

IN DEPTH REVIEW

# Gli inibitori della secrezione intracistica: nuove terapie nella ADPKD



Nunzia Miranda<sup>1</sup>, Francesca Miranda<sup>2</sup>, Luca Rinaldi<sup>1</sup>, Spiros Stratigis<sup>3</sup>, Giovambattista Capasso<sup>1</sup>

(1) *Cattedra di Nefrologia, Seconda Università degli Studi di Napoli*

(2) *Cattedra di Reumatologia, Sapienza - Università di Roma*

(3) *Dipartimento di Nefrologia, Università Ospedale di Heraklion - Creta*

## Abstract

La malattia renale policistica autosomica dominante (ADPKD) è la più frequente nefropatia ereditaria. Lo sviluppo e l'ingrandimento delle cisti richiede proliferazione delle cellule epiteliali tubulari e secrezione di fluido transepiteliale. Molteplici studi hanno suggerito che la secrezione di fluido attraverso le cellule che rivestono le cisti è guidato dalla secrezione di cloro mediato dal canale apicale CFTR e specifici trasportatori basolaterali. Il processo secretorio è stimolato da incrementati livelli di AMPc nelle cellule, probabilmente secondario a modificazioni nell'omeostasi del calcio e stimolazione anomala dei recettori V2 della Vasopressina.

Attualmente non esistono nella pratica clinica terapie in grado di rallentare la progressione della malattia ma le vie patogenetiche coinvolte stanno diventando sempre più chiare e nuovi spiragli si stanno aprendo con la sperimentazione di molecole capaci di agire sulla formazione e accrescimento cistico. Scopo di questa review è quello di chiarire le basi molecolari della secrezione intracistica nell'ADPKD in maniera da poter comprendere gli innumerevoli siti di intervento potenzialmente in grado di rallentare la progressione della crescita cistica. Considerati i molteplici trasportatori e canali ionici implicati nella secrezione di fluido intracistico si comprende le enormi potenzialità terapeutiche da poter saggiare in tale patologia.

Parole chiave: ADPKD, AMPc, AMPK, CFTR, KCa3.1, secrezione intracistica

## Inhibitors of intra-cystic secretion in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): a possible way forward

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited human renal disorder. Progressive enlargement of the kidneys is due to aberrant proliferation of the cyst epithelial cells, together with accumulation of fluid within the cyst cavities due to transepithelial fluid secretion.

Multiple studies have suggested that fluid secretion across ADPKD cyst-lining cells is driven by the transepithelial secretion of chloride, mediated by the apical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel (CFTR) and specific basolateral transporters.

Increased levels of cAMP, probably reflecting modifications in intracellular calcium homeostasis and abnormal stimulation of the vasopressin V2 receptor, in mutant renal epithelia, play an important role in the pathogenesis of ADPKD and contribute to both transepithelial secretion of fluid and proliferation of cyst epithelia. For example, cAMP activates the CFTR leading to the stimulation of Cl<sup>-</sup> secretion into the cyst lumen.

This review focuses on the pathophysiology and molecular mechanism of fluid secretion in ADPKD cysts examined during pre-clinical trials of potentially useful drugs for the treatment of this condition.

Key words: ADPKD, AMPK, cAMP, CFTR, fluid secretion in cysts, KCa3.1

## Introduzione

La malattia renale policistica autosomica dominante (ADPKD) è la più comune malattia renale ereditaria, responsabile del 10% dei pazienti con insufficienza renale cronica terminale e necessità di approccio sostitutivo [1].

L'exasperata proliferazione delle cellule epiteliali tubulari renali insieme a fenomeni di secrezione intracistica sono responsabili della formazione e accrescimento di numerose cisti piene di liquido che portano a progressiva perdita dei nefroni funzionanti, reni notevolmente ingranditi e progressiva perdita della funzionalità renale.

Si tratta di un disordine autosomico dominante causato nella maggior parte dei casi da mutazioni a carico di due geni per ora identificati: PKD1 (85%) o PKD2 (10%) che codificano rispettivamente per le proteine trans-membrana, policistina 1 e policistina 2 (PC1 e PC2).

La PC1 interagisce con la PC2 per formare un complesso multifunzionale che regola il segnale del calcio intracellulare, lo sviluppo e la riparazione epiteliale; inoltre è essenziale per il mantenimento di un fenotipo di cellula epiteliale renale di tipo differenziato [2], [3] (full text). Il meccanismo primario della formazione cistica non è ancora perfettamente conosciuto ma è generalmente accettato che la perdita funzionale delle policistine trasformi le cellule epiteliali tubulari in cellule scarsamente differenziate e iperproliferanti che danno luogo alle cisti renali. L'Adenosina 3', 5'-ciclico monofosfato (AMPC) e i suoi agonisti, tra cui primeggia la Vasopressina (AVP), giocano un ruolo stimolatorio sulla cistogenesi agendo su entrambe le tappe coinvolte nella formazione e accrescimento cistico, vale a dire sia sui fenomeni proliferativi delle cellule epiteliali tubulari che sulla secrezione transepiteliale di cloro [4].

L'incremento della proliferazione [5] dà inizio allo sviluppo delle cisti renali e una volta formate, risulta stimolata la secrezione di cloro nel lume cistico attraverso il canale CFTR (cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator), localizzato sulla membrana apicale delle cellule epiteliali cistiche; l'elettronegatività luminale così generata, permette il movimento di sodio e acqua dalla cellula nel lume cistico, secondo gradiente elettrico e osmotico rispettivamente, con progressivo ingrandimento cistico. Le cisti possono derivare da qualsiasi porzione tubulare ma originano principalmente dal dotto collettore [6]- [7].

Inizialmente il lume delle cisti mantiene il collegamento con il nefrone di origine e la filtrazione glomerulare contribuisce al riempimento cistico; nell'espandersi le cisti tendono a perdere tale connessione, probabilmente a causa dello stato di fibrosi dell'interstizio circostante [8], [9] (full text) e la secrezione intracistica diviene il solo meccanismo responsabile dell'accumulo di liquido nelle cisti;

Nella crescita cistica in PKD alla secrezione di fluido si accompagna l'iperplasia delle cellule epiteliali tubulari;

L'accumulo di fluido potrebbe contribuire all'iperplasia per stimolazione della divisione cellulare attraverso lo stretching della parete cistica [10] (full text), [9] (full text).

