BRUNO EDUARDO PEDROSO BALBO

**Camundongos com deficiência em *Pkd1* apresentam
disfunção cardíaca, fenótipo atenuado
por *knockout* de galectina-3**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Balbo, Bruno Eduardo Pedroso

Camundongos com deficiência em *Pkd1* apresentam disfunção cardíaca, fenótipo atenuado por *knockout* de glectina-3 / Bruno Eduardo Pedroso Balbo. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante 2.Miocardiopatias
3.Galectina 3 4.Ecocardiografia 5.Apoptose 6.Fibrose 7.Ultrassonografia 8.Biologia
molecular 9.Camundongos

USP/FM/DBD-245/14

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 29, Divisão de Nefrologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Dedicatória

À minha esposa Rosana e a meus filhos Helena e Davi.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Luiz Fernando Onuchic, meu orientador, agradeço por tudo que me foi ensinado, não apenas no campo das Ciências, mas também no âmbito dos relacionamentos humanos. Sua lisura, dedicação, imparcialidade, gosto pelo trabalho e amor à família são características inestimáveis e contagiantes.

À Andressa, agradeço não apenas grande colaboração neste projeto, mas também pela amizade, pelos conselhos e pelo estímulo nos momentos de dificuldade.

Agradecimentos

Aos Profs. Feng Qian, Roger Chammas, Emerson Soares e Maria Cláudia Irigoyen agradeço por todas as sugestões no projeto, pelo apoio e disponibilidade.

Ao Dr. Isac de Castro pela grande colaboração na análise estatística.

Aos amigos do LIM29, Ana Paula, Ane, Jonathan, Zenaide, Fernanda, Michele, Fernando, Will, Crysthiane, Frederico, Elieser, Diego, Natália, Juliano, Eliene, Margot e Renata pela amizade e pelas experiências compartilhadas.

Aos amigos do biotério, Flávio, Milena, Cynthia, Jaqueline, Selmo, Robison, Lucy, Carlos, Leandro e Pedro pelo profissionalismo no cuidado com os animais de experimentação.

Ao Dr. Antônio, Sra. Auta, André, Eduardo, Viviane e Gustavo, meus sinceros agradecimentos.

A todos da Disciplina de Nefrologia que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio à pesquisa, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa.

E a todos os pacientes do Ambulatório de Nefropatias Hereditárias, pela esperança compartilhada.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Símbolos

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos epidemiológicos da doença renal policística autossômica dominante	2
1.2	Aspectos genéticos e moleculares da DRPAD	2
1.3	Manifestações clínicas e história natural da DRPAD	7
1.4	Busca por modificadores fenotípicos	11
1.5	Galectinas.....	12
1.6	Estrutura e funções da galectina-3	14
1.7	Efeitos da galectina-3 sobre o desenvolvimento, estrutura e função renal	17
1.8	Galectina-3 e cistogênese <i>in vitro</i>	18
1.9	Galectina-3 e cistogênese <i>in vivo</i>	20
1.10	Galectina-3 e doenças crônicas	20
1.11	Hipóteses	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Modelos animais	29
3.2	Geração de camundongos duplos-mutantes	34
3.3	Grupos experimentais	35
3.4	Análise ecocardiográfica convencional	36
3.5	Análise da deformação miocárdica (strain) através de ecocardiografia por rastreamento de marcas acústicas (speckle-tracking)	36
3.6	Ultrassonografia renal	37
3.7	Aferição direta da pressão arterial média e da pressão arterial pulsátil	38
3.8	Análise do barorreflexo	39
3.9	Determinações bioquímicas	40
3.10	Análise morfológica dos tecidos	40

3.11	Quantificação de fibrose tecidual	41
3.12	Análise imunoistoquímica para quantificação de apoptose	41
3.13	Análise imunoistoquímica para quantificação da proliferação celular	42
3.14	Análise de expressão de galectina-3 por imunoistoquímica	43
3.15	Extração de proteínas e western blot	44
3.16	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Modelos de camundongo deficientes em Pkd1 e geração de duplos-mutantes Pkd1+/-:Lgals3-/- (HTG-), Pkd1cond/cond:Nestincre:Lgals3-/- (CIG-) e Pkd1V/V:Lgals3-/- (VVG)	48
4.2	Animais haploinsuficientes e císticos deficientes em Pkd1 apresentam disfunção sistólica e diastólica, assim como anormalidades na deformação miocárdica	49
4.3	A deficiência de Pkd1 pode levar a disfunção cardíaca primária e associada à hipertensão	56
4.4	Animais haploinsuficientes e císticos deficientes em Pkd1 apresentam apoptose e fibrose cardíaca aumentadas	58
4.5	A expressão de galectina-3 encontra-se aumentada no tecido cardíaco de camundongos císticos deficientes em Pkd1	60
4.6	Knockout para Lgals3 resgata o fenótipo cardíaco em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em Pkd1	62
4.7	O resgate do fenótipo cardíaco determinado por knockout de Gal-3 em camundongos deficientes em Pkd1 está associado à redução de apoptose e fibrose	63
4.8	Fenótipo renal em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em Pkd1	64
4.9	Knockout para Lgals3 resgata os fenótipos renais de proliferação celular, apoptose e fibrose em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em Pkd1	68
4.10	Knockout para Lgals3 prolonga a sobrevivência e diminui apoptose cardíaca e fibrose renal no camundongo Pkd1V/V	69
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	80
7	ANEXOS	82
8	REFERÊNCIAS	118

Listas

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual
×	vezes
±	mais ou menos
<	menor que
π	constante matemática PI (3,14159265)
%	porcentagem
°C	graus Celsius
Ca ²⁺	cálcio
Na ⁺	sódio
K ⁺	potássio
cm	centímetro
g	grama
h	hora
d	dia
kDa	kilo Dalton
L	litro
M	molar
m ²	metro quadrado
mEq	miliequivalente
mg	miligrama
mmHg	milímetro de mercúrio
mHz	megaHertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro

mM	milimolar
ms	milisegundo
nm	nanômetro
p	coeficiente de significância estatística
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
s	segundo
s ⁻¹	segundo elevado a potência menos um
UI	unidade internacional
µg	micrograma
µm	micromêtro

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Ac-SDKP	n-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina
AE	átrio esquerdo
AIC	aneurisma intracraniano
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
AO	aorta
Arg	arginina
Asp	ácido aspártico
<i>Bcl-2</i>	<i>B cell lymphoma-2</i>
<i>Bim</i>	<i>bcl-2-like protein 11</i>
BNP	peptídeo natriurético tipo B
bpm	batimentos por minuto
CAP	cílio apical primário
<i>Cdk</i>	<i>cyclin-dependent kinases</i>
CI	genótipo <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} . <i>Nestin</i> ^{cre}
CIG-	genótipo <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} . <i>Nestin</i> ^{cre} . <i>Lgals3</i> ^{-/-}
<i>cpk</i>	<i>congenital polycystic kidney</i>
CRD	<i>carbohydrate-recognition domain</i>
CRISP	<i>Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease</i>
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPPVE	diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo
DRCT	doença renal crônica terminal
DRP	doença renal policística
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante tipo 1
DRPAD2	doença renal policística autossômica dominante tipo 2
DRPAR	doença renal policística autossômica recessiva
DSIV	diâmetro do septo interventricular
ECA	enzima de conversão da angiotensina I

EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
E/A	relação entre as ondas E e A
E/e'	relação entre as ondas E e e'
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FC	frequência cardíaca
FCH	fator de crescimento de hepatócito
FE _{Cl}	fração de excreção de cloreto
FE _K	fração de excreção de potássio
FE _{Na}	fração de excreção de sódio
FEnVE	fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FLP	<i>functional length polymorphism</i>
FRT	<i>flippase recognition target</i>
Gal-3	galectina-3
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gli	glicina
Glu	ácido glutâmico
GPS	<i>G protein-coupled receptor proteolytic site</i>
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HE	hematoxilina-eosina
<i>HMOX1</i>	heme oxigenase-1
HT	genótipo <i>Pkd1</i> ^{+/-}
HTG-	genótipo <i>Pkd1</i> ^{+/-} : <i>Lgals3</i> ^{-/-}
HVE	hipertrofia ventricular esquerda
IEB	índice de efetividade do barorreflexo
IEB-aum	IEB com aumento da pressão arterial sistólica e prolongamento do intervalo de pulso
IEB-dim	IEB com diminuição da pressão arterial sistólica e encurtamento do intervalo de pulso
IL-5	interleucina-5
IP	intervalos de pulso
IPM	índice de performance miocárdica
JAK	<i>janus kinase-signal transducer</i>

Kb	kilobases
KO	<i>knockout</i>
LDL-A	<i>low-density lipoprotein receptor domain class A</i>
LGALS3	<i>lectin, galactosin binding, soluble 3</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein-kinase</i>
MDCK	<i>madin-Darby canine kidney</i>
MVE	massa do ventrículo esquerdo
NC	genótipo <i>Pkd1</i> ^{cond/cond}
NT-proBNP	porção N-terminal do peptídeo natriurético tipo B
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
PAS	pressão arterial sistólica
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	peso corporal
PC1	policistina-1
PC2	policistina-2
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>PKD1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>PKD2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
REJ	<i>receptor for egg jelly</i>
RNM	ressonância nuclear magnética
SBR	sensibilidade do barorreflexo
Ser	serina
S'	pico da velocidade da onda S' medida ao nível septal basal
S _{Cl}	concentração sérica de cloro
S _{Cr}	concentração sérica de creatinina
S _K	concentração sérica de potássio
S _{Na}	concentração sérica de sódio
SRAA	sistema renina-angiotensina-aldosterona
<i>STAT</i>	<i>activator of transcription</i>
S _U	concentração sérica de uréia
SV	genótipo <i>Pkd1</i> ^{+/+}

T	treonina
TBST	<i>tris-buffered saline</i> acrescida de <i>tween</i> 0,1%
TCIVE	tempo de contração isovolumétrica do VE
TD	tempo de desaceleração da onda E mitral
TDI	<i>tissue Doppler imaging</i>
TFG	taxa de filtração glomerular
<i>TGF-β1</i>	<i>Transforming growth factor-1</i>
T-PER	<i>Tissue Protein Extraction Reagent</i>
TRIVE	tempo de relaxamento isovolumétrico do VE
Trp	triptofano
TRS	terapia renal substitutiva
<i>TTF-1</i>	<i>thyroid transcription factor-1</i>
TUNEL	<i>terminal deoxinucleotidil transferase uracil nick end labeling</i>
U _{Cl}	concentração urinária de cloreto
U _{Cr}	concentração urinária de creatinina
U _K	concentração urinária de potássio
U _{Na}	concentração urinária de sódio
V	valina
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VRT	volume renal total
VV	genótipo <i>Pkd1</i> ^{V/V}
VVG-	genótipo <i>Pkd1</i> ^{V/V} : <i>Lgals3</i> ^{-/-}
<i>Wnt</i>	<i>wingless-int</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da policistina-1 e da policistina-2, os produtos de <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i> , e representação de seus domínios fundamentais	4
Figura 2 -	Doença renal policística autossômica dominante em paciente do sexo feminino de 49 anos	8
Figura 3 -	Representação esquemática dos membros da família das galectinas e dos tipos de estrutura formados entre galectinas e glicanos	13
Figura 4 -	Genotipagem dos camundongos por PCR relacionada aos alelos <i>Pkd1</i> ⁺ , <i>Pkd1</i> ^{cond} , à presença do transgene Cre, ao alelo <i>Pkd1</i> ^V , e ao alelo <i>Lgals3</i> ⁺	33
Figura 5 -	Fluxograma experimental para camundongos (A) SV, HT e HTG-; (B) NC, CI e CIG-; e (C) SV, VV e VVG-	35
Figura 6 -	Disfunção cardíaca em camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	51
Figura 7 -	Disfunção diastólica em camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	52
Figura 8 -	Análise da deformação miocárdica em camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	53
Figura 9 -	Apoptose e fibrose em tecido cardíaco	59
Figura 10 -	Expressão de galectina-3 e TGF-β1 em tecido cardíaco.....	61
Figura 11 -	Fenótipo renal em camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	65
Figura 12 -	Proliferação celular, apoptose e fibrose em tecido renal.....	66
Figura 13 -	Curva de sobrevivência dos animais <i>Pkd1</i> ^{V/V} e <i>Pkd1</i> ^{V/V} : <i>Lgals3</i> ^{-/-}	70
Figura 14 -	Fenótipos cardíaco e renal em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/+} , <i>Pkd1</i> ^{V/V} e <i>Pkd1</i> ^{V/V} : <i>Lgals3</i> ^{-/-} em P18	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros ecocardiográficos em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/-} e <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} : <i>Nestin</i> ^{cre} , seus respectivos duplos-mutantes e seus controles	54
Tabela 2 -	Deformação cardíaca em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/-} e <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} : <i>Nestin</i> ^{cre} , seus respectivos duplos-mutantes e seus controles	55
Tabela 3 -	Pressão arterial média e parâmetros de barorreflexo em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/-} e <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} : <i>Nestin</i> ^{cre} , seus respectivos duplos-mutantes e seus controles	57
Tabela 4 -	Parâmetros bioquímicos em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/-} e <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} : <i>Nestin</i> ^{cre} , seus respectivos duplos-mutantes e seus controles; e índice cístico renal em camundongos <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} : <i>Nestin</i> ^{cre} e <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} : <i>Nestin</i> ^{cre} ; <i>Lgals3</i>	67

Resumo

Balbo BEP. *Camundongos com deficiência em Pkd1 apresentam disfunção cardíaca, fenótipo atenuado por knockout de galectina-3* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Anormalidades miocárdicas destacam-se entre as manifestações cardiovasculares da doença renal policística autossômica dominante (DRPAD). Para investigar a patogênese dessas manifestações, analisamos o fenótipo cardíaco em camundongos com diferentes perfis de deficiência de *Pkd1*. Avaliamos o modelo *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre} (CI), com cistos renais e hipertensão, na idade de 20-24 semanas, e heterozigotos para mutação nula em *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}; HT) entre 10-13 semanas, representando um modelo não cístico de haploinsuficiência gênica. Animais *Pkd1*^{cond/cond} (não cístico; NC) e *Pkd1*^{+/+} (selvagem, SV) foram usados como controles. Análises ecocardiográficas de camundongos CI e HT revelaram diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, indicando disfunção sistólica. A relação E/A e o tempo de desaceleração foram consistentes com disfunção diastólica em animais CI. Ecocardiografia por *speckle-tracking* mostrou redução na deformidade cardíaca (*strain*) nos modelos CI e HT. Os corações de ambos os grupos apresentaram índices de apoptose maiores e fibrose discreta. Neste cenário, investigamos galectina-3 (Gal-3) como modificador potencial do fenótipo cardíaco na DRPAD. Duplos-mutantes *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre};*Lgals3*^{-/-} (CIG-) e *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-} (HTG-) cursaram com melhora da função sistólica e de *strain* comparados a CIs e HTs, não diferindo de NCs e SVs. Animais HTG- apresentaram melhora parcial da função diastólica. Apoptose e fibrose cardíaca mostraram-se reduzidas em CIG-s e HTG-s, alcançando valores similares a NCs e SVs. Análises de *western blot* revelaram expressão de Gal-3 maior em corações CIs que NCs, porém o mesmo não ocorreu entre HTs e SVs. Os duplos-mutantes não apresentaram diferença na ureia sérica quando comparados a CIs e HTs, assim como nas frações de excreção de Na⁺, Cl⁻ e K⁺. Por fim, empregamos um modelo renal cístico grave, homozigoto para um alelo que impede a clivagem da policistina-1 no sítio GPS (*Pkd1*^{V/V}; VV), e mostramos que a ausência de galectina-3 aumentou a sobrevida em animais *Pkd1*^{V/V};*Lgals3*^{-/-} (VVG-). Nossos resultados demonstram disfunção e alterações de deformidade miocárdica em diferentes modelos de deficiência de *Pkd1*, à semelhança da DRPAD humana, e revelam que *knockout* de Gal-3 resgata significativamente este fenótipo.

Descritores: 1. Rim policístico autossômico dominante; 2. Miocardiopatias; 3. Galectina 3; 4. Ecocardiografia; 5. Apoptose; 6. Fibrose; 7. Ultrassonografia; 8. Biologia molecular; 9. Camundongos

Summary

Balbo BEP. *Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice and phenotype rescue by galectin-3 knockout*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Myocardial abnormalities stand out among ADPKD cardiovascular manifestations. To elucidate their pathogenesis, we analyzed the cardiac phenotype in distinct models of *Pkd1*-deficiency. We evaluated *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre} (CY) cystic, hypertensive mice at 20-24 weeks of age, and *Pkd1*^{+/-} (HT) noncystic mice at 10-13 weeks, a model of gene haploinsufficiency. *Pkd1*^{cond/cond} (noncystic; NC) and *Pkd1*^{+/+} (wild type, WT) animals were used as controls. Echocardiographic analyses in CY and HT mice revealed decreased left ventricle ejection fraction (LVEF), indicating systolic dysfunction, as well as E/A ratios and deceleration times consistent with diastolic dysfunction in CY animals. Speckle-tracking echocardiography showed reduced cardiac deformability in both models. CY and HT hearts presented higher apoptotic rates and mild fibrosis. In this scenario, we investigated galectin-3 (Gal-3) as a potential modifier of the ADPKD cardiac phenotype. Double mutants *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre};*Lgals3*^{-/-} (CYG-) and *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-} (HTG-) displayed improved systolic and deformability parameters compared to single mutants, while such values did not differ from NCs and WTs. HTG-s presented a partial improvement in diastolic function. CYG- and HTG- hearts showed decreased apoptosis and fibrosis, reaching NC and WT baselines. Western blot analyses revealed higher Gal-3 expression in CY than NC hearts but no difference between HT and WT mice. CYG- and HTG- animals showed no difference in BUN and in the fractional excretion of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ compared to CYs and HTs. We also employed a more severe renal cystic model, homozygous for an allele that hinders polycystin-1 cleavage at the GPS site (*Pkd1*^{V/V}; VV), and showed that *Pkd1*^{V/V};*Lgals3*^{-/-} mice present longer survival than VVs. Our findings demonstrate myocardial dysfunction and abnormal deformability in different *Pkd1*-deficient models, reproducing human ADPKD, and reveals that Gal-3 knockout significantly rescues this phenotype.

Descriptors: 1. Autosomal dominant polycystic kidney disease; 2. Cardiomyopathies; 3. Galectin 3; 4. Echocardiography; 5. Apoptosis; 6. Fibrosis; 7. Ultrasonography; 8. Molecular biology; 9. Mice.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da doença renal policística autossômica dominante

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é a doença renal monogênica mais comum, com prevalência populacional de 1:400 a 1:1000. Embora as manifestações renais predominem vastamente na busca por atenção médica, a DRPAD é uma enfermidade sistêmica, podendo também se acompanhar de alterações em fígado, pâncreas, cérebro, vasos sanguíneos e outros órgãos (Torres; Harris, 2009).

