor de Wilms 1.

Os retângulos são fatores de crescimento da família beta, e os círculos são fatores de transcrição. As setas indicam a perda de expressão do gene pela ausência do outro. As setas pontilhadas indicam repressão dos genes EYA e GDNF pelo FOXC1. A seta com linha dupla indica um possível efeito pós-transcricional.

Gene *sine oculis* (SIX1)

A família de genes SIX é composta por seis membros (SIX 1-6) e é homóloga ao *sine oculis* da *Drosophila*, codificando um fator de transcrição de hemeodomínio. Dentro dessa família, os genes SIX1 e SIX2 são importantes na nefrogênese. Estudos têm demonstrado que esses genes são expressos no desenvolvimento inicial do rim (7).

Em ratos com o SIX1 ausente, o broto uretérico não invade o mesênquima metanéfrico, e este, por sua vez, sofre apoptose. Nesses animais, a expressão do PAX2, SIX2 e SALL1 é marcadamente reduzida no mesênquima metanéfrico (figura 2). No entanto, a expressão do EYA1 é normal (7).

Através do mapeamento de um locus para a síndrome de BOR/BO no cromossomo humano 14q 23.1,

foram localizados, dentro de um intervalo genético crítico de 33 megabases, os genes SIX1, SIX4 e SIX6 (10).

Nesse mesmo estudo, foram identificadas três diferentes mutações no gene SIX1 em parentes que apresentavam síndrome de BOR/BO. As três mutações são muito importantes para as interações necessárias entre os genes SIX1 e EYA1. Foi observado também que, das três mutações, duas foram na região de hemeodomínio, sendo que estas são cruciais para ligadura SIX1-DNA, indicando, dessa forma, o gene SIX1 como causador da síndrome de BOR/BO (10).

Gene *sal-like 1* (SALL1)

SALL1 é um homólogo da região específica *homeotic gene spatt* da *Drosophila*. A consequência da inativação do SALL1 em ratos mutantes é a formação incompleta do broto uretérico e falência da formação tubular. Em humanos, mutações no SALL1 caracterizam a síndrome de Townes-Brocks, que resulta em orelhas displásicas, polidactilia pré-axial, ânus *imperforate* e anormalidades renais e auditivas (4).

A expressão dos genes GDNF, EYA1 e WT1 continuam ocorrendo no mesênquima do Sall1 mutante; porém, apesar de a expressão do GDNF continuar ocorrendo em mutantes SALL1, WT1 e SIX1, talvez ela esteja em um nível tão baixo que o desenvolvimento metanéfrico não prossiga (1,4).

Gene *forkhead box* (FOXC1)

FOXC1 é um fator de transcrição de uma família de *forkhead/winged-helix family* e é expresso no mesênquima metanéfrico. O fenótipo de animais *knockout* FOXC1 depende muito do contexto genético. Mutações nesse gene são responsáveis por rim *display* e anormalidades nos ureteres. Esse gene é importante para a localização de onde o broto uretérico se formará no ducto de Wolffian, pois pode reprimir a expressão do GDNF em um local específico do mesênquima metanéfrico (1,4).

Gene supressor do tumor de Wilms (WT1)

O WT1 desempenha um papel muito importante no desenvolvimento do sistema urogenital. Mutações nesse gene causam o tumor de Wilms, síndrome de Denys-Drash, síndrome de Frasier, malformações urogenitais e o desenvolvimento anormal do coração e do pulmão (4, 11).

A síndrome de Denys-Drash é uma desordem rara, que se caracteriza por pseudo-hermafroditismo, síndrome nefrótica congênita, insuficiência renal precoce e tumor

de Wilms (12,13). A síndrome de Frasier é uma desordem relativamente rara, caracterizada por disgenesia gonadal XY, gonadoblastoma e glomerulopatia progressiva, devido à glomeruloesclerose segmental focal não-específica (14,15).

Em estudos com murinos mutados WT1, foi observada insuficiência do desenvolvimento renal e das gônadas, pois, nesses animais, as células do blastema metanéfrico sofrem apoptose em 11 dias de gestação. Nessa condição, o broto uretérico não se forma a partir do ducto de Wolffian e, além disso, não ocorre a formação do rim metanéfrico (4, 11).