## Struttura e funzioni del CFTR

Il CFTR è un canale selettivo per lo ione cloro che è attivato dall'AMPc [11] (full text); fa parte di una famiglia di trasportatori che legano l'ATP, utilizzandone l'energia per guidare il trasporto di molecole diverse attraverso la membrana. Mutazioni dei geni che codificano per questi trasportatori sono responsabili di malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC), la sindrome di Dubin-Johnson, la degenerazione maculare età-correlata, la malattia di Tangier e la sitosterolemia.

Da un punto di vista strutturale il CFTR è una grande glicoproteina costituita da due domini (MSDN1 e MSDN2); ciascun dominio, formato da sei porzioni trans-membrana, lega NBD (dominio legante il nucleotide, rispettivamente NBD1 e NBD2). Un sito regolatorio (R) lega tra loro il primo NBD (NBD1) e il secondo dominio trans membrana (figura 1).

Prima che il canale risulti aperto il sito R è fosforilato in corrispondenza di diversi siti da una protein chinasi A (PKA). Una volta che R è fosforilato l'apertura e chiusura del canale è controllata da cicli di legame e idrolisi di ATP in corrispondenza di NBD.

È espresso in diversi tessuti includendo il rene, il polmone, l'intestino, il pancreas, i dotti sudoripari e i vasi deferenti [11] (full text), [12] (full text). Nelle cellule epiteliali, il CFTR media la secrezione di cloro; ha inoltre un ruolo regolatorio sui meccanismi di rilascio dell'ATP e su molte proteine di trasporto come i canali epiteliali del sodio (ENaC), i canali del K, gli scambiatori di anioni, i trasportatori Na-HCO<sub>3</sub>-e le acquaporine [13], [14] (full text).

La secrezione di cloro, nella maggior parte delle cellule epiteliali, è regolata attraverso la modulazione dell'attività del canale (apertura e chiusura) e attraverso il numero di canali sulla membrana che dipende dalla loro inserzione e rimozione.

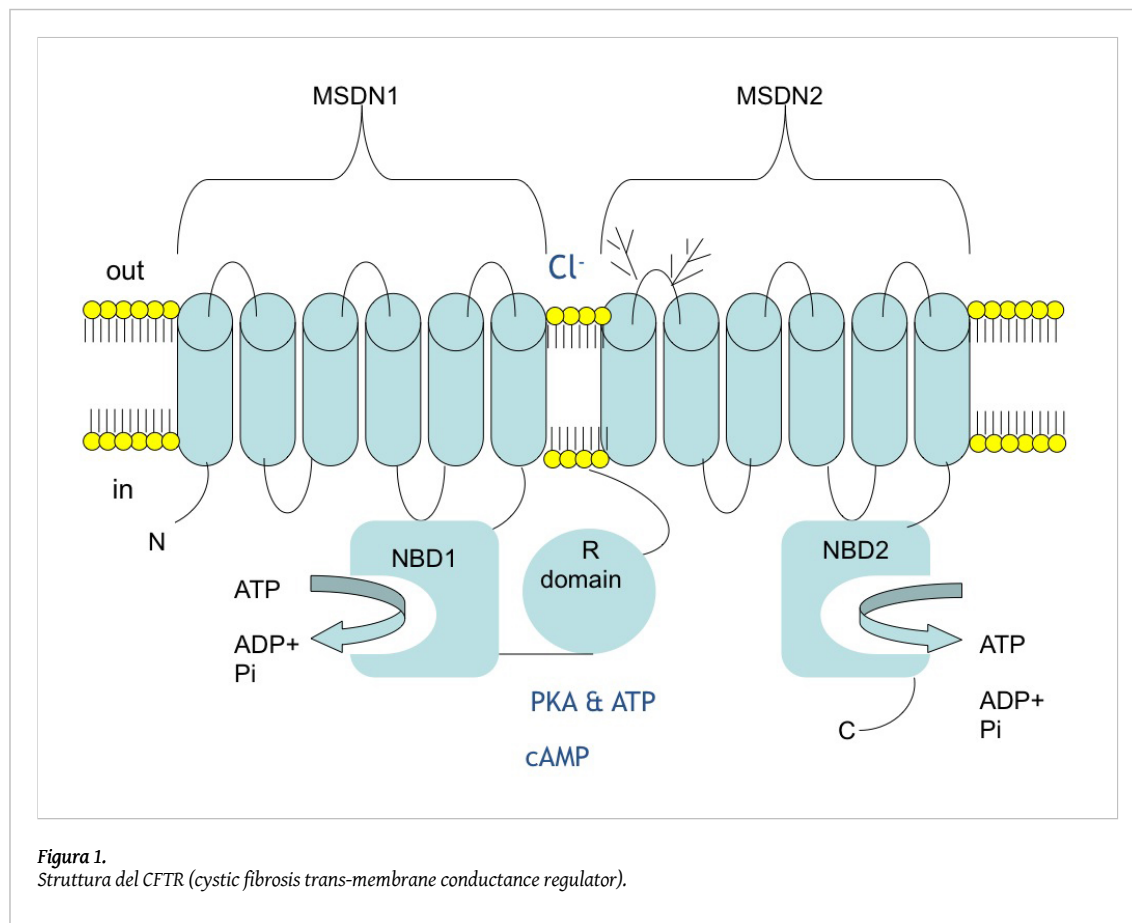


Figura 1.  
Struttura del CFTR (cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator).

Il CFTR ha importanti funzioni anche in condizioni patofisiologiche poiché contribuisce in ADPKD all'ingrandimento delle cisti renali, e nell'intestino la secrezione di cloro CFTR-mediata, è responsabile della diarrea secretoria indotta da *Vibrio cholera* e *Clostridium difficile*; nel cuore, il CFTR media le correnti del cloro protein-chinasi A (PKA)-stimolate, con eventuale effetto protettivo contro le aritmie focali e l'ischemia cardiaca [15] (full text).