A DRPAD tem enorme impacto médico, social e econômico. Com penetrância de 100%, esta enfermidade responde por 4,4% dos pacientes em terapia renal substitutiva (TRS) em casuística norte-americana (*United States Renal Data System*, 2003). No Brasil, dados epidemiológicos são escassos. No sul do país, um estudo transversal em 24 centros de hemodiálise mostrou que a doença responde por 7,5% dos pacientes em TRS (Nunes et al., 2008). Em São Paulo, estudo retrospectivo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo revelou que 8,4% dos pacientes encaminhados a TRS eram portadores de DRPAD. Nessa mesma casuística, ao se considerar isoladamente cada causa de glomerulonefrite crônica, a DRPAD constituiu a terceira causa mais frequente de doença renal crônica terminal (DRCT) (Balbo et al., 2007).

1.2 Aspectos genéticos e moleculares da DRPAD

A DRPAD é geneticamente heterogênea, associando-se a mutações patogênicas em um de dois genes: *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*, localizado no cromossomo 16p13.3) e *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*, mapeado ao intervalo cromossômico 4q21). Em populações identificadas clinicamente, aproximadamente 85% dos casos da doença decorrem de mutações em *PKD1*, condição denominada

DRPAD tipo 1 (DRPAD1), enquanto em cerca de 15% dos pacientes a enfermidade deve-se a mutações no gene *PKD2*, forma denominada DRPAD tipo 2 (DRPAD2).

O gene *PKD1* apresenta 46 éxons distribuídos ao longo de um segmento genômico de ~52 kilobases (kb) e codifica uma glicoproteína integral de membrana com 4.303 aminoácidos (aa), denominada policistina-1 (PC1) (Hughes et al., 1995). PC1 apresenta uma grande porção extracelular N-terminal, com mais de 3.000 aa, 11 domínios transmembrânicos e uma porção C-terminal intracelular curta. Sua porção extracelular contém uma combinação complexa de domínios frequentemente envolvidos em interações proteína-proteína e proteína-carboidrato. Este conjunto de domínios compreende 16 cópias de uma repetição de 80 aa semelhante a regiões de imunoglobulina, o domínio PKD, uma sequência sinal, repetições ricas em leucina, domínios WSC, lectina tipo-C e LDL-A (*low-density lipoprotein receptor domain class A*), um módulo REJ (*receptor for egg jelly*) e um domínio GPS (*G protein-coupled receptor proteolytic site*). O módulo REJ parece ser particularmente importante, por desempenhar um papel aparentemente regulatório na molécula, enquanto o domínio GPS mostrou-se essencial para a clivagem da proteína, um processo associado a importantes consequências estruturais sobre o néfron distal (Yu et al., 2007). Sua porção C-terminal apresenta diversos sítios de fosforilação e um domínio helicoidal fundamental para a interação física entre as porções C-terminais da PC1 e da policistina-2 (PC2), o produto do gene *PKD2*. Esta realidade molecular é consistente com a existência de uma via comum, alterada no desenvolvimento da DRPAD (Qian et al., 1997). A diversidade de domínios encontrada na PC1, por sua vez, é compatível com a estrutura de uma molécula multifuncional, com características de receptor de membrana e molécula de adesão (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura da policistina-1 e da policistina-2, os produtos de *PKD1* e *PKD2*, e representação de seus domínios fundamentais

O gene *PKD2* apresenta 15 éxons e expressa um RNAm de 5,4 Kb, traduzido na glicoproteína de membrana de 968 aa PC2. Esta molécula contém seis domínios transmembrânicos, apresentando ambas as extremidades N- e C- terminais em localização intracitosólica. PC2 funciona como um canal de cátions não-seletivo, permeável a Ca^{2+} , cuja atividade é regulada pela PC1.

A redução da expressão de uma dessas proteínas para níveis abaixo de um limiar crítico resulta em defeitos de polaridade celular, aumento nas taxas de proliferação e apoptose, expressão de fenótipo secretório, remodelamento da matriz

extracelular e desenvolvimento cístico (Bastos et al., 2011). O complexo formado pelas proteínas envolvidas na DRPAD, PC1 e PC2, localiza-se nos cílios apicais primários, onde atua possivelmente como um sensor capaz de detectar estímulos físicos e/ou químicos. A ativação deste sensor parece transduzir sinais do meio extra para o intracelular por meio do influxo de Ca^{2+} através do canal PC2. A entrada deste cátion, por sua vez, promove a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, elevando substancialmente os níveis citosólicos do mesmo. Esta elevação do Ca^{2+} intracelular, por sua vez, modula várias atividades biológicas subcelulares, incluindo proliferação celular, apoptose, expressão gênica e diferenciação celular. Na DRPAD, portanto, as células apresentam uma homeostase defeituosa do Ca^{2+} intracelular, alteração aparentemente responsável por sua proliferação anormalmente aumentada em resposta ao monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). De fato, ao contrário de células renais epiteliais normais, em células de doença renal policística (DRP) o AMPc estimula a via MAPK/ERK (*mitogen activated protein-kinase/extracellular signal-regulated kinase*), induzindo proliferação celular (Yamaguchi et al., 2006). Vale destacar, ainda, que a redução do Ca^{2+} intracelular pode favorecer o acúmulo intracelular de AMPc, por meio da estimulação da adenil ciclase-6 e da inibição da fosfodiesterase-1 dependente de Ca^{++} /calmodulina. Mostrou-se, além disso, que o AMPc é capaz de estimular secreção transepitelial de fluido dirigida por Cl^- em epitélio DRPAD.

A diversidade de tecidos onde PC1 e PC2 se expressam é consistente com as manifestações pleiotrópicas da DRPAD. Além dos cistos renais, formações císticas também podem ser detectadas em fígado, pâncreas, vesícula seminal e aracnóide. Vale destacar que esses tecidos apresentam células em que o cílio apical primário (CAP) apresenta funções relevantes, uma organela funcionalmente comprometida na DRPAD. Nas células epiteliais tubulares ou ductais renais onde o CAP é aparentemente sensível a mudanças no fluxo de fluido, o fenótipo resultante na DRPAD é o cisto renal (Nauli et al., 2003). No músculo liso e no endotélio vascular dos portadores de DRPAD, o comprometimento da função do CAP parece resultar clinicamente no desenvolvimento precoce de hipertensão arterial e remodelamento vascular (Ecder; Schrier, 2009).

As policistinas são proteínas multifuncionais. De fato, diversos estudos sustentam a participação da PC1 também em funções extraciliares, incluindo interações célula-célula e célula-matriz. A importância das policistinas na adesão célula-célula é evidenciada pela expressão de PC1 na membrana plasmática em desmosomos, adesões focais e junções *adherens*. Em cultura de células e em tecido cístico de portadores de DRPAD, observa-se polarização anormal das proteínas de desmosomos em domínio apical, além de alterações estruturais em junções *adherens*. Tais anormalidades contribuem para o enfraquecimento da adesão celular e tornam o epitélio mais vulnerável à dissociação em resposta ao estresse de cisalhamento (Silberberg et al., 2005).

Outra função extraciliar das policistinas consiste em seu efeito de regulação do ciclo celular, ao menos parcialmente mediada pela via JAK-STAT (*janus kinase-signal transducer and activator of transcription*). STATs são fatores de transcrição citoplasmáticos que sofrem processo de translocação para o núcleo após sua ativação por fosforilação, um processo dependente de proteínas com atividade tirosina quinase. PC1 não apresenta domínio tirosina quinase e, conseqüentemente, não poderia ativar STATs diretamente. Entretanto, PC1 é capaz de interagir fisicamente com uma proteína da família JAK, JAK2, que ativa STAT1. Nesse processo de interação entre PC1 e JAK2, PC2 é cofator essencial. A via JAK-STAT, por sua vez, interfere na progressão do ciclo celular, o qual é controlado por quinases dependentes de ciclinas (Cdk, *Cyclin-dependent kinases*). Vale notar que a regulação do ciclo celular depende do equilíbrio entre as ciclinas e seus inibidores. Logo, a via JAK-STAT ativada pelo complexo PC1/PC2 promove a regulação positiva da expressão de p21, a qual determina redução da atividade de Cdk2 e conseqüente parada do ciclo celular em G₀/G₁. Esta via parece contribuir para a redução da taxa de proliferação celular determinada por PC1/PC2. Tal ação biológica, combinada à indução de resistência à apoptose em células epiteliais do rim em desenvolvimento induzida pela PC1, parece permitir que tais células evoluam para diferenciação terminal e conseqüente formação tubular (Bhunja et al., 2002).

1.3 Manifestações clínicas e história natural da DRPAD

A DRPAD manifesta-se tipicamente na idade adulta; perda de função renal, hipertensão, dor lombar, hematúria macroscópica e nefrolitíase são as principais manifestações que levam o paciente à procura de auxílio médico (Figura 2). Em virtude do padrão de herança autossômico dominante, é comum o relato de vários familiares acometidos, direcionando a abordagem diagnóstica. Pacientes assintomáticos com cistos renais incidentais detectados por exame de imagem, contudo, também constituem uma apresentação comum na prática clínica.

Na maior parte dos casos, a doença evolui com hipertensão arterial antes de perda significativa da função renal. O declínio da taxa de filtração glomerular (TFG), por sua vez, tende a ocorrer após a fase inicial da idade adulta. Vale dizer que o gene mutado constitui-se em um determinante importante da gravidade da doença renal. Na DRPAD1, a DRCT ocorre em média 20 anos mais cedo que na DRPAD2: 54 *versus* 74 anos, respectivamente (Hateboer et al., 1999). Caracteristicamente, a função renal permanece estável até fases relativamente tardias no curso da doença, quando os rins já se encontram substancialmente aumentados. Quando os pacientes atingem uma TFG de $55 \text{ mL/min/1,73m}^2$, acentua-se a taxa de queda da função renal, atingindo 5 a $6 \text{ mL/min/1,73m}^2/\text{ano}$ entre os homens e 4 a $5 \text{ mL/min/1,73m}^2/\text{ano}$ nas mulheres (Gabow et al., 1992).

Figura 2 - Doença renal policística autossômica dominante em paciente do sexo feminino de 49 anos (à esquerda). Tomografia computadorizada de abdome e pelve sem contraste, em corte coronal, mostra cistos renais bilaterais e um grande cisto hepático. À direita, evolução típica da DRPAD, mostrando que o aumento progressivo do volume do órgão antecede a perda significativa de função renal

Estudos conduzidos pelo consórcio CRISP (*Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease*) destacam-se na busca por marcadores substitutos para a evolução da taxa de declínio da função renal. Seus resultados permitiram quantificar por ressonância nuclear magnética (RNM) o volume renal, além de demonstrar que o volume cístico segue uma curva exponencial, correlacionando-se de maneira inversa com a TFG (Figura 2). Por se constituir atualmente no melhor marcador substituto de progressão da doença renal, a quantificação da variação do volume renal tem sido aplicada para avaliar a efetividade de intervenções potencialmente terapêuticas em estudos clínicos. Diversos estudos experimentais em modelos animais de DRP também têm aplicado este conceito, ao avaliar a doença e sua progressão por meio da mensuração do

volume renal. Tais medidas têm sido obtidas a partir de métodos de imagem, incluindo RNM, e avaliação direta do órgão após sacrifício do animal (Chapman et al., 2003).

Além da perda de função, outras manifestações renais típicas da DRPAD incluem defeitos de concentração urinária e excreção de amônia, anormalidades que tendem a ocorrer precocemente (Torres et al., 1994; Zitteima et al., 2012).

As manifestações extrarrenais da DRPAD podem decorrer da presença de cistos em outros órgãos e de anormalidades em tecido conectivo. O acometimento hepático por cistos constitui a manifestação extrarrenal mais comum. Cistos hepáticos surgem mais tardiamente que os renais e aumentam progressivamente com a idade, ocorrendo em mais da metade dos pacientes entre 15 e 24 anos e em cerca de 90% daqueles entre 35 e 46 anos. Embora a prevalência de fígado policístico na DRPAD não seja determinada por gênero, os quadros graves com fígado maciçamente acometido ocorrem tipicamente em mulheres, particularmente em multíparas e associados ao uso prolongado de estrógeno. Os principais sintomas associados aos cistos hepáticos decorrem dos efeitos da expansão do fígado pelos cistos, determinando sintomas como empachamento ou compressão de outras estruturas. Além disso, também apresentam complicações semelhantes aos cistos renais, como hemorragia, infecção ou ruptura. No entanto, a função hepática é tipicamente preservada na DRPAD, mesmo nos casos de acometimento hepático maciço (Luciano; Dahl, 2014). O desenvolvimento de cistos, por sua vez, também pode ocorrer em aracnóide, pâncreas, baço, trato seminal e meninge espinhal.

Entre as anormalidades de tecido conectivo, destacam-se os aneurismas vasculares, sendo o aneurisma intracraniano (AIC) o mais comum. AICs assintomáticos ocorrem em cerca de 8% dos casos de DRPAD, sendo quatro vezes mais frequentes na DRPAD que na população geral e podendo apresentar concentração de ocorrência em determinadas famílias. Apesar de apresentarem a mesma localização dos aneurismas esporádicos, originando-se mais frequentemente na circulação cerebral anterior, rompem em média 10 anos antes na DRPAD e apresentam igual distribuição entre os sexos, diferentemente do acometimento preferencial do sexo feminino observado na população geral. A elevada prevalência

de AICs na DRPAD, por sua vez, justifica seu rastreamento em determinados subgrupos, especialmente naqueles com história familiar de hemorragia subaracnódea ou AIC (Luciano; Dahl, 2014).

Diversos estudos mostram que eventos cardiovasculares constituem a causa mais comum de morte na DRPAD (Perrone et al., 2001; Ecker; Schrier, 2009). Um estudo com dados de autópsia de um serviço norte-americano, publicado em 1997, mostrou que na era pós-diálise 89% dos pacientes com DRPAD apresentavam doença arterial coronariana (Fick et al., 1995). Nesse contexto, destacam-se os efeitos da hipertensão arterial sistêmica. Diversos estudos sugerem que a distensão e a compressão vascular secundárias ao crescimento cístico resultem em áreas focais de isquemia renal, ativando o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Além disso, o comprometimento do endotélio e da musculatura lisa vascular, com prejuízo da produção de óxido nítrico e menor resposta vasodilatadora, em associação com o comprometimento do fluxo sanguíneo renal, colaboram para a ativação do SRAA, retenção de sódio e aumento da resistência vascular, alterações que culminam no desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica.

Outra manifestação frequente na DRPAD é a hipertrofia ventricular esquerda (HVE). Diversos estudos mostram maior prevalência de HVE em normotensos com DRPAD comparados a controles sem DRPAD de mesmo sexo e idade. Além disso, pacientes hipertensos com DRPAD e com função renal normal também apresentam maior prevalência de HVE quando comparados a controles hipertensos sem DRPAD: 50% *versus* 30% entre os homens e 52% *versus* 22% entre as mulheres (Chapman et al., 2010). Além dessa complicação, o envolvimento cardiovascular na DRPAD também inclui anormalidades valvares cardíacas e miocardiopatia dilatada idiopática, um achado descrito apenas recentemente (Paavola et al., 2013). Poucos estudos, entretanto, abordaram as anormalidades cardíacas potenciais em modelos animais viáveis ortólogos à DRPAD (Paavola et al., 2013; Muto et al., 2002; Kurbegovic et al., 2010; Stypmann et al., 2007; Fonseca et al., 2014). Pontos críticos associando a deficiência de *Pkd1* ou *Pkd2* e a função e estrutura cardíacas, portanto, incluindo a doença humana, permanecem a ser elucidados.

1.4 Busca por modificadores fenotípicos

No cenário exposto, um número crescente de estudos experimentais e clínicos, concluídos e em andamento, dirigem-se à investigação de agentes e intervenções com potencial de interferência sobre a progressão da doença renal, o principal fator associado à morbidade, e sobre as manifestações cardiovasculares, fortemente associadas à mortalidade nessa população. Nesse cenário intrincado de interação entre o rim e os demais sistemas na DRPAD, em particular o cardiocirculatório, cresce a importância da identificação de *loci* ou agentes modificadores dos fenótipos associados à doença.

Até o momento, a busca por *loci* modificadores candidatos na DRPAD, selecionados por possível relevância na patogênese da doença ou mesmo por associação com prognóstico em outras doenças renais, obteve pouco êxito. Não se demonstrou, por exemplo, que o polimorfismo I/D na enzima de conversão da angiotensina I (ECA) associa-se com DRCT de início mais precoce na DRPAD. Estudos com outros componentes do SRAA também foram negativos. O polimorfismo *Glu298Asp* na isoforma endotelial da óxido nítrico sintase tem sido associado à DRCT mais precoce na DRPAD; este achado, todavia, não foi reproduzido em outros estudos. Por sua vez, um polimorfismo funcional de comprimento (FLP, *functional length polymorphism*) na região promotora de *HMOX1*, gene que codifica a heme oxigenase-1, não interferiu na progressão da doença renal da DRPAD, embora esse mesmo polimorfismo tenha papel protetor em diversos modelos de lesão renal. A progressão da DRPAD também não parece ser afetada por polimorfismos funcionais nos genes que codificam os receptores B1 e B2 da bradicinina, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), tal como a região regulatória do gene que codifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) (Torres; Harris, 2009).

Com base nessas considerações, alelos específicos, *knockout* (KO) ou superexpressão de determinados genes poderiam alterar a expressão da doença em diferentes órgãos. A identificação de tais modificadores, por sua vez, poderia

impactar o entendimento da DRPAD, estabelecer marcadores de progressão da doença e ampliar as possibilidades terapêuticas. Nos últimos anos, galectina-3 (Gal-3) foi caracterizada como um regulador chave de fibrose em coração, fígado e rim (Yu et al., 2013; Henderson et al., 2006; Henderson et al., 2008). Além disso, níveis circulantes elevados dessa proteína têm sido associados à evolução de doenças cardíacas e renais crônicas (van Kimmenade et al., 2006; O'Seaghdha et al., 2013). Nesse cenário, entendemos que Gal-3 pudesse se constituir em um modificador dos fenótipos associados à DRPAD, particularmente do fenótipo cardiovascular.

1.5 Galectinas

As galectinas são proteínas de baixo peso molecular que pertencem à família das lectinas. Caracteristicamente se ligam a β -galactosídeos, não possuem atividade enzimática intrínseca, não dependem de Ca^{2+} para sua atividade e são secretadas por uma via “não clássica”, ou seja, independente do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Em termos evolucionários, são proteínas altamente conservadas, presentes em todos os metazoários (Krzeslak; Lipinska, 2004).

Diferentes tipos de galectinas compartilham homologia estrutural primária em um domínio comum, denominado CRD (*carbohydrate-recognition domain*). O número e a organização dos CRDs permitiu a classificação das galectinas em três grupos: (1) prototípicas, com um único CRD, o qual pode se associar e formar homodímeros (Gal-1, -2, -7, -10, -13, -14); (2) com repetições em *tandem*, que apresentam dois CRDs ligados por um domínio polipeptídico, formando heterodímeros (Gal-4, -8, -9, -12); e (3) tipo químera, na qual a galectina-3 é a única representante (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática dos membros da família das galectinas e dos tipos de estrutura formados entre galectinas e glicanos

1.6 - Estrutura e funções da galectina-3

De todas as galectinas identificadas até o momento, uma das mais estudadas é a galectina-3. Esta proteína monomérica apresenta peso molecular de 30 a 35 kDa e é composta por 3 domínios estruturais distintos: uma estrutura globular, localizada na extremidade C-terminal onde se posiciona o CRD; uma sequência similar a colágeno rica em glicina, tirosina e prolina, a qual serve de substrato para metaloproteinases; e uma curta extremidade N-terminal (Barondes et al., 1994).