Em embriões WT1 $-/-$, foi observado que o PAX2, SIX2 e GDNF estão presentes como RNA no mesênquima metanéfrico, pois estes não requerem o broto uretérico ou o WT1 para a sua expressão (16).

O WT1 é primeiramente expresso no mesoderma intermediário e posteriormente restrito para o mesênquima metanefrogênico, gônadas e mesotélio, entre outros (1). O gene WT1 codifica um fator de transcrição que tem diversas isoformas. Como fator de transcrição, ele pode regular a formação do broto uretérico e também as respostas do mesênquima metanéfrico aos sinais de indução do broto uretérico epitelial (4).

Gene da família *paralogous* (HOX11)

Os genes HOX11 desempenham um papel de extrema importância na regulação do desenvolvimento inicial dos vertebrados (17). O complexo HOX, nos mamíferos, é dividido em quatro grupos, contendo 13 conjuntos de genes. Estudos em ratos demonstram que, quando estes são mutados individualmente para os genes HOXA11 ou HOXD11, apresentam anormalidades renais e, quando são duplo-mutantes para esses genes, demonstram hipoplasia renal. Na remoção do gene HOXC11, ocorre a perda completa na indução renal metanéfrica. Nos animais triplo-mutantes, a expressão dos genes PAX2, WT1 e EYA1 não é interferida; no entanto, a expressão do SIX2 e GDNF é ausente (figura 2) (18).

CONCLUSÕES

O desenvolvimento inicial do rim é determinado por vários genes que trabalham em conjunto com outros genes e seus respectivos produtos. No entanto, as interações entre esses genes não devem ser vistas como um caminho linear com uma hierarquia estrita, na qual um gene regula apenas a atividade de outro gene de um nível inferior, mas sim como uma rede de interações genéticas (1).

O estudo dessa rede de interações genéticas é muito importante para o entendimento das bases moleculares das malformações do desenvolvimento renal, que é necessário para a prevenção e tratamento dessas desordens (2).

REFERÊNCIAS

1. Brodbeck S, Englert C. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. *Pediatr Nephrol.* 2004;19(3):249-55.
2. Burrow CR. Regulatory molecules in kidney development. *Pediatr Nephrol.* 2000;14(3):240-53.
3. Glassberg KI. Normal and abnormal development of the kidney: a clinician's interpretation of current knowledge. *J Urol.* 2002;167(6):2339-50.
4. Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet.* 2002;3(7):533-43.
5. Esquela AF, Lee SJ. Regulation of metanephric kidney development by growth differentiation factor 11. *Dev Biol.* 2003;257(2):356-70.
6. Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development.* 1995;121(12):4057-65.
7. Xu PX, Zheng W, Huang L, Maire P, Laclef C, Silvius D. Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development.* 2003;130(14):3085-94.
8. Obara-Ishihara T, Kuhlman J, Niswander L, Herzlinger D. The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm. *Development.* 1999;126(6):1103-8.
9. Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet.* 1999;23(1):113-7.
10. Ruf RG, Xu PX, Silvius D, et al. SIX1 mutations cause branchio-oto0renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(21):8090-5.
11. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. Wt1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993;74(4):679-91.
12. Yamamoto K, Santo Y, Satomura K. A case of Denys-Drash syndrome with prophylactic bilateral nephrectomy. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 2003;45(1):42-6.
13. Lin HC, Lin SK, Wen MC, Tseng CF, Fu LS, Chi CS. Denys-Drash syndrome. *J Formos Med Assoc.* 2004;103(1):71-4.
14. Tajima T, Sasaki S, Tanaka Y, et al. 46, XY phenotypic male with focal segmental glomerulosclerosis caused by the WT1 splice site mutation. *Horm Res.* 2003;60(6):302-5.
15. Wang NJ, Song HR, Schanen NC, Litman NL, Frasier SD. Frasier syndrome comes full circle: genetics studies performed in an original patient. *J Pediatr.* 2005;146(6):843-4.
16. Donovan MJ, Natoli TA, Sainio K, et al. Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev Genet.* 1999;24(3-4):252-62.
17. Langenau DM, Palomero T, Kanki JP, et al. Molecular cloning and developmental expression of Tlx (Hox11) genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Dev.* 2002;117(1-2):243-8.
18. Wellik DM, Hawkes PJ, Capecchi MR. Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev.* 2002;16(11):1423-32.