Quindi nella maggior parte degli epitelii secretori e nell'epitelio cistico dell'ADPKD la secrezione di fluido dipende principalmente dalla secrezione di cloro transepiteliale AMPc-stimolata.

Mutazioni nel gene che codifica per il CFTR determinano la fibrosi cistica (FC), caratterizzata da secrezioni endocrine dense e vischiose perché poco idratate e conseguenze cliniche maggiori come infezioni ricorrenti delle vie aeree e insufficienza pancreatica.

Nella FC non si riscontrano cambiamenti significativi nella funzionalità renale nonostante l'ampia espressione del CFTR nel rene [16], [17] facendo supporre un suo ruolo marginale nella fisiologia renale [18].

L'AMPc nei meccanismi secretivi della crescita cistica interviene stimolando il canale CFTR sul versante apicale della membrana plasmatica; nella fattispecie, esso attiva la protein chinasi A (PKA) che determina la fosforilazione del CFTR in corrispondenza di molti residui nel dominio citoplasmatico, permettendo la secrezione di cloro nel lume cistico secondo gradiente di concentrazione [19], [20].

Il movimento del cloro attraverso il CFTR è il *primum movens* per il passaggio di sodio e di acqua successivi, guidato il primo da gradiente elettrochimico e il secondo da quello osmotico.

La secrezione transepiteliale di cloro è mediata, inoltre, anche da un cotrasportatore  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -bumetanide-sensibile (BSC o NKCC) presente sul versante basolaterale della membrana della cisti.

Il ruolo patogenetico della secrezione del cloro è stato dimostrato valutando il processo secretivo e le correnti ioniche sia in pareti intatte di cisti che in monostrati di cellule in coltura estratte da cisti ADPKD.

La secrezione, indotta da sostanze con funzione stimolatoria su l'AMPc (come la fosfocolina) si accompagnava ad un incremento dell'elettronegatività luminale; essa era abolita in assenza di cloro nella soluzione basolaterale o in presenza di un inibitore del cotrasportatore  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , la Bumetanide. La secrezione era abolita anche da inibitori del CFTR e da nucleotidi antisense del canale medesimo [21]. Ulteriore conferma del ruolo del CFTR nel meccanismo secretivo e nella patogenesi dell'ADPKD è la minore severità della malattia policistica renale in individui affetti contemporaneamente da ADPKD e FC rispetto ad individui affetti solo da ADPKD [22], [23] (full text).

Le modalità di trasporto del sodio e dell'acqua possono essere di tipo transcellulare e paracellulare (figura 2); riguardo al sodio, alcune evidenze indicano la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasi localizzata a livello della membrana apicale, è coinvolta nel trasporto anche se è preponderante la modalità paracellulare. Il trasporto dell'acqua per via transcellulare è acquaporina-mediato.

Nel processo di secrezione intracistica è possibile distinguere 4 steps principali [24]: trasporto attivo di cloro attraverso la membrana basolaterale, accumulo all'interno della cellula dello ione a una concentrazione superiore tale da non garantirne l'equilibrio elettrochimico, trasporto passivo attraverso la membrana apicale nel lume, e flusso passivo di sodio e acqua attraverso la via paracellulare. Il trasporto del cloro attraverso la membrana basolaterale è ottenuto attraverso una serie di trasportatori localizzati basolateral-

mente: la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$ , il co-trasporto  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , i canali del  $\text{K}^+$ . Il passaggio del  $\text{Na}^+$  dalla cellula epiteliale all'interstizio attraverso la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$  fornisce l'energia necessaria all'entrata di cloro nella cellula attraverso la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , poiché stabilisce un forte gradiente elettrochimico per l'entrata del sodio nella cellula. I canali per il potassio basolaterali, che trasportano il potassio dalla cellula all'interstizio, sono importanti per la secrezione transepiteliale di cloro perché determinano il riciclo del potassio, rifornendo l'interstizio del potassio entrato nella cellula attraverso la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , e la iperpolarizzazione della membrana basolaterale che mantiene la forza motrice per il movimento degli ioni cloro attraverso la membrana apicale [24].

La fosforilazione da parte della PKA può aumentare il trasporto di cloro oltre che attivando il CFTR anche stimolando l'inserzione di canali CFTR sulla membrana plasmatica apicale.

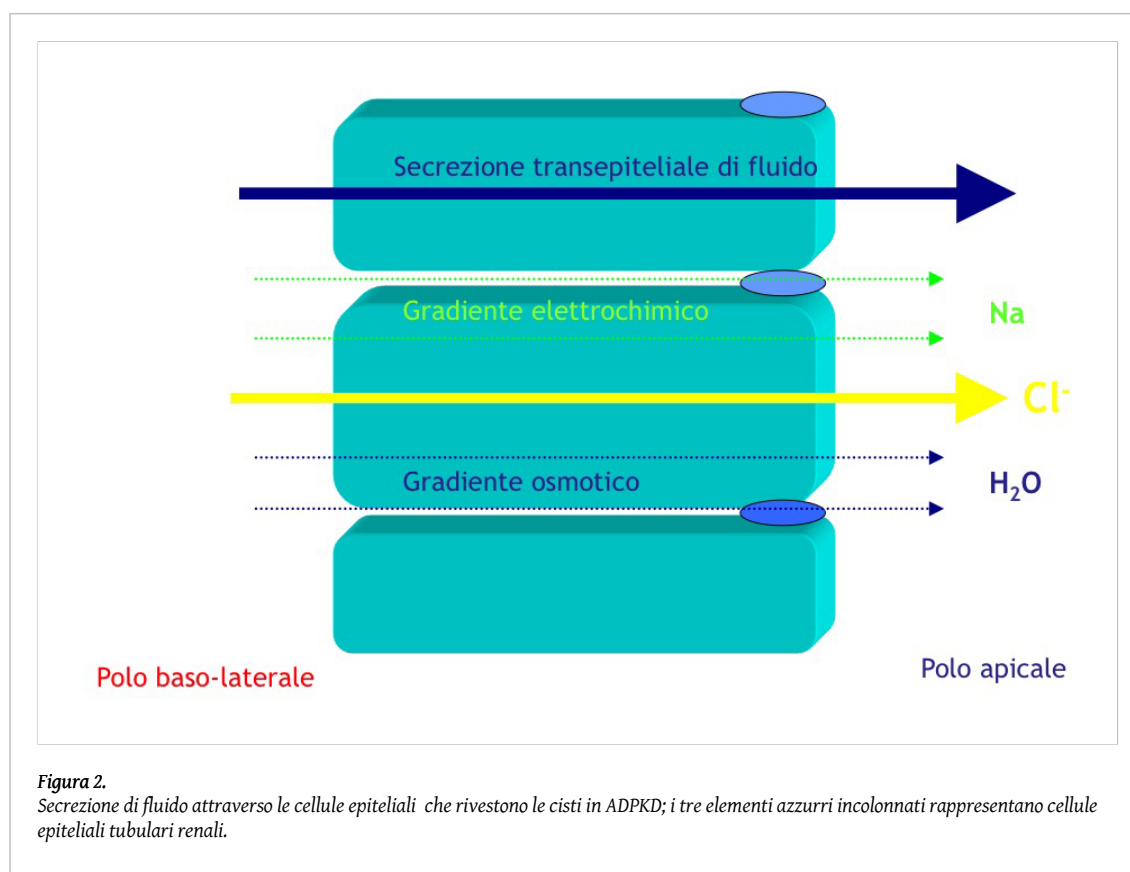
Accanto ad una regolazione positiva vi è anche una regolazione negativa sul CFTR; esso è inattivato dalla defosforilazione indotta da fosfatasi e da una serina-treonina-chinasi attivata dall'AMPc (AMPK).