A estrutura do gene humano que codifica a galectina-3, *LGALS3* (*Lectin, galactosin binding, soluble 3*), é consistente com a organização referida em múltiplos domínios. *LGALS3* mapeia em 14q21-22 e apresenta 6 éxons e 5 íntrons. De modo geral, a estrutura do gene humano é bastante similar à do murino. O promotor humano, tal como o murino, não apresenta sequências TATA a montante do início da transcrição. Por outro lado, esta região é rica em ilhas CpG e tem sua expressão regulada por metilação (Gallager et al., 2005).

Gal-3 pode ser encontrada no meio intra ou extracelular. Quando em solução, apresenta-se frequentemente em monômeros; por outro lado, ao se ligar a superfícies contendo glicoconjugados multivalentes, comumente se apresenta em polímeros, os quais se organizam a partir de uma estrutura pentamérica (Figura 3). O compartimento intracelular concentra a maior parte da Gal-3 sintetizada. Sua translocação para o núcleo ou secreção não convencional para o meio extracelular, por sua vez, interferem diretamente em diversos processos biológicos fundamentais (Davidson et al., 2002). Vale dizer que uma grande diversidade de células expressam Gal-3, incluindo células inflamatórias (monócitos, macrófagos, neutrófilos e mastócitos), fibroblastos, células dendríticas, neurônios e células epiteliais do intestino, rim, pele, mama e glândulas salivares (Perilo et al., 1998; Rabinovich et al., 2002; Le Marer, 2000).

Seguindo o padrão da maior parte das galectinas, Gal-3 atua como receptor para ligantes associados a sequências poli-N-acetil-lactosamina. A ligação a carboidratos, porém, não é única. Além dos sítios de ligação para lactose e para N-acetil-glicosamina, também apresenta subsítios para ligação a compostos aglicônicos,

como lipídios e peptídeos. Com base na ligação de Gal-3 a peptídeos, outros ligantes passaram a ser descritos, incluindo proteínas de matriz extracelular (laminina e fibronectina), proteínas de membrana (integrinas), proteínas intracelulares (citoqueratinas) e produtos avançados de glicosilação (Krzeslak; Lipinska, 2004, Hirabayashi et al., 2002).

A fosforilação é a única modificação pós-traducional identificada em Gal-3, tendo impacto significativo sobre o grau de afinidade aos ligantes (Mazurek et al., 2000). A fosforilação do resíduo Ser-6 reduz substancialmente a afinidade de Gal-3 por seus ligantes, ao passo que a desfosforilação restaura sua capacidade de ligação a carboidratos. O estado de fosforilação de Gal-3 determina, portanto, o estado “on/off” da molécula em relação à afinidade de ligação a carboidratos, modulando diretamente as interações proteína-carboidrato.

Gal-3 constitui-se numa proteína multifuncional, com ações pleiotrópicas e participação em diversos processos biológicos, como apoptose, proliferação celular, migração e adesão celular. No meio extracelular, Gal-3 modula interações célula-célula e célula-matriz, apresentando efeitos tanto adesivos quanto anti-adesivos. No processo de inflamação, promove adesão de neutrófilos humanos à laminina, enquanto sua interação com a integrina $\alpha 1 \beta 1$ inibe a adesão de diversos tipos de células tumorais a vários substratos da matriz extracelular, tais como colágeno IV, fibronectina e laminina (Ochieng et al., 1998). Essa dualidade de função também se aplica aos processos de proliferação celular. De fato, Gal-3 pode atuar tanto de maneira estimulatória como inibitória (Krzalak et al., 2004). Diversos estudos mostraram que Gal-3 atua como um regulador positivo de proliferação celular no âmbito oncológico, incluindo linfoma de células T, melanoma, carcinoma mamário e carcinoma de tireóide (Yang et al., 1996; Honjo et al., 2001; Yoshi et al., 2001). Por outro lado, células de câncer de próstata transfectadas com *LGALS3* apresentaram redução da velocidade de crescimento *in vivo* e *in vitro* (Ellerhorst et al., 2002). Os mecanismos de interferência da Gal-3 nos processos de proliferação celular, contudo, são ainda pouco conhecidos. Evidências recentes, no entanto, sugerem que Gal-3 possa regular a expressão de proteínas do ciclo celular, como as ciclinas A e E e inibidores de quinases dependentes de ciclina (p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1}); mediar a ativação de vias de sinalização, como a via Wnt (*wingless-int*); e aumentar a

expressão de fatores de transcrição como TTF-1 (*thyroid transcription factor-1*) (Yoshii et al., 2002; Paron et al., Shimura et al., 2005).

O papel de Gal-3 na apoptose é complexo. Diversos fatores modulam sua ação nesse processo, incluindo o compartimento celular em que atua, seu estado de fosforilação, os ligantes com que interage e o estado de diferenciação das células e dos tecidos. Vários estudos mostram que no meio intracelular Gal-3 exerce um papel antiapoptótico, por meio de processos que independem de sua ligação com carboidratos. Em contraste, no meio extracelular ela se liga a oligossacarídeos de superfície celular, induz apoptose e modula interação célula/matriz. A substituição de seu sítio de fosforilação Ser-6 por um resíduo não fosforilável como a alanina, por sua vez, inibe sua translocação para o núcleo, determinando a perda de sua atividade antiapoptótica (Takenaka et al., 2004).

A relação de Gal-3 com proteínas relacionadas à apoptose tem elucidado alguns dos mecanismos moleculares associados a esse processo. Entre tais proteínas, destacam-se as pertencentes à família Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*), constituída por diversos membros pró- e antiapoptóticos. Tais proteínas atuam na regulação do equilíbrio entre células recém-formadas e senescentes. Nesse contexto, destacam-se algumas propriedades estruturais compartilhadas entre a Gal-3 e Bcl-2 (Nakahara et al., 2005). Ambas são fosfoproteínas com atividade regulada por seu estado de fosforilação. Quando fosforilada, Bcl-2 conserva seu papel antiapoptótico, ao passo que seu estado desfosforilado favorece sua degradação por ubiquitinação (Ito et al., 1997). Além disso, ambas as proteínas contêm o domínio “*anti-death motif*” na extremidade C-terminal, contendo a sequência Asp-Trp-Gli-Arg (NWGR) e crítico para sua função antiapoptótica (Yu et al., 2002). Por fim, Gal-3 mimetiza a capacidade de formar heterodímeros, fato também observado entre membros da família Bcl-2 (Yu et al., 2002).

Outra importante função de Gal-3 é regular a resposta imune. Gal-3 é capaz de ativar linfócitos T; inibir a produção de IL-5 (interleucina-5) em várias células, incluindo eosinófilos; e ativar mastócitos, neutrófilos e monócitos. Na imunidade inata, atua no reconhecimento de antígenos ao se ligar a carboidratos derivados de patógenos, estimulando a captação destes por macrófagos. Ao contrário, animais KO

para Gal-3 apresentam diminuição da função dos mastócitos, menor acumulação de leucócitos em estados de inflamação de vias aéreas, menor resposta inflamatória peritoneal e maior dificuldade em abortar infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Yang et al., 2008). Destaca-se, ainda, o papel modulatório de Gal-3 sobre processos associados ao desenvolvimento e à progressão de câncer, como aumento potencial da proliferação celular, evasão da apoptose, invasão tecidual e angiogênese.

Além das propriedades estruturais compartilhadas por Bcl-2 e Gal-3, há evidências do envolvimento de ambas as proteínas no processo de cistogênese/crescimento cístico renal. Camundongos *Bcl2*^{-/-} apresentam, além de apoptose linfóide significativa, retardo no crescimento, rins maçicamente císticos e morte pós-natal precoce (Veis et al., 1993). *Knockout* e *knockdown* da proteína pró-apotótica Bim (*Bcl-2-like protein 11*), por sua vez, são capazes de prevenir o desenvolvimento de cistos, sugerindo que o estímulo pró-apoptótico descontrolado favoreça a cistogênese neste modelo animal de doença renal policística. Apresento, a seguir, os achados atualmente disponíveis sobre a relação galectina-3/desenvolvimento e função renal e a relação galectina-3/formação e crescimento cístico renal.

1.7 Efeitos da galectina-3 sobre o desenvolvimento, estrutura e função renal

O mesonéfron humano se desenvolve na quinta semana pós-fertilização e regride após o primeiro trimestre. Este órgão segmentar contém glomérulos vascularizados que drenam a néfrons, os quais apresentam estruturas compatíveis com túbulos proximal e distal conectados ao duto mesonéfrico (Winyard et al., 1997). Em rins humanos normais em fase embrionária, Gal-3 é detectada no duto mesonéfrico e nos túbulos mesonéfricos distais. No metanefro, precursor do rim adulto, Gal-3 é detectada nas extremidades das ramificações dos brotos ureterais, em linhagens de dutos coletores subcorticais e em grande intensidade nos dutos coletores papilares e medulares. Após o período embrionário, a expressão renal de galectina-3 diminui, restringindo-se a células dos túbulos e dutos coletores. Esta particularidade ocorre especialmente em células intercaladas do tipo α , nas quais atua no processo

de diferenciação terminal (Hikita et al., 2000). Em rins multicísticos displásicos e na doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR), por sua vez, Gal-3 apresentou ampla expressão no epitélio cístico (Winyard et al., 1997). Esses achados levaram à investigação dos efeitos da Gal-3 sobre modelos de cistogênese *in vitro* e *in vivo* (Chiu et al., 2006).

Estudos conduzidos em camundongos homozigotos para mutação nula em *Lgals3*, o ortólogo em camundongo a *LGALS3*, trouxeram informações iniciais sobre o papel de Gal-3 na estrutura e na função renal (Hsu et al., 2000). Camundongos selvagens apresentaram expressão de Gal-3 em duto coletor, embora variável, e em menor intensidade no ramo ascendente espesso da alça de Henle. Surpreendentemente, contudo, camundongos *Lgals3*^{-/-} apresentam aspecto saudável, sem alterações fenotípicas aparentes de grande impacto. Interessantemente, em condições basais tais animais apresentaram pressão arterial normal e ausência de alterações hidroeletrolíticas ou do equilíbrio ácido-básico. Análises estruturais, no entanto, revelaram diminuição de cerca de 11% no número de glomérulos e aumento do peso renal em 17%, achados consistentes com hipertrofia renal. Estudos funcionais não detectaram alteração na TFG; entretanto, esses animais apresentaram maior fração de excreção de Cl⁻ e, sob regime de baixa ingestão de sal, sinais de contração do volume extracelular. Por outro lado, sob elevada ingestão de sal esses camundongos cursaram com menor pressão arterial que seus controles selvagens. Dada a perda significativa de Cl⁻ nesses animais, alguns autores sugeriram que os mesmos se comportavam de maneira semelhante a pacientes com síndrome de Bartter; de fato, além da perda aumentada de Cl⁻ e Na⁺, apresentavam hipocalcemia e alcalose metabólica. Até o momento, contudo, o mecanismo pelo qual Gal-3 regula a homeostase do Cl⁻ não está definido (Bichara et al., 2006).

1.8 Galectina-3 e cistogênese *in vitro*

Células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) são capazes de gerar cistos em matrizes tridimensionais quando cultivadas em gel de colágeno tipo I. Gal-3 expressou-se de maneira uniforme em tais células isoladas, tanto na superfície celular

como no citosol (Bao; Hughes, 1995). Com a proliferação das células na matriz, houve diminuição da expressão de Gal-3 no citoplasma e aumento de sua expressão subjacente à membrana citoplasmática. Quando as células se agregaram para a formação de estruturas císticas, observou-se forte polarização, com predomínio de sua expressão nas porções basolaterais e pouca expressão citosólica. Com o crescimento da estrutura, a expressão basolateral de Gal-3 diminuiu, enquanto a apical aumentou. Além disso, o aumento do número de camadas celulares através da cultura de células MDCK em Matrigel seguiu-se de redistribuição de Gal-3, caracterizada pela manutenção do padrão de expressão basolateral nas células adjacentes ao lúmen e expressão citoplasmática uniforme nas células da periferia (Bao; Hughes, 1995).

Em células MDCK, a tubulogênese pode ser induzida por tratamento com fator de crescimento de hepatócito (FCH). A indução deste processo resulta em brotamentos, a partir dos quais ocorre alongamento, ramificação e fusão, formando a estrutura tubular propriamente dita. Nesse processo, a expressão de Gal-3 apresenta dois padrões: enquanto no corpo da estrutura tubular sua distribuição é basolateral, nas áreas de extensão e crescimento do túbulo sua expressão é ausente (Bao; Hughes, 1995). Nesse experimento, a adição de Gal-3 recombinante inibiu o crescimento cístico, ao passo que tal efeito foi revertido com o uso de anticorpo contra o domínio CRD dessa proteína.

O sistema de cultura de células MDCK em gel mimetiza morfológicamente estágios precoces do desenvolvimento renal, partindo da transição de agregados de células não polarizadas para condensados com contatos intercelulares extensos. Tais agregados se transformam em epitélio polarizado ao redor de um lúmen central, que se alonga com o estímulo decorrente da adição de FCH. Nesta fase, Gal-3 predomina na porção basolateral da célula. No período pós-natal em hamster, contudo, Gal-3 se expressa na superfície apical. Admite-se, portanto, que o perfil de localização subcelular de Gal-3 se associe a diferentes funções em diferentes fases do desenvolvimento orgânico.

1.9 Galectina-3 e cistogênese *in vivo*

Gal-3 é amplamente expressa no epitélio cístico de rins de portadores de DRPAR (Winyard et al., 1997). Esta observação sugeriu que Gal-3 tivesse influência sobre a cistogênese renal, achado posteriormente confirmado no camundongo *cpk* (*congenital polycystic kidney*), um modelo animal cístico recessivo não ortólogo à DRPAR humana (Chiu et al., 2006). O fenótipo renal do camundongo *cpk* compreende dilatações císticas dos dutos coletores na primeira semana pós-natal, progredindo para expansão cística maciça e destruição de tecidos subjacentes a partir de então. Esse fenótipo gravíssimo resulta em morte do animal entre a terceira e a quarta semanas pós-natais (Hou et al., 2002).

Em camundongos selvagens com *background* genético C57BL/6, Gal-3 se expressa no broto ureteral, nos dutos coletores e no urotélio da pelve renal, entre a primeira e a quarta semanas de vida (Hikita et al., 2000). No modelo *cpk*, detectou-se ampla marcação de Gal-3 em túbulos coletores levemente dilatados e no epitélio dos cistos maiores. Para responder se a ausência da galectina-3 alteraria o fenótipo cístico *in vivo* do modelo *cpk*, foram gerados animais duplos-mutantes, ou seja, animais císticos *cpk* sem expressão de Gal-3 (Chiu et al., 2006). Ao final das análises, os resultados revelaram que o fenótipo cístico renal era mais grave nos animais duplos-mutantes, corroborando a hipótese de que a Gal-3 modulava o fenótipo cístico do camundongo *cpk*, atenuando-o.

1.10 Galectina-3 e doenças crônicas

Estudos iniciais revelaram expressão de Gal-3 no coração de linhagens murinas, com sinal positivo em matriz extracelular, fibroblastos e macrófagos, porém negativo em cardiomiócitos (Kim et al., 2007; de Boer et al., 2009). Um achado recente e inesperado, contudo, trouxe informações importantes para a compreensão da ação de Gal-3 nesse órgão (Schroen et al., 2004). Este estudo investigou o perfil de expressão de *Lgals3* em tecido miocárdico de ratos Ren-2, animais transgênicos

que desenvolvem insuficiência cardíaca. Os resultados mostraram que o gene *Lgals3* foi o mais intensamente expresso em animais Ren-2 jovens comparados a controles selvagens, antes mesmo de desenvolverem manifestações da doença. Em seguida, demonstrou-se que a administração exógena de Gal-3 recombinante resultava em proliferação de fibroblastos cardíacos. Para excluir potenciais efeitos sistêmicos de Gal-3 recombinante, mostrou-se que a infusão de Gal-3 no saco pericárdico de animais selvagens resultava em disfunção miocárdica, com aumento da expressão de colágeno tipo I (Sharma et al., 2004). Por fim, a administração exógena de Gal-3 também resultou em aumento da expressão de ciclina D1, um importante regulador do ciclo celular. Nesse mesmo estudo, confirmou-se que a expressão de Gal-3 se encontra aumentada em pacientes com hipertrofia miocárdica, mesmo entre aqueles sem comprometimento da função sistólica.

A partir dessas observações, demonstrou-se que a elevada expressão de Gal-3 no miocárdio ocorria em vários outros modelos murinos de insuficiência cardíaca, incluindo a cardiomiopatia e a miocardite crônica ativa induzida por interferon gama; a cardiomiopatia diabética induzida por estreptozotocina; e o modelo de remodelamento ventricular esquerdo induzido por infusão de angiotensina II (Reifenberg et al., 2007; Thandavarayan et al., 2008; Sharma et al., 2008). Nessa mesma linha, mostrou-se ainda que a coinfusão do tetrapeptídeo Ac-SDKP (N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina), um inibidor natural de fibrose e inflamação, não apenas inibiu a expressão de Gal-3 mediada por infusão de angiotensina II como também atenuou a disfunção miocárdica em ratos Sprague-Dawley (Liu et al., 2009). O papel da galectina-3 no desenvolvimento de fibrose, todavia, não se limita ao coração. Na cirrose hepática humana, Gal-3 apresentou expressão significativamente aumentada; além disso, em modelo de fibrose hepática murina, correlacionou-se temporalmente com a indução e a resolução do processo. Tais observações são apoiadas pela atenuação da fibrose hepática observada em modelos de esteato-hepatite não alcoólica induzidos por dieta em animais *knockout* para galectina-3. Nesses animais, constatou-se bloqueio da ativação de miofibroblastos e uma menor expressão de pró-colágeno tipo I (Henderson et al., 2008). A relação Gal-3/fibrose, por fim, voltou a se confirmar em pulmão, onde um efeito modulador foi observado na fibrose pulmonar idiopática (Mackinnon et al., 2012).

Aumento da expressão de Gal-3 também foi observado em modelo de fibrose renal por obstrução ureteral unilateral em camundongo; na mesma linha conceitual, animais KO para Gal-3 submetidos a obstrução ureteral apresentaram atenuação da fibrose (Okamura et al., 2011). Por meio de técnicas de depleção de macrófagos e de experimentos *in vitro* usando sobrenadantes de macrófagos e fibroblastos em cultura, demonstrou-se também que a expressão e secreção de Gal-3 por macrófagos é crítica na ativação de fibroblastos (Henderson et al., 2008).

Recentemente, em um grande estudo prospectivo conduzido na população de Framingham, demonstrou-se que níveis elevados de Gal-3 associaram-se a um maior risco de doença renal crônica incidente na população geral, e com um declínio mais rápido de função renal em indivíduos com nefropatia já instalada. Em conjunto, esses resultados sugerem que níveis aumentados de Gal-3 possam identificar sujeitos sob risco de desenvolver doença renal crônica, mesmo anos antes de seu início clínico. Tais observações apoiam o processo de fibrose como evento precoce na patogênese da doença renal crônica (O'Seaghdha et al., 2013).

Uma série de estudos clínicos têm demonstrado a associação entre níveis séricos de Gal-3 e mortalidade por evento cardiovascular (van Kimmenade et al., 2006; Lock et al. 2007). Os biomarcadores mais comumente usados na insuficiência cardíaca, como peptídeo natriurético tipo B (BNP) e a porção N-terminal deste peptídeo (NT-proBNP), correlacionam-se com a gravidade da sobrecarga miocárdica mas apresentam variabilidade e não se correlacionam com o processo patológico subjacente. Nesse contexto, o nível sérico de Gal-3 parece acrescentar informação prognóstica em comparação a BNP e NT-proBNP, ao predizer mortalidade e não sofrer alterações em pacientes que apresentam artificialmente melhora da função miocárdica, incluídos nesses casos aqueles com suporte circulatório mecânico (Milting et al., 2008).

1.11 Hipóteses

A partir das evidências referidas, trabalhamos com a hipótese de que animais deficientes em *Pkd1* pudessem apresentar manifestações cardíacas semelhantes às observadas na DRPAD humana. Vale destacar que PC1 e PC2 são essenciais para o desenvolvimento do coração (Geng et al., 1997; Markowitz et al., 2009). Camundongos homozigotos KO para *Pkd1* e *Pkd2* apresentam, de fato, letalidade embrionária devido a defeitos cardíacos graves (Boulter et al., 2001; Wu et al., 2000; Muto et al., 2002). Poucos estudos, entretanto, avaliaram este fenótipo em modelos animais ortólogos à DRPAD e viáveis (Paavola et al., 2013; Muto et al., 2002; Kurbegovic et al., 2010; Stypmann et al., 2007). Com o objetivo de estudar aspectos fundamentais da patogênese de tais alterações, utilizamos modelos de camundongo com perfis distintos de deficiência do gene *Pkd1*. O primeiro modelo, heterozigoto para um alelo nulo de *Pkd1*, não apresenta cistos e não é hipertenso até a idade de 15 semanas, representando o estado de haploinsuficiência pura (*Pkd1*^{+/-}) que caracteriza o *background* genético da doença humana. O segundo modelo consiste em um camundongo exposto a *knockout* condicional (*Pkd1*^{cond/cond}:Nestin^{cre}), com mutações inativadoras somáticas em ambos os alelos *Pkd1*, distribuídas em mosaico. Este modelo reproduz o fenótipo cístico renal da doença humana, porém não apresenta o *background* celular haploinsuficiente. Nesse contexto, os dois modelos se complementam, permitindo a separação dos componentes genéticos e moleculares da doença e a consequente otimização do estudo de seus mecanismos patogénéticos.

Dada a elevada prevalência de manifestações cardiovasculares na DRPAD humana, e considerando a emergência da galectina-3 como fator associado à progressão de cardiopatias e nefropatias, também formulamos a hipótese desta lectina atuar como modificador dos fenótipos cardíaco e renal da DRPAD. Nesse cenário, nossa estratégia se pautou na geração de duplos-mutantes, ou seja, animais deficientes em *Pkd1* e *knockouts* para Gal-3, constituindo assim os modelos *Pkd1*^{+/-}:*Lgals3*^{-/-} e *Pkd1*^{cond/cond}:Nestin^{cre}:*Lgals3*^{-/-}.

Por fim, para complementar a investigação dos efeitos potenciais da Gal-3 sobre os fenótipos associados à DRPAD, investigamos seu impacto sobre uma

terceira linhagem de animais geneticamente modificados deficientes em *Pkd1*. Este modelo, homozigoto para um alelo *Pkd1 knockin* resistente à clivagem de PC1 no sítio GPS (*Pkd1^{V/V}*), caracteriza-se por um fenótipo renal cístico muito grave e associa-se a mortalidade precoce, tipicamente na terceira semana de vida. Com base na geração de duplos-mutantes *Pkd1^{V/V}:Lgals3^{-/-}* e na natureza deste modelo, pudemos ampliar nossa análise, avaliando o efeito da supressão da expressão de Gal-3 sobre a sobrevivência destes animais, assim como sobre outras manifestações precoces.

2 OBJETIVOS

Os objetivos fundamentais deste projeto foram: 1) analisar o fenótipo cardíaco em modelos animais distintos de deficiência de *Pkd1*; e 2) investigar o papel potencial da galectina-3 como modificador dos fenótipos cardíaco, renal e sistêmico da doença renal policística autossômica dominante.

Para tanto, analisamos tais fenótipos em três modelos de camundongo deficientes em *Pkd1*: *Pkd1*^{+/-}, *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} e *Pkd1*^{V/V}; e avaliamos a interação genética potencial entre os loci *Pkd1* e *Lgals3* por meio da geração dos camundongos duplos-mutantes *Pkd1*^{+/-}.*Lgals3*^{-/-}, *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}.*Lgals3*^{-/-} e *Pkd1*^{V/V}.*Lgals3*^{-/-}. Para atingir tais metas, nossos objetivos específicos compreenderam:

1. Gerar animais duplos-mutantes através de cruzamentos sistematizados entre as linhagens deficientes em *Pkd1* e *Lgals3*^{-/-}, utilizando o *background* C57BL6/J. Tal abordagem proporcionou a geração de camundongos *Pkd1*^{+/-}.*Lgals3*^{-/-}, *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}.*Lgals3*^{-/-} e *Pkd1*^{V/V}.*Lgals3*^{-/-}.
2. Analisar parâmetros estruturais e funcionais cardíacos através de ecocardiografia transtorácica em camundongos *Pkd1*^{+/-} com 12-13 semanas de idade, comparando-os aos controles *Pkd1*^{+/+} e a animais *Pkd1*^{+/-}.*Lgals3*^{-/-}, assim como em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} com 22-23 semanas de idade, comparando-os a seus controles *Pkd1*^{cond/cond} e a animais *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}.*Lgals3*^{-/-}.
3. Analisar a pressão arterial e as respostas de barorreflexo a ela associados em camundongos *Pkd1*^{+/-} com 13 semanas de idade, comparando-os aos controles *Pkd1*^{+/+} e a animais *Pkd1*^{+/-}.*Lgals3*^{-/-}, assim como em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} com 24 semanas de idade, comparando-os a seus controles *Pkd1*^{cond/cond} e a animais *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}.*Lgals3*^{-/-}.

4. Analisar o envolvimento cístico renal em camundongos $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$ com 22-23 semanas de idade, por meio de análise ultrassonográfica e cálculo do índice cístico renal, comparando-os ao controles $Pkd1^{cond/cond}$ e a animais $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}$.
5. Analisar a TFG e o processamento tubular de Na^{+} , K^{+} e Cl^{-} através da determinação das concentrações séricas de uréia e creatinina e das frações de excreção destes eletrólitos em camundongos $Pkd1^{+/-}$, $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-};Lgals3^{-/-}$ com 10-11 semanas de idade, assim como em camundongos $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, $Pkd1^{cond/cond}$ e $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}$ com 20-21 semanas de idade.
6. Caracterizar a expressão cardíaca e renal de galectina-3 por meio de imunoistoquímica e compará-las entre camundongos $Pkd1^{+/-}$, $Pkd1^{+/-};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{+/+}$ na idade de 13 semanas, entre animais $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{cond/cond}$ com 23 semanas, e entre camundongos $Pkd1^{V/V}$, $Pkd1^{V/V};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{+/+}$ com 18 dias de vida.
7. Caracterizar a expressão cardíaca de galectina-3 e TFG- $\beta 1$ por meio de *western blot* e compará-las entre camundongos $Pkd1^{+/-}$, $Pkd1^{+/-};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{+/+}$ na idade de 13 semanas e entre animais $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{cond/cond}$ com 23 semanas.
8. Analisar os fenótipos histológicos renal e cardíaco e compará-los entre camundongos $Pkd1^{+/-}$, $Pkd1^{+/-};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{+/+}$ na idade de 13 semanas, entre animais $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{cond/cond}$ com 23 semanas, e entre camundongos $Pkd1^{V/V}$, $Pkd1^{V/V};Lgals3^{-/-}$ e $Pkd1^{+/+}$ com 18 dias; quantificar e comparar fibrose com base na coloração de picrosírius; quantificar e comparar proliferação celular com base na marcação para Ki-67; e quantificar e comparar apoptose com base na marcação para TUNEL (*terminal deoxynucleotidil transferase uracil nick end labeling*).
9. Analisar o perfil de sobrevivência para camundongos $Pkd1^{V/V}$, comparando-o ao dos duplos-mutantes $Pkd1^{V/V};Lgals3^{-/-}$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos animais

O alelo *Pkd1* com mutação nula utilizado em nosso projeto foi gerado por Piontek et al. (2004). Este alelo se baseou numa construção que apresentava parte do éxon 2 e todo o éxon 3 substituídos por um gene repórter (*lacZ*) acoplado em fase com o restante do éxon 2 e seguido por um marcador positivo, o gene de resistência à neomicina (*neor*). O segmento *lacZ-neor* inclui sequências de término de transcrição que impedem a expressão completa do gene, determinando inativação de *Pkd1*. A ausência de cistos renais na heterozigotose para mutação nula em *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}) em camundongos de 15 semanas caracteriza, neste modelo, um estado de haploinsuficiência pura.

A geração de animais haploinsuficientes para *Pkd1* baseou-se no cruzamento de uma fêmea *Pkd1*^{+/+} com um macho *Pkd1*^{+/-}, utilizando o *background* C57BL/6. O primeiro passo no processo de genotipagem consistiu na extração de DNA (*deoxyribonucleic acid*) a partir de amostras de cauda ou orelha. A utilização de um *primer* comum a ambos os alelos (KF1, 5'-AATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3') e de segundos *primers* reversos específicos para os alelos selvagem e *knockout* permitiu sua realização através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). Enquanto o *primer* reverso específico ao alelo selvagem posicionou-se na região do DNA substituído pela construção recombinante (KR1, 5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'), o *primer* específico ao alelo *knockout* localizou-se no segmento inserido (M3-2B, 5'-TACTCACACCTCCACCAGTGC-3'). Esta técnica permitiu a identificação de dois produtos de PCR de tamanhos distintos, cada um relacionado a um dos alelos. Uma banda de 180 pares de base (pb) corresponde ao alelo selvagem, ao passo que uma banda de 220 pb corresponde ao alelo mutante. Dessa forma, os animais com banda única de 180 pb foram diagnosticados como selvagens, enquanto os animais com as duas bandas (180 e 220 pb) foram classificados como heterozigotos. Os produtos das reações de PCR foram

submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2 %, corados com brometo de etídeo a 1 µg/mL e fotografados para documentação (Figura 4).

O segundo modelo animal utilizado apresenta alelos nulos condicionais de *Pkd1*. Um alelo *floxed* de *Pkd1* (*Pkd1*^{cond}) foi criado por nossos colaboradores Klaus Piontek et al. (2004), na Johns Hopkins University School of Medicine. Este alelo contém sítios *lox P* inseridos nos íntrons 1 e 4. Os sítios *lox P* podem ser induzidos a recombinar via Cre recombinase, de forma a produzir um novo alelo, *Pkd1*^{del2-4}, um alelo inativo. Em camundongos *TgN(balancer2)3Cgn*, a expressão de Cre recombinase é controlada pelo *promoter* do gene de rato nestina (*Nestin*) e por sequências *enhancer* localizadas no segundo íntron. Cre recombinase resulta em inativação em mosaico do alelo *floxed*. A linhagem *Pkd1*^{cond} foi cruzada com a linhagem *nestin-Cre*, de forma a produzir animais com fenótipos císticos renal e hepático que mimetizam a doença humana. A identificação dos alelos *Pkd1*^{cond} e do transgene Cre recombinase foi realizada através de reações específicas de PCR. Diferentemente do camundongo haploinsuficiente, este modelo cístico (*Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre}) não reproduz genotipicamente o *background* celular da doença humana, uma vez que na ausência da expressão de Cre recombinase os alelos condicionais comportam-se como alelos selvagens.

A geração de camundongos císticos amparou-se no cruzamento entre uma fêmea *Pkd1*^{cond/cond} com um macho *Pkd1*^{cond/+};*Nestin*^{cre} ou *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre}. O processo de genotipagem neste segundo modelo animal incluiu dois passos. No primeiro verificou-se se o alelo *Pkd1*^{cond} encontra-se em homozigose ou heterozigose, enquanto no segundo identificou-se a presença ou ausência de Cre recombinase no estado hemizigoto. A primeira reação envolveu a utilização dos seguintes primers: F4 (5'-CCTGCCTTGCTCTACTTTCC-3') e R5 (5'-AGGGCTTTTCTTGCTGGTCT-3'). A segunda reação, por sua vez, utilizou-se de dois primers específicos para a Cre recombinase: um *primer forward* (5'-ATTGCTGTCACTTGGT-CGTGGC-3') e um *primer reverse* (5'-GGAAAATGCTTCTGT-CCGTTTGC-3'). Na primeira reação de PCR o alelo *Pkd1*^{cond} foi identificado por um produto de 250 pb, enquanto o alelo selvagem associou-se a um produto de 180 pb. Dessa forma, a presença de uma única banda de 250 pb identificou um animal de genótipo *Pkd1*^{cond/cond}, a presença de uma única

banda de 180 pb definiu um animal $Pkd1^{+/+}$ e a presença de ambas as bandas, de 180 e 250 pb, estabeleceu o genótipo do animal $Pkd1^{cond/+}$. Na segunda reação, a identificação de um produto de 200 pb indica a presença do gene Cre recombinase, enquanto a ausência dessa banda indica que o animal não contém esse transgene (Figura 4).

O terceiro modelo animal utilizado, desenvolvido na Johns Hopkins University School of Medicine (Yu et al., 2007), constitui-se em camundongos homozigotos para um alelo *knockin* de $Pkd1$, que impede a clivagem da PC1 no sítio GPS. Este alelo *knockin* foi criado pela introdução da mutação T3041V, que modifica este sítio de clivagem susceptível à *cis*-autoproteólise sem afetar a estrutura e a função da proteína. A ausência deste sítio de clivagem susceptível à *cis*-autoproteólise resulta, portanto, na não formação do grande fragmento N-terminal e do fragmento menor transmembrânico C-terminal da policistina-1. Dessa forma, esses camundongos expressam a forma não clivada da PC1, mas não os fragmentos mencionados. Este modelo animal permitiu, assim, avaliar separadamente *in vivo* as funções das formas clivada e não clivada da PC1. Vale dizer que animais heterozigotos ($Pkd1^{V/+}$) são férteis e não apresentam fenótipo cístico, enquanto os homozigotos para o alelo hipomórfico ($Pkd1^{V/V}$) apresentam menor crescimento corporal e insuficiência renal progressiva a partir do oitavo dia pós-natal. Tal fenótipo evolui para um grave acometimento cístico renal e acentuado aumento no volume renal, resultando em distensão abdominal. Além disso, animais homozigotos apresentam sobrevida intensamente reduzida, mais frequentemente inferior a 25 dias. A geração de camundongos císticos $Pkd1^{V/V}$ partiu do cruzamento entre fêmea e macho $Pkd1^{V/+}$. O processo de genotipagem deste modelo, por sua vez, também se baseou na técnica de PCR associada a um par de primers: um *forward* (5'-CCAAACAACCTCAGACCAGG-3') e outro *reverse* (5'-ACCAGGACAGCAAGAAAAC-3'). O alelo mutante $Pkd1^V$ possui um sítio FRT retido no local de inserção do gene de resistência à neomicina (*Neo*); logo, possui um produto de amplificação maior (329 pb) que o alelo selvagem $Pkd1^+$ (280 pb) (Figura 6).

Neste estudo empregamos, ainda, um quarto modelo animal: camundongos *knockout* para galectina-3. Este modelo foi criado por Fu-Tong Liu e cols., na

Universidade da Califórnia (Hsu et al., 2000), e cedido pelo Prof. Roger Chammas, desta Faculdade de Medicina. A inativação de *Lgals3* foi obtida por meio da geração de um alelo com inserção de um fragmento de DNA acoplado ao gene de resistência à neomicina (*neor*) entre o íntron 4 e o éxon 5. Animais *knockout* para Gal-3 (*Lgals3*^{-/-}) são férteis, têm cerca de 11% menos glomérulos e tipicamente apresentam uma maior fração de excreção de cloreto (Bichara et al., 2006). Camundongos *Lgals3*^{-/-} foram produzidos a partir do cruzamento entre fêmea e macho *Lgals3*^{+/-}. A genotipagem associada a esses animais também se pautou em dois produtos específicos de PCR relacionados ao uso de três *primers*: um *primer forward*, comum aos produtos selvagem e mutante (EBPEX5DR, 5'-CACTCTCAAAGGGGAAGGC-TGACTGTC-3'); um *primer reverse*, posicionado no íntron 4, específico para o alelo selvagem (INT4A, 5'-GTAGGTGAGAGTCACAAGCTGGAGGCC-3') e um terceiro *primer* posicionado em *neor*, específico para o alelo mutante (Neo1448, 5'-GGCTGACCG-CTTCCTCGTGCTTTACGG-3'). Um produto de PCR de 330 bp associou-se ao alelo nulo, enquanto um produto de 490 bp indicou a presença do alelo selvagem. Animais homozigotos *Lgals3*^{-/-} apresentaram, portanto, uma única banda com cerca de 330 bp (Figura 6).

Nosso estudo foi conduzido em sua totalidade com camundongos machos, de modo a evitar heterogeneidade experimental. Este projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da USP/Hospital das Clínicas da FMUSP, seguindo os padrões nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais.

Figura 4 - Genotipagem dos camundongos por PCR relacionada aos alelos *Pkd1*⁺, *Pkd1*^{cond}, à presença do transgene Cre, ao alelo *Pkd1*^V, e ao alelo *Lgals3*⁺

3.2 Geração de camundongos duplos-mutantes

A supressão da expressão de Gal-3 foi introduzida nos três modelos deficientes em *Pkd1* por meio dos algoritmos de cruzamento descritos a seguir. O primeiro objetivou a geração de camundongos *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-}. Para tanto, cruzamos macho *Pkd1*^{+/-} com fêmea *Pkd1*^{+/+};*Lgals3*^{-/-}. Conforme esperado, cerca de 50% da prole apresentou genótipo *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{+/-}; apenas machos com este genótipo, contudo, foram selecionados. Machos *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{+/-} foram, então, cruzados com fêmeas *Pkd1*^{+/+};*Lgals3*^{-/-}. Chegamos, assim, ao macho *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-}, procriador na matriz composta com a fêmea *Pkd1*^{+/+};*Lgals3*^{-/-}, gerando machos de genótipo igual.