## Inibitori diretti del CFTR

Uno dei bersagli per inibire la secrezione intracistica è rappresentato dal CFTR.

Esistono diverse molecole con funzione inibitoria: alcune ne ostruiscono fisicamente il poro (*open channel blockers*) mentre altre agiscono da inibitori allosterici legando il CFTR in corrispondenza di siti lontani dal poro (*allosteric inhibitors*).

I primi sono anioni ( $\text{A}^-$ ), per la maggior parte lipofili e di grosse dimensioni; in loro presenza i canali CFTR aperti risultano fisicamente occlusi; possono occludere il poro del CFTR legando il vestibolo intracellulare del poro (es. glibenclamide) oppure quello extracellulare (es. glicina idrazide).



Nello studio di Yang et al. [25] (full text), più di 30 inibitori del CFTR sono stati screenati in cellule epiteliali renali Madin Darby canine (MDCK) tipo I; si tratta di cellule che esprimono endogenamente il CFTR e che formano cisti quando fatte crescere in gel di collagene in presenza di agonisti dell'AMPC; le molecole testate appartenevano a due gruppi: analoghi della glicina idrazide (open channel blockers) e analoghi del tiazolidinone (allosteric inhibitors).

Le colture di MDCK tipo I su gel di collagene formavano un monostrato epiteliale con microvilli, un cilio solitario e giunzioni strette. La formazione e la crescita cistica erano AMPC-dipendente che determina proliferazione cellulare e secrezione. Come agonista del AMPC è stata utilizzata la fosfocolina in assenza della quale le cisti non si formavano;

Le cisti si evidenziavano alla 3-4° giornata e progressivamente si ingrandivano nei giorni successivi. La cosa interessante è che l'esposizione delle cisti agli inibitori riduceva la formazione e la crescita cistica; non si notava alcun effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare; l'inibizione era reversibile poiché il fenotipo cistico ricompariva in assenza della molecola studiata.

I migliori inibitori come efficacia e assenza di tossicità venivano poi testati nelle colture di reni embrionali e in modelli animali. Reni estratti da embrioni murini wild-type erano utilizzati per testare due composti T08 (analogo del tiazolidinone) e G07 (analogo della glicina idrazide). Le colture venivano sviluppate sia in assenza che in presenza di 8-Br-cAMP, stimolo alla proliferazione e secrezione intracistica.

In sua assenza, i reni incrementavano di dimensioni oltre il quarto giorno, mentre la sua presenza si accompagnava allo sviluppo di numerose cisti. Entrambi i composti riducevano sia le dimensioni che il numero delle cisti con effetto reversibile alla loro sospensione. La crescita renale in assenza dell'8-Br-cAMP non era influenzata da questi composti.

Poco chiari e apparentemente contraddittori sono gli effetti degli inibitori del CFTR sulla proliferazione cellulare. Infatti, in uno studio precedente, Li et al. [26] hanno dimostrato che alcuni inibitori del CFTR (glibenclamide, genisteina, CFTR inh-172, NPPB) presentavano un effetto inibitorio sulla proliferazione di cellule MDCK.

I composti T08 e G07 venivano testati per via sottocutanea, in topi Pkd1flox/-;Ksp-Cre, modello murino di ADPKD particolarmente aggressiva, ottenuto mediante inattivazione di Pkd1 rene-selettiva; è caratterizzato da sviluppo di grandi cisti con insufficienza renale nelle prime 2 settimane di vita e morte a 20 giorni. Entrambi gli inibitori riducevano la formazione cistica e i segni clinici di PKD con minori pesi renali, e ridotte concentrazioni di creatinemia e azotemia rispetto agli animali non trattati. Lo sviluppo di una malattia polmonare fibrosi cistica-like sembrerebbe improbabile poiché è minimo l'accumulo di inibitore nel polmone ed è necessario inibire il CFTR per più del 90% per influire sulla funzione polmonare. Gli autori dello studio concludono considerando queste molecole come possibili agenti terapeutici per rallentare la crescita cistica nell'ADPKD umana e meritevoli quindi di approfondimento in ulteriori studi.