Nosso segundo algoritmo teve como meta gerar camundongos *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre};*Lgals3*^{-/-}. Para isto, cruzamos macho *Pkd1*^{cond/+};*Nestin*^{cre} com fêmea *Pkd1*^{+/+};*Lgals3*^{-/-}. A partir deste primeiro casal, seguiram-se várias gerações até a obtenção de matrizes capazes de gerar animais duplos-mutantes machos com o genótipo desejado, *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre};*Lgals3*^{-/-}.

O terceiro algoritmo dirigiu-se à geração de camundongos *Pkd1*^{V/V};*Lgals3*^{-/-}. Para tanto, cruzamos macho *Pkd1*^{V/+};*Lgals3*^{+/+} com fêmea *Pkd1*^{+/+};*Lgals3*^{-/-}. Como esperado, obtivemos cerca de 50% da prole com genótipo *Pkd1*^{V/+};*Lgals3*^{+/-}, porém apenas os machos foram selecionados. Na etapa seguinte, cruzamos macho *Pkd1*^{V/+};*Lgals3*^{+/-} com fêmea *Pkd1*^{+/+};*Lgals3*^{-/-}, de modo a obter machos e fêmeas *Pkd1*^{V/+};*Lgals3*^{-/-}, os quais passaram a atuar como matrizes na geração de animais machos *Pkd1*^{V/V};*Lgals3*^{-/-}.

3.3 Grupos experimentais

Nosso estudo foi conduzido em três conjuntos experimentais: o primeiro foi constituído pelos grupos *Pkd1*^{+/+} (SV), *Pkd1*^{+/-} (HT) e *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-} (HTG-) (Figura 5A); o segundo incluiu os grupos experimentais *Pkd1*^{cond/cond} (NC), *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} (CI) e *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre};*Lgals3*^{-/-} (CIG-) (Figura 5B); e o terceiro constituiu-se dos grupos *Pkd1*^{+/+} (SV), *Pkd1*^{V/V} (VV) e *Pkd1*^{V/V};*Lgals3*^{-/-} (VVG-) (Figura 5C). O fluxograma experimental aplicado a cada conjunto experimental encontra-se na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma experimental para camundongos (A) SV, HT e HTG-; (B) NC, CI e CIG-; e (C) SV, VV e VVG-. S_{Cr} , S_U , S_{Na} , S_K e S_{Cl} referem-se às concentrações séricas de creatinina, uréia, Na^+ , K^+ e Cl^- . U_{Cr} , U_{Na} , U_K e U_{Cl} referem-se às concentrações urinárias de creatinina, Na^+ , K^+ e Cl^- .

3.4 Análise ecocardiográfica convencional

A análise ecocardiográfica foi realizada utilizando o aparelho Vevo 2100 (Visual Sonics Inc, Toronto, Canadá) com transdutor de 40 mHz, em animais SV, HT e HTG- de 12-13 semanas de idade e em animais NC, CI e CIG- com 22-23 semanas.

Para realização do procedimento, o camundongo foi anestesiado colocando-se o mesmo em uma câmara fechada, ventilada com mistura titulável de oxigênio e isoflurano. Em seguida o animal foi retirado desta câmara e colocado em decúbito dorsal em placa aquecida a 40°C, com a extremidade cranial introduzida em tubo com aporte contínuo de isoflurano. Cada pata foi fixada em eletrodos que convertem o sinal em frequência cardíaca e traçado eletrocardiográfico, utilizados para monitoração durante o procedimento. Em seguida, o camundongo foi submetido à tricotomia da região torácica através de lâmina metálica. A análise ecocardiográfica foi realizada no modo M, em Doppler colorido e Doppler tissular, seguida do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEnVE), da massa do ventrículo esquerdo (MVE) e do índice de performance miocárdica (IPM) (Ramires et al., 2006).

3.5 Análise da deformação miocárdica (*strain*) através de ecocardiografia por rastreamento de marcas acústicas (*speckle-tracking*)

A deformação (*strain*) de um dado tecido em uma direção específica é definida pela mudança de comprimento de um segmento dividido por seu comprimento original $[(L1-L0)/L0]$, enquanto a taxa de deformação (*strain rate*) é definida pela mudança desta deformação ao longo de um determinado período $[(L1-L0)/L0 \times s^{-1}]$ (Bauer et al., 2011). Neste estudo, as medidas de deformação miocárdica e da taxa de deformação foram obtidas através do rastreamento das marcas acústicas (*speckle-tracking*) derivadas de ecocardiografia bidimensional nos eixos curto e longo da região para-esternal. Todas as imagens foram adquiridas a uma frequência

de 200 quadros/s e a uma profundidade de 11 mm. A aquisição das imagens, por sua vez, foi conduzida por um investigador experiente, utilizando um algoritmo de análise previamente validado (VevoStrain, VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) (Bauer et al., 2011).

O processo utilizado para obtenção das medidas de *strain* e *strain rate* inicia-se com a seleção de imagens em modo B adquiridas digitalmente, com bordas endocárdicas e epicárdicas nítidas e sem a presença de artefatos. Neste processo, três ciclos cardíacos são selecionados para análise, acompanhados da marcação semi-automática das bordas endocárdicas e epicárdicas. Quando necessário, ajustes e correções são realizados para otimização da qualidade no rastreamento das marcas acústicas. Em seguida, as imagens rastreadas são processadas quadro a quadro para obtenção das medidas em cada eixo. Neste estudo os valores obtidos foram globais, ou seja, resultaram da média calculada em cada um dos seis segmentos cardíacos, e representam valores de pico.

3.6 Ultrassonografia renal

A análise ultrassonográfica renal foi realizada com o mesmo equipamento de ultrassom utilizado na avaliação ecocardiográfica, nos mesmos animais e na mesma faixa etária aplicada à ecocardiografia. O mesmo plano metodológico foi utilizado, exceto pela posição do animal que, nesta avaliação, foi o decúbito ventral, permitindo a tricotomia dorsal. Imagens bidimensionais foram adquiridas para cada rim e as medidas dos três eixos renais foram obtidas, com o objetivo de calcular o volume renal total (VRT) (Nishiura et al., 2009). Este valor é calculado com base na equação modificada de volume do elipsóide:

$$\text{VRT} = 4/3 \times \pi \times [(\text{eixo dorso-ventral} + \text{largura})/4]^2 \times (\text{eixo sagital})/2$$

Em seguida, o transdutor percorre cada rim de um pólo a outro, gerando um filme de cortes axiais composto por 200 imagens. A análise desta sequência foi utilizada para o cálculo do volume de cada cisto, uma vez que as sequências obtidas permitem identificar o maior diâmetro de cada cisto. Dado que a forma dos cistos renais aproxima-se à forma da esfera, o volume de cada cisto pode ser obtido a partir da equação:

$$\text{Volume cístico individual} = 4/3 \times \pi \times (\text{raio})^3$$

Após a etapa de varredura, que dura 3 s para cada rim, o procedimento é encerrado, substituindo o fluxo de isoflurano por oxigênio de modo a permitir a recuperação anestésica do animal.

A partir do volume renal total e da soma dos volumes de todos os cistos de cada rim, obtém-se o índice cístico unilateral (rim direito ou rim esquerdo) e global (rim direito e rim esquerdo), de acordo com as equações abaixo:

$$\text{Índice cístico unilateral (\%)} = [(soma dos volumes dos cistos no rim escolhido) \times 100] / \text{volume renal total}$$

$$\text{Índice cístico global (\%)} = [(soma dos volumes dos cistos de ambos os rins) \times 100] / \text{soma dos volumes renais}$$

3.7 Aferição direta da pressão arterial média e da pressão arterial pulsátil

Os animais foram submetidos a anestesia inalatória com isoflurano 1,5%. Um catéter de 4,0 cm de comprimento (Micro-Renathane, Braintree Science Inc, EUA), 0,40 mm de diâmetro externo e 0,25 mm de diâmetro interno foi inserido na artéria

carótida direita, para registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) (Ceroni et al., 2010). Previamente ao implante, o catéter foi preenchido com solução de NaCl 0,9% heparinizada (50 UI/mL) e ocluído com um pino de metal. O catéter foi exteriorizado na nuca dos animais com auxílio de um trocáter. Após sutura das incisões, o catéter foi acoplado a um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, EUA), para aferição de PAM (mmHg), PAP (mmHg) e FC (bpm). O registro dos dados foi realizado após 24h de recuperação pós-cirúrgica, permitindo a recuperação e adaptação do animal ao sistema.

3.8 Análise do barorreflexo

A análise do barorreflexo baseou-se no “método da sequência”, descrito por Parati et al. (1998). Após a aquisição dos dados de pressão arterial invasiva, utilizou-se um programa para eliminar aberrâncias no traçado, e que permitia a identificação de intervalos de pulso (IP) com picos sistólicos consecutivos. A partir deste registro de 24h, os parâmetros de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), PAM, e FC foram obtidos. Em seguida, sequências caracterizadas pelo aumento progressivo da PAS e do IP (sequências +IP/+PAS) ou pela diminuição progressiva da PAS e do IP (sequências -IP/-PAS) foram identificadas a partir do limiar de 1 mmHg na PAS e de 6 ms no IP. A partir desses dados obteve-se um coeficiente de regressão, definido como índice de sensibilidade do barorreflexo (SBR, ms/mmHg). As rampas foram definidas como a somas de todas as sequências +PI/+PAS e -PI/-PAS obtidas durante o registro de 24h. O índice de efetividade do barorreflexo (IEB), por sua vez, foi definido como a razão entre o número de sequências de barorreflexo sobre o número total de séries nas quais a PAS progressivamente aumentou ou diminuiu, independentemente das alterações reflexas no IP.

3.9 Determinações bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada por acesso retro-ocular, para mensuração das concentrações séricas de uréia (S_U) e creatinina (S_{Cr}). A determinação da S_U baseou-se no método de Crocker modificado (Strufaldi, 1987) (Celm, Brasil) e da S_{Cr} no método quantitativo colorimétrico (Labtest, Brasil). As mensurações das concentrações séricas de Na^+ (S_{Na}) e K^+ (S_K) foram realizadas em espectrofotômetro de chama modelo FC280 (Celm, Brasil). A mensuração da concentração sérica de Cl^- (S_{Cl}), por sua vez, foi conduzida a partir de reação colorimétrica com tiocianato e leitura por espectrofotômetro (Labtest, Brasil).

As determinações das concentrações urinárias de Na^+ (U_{Na}), K^+ (U_K) e Cl^- (U_{Cl}) foram realizadas utilizando a mesma metodologia. A fração de excreção de Na^+ (FE_{Na}) foi obtida a partir da equação $FE_{Na} = 100 \times (U_{Na} \times S_{Cr}) / (S_{Na} \times U_{Cr})$, onde U_{Cr} representa a concentração urinária de creatinina. As frações de excreção de K^+ (FE_K) e de Cl^- (FE_{Cl}) foram calculadas de maneira análoga à de Na^+ .

3.10 Análise morfológica dos tecidos

O coração e os rins dos camundongos HT, HTG- e SV de 13 semanas, dos animais CI, CIG- e NC de 23 semanas, e dos camundongos VV, VVG- e SV em P18 foram removidos, avaliados macroscopicamente e preparados para análise histológica, imunoistoquímica e por *western blot*. Camundongos HT, HTG-, SV, CI, CIG- e NC foram submetidos a anestesia com tiopental a 80 $\mu\text{g/g}$ de PC, por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram submetidos a toracotomia, um catéter foi inserido no ventrículo esquerdo, e um corte foi feito no átrio direito para drenar o sangue. Nesse ponto iniciou-se a perfusão com solução salina a 2 mL/min usando a bomba Miniplus 3 (Gilson Inc., Middleton, WI, EUA) até exsanguinação completa. O procedimento foi finalizado com a coleta de órgãos, reservando-se o rim esquerdo e parte do coração, armazenados em nitrogênio líquido, para extração e análise de proteínas. O procedimento empregado para camundongos VV, VVG- e SV seguiu o

mesmo protocolo recém-descrito, com exceção da perfusão com solução salina em virtude do pequeno tamanho dos animais.

O rim direito e parte do coração foram preparados para histologia com fixação em formaldeído 4% por cerca de 24h. Tais amostras foram então processadas em série graduada de etanol, incluídas em parafina, submetidas a cortes com espessura de 3 μ m e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

3.11 Quantificação de fibrose tecidual

Cortes histológicos de rim e coração correspondentes a todos os grupos experimentais analisados foram submetidos a coloração pela técnica de picrosírius a 0,2% (Sirius Red, Direct Red 80, Milwaukee, EUA). As lâminas coradas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX-51, Japan) equipado com um polarizador de luz, acoplado a um analisador de imagem. Neste sistema, uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio provê imagens em um monitor. Doze campos de miocárdio e 12 campos de rim (10 de córtex e dois de medula renal) foram digitalizados a um aumento de 400x para cada animal avaliado. A seguir, essas imagens foram processadas pelo *software* Image ProPlus 6.0, permitindo a quantificação do colágeno através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas, alaranjadas ou esverdeadas. O resultado final foi obtido, por fim, pela razão entre a área do conteúdo de colágeno e a área intersticial total (Whittaker et al., 1994; Farris et al., 2011).

3.12 Análise imunoistoquímica para quantificação de apoptose

A análise qualitativa e quantitativa de apoptose celular foi realizada por imunoistoquímica através da técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenindeoxyuridine nick-end labeling*) com o kit *ApopTag Plus Peroxidase in Situ Detection* (Chemicon, Billerica, EUA). Após desparafinização e reidratação com uma bateria de xilol e álcool, as secções foram pré-tratadas com

proteínase K (20mg/mL, Promega, Madison, EUA) diluída em PBS (*Phosphate Buffered Saline*; 0,01 M, pH 7,4) durante 15 min à temperatura ambiente. Seguindo lavagens com água destilada, foi realizado bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 10 min e, a seguir, bloqueio com leite em pó desnatado 6% diluído em PBS, por 30 min a 37°C. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com tampão de equilíbrio do kit, por no mínimo 10 s. Para marcar o DNA clivado, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C com a enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT), diluída 1:12 no tampão de reação, o qual contém nucleotídeos marcados com digoxigenina. Após esse período, as lâminas foram incubadas com o tampão de parada da reação por 10 min à temperatura ambiente. Imediatamente após, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidase por 30 min, à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram reveladas com o substrato cromógeno 3,3-diaminobenzidina 0,025% (DAB, Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) e, a seguir, contra-coradas com hematoxilina de Harrys. Utilizou-se como controle negativo secções de tecido incubada sem a enzima TdT e como controle positivo secções de baço de camundongo, tecido com alto índice apoptótico.

A quantificação da taxa de apoptose foi realizada por meio da contagem de núcleos positivos e núcleos totais em 10 campos de miocárdio (apoptose cardíaca) e 10 campos renais (apoptose renal, oito campos representando o córtex e dois a medula renal) para cada camundongo analisado. Em ambos os casos a quantificação foi conduzida através de microscopia óptica em aumento de 400x, empregando o mesmo sistema de imagem e *software* referidos anteriormente. A taxa de apoptose foi expressa como o número de células com núcleos positivos para cada 10000 células observadas.

3.13 Análise imunoistoquímica para quantificação da proliferação celular

A análise de proliferação celular foi realizada por imunoistoquímica para o marcador Ki-67. Após desparafinização e reidratação dos tecidos com uma bateria de xilol e álcool, as secções do tecido foram submersas na solução *Target Retrieval*

Solution (Dako, Carpinteria, EUA), diluída 1:10 e previamente aquecida a 95°C. A exposição antigênica seguiu-se por 40 min em panela a vapor. Os tecidos foram arrefecidos à temperatura ambiente, lavados em água destilada e depois imersos em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio de peroxidase endógena. Em seguida, as lâminas foram incubadas com leite em pó desnatado 6% em PBS 0,01 M, durante 30 min a 37° C. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-Ki-67 (rabbit Monoclonal, ab16667, ABCAM, Cambridge, USA) diluído 1:100, durante 12 h a 4°C. O controle negativo foi realizado na ausência do anticorpo primário, enquanto como controle positivo utilizamos uma secção de tecido de baço de camundongo. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o polímero EnVision + Dual Link System-HRP (Dako, Carpinteria, EUA) durante 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram novamente lavados com PBS e revelados com o substrato DAB 0,05% (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris.

A quantificação da taxa de proliferação celular foi realizada por meio da contagem de núcleos positivos e núcleos totais em 10 campos renais (oito representando o córtex e dois a medula renal) e 10 campos de miocárdio para cada camundongo avaliado. Em ambos os casos a quantificação foi realizada usando microscopia óptica em aumento de 400x, empregando o mesmo sistema de imagem e *software* referidos anteriormente. A taxa de proliferação celular foi expressa como o número de células com núcleos positivos para cada 10000 ou 100 células observadas.

3.14 Análise de expressão de galectina-3 por imunoistoquímica

Analizamos o perfil de expressão de galectina-3 por imunoistoquímica em tecido cardíaco e renal de camundongos SV e HT; NC e CI; e SV/VV. Tecidos cardíaco e renal dos animais HTG-, CIG- e VVG- foram utilizados como controles negativos. Esta análise foi realizada com o uso de um anticorpo monoclonal anti-galectina-3 (M3/38, hibridoma), cedido pelo Prof. Roger Chammas.

Este procedimento se iniciou com a desparafinização das lâminas com xilol e reidratação das mesmas em baterias de álcool. Após esta fase, foi realizada a recuperação antigênica, onde as lâminas, imersas em tampão EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), permaneceram aquecidas a 95° C por 30 min em panela a vapor. Após resfriamento em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água corrente, seguido de água destilada, e transferidas para solução PBS. As lâminas foram então submetidas a bloqueio da peroxidase endógena, realizado por 15 min com solução de peróxido de hidrogênio 3%. Em seguida, as lâminas foram incubadas com avidina e biotina, 15 min cada, para bloqueio da biotina endógena, e depois incubadas em solução PBS com leite desnatado 6% por 30 min à temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se o anticorpo primário e as lâminas permaneceram em câmara úmida por 12h a 4°C. No dia seguinte, seguiu-se incubação com o anticorpo secundário biotilado por 45 min (*rabbit anti-rat*, Dako, Carpinteria, EUA), seguida de peroxidase conjugada a estreptavidina em tampão Tris 50 mM, pH 7,6 por mais 45 min. Para revelação, foi utilizado o cromógeno DAB 0,025% (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA). Após lavagem, realizou-se a contra-coloração com hematoxilina de Harris.

3.15 Extração de proteínas e *western blot*

As amostras foram homogeneizadas com um aparelho Potter em tampão de homogeneização T-PER *Tissue Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 4°C, contendo um coquetel de inibidores de protease (*Cocktail Protease Inhibitor*, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), e então centrifugadas a 12000 rpm por 10 min a 4° C para remover núcleos e debris celulares. O sobrenadante foi utilizado como extrato proteico total para as análises quantitativas. A quantificação protéica foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (kit *Bio-Rad Protein Assay*, Hercules, CA, EUA), comparando as medidas obtidas para as amostras à curva padrão de albumina bovina lida a 600 nm.

As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo 10% de β -mercaptoetanol e fervidas em banho seco por 5 min. Quantidades equitativas de

proteína foram submetidas a SDS-PAGE (15% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Mini-PROTEAN, Life Sciences, Syracuse, NY, EUA), em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após adequada eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,22 μ m (BioAgency, Londres, Reino Unido) para a realização de análises de *western blot*. Esta membrana foi incubada por 2 h em solução bloqueadora contendo leite desnatado 5% para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir, as membranas foram incubadas por 12 h a 4° C, com os seguintes anticorpos primários: anti-Galectina 3 (1:150, M3/38, hibridoma), anti-TGF- β 1 (1:4000, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (1:5000; Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido). Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído 1:10000 em leite desnatado 5% por 1 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL *Prime Western Blotting Detection reagent* (Amersham, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). O sinal quimioluminescente foi detectado pelo sistema digital de aquisição de imagens ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) e quantificado por densitometria (Scion Image, Scion Corporation, Torrance, CA, EUA). Todas as lavagens foram feitas em TBST (*tris-buffered saline* acrescida de *tween* 0,1%) por aproximadamente 5 minutos, três vezes. Os resultados foram expressos como a razão densitométrica entre a proteína avaliada e GAPDH.

3.16 Análise estatística

Os dados contínuos foram comparados à curva normal pelo teste de Komolgorov–Smirnov e classificados em paramétricos ou não paramétricos. Quando três grupos foram comparados, utilizamos ANOVA para medidas não repetidas com o pós-teste de Tukey ou LSD para variâncias semelhantes, após aplicação do teste de Bartlett. Para variâncias diferentes, aplicamos ANOVA com correção de Welsh e o pós-teste de Dunnett C. Para dados não paramétricos, utilizamos o teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos, ou o teste de Kruskal-Wallis com os pós-

testes de Müller-Dunn, Conover-Inman ou Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner para comparações entre três grupos. A análise de sobrevida foi realizada através da curva de Kaplan-Meier com o teste de Log-rank. Foi considerado para todo o estudo risco $\alpha \leq 5\%$ e risco $\beta \leq 20\%$. Os testes foram realizados utilizando-se o programa SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, EUA), Systat 13.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA) e GraphPad 5.0 (Prism Software, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Modelos de camundongo deficientes em *Pkd1* e geração de duplos-mutantes *Pkd1*^{+/-}:*Lgals3*^{-/-} (HTG-), *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}:*Lgals3*^{-/-} (CIG-) e *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-} (VVG-)

Utilizamos três modelos de camundongo com padrões distintos de deficiência de *Pkd1* para investigar os efeitos potenciais de espectros diferentes de expressão de policistina-1 sobre os fenótipos cardiovascular e renal. Estes modelos foram submetidos a cruzamentos sistemáticos com animais KO para *Lgals3*, de modo a gerar camundongos duplos-mutantes que permitissem a avaliação de interação genética potencial entre esses dois *loci*. Todas as linhagens animais usadas neste estudo foram estabelecidas no *background* C57BL/6 e todos os experimentos foram conduzidos em camundongos machos.

O primeiro modelo mutante, um camundongo heterozigoto para mutação nula em *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}; HT), reproduz o *background* celular sistêmico de haploinsuficiência de *Pkd1* encontrado em pacientes com DRPAD1, mas não apresenta cistos renais até a idade de 15 semanas. Animais selvagens (*Pkd1*^{+/+}; SV) foram utilizados como seus controles.

O segundo modelo constitui-se em um camundongo homozigoto para um alelo *Pkd1 floxed* associado a um padrão de inativação gênica em mosaico, determinado pelo perfil de expressão do transgene *Nestin-Cre* e consequente excisão dos éxons 2-4 de *Pkd1* (*Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}; CI) (Fonseca et al., 2014; Piontek et al., 2004). Este modelo desenvolveu um fenótipo renal mais leve em nosso biotério que o descrito anteriormente por Shillingford et al. (2010). Camundongos CI apresentam cistos renais e hipertensão de início precoce (Fonseca et al., 2014), reproduzindo o fenótipo da DRPAD humana; no entanto, diferentemente do modelo anterior, eles não apresentam o *background* celular sistêmico haploinsuficiente para *Pkd1*. Neste grupo, animais não císticos (*Pkd1*^{cond/cond}; NC) foram utilizados como controles.

O terceiro modelo consiste em um camundongo homozigoto para um alelo *Pkd1 knockin* hipomórfico que impede a clivagem de PC1 no sítio GPS (*Pkd1^{V/V}*, VV). Este modelo desenvolve doença renal cística precoce e maciça no período pós-natal, caracterizada por envolvimento do néfron distal, uremia e mortalidade precoce (Yu et al., 2007).

Para combinar os modelos deficientes em *Pkd1* descritos com o estado de ausência de expressão de galectina-3, utilizamos um modelo de camundongo adicional, homozigoto para uma mutação nula em *Lgals3* (Hsu et al., 2000). Estes animais são viáveis e férteis. A realização de cruzamentos sucessivos e sistematizados, por sua vez, conduziu à geração de camundongos duplos-mutantes *Pkd1^{+/-}:Lgals3^{-/-}* (HTG-), *Pkd1^{cond/cond}:Nestin^{cre}:Lgals3^{-/-}* (CIG-) e *Pkd1^{V/V}:Lgals3^{-/-}* (VVG-).

4.2 Animais haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1* apresentam disfunção sistólica e diastólica, assim como anormalidades na deformação miocárdica

Análises funcionais cardíacas revelaram disfunção sistólica em ambos os modelos deficientes em *Pkd1*. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) mostrou-se reduzida em camundongos HT comparados a SV ($43,2 \pm 8,2\%$ vs $55,3 \pm 8,5\%$; $p < 0,01$) e em animais CI comparados a NC ($44,1 \pm 14,4\%$ vs $62,3 \pm 8,1\%$; $p < 0,01$) (Figura 6, Tabela 1). Anormalidades de função diastólica também foram detectadas em camundongos CI. De fato, esses animais apresentaram maior relação E/A que camundongos NC [$1,74$ ($1,45$ - $2,25$) vs $1,21$ ($1,11$ - $1,30$); $p < 0,001$], além de um menor tempo de desaceleração mitral ($20,1 \pm 2,3$ vs $25,9 \pm 2,2$ ms; $p < 0,01$) (Figura 7, Tabela 1).

A utilização de *tissue Doppler imaging* (TDI) permitiu avaliações complementares da função cardíaca. Camundongos CI apresentaram índice de *performance* miocárdica (IPM) maior que animais NCs ($0,73 \pm 0,12$ vs $0,40 \pm 0,21$; $p < 0,01$), um achado consistente com disfunção cardíaca global (Tabela 1). A relação E/e' foi também maior em camundongos CI que em animais NC ($40,6 \pm 7,2$ vs

24,7±8,7; $p<0,05$). Análises por TDI revelaram, ainda, maior relação E/e' em camundongos HT que em seus controles SV (40,3±10,3 vs 28,4±4,4; $p<0,01$).

Análises de geometria cardíaca detectaram hipertrofia de ventrículo esquerdo (HVE) em camundongos HT quando comparados a seus controles SV (78,2±19,1 vs 58,6±15,5 mg de massa do ventrículo esquerdo (MVE); $p<0,05$) (Tabela 1). Esses resultados foram apoiados pelo achado de um maior diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo (DPPVE) em camundongos HT [0,73 mm (0,68-0,73)] que em animais SV [0,66 mm (0,55-0,69); $p<0,05$] (Tabela 1). Camundongos CI e NC não diferiram, contudo, quanto à MVE e DPPVE. Não detectamos, também, diferenças significantes entre camundongos HT e SV e entre animais CI e NC para o diâmetro do septo interventricular (DSIV) e para a relação átrio esquerdo/aorta (AE/AO).

As análises recentes de deformação miocárdica (*strain*), assim como de suas taxas (*strain rate*), têm contribuído importantemente para a identificação de fenótipos patológicos em modelos experimentais de miocardiopatias e em determinadas situações clínicas (Bauer et al., 2011; Kramann et al., 2014). Em nosso estudo, animais CI apresentaram diminuição de todos os parâmetros de deformação, exceto um, mas mesmo este acompanhou a tendência dos demais (Figura 8, Tabela 2). Animais HT, por sua vez, apresentaram diminuição da taxa de *strain* radial no eixo curto e do *strain* longitudinal quando comparados aos camundongos SV, entretanto três outros parâmetros de deformação miocárdica seguiram a mesma tendência (Figura 8, Tabela 2).

Figura 6 - Disfunção cardíaca em camundongos deficientes em *Pkd1*. Análise comparativa para (A, G) pressão arterial média (PAM), (B, H) fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), (C, I) índice de performance miocárdica (IPM), (D, J) tempo de contração isovolumétrica do ventrículo esquerdo (TCIVE), (E, K) relação E/e', e (F, L) massa do ventrículo esquerdo (MVE), entre camundongos SV, HT e HTG- (A-F) na idade de 12-13 semanas para parâmetros ecocardiográficos e 13 semanas para medida da PAM; e entre animais NC, CI, e CIG- (G-L) na idade de 22-23 semanas para parâmetros ecocardiográficos e 24 semanas para PAM. Imagens em modo M foram usadas para o cálculo da FEVE em (M) para camundongos SV, HT e HTG- e em (N) para NC, CI e CIG-. Dados paramétricos foram comparados por meio de ANOVA, com resultados apresentados em média e desvio-padrão. Dados não paramétricos foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. A-F: * $p < 0,05$ vs SV; ** $p < 0,01$ vs SV; † $p < 0,05$ vs HT; ††† $p < 0,001$ vs HT. G-L: * $p < 0,05$ vs NC; ** $p < 0,01$ vs NC; † $p < 0,05$ vs CI; †† $p < 0,01$ vs CI.

Figura 7. Disfunção diastólica em camundongos deficientes em *Pkd1*. Análise comparativa para (A, E) relação E/A, (B, F) tempo de desaceleração mitral (TD), (C, G) tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (TRIVE), e (D, H) relação átrio esquerdo/aorta (AE/Aorta), entre animais SV, HT e HTG- (A-D) com 12-13 semanas de idade e entre animais NC, CI e CIG- (E-H) com 22-23 semanas de idade. Imagens representativas em Doppler pulsado mostrando ondas E e A em (I) animais SV, HT e HTG-, e em (J) animais NC, CI e CIG-. Dados paramétricos foram comparados utilizando ANOVA, com os resultados apresentados em média e desvio-padrão. Dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. A-D: † $p < 0,05$ vs HT. E-H: * $p < 0,05$ vs NC; ** $p < 0,01$ vs NC; *** $p < 0,001$ vs NC.

Figura 8 - Análise da deformação miocárdica em camundongos deficientes em *Pkd1*. Análise comparativa para (A, E) *strain* circunferencial no eixo curto, (B, F) *strain* radial no eixo curto, (C, G) *strain* longitudinal no eixo longo, (D, H), e *strain* radial no eixo longo, entre animais SV, HT e HTG- (A-D) com 12-13 semanas de idade, e entre animais NC, CI e CIG- (E-H) com 22-23 semanas de idade. Imagens representativas mostrando as curvas de *strain* regionais e globais para (I) *strain* longitudinal em camundongos SV, HT e HTG- e (J) *strain* radial no eixo curto em animais NC, CI e CIG-. Dados paramétricos foram comparados através de ANOVA, com resultados apresentados em média e desvio-padrão. A-D: *p<0,05 vs SV; †p<0,05 vs HT; ††p<0,01 vs HT. E-H: *p<0,05 vs NC; **p<,01 vs NC; †p<0,05 vs CI; ††p<0,01 vs CI.

Tabela 1 - Parâmetros ecocardiográficos em camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}, seus respectivos duplos-mutantes e seus controles

Parâmetros	SV (n=8)	HT (n=12)	HTG- (n=8)	NC (n=9)	CI (n=7)	CIG- (n=9)
Estrutura						
DSIV (mm)	0,57±0,06	0,66±0,12	0,68±0,13	0,65±0,10	0,70±0,13	0,63±0,09
DPPVE (mm)	0,66 (0,56-0,69)	0,73 (0,68-0,73)*	0,70 (0,65-0,81)	0,76 (0,69-0,81)	0,78 (0,72-1,02)	0,83 (0,66-0,92)
AE/Aorta	0,87 (0,65-1,01)	1,06 (0,99-1,26)	1,07 (0,97-1,13)	1,03 (0,93-1,19)	1,21 (1,01-1,25)	1,11 (0,97-1,33)
MVE (mg)	58,6±15,5	78,2±19,1*	64,0±15,0	77,8±18,0	91,3±16,1	80,4±15,5
Função sistólica						
FEVE (%)	55,3±8,5	43,2±8,2**	61,6±6,3†††	62,3±8,1	44,1±14,4*	61,1±5,3†
FEnVE (%)	28,4±5,6	21,1±4,8*	32,6±4,4†††	33,4±6,0	22,0±7,7*	32,3±3,6†
Função diastólica						
E/A	1,60 (1,33-1,62)	1,98 (1,57-2,77)	1,36 (1,14-1,83)†	1,21 (1,11-1,30)	1,74 (1,45-2,25)***	1,77 (1,27-2,02)***
TD (ms)	22,0±3,2	19,4±3,0	22,5±1,9	25,9±2,2	20,1±2,3**	20,5±4,0*
TRIVE (ms)	18,6 (17,7-20,9)	18,6 (15,9-25,3)	18,2 (16,9-19,9)	17,8 (16,8-19,3)	19,5 (18,3-22,3)	20,8 (17,9-22,6)
Outros parâmetros						
IPM	0,50±0,16	0,66±0,19	0,58±0,10	0,40±0,21	0,73±0,12**	0,50±0,11††
TCIVE (ms)	84,7 (77,3-88,8)	86,2 (79,6-101,6)	86,2 (82,8-99,5)	76,1 (65,5-81,9)	93,1 (85,8-97,5)***	86,9 (79,1-94,0)†††
S' (mm/s)	18,0 (16,7-19,1)	16,0 (13,7-19,8)	19,0 (16,7-19,9)	22,5 (19,4-27,9)	18,1 (14,4-21,4)	20,5 (17,5-23,1)
E/e'	28,4±4,4	40,3±10,3**	31,3±6,0†	24,7±8,7	40,6±7,2*	31,0±11,6

DSIV: diâmetro do septo interventricular. **DPPVE:** diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo. **AE/Aorta:** relação entre o átrio esquerdo e a aorta. **MVE:** massa do ventrículo esquerdo. **FEVE:** fração de ejeção do ventrículo esquerdo. **FEnVE:** fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. **E/A:** relação entre as ondas E e A. **TD:** tempo de desaceleração da onda E mitral. **TRIVE:** tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo. **IPM:** índice de performance miocárdica. **TCIVE:** tempo de contração isovolumétrica do ventrículo esquerdo. **S':** pico da velocidade da onda S' medida ao nível septal basal. **E/e':** relação entre as ondas E e e'. Dados paramétricos foram comparados por meio de ANOVA, com os resultados expressos em média e desvio-padrão. Dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. HT/HTG-SV: *p<0,05 vs SV; **p<0,01 vs SV; †p<0,05 vs HT; †††p<0,001 vs HT. CI/CIG-NC: *p<0,05 vs NC; **p<0,01 vs NC; ***p<0,001 vs NC; †p<0,05 vs CI; †††p<0,001 vs CI.

Tabela 2 - Deformação cardíaca em camundongos $Pkd1^{+/-}$ e $Pkd1^{cond/cond}.Nestin^{cre}$, seus respectivos duplos-mutantes e seus controles

Parâmetros	SV (n=6)	HT (n=7)	HTG- (n=7)	NC (n=8)	CI (n=5)	CIG- (n=7)
Eixo curto (%)						
<i>Strain</i> circunferencial	-20,48±8,94	-19,08±5,18	-24,06±4,77	-24,33±6,53	-14,49±5,77**	-24,40±2,39††
Taxa de <i>strain</i> circunferencial ($\times s^{-1}$)	-8,23±2,77	-5,80±1,49	-9,29±2,82†	-8,79±2,57	-5,18±2,44 *	-8,72±2,43†
<i>Strain</i> radial	29,94±8,87	26,30±6,93	29,75±5,56	32,23±8,18	21,17±9,60*	33,71±3,89†
Taxa de <i>strain</i> radial ($\times s^{-1}$)	8,21±0,76	5,68±0,67**	8,51±1,80††	10,04±2,67	6,34±2,86*	8,26±1,31
Eixo longo (%)						
<i>Strain</i> longitudinal	-15,44±1,93	-11,48±1,78*	-18,89±3,92†	-20,44±7,61	-12,16±4,80*	-16,69±4,30
Taxa de <i>strain</i> longitudinal ($\times s^{-1}$)	-5,59±0,77	-4,50±1,38	-7,12±1,60†	-8,55±2,98	-4,07±2,15**	-6,91±1,91†
<i>Strain</i> radial	24,02±2,34	18,33±4,54	25,76±4,95††	27,14±11,27	20,61±7,38	32,16±4,85†
Taxa de <i>strain</i> radial ($\times s^{-1}$)	7,06±0,91	6,24±1,09	7,74±1,55†	9,45±2,76	5,67±2,03**	9,36±1,67††

Dados paramétricos foram comparados por ANOVA, com os resultados expressos em média e desvio-padrão. Nesta análise utilizou-se o pós-teste de Tukey. HT/HTG-/SV: * $p < 0,05$ vs SV; ** $p < 0,01$ vs SV; † $p < 0,05$ vs HT; †† $p < 0,01$ vs HT. CI/CIG-/NC: * $p < 0,05$ vs NC; ** $p < 0,01$ vs NC; † $p < 0,05$ vs CI; †† $p < 0,01$ vs CI.

4.3 A deficiência de *Pkd1* pode levar a disfunção cardíaca primária e associada à hipertensão

Fonseca et al. (2014) demonstraram anteriormente que camundongos HT, no *background* genético 129Sv, não são hipertensos na idade de 13 semanas. Neste estudo confirmamos este achado no *background* C57BL/6, não detectando diferença estatisticamente significativa para PAM entre animais HT e SV (Figura 6, Tabela 3). Esses dados sugerem que a disfunção cardíaca observada em camundongos haploinsuficientes não resulte primordialmente de níveis cronicamente elevados de pressão arterial; pelo contrario, essa disfunção parece representar uma anormalidade primária associada à diminuição da atividade funcional de *Pkd1*.

O mesmo estudo de Fonseca et al. (2014) também analisou os níveis de pressão arterial em camundongos CI e NC no *background* C57BL/6 e constatou hipertensão arterial sistêmica (HAS) em animais CI com 5 e 13 semanas de idade. Interessantemente, na idade de 24 semanas esses animais apresentaram apenas tendência à elevação da PA. Esse achado, consistente com os resultados do estudo atual, foi interpretado como decorrente da lesão cardíaca crônica imposta pela HAS (Figura 1, Tabela 3). A disfunção cardíaca em animais CI parece, portanto, ter dois componentes: um primariamente dependente da atividade reduzida de *Pkd1* e outro secundário aos efeitos crônicos da HAS.