Altre molecole che hanno mostrato di poter inibire la secrezione di cloro e la crescita cellulare in MDCK sono gli agenti in grado di inibire la fosforilazione AMPC-dipendente del CFTR (H-89) e i canali/trasportatori localizzati sulla membrana baso-laterale (bumetanide); sono state inoltre investigate molecole con funzione inibitoria su canali presenti sulla membrana apicale che secernono cloro ma diversi dal CFTR; sembra invece che queste molecole non abbiano effetto sulla crescita cistica ad eccezione del tamoxifene e dell'acido niflumico che però sono conosciuti anche come bloccanti il CFTR [26]; quindi è verosimile che il loro effetto sia correlato all'inibizione del CFTR.

## La metformina, attivatore di AMPK (chinasi attivata dall'AMPc) inibisce il CFTR e l'mTOR

Il CFTR è regolato in senso negativo da una chinasi attivata dall'AMPc, la AMPK [27].

Essa fa parte della famiglia di serin/treonin chinasi metabolita-sensibile, attivata dall'incremento del rapporto AMP/ATP. Alcuni studi hanno mostrato che il CFTR lega l'AMPK e che questa interazione potrebbe essere essenziale perché possa essere da questa fosforilato; la fosforilazione ridurrebbe la secrezione del cloro, inibendo l'attività del canale, senza alcun effetto sul numero dei canali CFTR sulla membrana plasmatica [27].

Oltre al CFTR anche l'mTOR (acronimo per mammalian target of rapamycin), una serin/treonin chinasi iperattivata nell'ADPKD [28] (full text), risulta essere regolata negativamente dall'AMPK.

L'mTOR, stimola la proliferazione e la crescita cellulare; essa controlla la trasduzione di segnali attraverso la fosforilazione di regolatori dell'iniziazione della traduzione (4E-BP1 e p70-S6-chinasi); l'mTOR assolve alla funzione di stimolo della crescita e proliferazione cellulare formando un complesso con una proteina chiamata "Raptor", il complesso viene definito mTOR-C1 e rappresenta il target della rapamicina [28] (full text).

La metformina, un farmaco a noi noto per il suo comune utilizzo come ipoglicemizzante orale, è un attivatore dell'AMPK, determinando inibizione di entrambi i pathways, CFTR e mTOR. L'AMPK fosforila e direttamente inibisce il CFTR, e indirettamente, antagonizza l'mTOR attraverso la fosforilazione di TSC2 (tuberina) e Raptor.

L'mTOR in condizioni fisiologiche esprime un'elevata attività nelle cellule epiteliali nei reni in accrescimento durante lo sviluppo postnatale mentre è inattiva nel rene adulto grazie a meccanismi di regolazione in cui sono coinvolti la PC1, l'amartina (TSC1) e la tuberina (TSC2); le proteine TSC1 e TSC2 sono mutate nella sclerosi tuberosa 1 e 2 rispettivamente [28] (full text); esse regolano la crescita cellulare e la loro assenza è responsabile della comparsa di tumori benigni in vari organi in tale patologia.

La tuberina e l'mTOR interagiscono con la porzione C-terminale citoplasmatica di PC1 e l'mTOR è inattivo quando Rheb lega il GDP piuttosto che il GTP; infatti Rheb solamente quando lega il GTP, ha attività chinasica e quindi è in grado di attivare mTOR.

Lo stato GTP/GDP di Rheb è regolato dalla tuberina che favorisce la reazione  $GTP = GDP + P$  in virtù del suo legame con l'amartina; dunque, il complesso tuberina-amartina agisce da inibitore di mTOR in virtù della sua funzione GTPasica.

L'AMPK inibisce la cascata di mTOR fosforilando e quindi attivando la tuberina; la tuberina a sua volta potrà inibire Rheb.

La metformina ha mostrato di poter arrestare la crescita cistica in modelli di cistogenesi *in vitro*, nelle cellule MDCK, e *in vivo*, in topi Pkd1flox/-; Ksp-Cre.

Nel trasporto delle cellule epiteliali, l'AMPK non solo modula l'attività del CFTR ma sembra inibire gli ENaC [29] (full text); sebbene ciò nel rene cistico potrebbe portare a ridotto assorbimento di fluido e dunque al suo eventuale accumulo nelle cisti, il ruolo degli ENaC nelle cellule epiteliali che rivestono le cisti è ancora incerto e comunque dai dati per ora disponibili, l'effetto netto della modulazione di AMPK sembra quello di ridurre l'accumulo di fluido luminale.

La metformina risulta potenzialmente in grado di inibire entrambi gli steps coinvolti nella cistogenesi in ADPKD.

## Gli inibitori dei canali del potassio (KCa3.1) inibiscono in maniera indiretta il CFTR

I canali per il potassio, KCa3.1, localizzati sulla membrana basolaterale delle cellule che rivestono le cisti, hanno un ruolo di rilievo nella secrezione di ioni cloro e quindi di fluido nelle cisti [30]. Si tratta di canali per il potassio “Ca<sup>2+</sup>-attivati a conduttanza intermedia”. La regolazione di questi canali è complessa e diverse molecole segnale sono richieste per la loro attivazione. Oltre al calcio, tali canali richiedono per l’attivazione il fosfatidil inositolo trifosfato, (PI(3)P), e la diretta fosforilazione in corrispondenza dell’istidina 358 sulla porzione C-terminale da parte di una chinasi B. Inoltre, sono stimolati sia dall’AMPc che dalla PKA, vie del segnale intracellulare che sono iperattivate nelle cellule epiteliali che rivestono le cisti [30].

Come abbiamo accennato in uno dei paragrafi precedenti, perché il CFTR funzioni sulla membrana apicale, è necessaria l’attività di una serie di trasportatori localizzati a livello basolaterale delle cellule epiteliali, cioè la pompa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasi, il co-trasporto Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>, i canali del K<sup>+</sup>. Il cloro passa nella cellula attraverso il co-trasporto Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> che è conosciuto per essere inibito dai cosiddetti diuretici dell’ansa; ne sono note due isoforme, SLC2A1 (NKCC2) e SLC2A2 (NKCC1). La prima è localizzata esclusivamente sulla membrana apicale della porzione spessa ascendente dell’ansa di Henle mentre l’altra è ubiquitaria ed espressa sul polo basolaterale sia di cellule epiteliali secernenti cloro che di cellule non epiteliali. NKCC1 è stata riscontrata in 1/3 delle cisti ADPKD con pattern basolaterale e le cisti positive per NKCC1 lo erano anche per il CFTR.