As medidas invasivas de PA permitiram também a análise da atividade de barorreflexo. Animais HT apresentaram tendência a um menor índice de efetividade de barorreflexo (IEB) quando comparados a animais SV. Por outro lado, a sensibilidade do barorreflexo (SBR) não foi diferente entre os modelos deficientes em *Pkd1* e seus respectivos controles (Tabela 3).

Tabela 3 - Pressão arterial média e parâmetros de barorreflexo em camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}, seus respectivos duplos-mutantes e seus controles

Parâmetros	SV (n=5)	HT (n=6)	HTG- (n=5)	NC (n=6)	CI (n=6)	CIG- (n=6)
Dados hemodinâmicos						
PAM (mmHg)	119,8±8,6	130,8±11,1	118,2±9,1	131,6±13,1	140,0±7,2	132,5±11,5
Dados de barorreflexo						
Rampas (n)	724,8±171,1	662,2±225,2	606,2±148,7	837,6±163,2	815,4±165,7	775,2±307,0
IEB	0,27±0,06	0,23±0,06	0,34±0,07	0,20±0,07	0,15±0,10	0,22±0,07
IEB-aum	0,28±0,08	0,27±0,08	0,34±0,06	0,21±0,09	0,14±0,11	0,26±0,06
IEB-dim	0,25±0,18	0,18±0,07	0,33±0,09†	0,19±0,05	0,15±0,10	0,17±0,09
SBR (ms/mmHg)	1,97 (1,49-4,25)	2,11 (1,55-4,65)	3,63 (2,34-6,01)	1,58 (1,29-2,62)	1,10 (0,75-1,33)	1,94 (1,39-3,38)

PAM: pressão arterial média. **IEB:** índice de efetividade do barorreflexo. **IEB-aum/-dim:** índice de efetividade do barorreflexo para sequências com aumento da pressão arterial sistólica e prolongamento do intervalo de pulso (**IEB-aum**) ou diminuição da pressão arterial sistólica e encurtamento do intervalo de pulso (**IEB-dim**). **SBR:** sensibilidade do barorreflexo. Dados paramétricos foram comparados por ANOVA, com resultados apresentados em média e desvio-padrão. Dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartis. †p<0,05 vs HT.

4.4 Animais haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1* apresentam apoptose e fibrose cardíaca aumentadas

Análises de apoptose em tecido cardíaco, realizadas através da técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling*), revelaram taxas maiores em camundongos HT que SV [41,7 (28,5-60,3) vs 9,6/10000 células (6,9-15,4); $p<0,01$]. De forma similar, corações CI apresentaram uma taxa apoptótica mais alta que corações NC [71,4 (42,8-81,4) vs 14,6/10000 células (0-29,4); $p<0,01$] (Figura 9). Conforme esperado, a proliferação celular em tecido cardíaco foi virtualmente ausente nos modelos deficientes em *Pkd1* e em seus respectivos controles (dados não mostrados).

O índice de fibrose intersticial em tecido cardíaco, avaliado pela técnica de Picrosírius, detectou elevação significativa, porém leve, em animais HT quando comparados a SV [0,21% (0,17-0,26) vs 0,06% (0,06-0,07); $p<0,01$]. Um padrão semelhante foi observado em camundongos CI comparados a animais NC [0,44% (0,41-1,02) vs 0,05% (0,03-0,06); $p<0,001$] (Figura 9).

Figura 9 - Apoptose e fibrose em tecido cardíaco. Análise comparativa para (A) marcação para TUNEL entre animais SV (n=7), HT (n=9) e HTG- (n=7); (B) marcação para TUNEL entre animais NC (n=9), CI (n=7) e CIG- (n=8); (C) marcação para Picrosírius entre animais SV (n=8), HT (n=11) e HTG- (n=8); e (D) marcação para Picrosírius entre animais NC (n=9), CI (n=7) e CIG- (n=6). A, C: 13 semanas; B, D: 23 semanas. (E) Imagens representativas de marcação para TUNEL em tecido cardíaco. Magnificação original, x400 (detalhe, x800). (F) Imagens representativas para marcação para Picrosírius sob luz polarizada em tecido cardíaco. Magnificação original, x400. Dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com resultados apresentados em mediana e intervalo interquartis. A, C: **p<0,01 vs SV; †††p<0,001 vs HT. B, D: **p<0,01 vs NC; ***p<0,001 vs NC; ††p<0,01 vs CI; †††p<0,001 vs CI.

4.5 A expressão de galectina-3 encontra-se aumentada no tecido cardíaco de camundongos císticos deficientes em *Pkd1*

Análise por *Western blot* em tecido cardíaco mostrou aumento da expressão de Gal-3 em camundongos CI quando comparados a seus controles NC, diferença não observada entre animais HT e SV (Figura 10). A expressão de TGF- β 1, entretanto, mostrou-se heterogênea dentro dos grupos, não diferindo entre camundongos deficientes em *Pkd1* e seus respectivos controles.

Figura 10 - Expressão de galectina-3 e TGF-β1 em tecido cardíaco. Análises comparativas da expressão quantitativa de Gal-3, avaliada por *western blot* e densitometria normalizada para GAPDH, entre camundongos (A) SV (n=7) e HT (n=9) e (B) NC (n=5) e CI (n=5); análises comparativas da expressão de TGF-β1 entre camundongos (C) SV (n=7), HT (n=9) e HTG- (n=5) e (D) NC (n=4), CI (n=4) e CIG- (n=4). A, C: 13 semanas; B, D: 23 semanas. *Imunoblots* mostrando a expressão cardíaca de Gal-3, TGF-β1 e GAPDH em camundongos (E) SV, HT e HTG- e (F) NC, CI e CIG-. Dados não paramétricos foram comparados com o teste de Mann-Whitney em A e B, e por ANOVA em C e D, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. B: *p<0,05 vs NC.

4.6 *Knockout para Lgals3* resgata o fenótipo cardíaco em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1*

Camundongos HTG- cursaram com melhora da função sistólica comparados a animais HT, apresentando maior FEVE ($61,6 \pm 6,3\%$ vs $43,2 \pm 8,2\%$; $p < 0,001$). Resultados similares foram observados em camundongos CIG- quando comparados a animais CI ($61,1 \pm 5,3$ vs $44,1 \pm 14,4\%$; $p < 0,05$) (Figura 6, Tabela 1). Vale dizer que os valores obtidos para camundongos HTG- e CIG- alcançaram níveis equivalentes aos dos controles SV e NC, indicando resgate completo da função sistólica.

Uma melhora parcial na função diastólica também foi detectada em animais HTG-. Esses camundongos apresentaram a relação E/A menor que animais HT [1.36 ($1.14-1.83$) vs 1.98 ($1.57-2.77$); $p < 0.05$], enquanto tanto a relação E/A como TD não diferiram entre os modelos HTG- e SV (Figura 7, Tabela 1). Camundongos CIG-, entretanto, não apresentaram melhora na relação E/A e no TD quando comparados a animais CI (Figura 7, Tabela 1). A relação E/e' mostrou-se menor para os camundongos HTG- que para os animais HT ($31,1 \pm 6,0$ vs $40,3 \pm 10,3$; $p < 0,05$), enquanto o IPM foi menor em camundongos CIG- que em animais CI ($0,50 \pm 0,11$ vs $0,73 \pm 0,12$; $p < 0,01$). É importante notar que este padrão foi consistente com o resgate funcional do fenótipo cardíaco.

Em apoio ao resgate do fenótipo cardíaco determinado por KO de *Lgals3*, observamos que vários parâmetros de *strain* também foram resgatados nos camundongos CIG- e HTG- (Figura 8, Tabela 2). Além disso, não houve diferença para a MVE entre animais HTG- e SV (Figura 6, Tabela 1). Este efeito benéfico também foi observado para o índice de efetividade do barorreflexo para sequências com diminuição da pressão e do intervalo de pulso (IEB-dim) em camundongos HTG- comparados a HT (0.33 ± 0.09 vs 0.18 ± 0.07 ; $p < 0.05$) (Tabela 3).

Nossos dados sugerem, portanto, que o componente primário da disfunção cardíaca seja amplamente corrigido pela remoção da expressão da Gal-3, enquanto a disfunção imposta pela HAS poderia ser potencialmente influenciada por KO de *Lgals3*.

4.7 O resgate do fenótipo cardíaco determinado por *knockout* de *Lgals3* em camundongos deficientes em *Pkd1* está associado à redução de apoptose e fibrose

As taxas de apoptose cardíaca foram menores em camundongos HTG- que em animais HT [8,01 (6,58-17,87) vs 41,74/10000 células (28,54-60,35); $p < 0,001$], atingindo níveis similares aos dos controles SV. Na mesma linha, camundongos CIG- apresentaram uma taxa de apoptose cardíaca menor que animais CI [17,27 (13,26-23,99) vs 71,36/10000 células (42,81-81,37); $p < 0,001$], atingindo também níveis similares aos de seus controles NC (Figura 9). Estes dados apóiam o resgate do fenótipo apoptótico pela supressão da expressão de Gal-3 em ambos os modelos deficientes em *Pkd1*.

Nossas análises também revelaram menores índices de fibrose em tecido cardíaco em camundongos HTG- quando comparados a animais HT [0.04% (0.03-0.05) vs 0.21% (0.17-0.26); $p < 0.001$] e em camundongos CIG- quando comparados a animais CI [0.10% (0.07-0.14) vs 0.44% (0.41-1.02); $p < 0.001$], valores que se aproximaram dos de seus respectivos controles SV e NC (Figura 9). Tais observações também amparam o resgate do fenótipo de fibrose cardíaca por KO de *Lgals3* em ambos os modelos.

4.8 Fenótipo renal em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1*

Não houve diferença nos níveis de uréia sérica entre camundongos HT e SV e entre animais CI e NC (Figura 11, Tabela 4). Também não observamos diferenças para as frações de excreção de Na^+ (FE_{Na}), K^+ (FE_{K}) e Cl^- (FE_{Cl}) entre os mesmos grupos (Tabela 4). Análises ultrassonográficas de alta resolução confirmaram a ausência de cistos renais em camundongos SV, HT e NC, assim como em animais HTG-, e confirmaram a presença de cistos em camundongos CI (Figura 11, Tabela 4).

Detectamos uma maior taxa de proliferação tubular em camundongos HT que em animais SV [135,40 (108,50-163,50) vs 27,08/10000 células (22,34-36,41); $p<0,001$]. O mesmo padrão foi encontrado em rins CI quando comparados a rins NC [97,28 (71,53-135,90) vs 27,66/10000 células (21,83-30,41); $p<0,05$] (Figura 12).

Camundongos HT apresentaram aumento da taxa de apoptose quando comparados a animais SV [11,95 (10,37-14,73) vs 2,93/10000 células (2,64-4,53); $p<0,01$], diferença também encontrada entre rins CI e NC [18,04 (16,31-30,11) vs 2,81/10000 células (2,05-3,56); $p<0,001$] (Figura 12).

Embora discreta, a fibrose intersticial renal mostrou-se mais elevada em camundongos HT que em animais SV [0,31% (0,21-0,44) vs 0,04% (0,02-0,04); $p<0,001$]. Os índices de fibrose renal também foram maiores em rins CI que em rins NC [1,32% (0,73-2,47) vs 0,03% (0,01-0,05); $p<0,001$] (Figura 7).

Figura 11 - Fenótipo renal em camundongos deficientes em *Pkd1*. Análise comparativa da uréia sérica entre camundongos (A) SV, HT e HTG- com idade de 10-11 semanas, e (B) NC, CI e CIG- com idade de 20-21 semanas; e (C) análise comparativa dos índices císticos renais entre animais CI e CIG- com idade de 22-23 semanas. (D) Imagens representativas da marcação para Gal-3 em tecido renal de animais SV, HT, HTG-, NC, CI e CIG-. Magnificação original, 400x. (E) Imagens representativas em HE de cistos renais em camundongos CI e CIG-, e ausência de cistos em animal NC. Magnificação original, x100. (F) Imagens representativas de ultrassom renal em eixo longitudinal de animais NC, CI e CIG-. Dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal Wallis (A, B) e Mann-Whitney (C), com resultados apresentados em mediana e intervalo interquartis.

Figura 12 - Proliferação celular, apoptose e fibrose em tecido renal. Análise comparativa para marcação tubular de Ki-67 entre camundongos (A) SV (n=6), HT (n=10) e HTG- (n=6), e (D) NC (n=7), CI (n=5) e CIG- (n=7); análise comparativa para marcação tubular de TUNEL entre camundongos (B) SV (n=5), HT (n=6) e HTG- (n=5), e (E) NC (n=7), CI (n=6) e CIG- (n=6); e análise comparativa para a área de fibrose intersticial renal entre camundongos (C) SV (n=8), HT (n=11) e HTG- (n=7), e (F) NC (n=9), CI (n=7) e CIG- (n=7). (G) Imagens representativas de tecido renal para marcação de Ki-67. (H) Imagens representativas de tecido renal para marcação de TUNEL. (I) Imagens representativas em tecido renal para marcação de Picrosírius à luz polarizada. G-H: Magnificação original, x400; detalhe, x800. Dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, com resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. A-C: **p<0,01 vs SV; ***p<0,001 vs SV; †p<0,05 vs HT. D-F: *p<0,05 vs NC; ***p<0,001 vs NC. †p<0,05 vs CI.

Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos em camundongos $Pkd1^{+/-}$ e $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, seus respectivos duplos-mutantes e seus controles; e índice cístico renal em camundongos $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$ e $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}$

Parâmetros	SV (n=8)	HT (n=12)	HTG- (n=8)	NC (n=9)	CI (n=7)	CIG- (n=9)
Dados bioquímicos						
S_U (mg/dL)	55,2 (46,5-64,3)	54,9 (52,0-65,7)	71,9 (44,7-74,7)	60,4 (56,1-70,3)	65,2 (54,1-70,7)	68,5 (59,5-80,1)
S_{Na} (mEq/L)	141,0 (140,0-142,0)	140,5 (140,0-142,0)	141,0 (138,0-141,0)	138,0 (134,5-140,5)	140,0 (140,0-141,0)	140,0 (138,5-142,5)
S_K (mEq/L)	4,2 (4,1-4,3)	4,4 (4,1-4,9)	4,3 (4,2-4,4)	4,9 (4,6-5,4)	4,8 (4,5-5,7)	5,0 (4,8-5,2)
S_{Cl} (mEq/L)	107,1±3,3	104,5±5,1	109,3±3,8	107,6±4,1	106,2±5,0	108,7±5,6
FE_{Na} (%)	0,58 (0,46-0,76)	0,76 (0,37-1,01)	0,78 (0,39-1,29)	0,47 (0,38-0,60)	0,52 (0,26-0,64)	0,78 (0,33-1,59)
FE_K (%)	31,5 (29,9-39,7)	36,2 (34,2-57,9)	47,2 (26,0-77,4)	29,0 (24,2-31,5)	24,2 (17,9-31,8)	56,60 (19,9-67,3)
FE_{Cl} (%)	0,73 (0,61-0,80)	0,80 (0,45-1,13)	0,97 (0,59-1,88)	0,62 (0,52-0,78)	0,74 (0,34-1,04)	0,85 (0,69-1,17)
Ultrassonografia renal						
Índice cístico (%)	Não se aplica ^a				5,82 (3,64-9,94)	10,02 (2,61-13,63)

S_U: uréia sérica. S_{Na}: Na⁺ sérico. S_K: K⁺ sérico. S_{Cl}: Cl⁻ sérico. FE_{Na}: fração de excreção de Na⁺. FE_K: fração de excreção de K⁺. FE_{Cl}: fração de excreção de Cl⁻. ^aAnimais SV, HT, HTG- e NC não apresentaram cistos renais à ultrassonografia. O índice cístico foi comparado pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartis. Os demais dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com resultados apresentados como mediana e intervalo interquartis. Dados paramétricos foram comparados com o teste ANOVA, com resultados expressos em média e desvio-padrão.

4.9 *Knockout para *Lgals3* resgata os fenótipos renais de proliferação celular, apoptose e fibrose em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1**

A ausência de Gal-3 resgatou o fenótipo de proliferação celular tubular em rins HTG-, diminuindo sua taxa [44,29 (23,59-57,73)] em comparação a rins HT ($p<0,05$), e levando-a a níveis similares aos de camundongos SV (Figura 12). O mesmo efeito foi observado em camundongos CIG-, que apresentaram uma taxa de proliferação tubular menor [10,97 (9,19-14,94)] que animais CI ($p<0,05$), e equivalente à de rins NC (Figura 12).

KO para *Lgals3* também resgatou o fenótipo relacionado à apoptose tubular em rins HTG-, reduzindo sua taxa [2,88 (1,40-4,79)] em comparação à de rins HT ($p<0,05$); tendência similar foi observada para rins CIG- (Figura 12).

O fenótipo de fibrose renal intersticial também foi resgatado em animais HTG-, revelando índices menores [0,10% (0,09-0,16)] que os de animais HTs ($p<0,05$) e se aproximando dos valores basais de camundongos SV (Figura 12). Tendência similar foi encontrada em rins CIG-.

Não foram detectadas diferenças para FE_{Na} , FE_K and FE_{Cl} entre camundongos HTG- e HT e entre animais CIG- e CI (Tabela 4). A análise ultrassonográfica, por sua vez, também não revelou diferença de índice cístico renal entre camundongos CIG- e CI (Figura 11, Tabela 4).

4.10 Knockout para *Lgals3* prolonga a sobrevida e diminui apoptose cardíaca e fibrose renal no camundongo *Pkd1*^{V/V}

A gravidade da doença em camundongos VV nos permitiu avaliar a influência do KO de *Lgals3* sobre a sobrevida desses animais. Notavelmente, a supressão sistêmica da expressão de Gal-3 aumentou sua sobrevida, estendendo-a de 21 dias (d) (20-24) em camundongos VV para 30 d (26-33) em animais VVG- ($p<0,001$) (Figura 13).

Interessantemente, camundongos VV apresentaram maior taxa de apoptose cardíaca que animais SV em P18 [36,94 (31,85-40,61) *vs* 17,33/10000 células (11,07-18,07); $p<0,01$], um fenótipo resgatado pela ausência de expressão de Gal-3 no camundongo VVG- [21,56/10000 (13,86-23,21); $p<0,05$] (Figura 14). Não houve, todavia, diferença na taxa de fibrose cardíaca entre animais VV e VVG- (Figura 14).

Embora os níveis de uréia sérica dos animais VV e VVG- tenham sido mais elevados que os controles SV, não apresentaram diferença entre si em P18 (Figura 14). A taxa de proliferação tubular renal, contudo, foi mais alta em camundongos VV que em seus controles SV [24,87 (22,92-27,54) *vs* 8,40/100 células (7,86-9,19); $p<0,001$], um fenótipo também resgatado nos animais VVG- [14,46 (12,44-16,79); $p<0,05$ *vs* VVs] (Figura 14). Um padrão similar foi observado para a taxa de apoptose tubular, que se mostrou maior em rins de camundongos VV que em rins SV [117.4 (98.5-134.5) *vs* 4.1/10000 células (1.5-4.5); $p<0.001$], enquanto uma tendência de resgate foi verificada em animais VVG- (Figura 14). Um maior índice de fibrose intersticial também foi observado em rins VV comparados a rins SV em P18 [1.88% (1.62-2.83) *vs* 0.08% (0.06-0.12); $p<0.001$], acompanhado de uma tendência de resgate deste fenótipo para animais VVG- (Figura 14).