L’attività di NKCC1 richiede riciclo di sodio, attraverso la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasi basolaterale, e di potassio attraverso i KCa3.1.

I KCa3.1 riforniscono l’interstizio del potassio, entrato nella cellula attraverso la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> e l’efflusso di ioni K<sup>+</sup>determina iperpolarizzazione della membrana basolaterale che mantiene la forza motrice per il movimento degli ioni cloro attraverso la membrana apicale.

Il blocco farmacologico di tali canali ha mostrato bloccare in vitro la formazione cistica [30]. Gli inibitori farmacologici, a differenza degli inibitori diretti del CFTR di cui non esistono ancora molecole sicure e potenti, sono già testati in trials clinici di fase III per l’anemia a cellule falciformi.

Nello studio di Albaum et al., è stata accertata la presenza dell’mRNA dei KCa3.1 e correnti di K<sup>+</sup>attraverso i KCa3.1 in cellule MDCK, in colture primarie di cellule epiteliali renali umane normali (NHK cells) e in cellule isolate da cisti renali di pazienti con ADPKD. TRAM-34 è uno specifico inibitore di KCa3.1 ed è stato chiaramente dimostrato che blocca la secrezione di cloro non attraverso un’azione diretta sul CFTR o su altri canali del cloro apicali. Un diretto attivatore di KCa3.1 (DCEBIO) stimolava la secrezione di cloro nelle stesse cellule. A sostegno del ruolo dell’AMPc nella stimolazione di tali canali vi è l’evidenza che la stimolazione di cellule ADPKD con fosfocolina, agonista dell’AMPc determinava un’ iperpolarizzazione del potenziale di membrana, incremento del gradiente elettrochimico per la secrezione di cloro e quindi aumentata secrezione dello ione attraverso il CFTR (in maniera analoga al DCEBIO).

Il trattamento con TRAM -34 inibiva la formazione delle cisti in cellule MDCK, e inoltre anche la crescita delle cisti se era aggiunto dopo sei giorni di stimolazione con fosfocolina quando le cisti erano già cominciate a formarsi. Risultati simili sulla formazione e accrescimento cistico erano visti in cellule renali estratte da pazienti con ADPKD. La proliferazione non era inibita da TRAM-34, indicando che KCa3.1 non giocano un ruolo nella proliferazione di queste cellule almeno nelle condizioni testate.



Da sottolineare che, sebbene la vasopressina (AVP), agendo sui recettori V2 localizzati sulla membrana basolaterale delle cellule principali del dotto collettore (CD) e tubulo connettore (CNT), sia il segnale più importante nel determinare incremento del AMPc, esistono anche una serie di pathways indipendenti dai recettori V2 che contribuiscono all'incremento dei livelli renali di AMPc includendo anche molecole endogene simil-fosfocolina che si accumulano nel fluido cistico.

Queste osservazioni suggeriscono che gli inibitori di KCa3.1 bloccando la secrezione di cloro stimolata dall'AMPc generato anche in maniera V2-indipendente, potrebbero agire in maniera sinergica agli antagonisti recettoriali dell'AVP nell'inibire la crescita cistica nei pazienti con ADPKD.

## Agonisti dei recettori PPAR $\gamma$

Gli agonisti dei recettori PPAR $\gamma$  (acronimo di peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ) sono ligandi sintetici, usati nella pratica clinica come agenti che aumentano la sensibilità all'insulina nel trattamento del Diabete Mellito tipo II.

I PPAR $\gamma$  sono dei fattori di trascrizione nucleari attivati da piccoli ligandi lipofilici; essi inducono o reprimono la trascrizione di numerosi geni, regolandone le funzioni cellulari. La loro attivazione ha mostrato avere vari effetti metabolici come miglioramento del controllo glucidico e lipidico, riduzione dei mediatori dell'infiammazione, proprietà antiaterogene, riduzione del grasso addominale ed epatico, riduzione dei lipidi nelle miocellule, e un effetto ipotensivante; hanno mostrato inoltre una certa efficacia sulla malattia cistica in molti modelli di PKD.

Hanno evidenziato anche un effetto protettivo sulla funzionalità renale in varie malattie renali, includendo nefropatia diabetica, malattie dei podociti, danno renale ischemia/riperfusionese, fibrosi da senescenza e interstiziale.

Sono espressi nel dotto collettore, e poichè ligandi sintetici, come il pioglitazone, il rosiglitazone e il troglitazone e il farglitazar (GI2570) causano sodio-ritenzione e in rare occasioni anche edema palese, la maggior parte degli studiosi si è soffermato su un possibile ruolo di questi recettori sugli ENaC, localizzati appunto in questo segmento del nefrone.

In effetti, ci sono studi piuttosto discordanti sull'azione degli agonisti dei PPAR $\gamma$  sugli ENaC [31] (full text), [32] che sono invece chiaramente stimolati dall'AVP.

Infatti l'AVP che abbiamo visto avere un ruolo stimolatorio sul CFTR, regola positivamente anche gli ENaC e i canali dell'acqua (AQP) in maniera AMPc-mediata, attraverso modulazione dell'attività e dell'inserzione sulla membrana plasmatica.

L'azione dell'AVP nelle cellule principali si esplica attraverso l'azione sui recettori V2 localizzati sulla membrana basolaterale. Il legame dell'AVP ai suoi recettori risulta in una attivazione dell'adenilato ciclasi, produzione di AMPc, attivazione di PKA, e stimolazione della fosforilazione del CFTR localizzato sulla membrana apicale.

Due differenti agonisti dei recettori PPAR $\gamma$ , GI2570 e pioglitazone, sono stati testati in cellule MDCK dove mostravano chiaramente di poter inibire la secrezione di cloro AVP-stimolata [31] (full text); entrambi inibivano anche la corrente amiloride-sensibile (attraverso gli ENaC). Come abbiamo spiegato precedentemente, la secrezione di cloro nelle cellule principali necessita di 1) CFTR sulla membrana apicale, 2) riciclo di potassio attraverso i ROMK o canali per il K Ca-attivati, 3) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasi, e 4) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>.

Una riduzione dell'attività di uno dei sovramenzionati canali/trasportatori risulterà in un riduzione della secrezione di cloro. Nessuno dei due farmaci riduceva la produzione di AMPc AVP-stimolata né influenzava la PKA.

Entrambi i farmaci riducevano i livelli di mRNA di CFTR, ENaC $\gamma$ e PPAR $\gamma$  mentre il G12570 causava anche una riduzione significativa dell'mRNA dell'AQP2 e ENaC $\beta$ .

I risultati di questo studio [31] (full text) fanno ipotizzare che tali farmaci possano influenzare proteine a valle dell'AMPc e della PKA e a sostegno di ciò vi è la mancata reversione dell'inibizione della secrezione di cloro utilizzando la fosfocolina come attivatore dell'adenilato ciclasi.

Il pioglitazone ha mostrato inibire la crescita di cisti renali ed epatiche in ratti PCK (modello di ARPKD umana) inibendo la corrente ionica CFTR- mediata e la secrezione di fluido [33] (full text), [34] (full text).

L'effetto del pioglitazone sulla fibrosi tissutale, che avrebbe un ruolo principe nel contribuire al declino della funzionalità d'organo in PKD, è più difficoltoso da studiare poiché essa è lieve nelle fasi precoci della progressione della malattia in questo modello sperimentale.

Tempi di studio più lunghi sono necessari per valutare l'effetto antifibrotico di questi farmaci.

Tuttavia in altre malattie, l'uso dei PPAR $\gamma$ agonisti è stato correlato con riduzione della risposta infiammatoria e della fibrosi tissutale e recenti studi hanno mostrato la loro capacità di ridurre la fibrosi in tessuti come l'epidemie, polmone, rene e fegato [34], [35], [36] (full text).

I ratti PCK sono stati utilizzati come modello sperimentale in un altro studio [34] (full text) in cui il pioglitazone ha mostrato ridurre la progressione della malattia policistica renale ed epatica con riduzione del peso renale ed epatico, delle aree cistiche renale ed epatica, e dell'urea sierica. Gli autori si sono soffermati non sulla capacità dell'agonista di agire sulla secrezione intracistica ma sulla capacità di interferire con la proliferazione cellulare, processo iperattivato in PKD.

Il pioglitazone chiaramente riduceva la proliferazione cellulare con riduzione del numero di cellule positive per Ki67 (un marcatore di proliferazione cellulare) nei tubuli dilatati e nelle cisti provenienti da ratti trattati. Interessante è che veniva ridotto il numero di cellule positive per Ki67 anche in cellule tubulari non cistiche, suggerendo che il pioglitazone possa inibire gli eventi più precoci della formazione cistica.

L'inibizione della proliferazione cellulare renale era mediata dalla riduzione di due dei pathways intracellulari cruciali nella PKD: i segnali MEK/ERK ed AKT/mTOR. L'effetto inibitorio sulla proliferazione era analogo nel fegato con riduzione degli stessi marcatori di proliferazione.

Non è stato possibile dimostrare l'effetto antifibrotico nel rene poiché il grado di fibrosi e l'espressione di TGF- $\beta$  (associato alla progressione della fibrosi nei ratti PCK) nei reni PCK non erano marcatamente elevati rispetto agli animali normali. Tuttavia l'effetto antifibrotico del pioglitazone era ben documentabile a carico del fegato in cui il numero di cellule positive per il TGF/ $\beta$  nei ratti PCK era significativamente maggiore rispetto ai controlli ed era quindi possibile vedere l'effetto del farmaco sperimentale.

In uno studio precedente il pioglitazone veniva testato in topi con delezione degli esoni 2-6 in PKD1. I mutanti omozigoti muoiono in utero e sviluppano cisti renali e pancreatiche, idrope e difetti cardiaci, mentre gli eterozigoti sviluppano una PKD con andamento simile

all'ADPKD umana; il pioglitazone veniva somministrato in animali gravidi con il risultato di aumentare la sopravvivenza degli embrioni Pkd2<sup>-/-</sup> dopo la nascita con miglioramento dei difetti cardiaci e riduzione del grado di cistogenesi renale, probabilmente attraverso "restoring" del segnale Wnt/ $\beta$  catenina [37] (full text). Inoltre il trattamento a lungo termine migliorava la funzione endoteliale nei topi adulti eterozigoti (pkd1<sup>+/-</sup>) attraverso la produzione di ossido nitrico [37] (full text).

Un altro potente agonista dei recettori PPAR $\gamma$ , il rosiglitazone è stato utilizzato per trattare ratti Han:SPRD, un modello di ADPKD lentamente progressiva: mostrava di poter ritardare l'insufficienza renale ma a discapito dell'ipertrofia cardiaca, probabilmente dovuta ad un eccessivo assorbimento di sodio rosiglitazone-mediato [38] (full text).

In cellule MDCK il rosiglitazone ha esercitato un potente effetto inibitorio sull'espansione cistica attraverso il blocco della proliferazione e interferenza con la polarità planare e apicobasale e con la formazione del lume centrale [39] (full text).

Facendo il resoconto dei risultati ottenuti, si comprende come gli agonisti dei recettori PPAR $\gamma$  abbiano palesi proprietà anticistogeniche, non solo interferendo con la secrezione intracistica ma anche su svariati pathways alterati nella PKD; il loro futuro sviluppo per il trattamento dei i pazienti con ADPKD è probabilmente limitato dal riconoscimento del loro effetto cardiottossico (insufficienza cardiaca, morte cardiaca) in alcuni sottogruppi di pazienti; tuttavia sicuramente sono meritevoli di ulteriori approfondimenti scientifici per la loro apparente multidirezionalità d'azione.

*Gli Autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.*

---

## Bibliografia

- [1] Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993; 329: 332-342.
- [2] Boucher CA, Ward HH, Case RL et al. Receptor protein tyrosine phosphatases are novel components of a polycystin complex. *Biochimica et biophysica acta* 2011 Oct;1812(10):1225-38
- [3] Xia S, Li X, Johnson T et al. Polycystin-dependent fluid flow sensing targets histone deacetylase 5 to prevent the development of renal cysts. *Development (Cambridge, England)* 2010 Apr;137(7):1075-84 (full text)
- [4] Wallace DP Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochimica et biophysica acta* 2011 Oct;1812(10):1291-300
- [5] Yamaguchi T, Nagao S, Wallace DP et al. Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney international* 2003 Jun;63(6):1983-94
- [6] Verani RR, Silva FG Histogenesis of the renal cysts in adult (autosomal dominant) polycystic kidney disease: a histochemical study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1988 Nov;1(6):457-63
- [7] Torres VE, Wang X, Qian Q et al. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature medicine* 2004 Apr;10(4):363-4
- [8] Grantham JJ Polycystic kidney disease: neoplasia in disguise. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1990 Feb;15(2):110-6
- [9] Tanner GA, McQuillan PF, Maxwell MR et al. An in vitro test of the cell stretch-proliferation hypothesis of renal cyst enlargement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1995 Oct;6(4):1230-41 (full text)
- [10] Sullivan LP, Wallace DP, Grantham JJ et al. Epithelial transport in polycystic kidney disease. *Physiological reviews* 1998 Oct;78(4):1165-91 (full text)
- [11] Bradbury NA Intracellular CFTR: localization and function. *Physiological reviews* 1999 Jan;79(1 Suppl):S175-91 (full text)
- [12] Bertrand CA, Frizzell RA The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *American journal of physiology. Cell physiology* 2003 Jul;285(1):C1-18 (full text)
- [13] Ko SB, Zeng W, Dorwart MR et al. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nature cell biology* 2004 Apr;6(4):343-50
- [14] Yoo D, Flagg TP, Olsen O et al. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *The Journal of biological chemistry* 2004 Feb 20;279(8):6863-73 (full text)

- [15] Duan DY, Liu LL, Bozeat N et al. Functional role of anion channels in cardiac diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 2005 Mar;26(3):265-78 (full text)
- [16] Morales MM, Carroll TP, Morita T et al. Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *The American journal of physiology* 1996 Jun;270(6 Pt 2):F1038-48
- [17] Stanton BA Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and renal function. *Wiener klinische Wochenschrift* 1997 Jun 27;109(12-13):457-64
- [18] Uchida S, Sasaki S Function of chloride channels in the kidney. *Annual review of physiology* 2005;67:759-78
- [19] Quinton PM Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983 Feb 3;301(5899):421-2
- [20] Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science (New York, N.Y.)* 1991 Jul 12;253(5016):202-5
- [21] Davidow CJ, Maser RL, Rome LA et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro. *Kidney international* 1996 Jul;50(1):208-18
- [22] O'Sullivan DA, Torres VE, Gabow PA et al. Cystic fibrosis and the phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1998 Dec;32(6):976-83
- [23] Persu A, Devuyst O, Lannoy N et al. CF gene and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2000 Dec;11(12):2285-96 (full text)
- [24] Li H, Sheppard DN Therapeutic potential of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibitors in polycystic kidney disease. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2009;23(4):203-16
- [25] Yang B, Sonawane ND, Zhao D et al. Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008 Jul;19(7):1300-10 (full text)
- [26] Li H, Findlay IA, Sheppard DN et al. The relationship between cell proliferation, Cl<sup>-</sup> secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. *Kidney international* 2004 Nov;66(5):1926-38
- [27] Guggino WB, Stanton BA New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2006 Jun;7(6):426-36
- [28] Lieberthal W, Levine JS The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009 Dec;20(12):2493-502 (full text)
- [29] Bhalla V, Oyster NM, Fitch AC et al. AMP-activated kinase inhibits the epithelial Na<sup>+</sup> channel through functional regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry* 2006 Sep 8;281(36):26159-69 (full text)
- [30] Albaqumi M, Srivastava S, Li Z et al. KCa3.1 potassium channels are critical for cAMP-dependent chloride secretion and cyst growth in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney international* 2008 Sep;74(6):740-9
- [31] Nofziger C, Brown KK, Smith CD et al. PPARgamma agonists inhibit vasopressin-mediated anion transport in the MDCK-C7 cell line. *American journal of physiology. Renal physiology* 2009 Jul;297(1):F55-62 (full text)
- [32] Nofziger C, Chen L, Shane MA et al. PPARgamma agonists do not directly enhance basal or insulin-stimulated Na<sup>+</sup> transport via the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2005 Dec;451(3):445-53
- [33] Blazer-Yost BL, Haydon J, Eggleston-Gulyas T et al. Pioglitazone Attenuates Cystic Burden in the PCK Rodent Model of Polycystic Kidney Disease. *PPAR research* 2010;2010:274376 (full text)
- [34] Yoshihara D, Kurahashi H, Morita M et al. PPAR-gamma agonist ameliorates kidney and liver disease in an orthologous rat model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology* 2011 Feb;300(2):F465-74 (full text)
- [35] Zhang GY, Cheng T, Zheng MH et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits transforming growth factor-beta1 induction of connective tissue growth factor and extracellular matrix in hypertrophic scar fibroblasts in vitro. *Archives of dermatological research* 2009 Aug;301(7):515-22
- [36] Belfort R, Harrison SA, Brown K et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *The New England journal of medicine* 2006 Nov 30;355(22):2297-307 (full text)
- [37] Muto S, Aiba A, Saito Y et al. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Human molecular genetics* 2002 Jul 15;11(15):1731-42 (full text)
- [38] Dai B, Liu Y, Mei C et al. Rosiglitazone attenuates development of polycystic kidney disease and prolongs survival in Han:SPRD rats. *Clinical science (London, England : 1979)* 2010 Jul 9;119(8):323-33 (full text)
- [39] Mao Z, Streets AJ, Ong AC et al. Thiazolidinediones inhibit MDCK cyst growth through disrupting oriented cell division and apical-basal polarity. *American journal of physiology. Renal physiology* 2011 Jun;300(6):F1375-84 (full text)