Figura 13 - Curva de sobrevida dos animais $Pkd1^{V/V}$ e $Pkd1^{V/V}:Lgals3^{-/-}$. A mediana de sobrevida foi de 21 dias (20-24) para camundongos VV (n=22) e de 30 dias (26-33) para animais VVG- (n=22). Os dados foram comparados com o teste de Log-rank. ***p<0,001 vs VV.

Figura 14 - Fenótipos cardíaco e renal em camundongos $Pkd1^{+/+}$, $Pkd1^{V/V}$ e $Pkd1^{V/V};Lgals3^{-/-}$ em P18. Análise comparativa para (A) marcação para TUNEL em tecido cardíaco entre camundongos SV (n=5), VV (n=6) e VVG- (n=7); (B) área de fibrose intersticial em tecido cardíaco entre camundongos SV (n=5), VV (n=6) e VVG- (n=7); (C) uréia sérica entre camundongos SV (n=5), VV (n=6) e VVG- (n=8); (D) marcação para Ki-67 em tecido renal entre animais SV (n=5), VV (n=6) e VVG- (n=8); (E) marcação para TUNEL em tecido renal entre animais SV (n=5), VV (n=5) e VVG- (n=6); e (F) área de fibrose intersticial em tecido renal entre animais SV (n=5), VV (n=6) e VVG- (n=8). Imagens representativas para (G) expressão de Gal-3 em coração; (H) marcação para TUNEL em coração; (I) marcação para Picrosírius em coração; (J) expressão de Gal-3 em rim; (K) marcação para Ki-67 em rim; (L) marcação para TUNEL em rim; (M) marcação para Picrosírius em rim. Magnificação original, x400; detalhe, x800. Dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, com resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ vs SV; ** $p < 0,01$ vs SV; *** $p < 0,001$ vs SV; † $p < 0,05$ vs VV.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o entendimento dos mecanismos envolvendo a formação e o crescimento cístico renal na DRPAD avançou substancialmente (Torres et al., 2009). O surgimento de novos agentes farmacológicos, com benefício comprovado em estudos pré-clínicos, vem permitindo a realização de estudos clínicos com impacto potencial sobre a progressão da doença renal na DRPAD (Torres et al., 2012; Walz et al., Serra et al., 2010; Hogan et al., 2010; Cadnapaphornchai et al., 2014). Um número consideravelmente menor de estudos, contudo, investigaram as bases patogênicas das anormalidades cardiovasculares associadas a esta doença, apesar destas manifestações se responsabilizarem pela maior parte dos óbitos e resultarem em morbidade significativa em pacientes com DRPAD (Fick et al., 1995; Perrone et al., 2001). Além disso, a maior parte da atenção destinada a esta área tem se dirigido à patogênese da hipertensão arterial associada à DRPAD, enquanto os mecanismos básicos implicados na disfunção cardíaca relacionada à doença têm recebido poucas contribuições (Paavola et al., 2013).

Com o objetivo de elucidar aspectos fundamentais deste problema clínico importante, avaliamos o fenótipo cardíaco em dois modelos de camundongo viáveis ortólogos à DRPAD humana. Esses modelos foram estrategicamente complementares, permitindo a análise da estrutura e função cardíaca em cenários distintos de deficiência de *Pkd1*: camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* apresentam diminuição homogênea da atividade gênica, não associada a cistogênese renal nem a elevação da pressão arterial, enquanto animais *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre} apresentam cistos renais e hipertensão arterial associados a função renal preservada, mimetizando a doença humana. Estes camundongos desenvolvem o fenótipo cístico devido à inativação renal em mosaico do gene *Pkd1*, porém seu *background* celular sistêmico é heterogêneo, constituindo-se de células *knockout* para *Pkd1* (em menor número) e células selvagens (em maior número) (Fonseca et al., 2014).

Nossas análises ecocardiográficas revelaram uma menor FEVE em camundongos HT e CI que em seus respectivos controles, achados consistentes com a presença de disfunção sistólica nos dois modelos de deficiência gênica. Além disso,

o aumento da relação E/A e a redução do TD em animais císticos evidenciaram disfunção diastólica neste modelo. Uma tendência similar foi observada em camundongos haploinsuficientes. Em conjunto, esses resultados sugerem que diferentes perfis de deficiência de *Pkd1* possam levar à disfunção sistólica. Hipertensão arterial, por sua vez, parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de disfunção diastólica, enquanto os *backgrounds* deficientes em *Pkd1* podem contribuir para este fenótipo.

Apesar de não apresentarem pressão arterial elevada, camundongos HT também desenvolveram aumento da MVE. Este achado sugere que a resposta hipertrófica de ventrículo esquerdo observada na DRPAD possa prescindir do desenvolvimento prévio de hipertensão. Esses dados estão de acordo com um estudo recentemente publicado por Paavola et al. (2013), que reportou uma maior prevalência de miocardiopatia dilatada idiopática em pacientes com DRPAD.

Com base em novas técnicas ecocardiográficas, análises da deformação miocárdica (*strain*) têm recentemente aprimorado a avaliação da performance miocárdica, sobretudo por sua maior sensibilidade que a da ecocardiografia convencional (Bauer et al., 2011). De fato, a aplicação dessa nova metodologia em nosso estudo adicionou informações e permitiu uma análise mais acurada do fenótipo cardíaco. Tanto animais HT como CI apresentaram menor deformação miocárdica que seus respectivos controles, estabelecendo associação entre deficiência de *Pkd1* e um perfil patológico de *strain* e corroborando os resultados prévios. Esses resultados reproduzem, em certa dimensão, achados de outros trabalhos que utilizaram esta técnica para detecção precoce de alterações cardíacas em roedores e pacientes com miocardiopatias relacionadas a outras desordens (Kramann et al., 2014).

A medida invasiva da pressão arterial permitiu também a análise do barorreflexo, mecanismo responsável pelo controle de curto prazo das oscilações na pressão arterial. Interessantemente, a tendência de menor índice de efetividade do barorreflexo detectada em camundongos HT pode ampliar as implicações de nosso estudo, sugerindo que anormalidades associadas à deficiência de *Pkd1* possam comprometer as respostas de curto prazo a instabilidades hemodinâmicas.

Duas conclusões fundamentais se destacam em nosso estudo. A primeira pauta-se na detecção de disfunção miocárdica em modelos de camundongo com diferentes perfis de deficiência de *Pkd1*, associados ou não a pressão arterial elevada, sugerindo que a atividade de PC1 precise estar preservada nos níveis celular e tecidual cardíaco para impedir o desenvolvimento de miocardiopatia. Essa dependência pode ser provavelmente também aplicada à deficiência de *Pkd2*, uma vez que a redução da atividade de PC2 induzida por *knockdown* em peixes paulistinhas resultou em diminuição do débito cardíaco e bloqueio átrio-ventricular (Paavola et al., 2013). Além disso, neste mesmo estudo observou-se que pacientes com DRPAD tipo 2 apresentaram maior prevalência de miocardiopatia dilatada idiopática quando comparados à população geral. Esses autores mostraram que PC2 regula a homeostase do Ca^{++} intracelular, sugerindo que anormalidades nesse processo possam contribuir para a progressão à insuficiência cardíaca. Nesse cenário, postulamos que a deterioração cardíaca observada em animais deficientes em *Pkd1* compartilhe mecanismo similar. Estudos futuros, portanto, deveriam analisar a ciclagem do Ca^{++} intracelular no miocárdio de animais HT e CI. A segunda conclusão fundamental é de que a disfunção cardíaca, embora presente em ambos os modelos, foi mais grave nos animais hipertensos CI. Esta observação sugere que a disfunção cardíaca observada na DRPAD esteja associada a dois componentes: um efeito primário, dependente da diminuição da atividade funcional da PC1, e um efeito secundário associado ao curso crônico da hipertensão arterial. As observações de que pacientes com DRPAD normotensos apresentam maior prevalência de hipertrofia ventricular esquerda que controles saudáveis (Chapman et al., 1997; Bardají et al., 1998) e de que indivíduos portadores de DRPAD hipertensos apresentam complicações cardiovasculares mais frequentes que aqueles normotensos apóiam fortemente essa conclusão (Schrier, 2009).

PC1 atua como um modulador crítico de proliferação celular, apoptose e fibrose (Gallager et al., 2010); alterações nesses processos, por sua vez, podem estar potencialmente envolvidos no desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Narula et al., 2006). Investigamos esta hipótese em nossos modelos animais com deficiência em *Pkd1*. A ausência de proliferação celular no miocárdio dos animais CI e HT sugere que alterações neste processo não contribuam para o fenótipo cardíaco

observado. Embora o índice de fibrose cardíaca tenha se mostrado elevado em ambos os modelos, esta alteração foi discreta e não se acompanhou de expressão aumentada de TGF- β 1. Essas observações caracterizam um fenótipo cardíaco muito menos grave do que aqueles observados em outras doenças cardíacas (Martos et al., 2007). Hassane et al., por outro lado, observaram índices elevados de fibrose e sinalização aumentada da via TGF- β 1/Smad em tecido renal de animais deficientes em *Pkd1* e pacientes com DRPAD (Hassane et al., 2010). Nossos dados, associados às observações desses autores, sugerem que a fibrose e a ativação de TGF- β 1 não sejam tão intensos em tecido cardíaco de camundongos deficientes em *Pkd1* quanto o são em tecido renal, sugerindo que fibrose não seja um contribuinte decisivo para o desenvolvimento das anormalidades cardíacas. Nossos dois modelos, contudo, apresentaram apoptose cardíaca aumentada, sugerindo que a morte celular programada desempenhe um papel importante no desenvolvimento da disfunção cardíaca associada à deficiência de *Pkd1*.

Galectinas são proteínas de baixo peso molecular pertencentes à família das lectinas. Neste grupo destaca-se a galectina-3 (Gal-3), proteína com características multifuncionais (Krzeslak; Lipinska, 2004; Dunic et al., 2006). No nível intracelular, Gal-3 regula a expressão gênica e modula o ciclo celular e apoptose. No meio extracelular, por outro lado, tem papel na regulação da organogênese, particularmente nas interações célula-célula e célula-matriz (Krzeslak; Lipinska, 2004; Dunic et al., 2006).

Várias evidências tem destacado o papel da Gal-3 na patogênese de doenças cardíacas e renais. Em um modelo de miocardiopatia hipertensiva, *Lgals3* foi um dos genes mais expressos (Schroen et al., 2004). *Knockout* de Gal-3, por sua vez, atenuou a insuficiência cardíaca em ratos REN-2 (Yu et al., 2013), enquanto a infusão direta de Gal-3 no saco pericárdio induziu insuficiência cardíaca em animais controles (Sharma et al., 2004). Interessantemente, níveis circulantes elevados desta molécula têm sido associados a doenças cardíacas e renais incidentes, caracterizando Gal-3 como um biomarcador (de Boer et al., 2009; O'Seaghdha et al., 2013).

A partir das observações mencionadas, formulamos a hipótese de que Gal-3 pudesse atuar como modificador dos fenótipos cardíaco e renal da DRPAD. A

investigação desta possibilidade tornou-se possível por meio da geração dos animais HTG- e CIG-. Ambos os modelos duplos-mutantes apresentaram melhora da função sistólica em comparação a HT e CI, um achado associado à diminuição da apoptose e fibrose em tecido cardíaco. O retorno dos parâmetros de função sistólica a valores não diferentes dos encontrados nos controles SV e NC, por sua vez, permitem concluir que *knockout* para Gal-3 promoveu o resgate deste fenótipo. Constatamos que a deformação miocárdica (*strain*) também foi resgatada em ambos os modelos, porém com maior intensidade nos camundongos CIG-. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a correção da taxa de apoptose desempenhe um papel fundamental nos efeitos de resgate funcional e de *strain* associados ao *knockout* de Gal-3. Estudos futuros serão necessários, todavia, para elucidar se esses efeitos decorrem da abolição da interação física entre Gal-3 e PC1 ou da atenuação de vias pró-apoptóticas direta ou indiretamente moduladas pela Gal-3.

Disfunção diastólica, por outro lado, foi observada nos camundongos CI, enquanto tendência similar foi detectada em animais HT. Apenas os camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*, entretanto, se beneficiaram do *knockout* para Gal-3. Esses resultados sugerem que as alterações diastólicas sejam provavelmente não determinadas pela taxa de apoptose aumentada, e que o mecanismo primário de resgate observado em animais HT seja distinto do que ampara o resgate da função sistólica. Interessantemente, o efeito da Gal-3 no fenótipo cardíaco em nossos animais deficientes em *Pkd1* não seguiu o efeito protetor da Gal-3 proposto anteriormente para rins de camundongos *cpk* (Chiu et al., 2006). As razões para explicar esta diferença órgão-específica, no entanto, permanecem incertas. A expressão aumentada da expressão de Gal-3 em tecido cardíaco CI mas não HT comparada a seus controles sugere, por sua vez, que os níveis teciduais de Gal-3 possam modular quantitativamente a disfunção cardíaca, uma vez que o comprometimento miocárdico foi maior em camundongos CI que HT. A melhora no IEB-dim também foi detectada em animais HTG-, sugerindo que o *knockout* para a Gal-3 possa permitir uma melhor efetividade no controle das oscilações de pressão arterial neste modelo.

Knockout para Gal-3 não mostrou impacto sobre os níveis séricos de uréia em camundongos HT e CI. A ausência aparente de disfunção renal nesses modelos,

entretanto, não permite conclusões definitivas sobre os efeitos potenciais da supressão de Gal-3 sobre a TFG. Não foram constatadas, também, diferenças na FE_{Na} , FE_K e FE_{Cl} entre animais CI e NC e entre camundongos HT e SV, embora um estudo prévio tenha observado uma maior FE_{Cl} em animais *knockout* para Gal-3 (Bichara et al, 2006). Destaca-se, ainda, o fato de animais CIG- não terem apresentado elevação do índice cístico quando comparados a camundongos CI. Este achado se contrapõe aos resultados obtidos anteriormente para o camundongo *cpk*, modelo em que a ausência de Gal-3 se traduziu em aumento do índice cístico renal (Chiu et al., 2006). Embora ainda não tenhamos explicação para essa diferença, devemos considerar que o fenótipo cístico discreto do modelo CI pode ter contribuído para a mesma e que o camundongo *cpk* constitui um modelo não ortólogo à DRPAR humana. Embora sem repercussões funcionais, constatou-se que *knockout* para Gal-3 reduziu as taxas de proliferação, apoptose e fibrose em rins de camundongos HT e diminuiu a taxa de proliferação tubular em animais CI, além de ter se acompanhado de tendências de redução para apoptose e fibrose intersticial em rins CI. Nesse contexto, períodos de observação mais longos são necessários para investigar potenciais implicações desses achados na progressão da função renal.

Este estudo também investigou os fenótipos renal, cardíaco e sistêmico nos animais gravemente císticos VV. Animais VVG- apresentaram aumento da sobrevivência quando comparados a camundongos VV, caracterizando um resgate parcial do fenótipo sistêmico determinado por *knockout* de Gal-3. Embora o principal contribuinte para este efeito ainda seja incerto, melhoras dos fenótipos cardíaco e renal são bons candidatos para tal, uma vez que camundongos VVG- apresentaram taxa de apoptose cardíaca reduzida e rins VVG- mostraram taxa de proliferação diminuída em comparação a animais VV. Deve-se considerar, ainda, que as diferenças mencionadas poderiam se tornar mais robustas ou significantes em idades superiores a P18, momento em que os dados apresentados foram obtidos.

Nossos achados demonstram a existência de disfunção cardíaca e de um padrão anormal de deformação miocárdica em modelos de camundongo com diferentes perfis de deficiência em *Pkd1*. Nossos resultados também sugerem que um efeito primário, dependente da atividade diminuída de PC1, e um secundário, resultante da ação de longo prazo da hipertensão arterial, possam desempenhar

papeis significativos no desenvolvimento deste fenótipo. Mostramos, ainda, que *knockout* para Gal-3 resgata os fenótipos normais de função sistólica e de *strain* em camundongos císticos e haploinsuficientes, efeitos associados à redução da apoptose cardíaca, e prolonga a sobrevida de animais VV. Dada a natureza ortóloga dos modelos de deficiência de *Pkd1* avaliados neste estudo, nossos dados não apenas ampliam o entendimento do fenótipo cardíaco na DRPAD humana, como também lançam as bases para futuros estudos sobre o uso de galectina-3 como biomarcador e como alvo de novas terapias dirigidas à disfunção cardíaca nesta doença.

6 CONCLUSÕES

1. Nossos achados demonstram a existência de disfunção cardíaca e de um padrão anormal de deformação miocárdica em modelos de camundongo com diferentes perfis de deficiência em *Pkd1*.
2. Nossos resultados sugerem que um efeito primário, dependente da atividade diminuída de PC1, e um secundário, resultante da ação de longo prazo da hipertensão arterial, possam desempenhar papéis significativos no desenvolvimento da disfunção cardíaca em camundongos deficientes em *Pkd1*.
3. *Knockout* para Gal-3 resgata os fenótipos normais de função sistólica e de *strain* em camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1*.
4. O resgate do fenótipo cardíaco desenvolvido por camundongos haploinsuficientes e císticos deficientes em *Pkd1*, promovido por *knockout* para Gal-3, se associa à redução da apoptose cardíaca.
5. *Knockout* para Gal-3 prolonga a sobrevivência de camundongos *Pkd1*^{V/V}.
6. Dada a natureza ortóloga dos modelos de deficiência de *Pkd1* avaliados neste estudo, nossos dados ampliam o entendimento do fenótipo cardíaco na DRPAD humana.
7. Considerando a natureza ortóloga dos modelos estudados, nossos achados abrem perspectivas de estudo para o uso potencial de Gal-3 como biomarcador e como alvo para futuras terapias dirigidas à disfunção cardíaca nesta doença.

7 ANEXO

Cardiac Dysfunction in *Pkd1*-Deficient Mice and Phenotype Rescue by Galectin-3 Knockout

Bruno Eduardo Pedroso Balbo¹, Andressa Godoy Amaral¹, Jonathan Mackowiak Fonseca¹, Isac de Castro¹, Vera Maria Cury Salemi², Leandro E Souza², Fernando dos Santos², Maria Cláudia Costa Irigoyen², Feng Qian³, Roger Chammas⁴, Luiz Fernando Onuchic^{1,5}.

¹Divisions of Nephrology and Molecular Medicine, Department of Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

²Department of Cardiopneumology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, School of Medicine São Paulo, Brazil

³Division of Nephrology, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

⁴Center for Translational Research in Oncology, Cancer Institute, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

⁵Center for Cellular and Molecular Studies and Therapy (NETCEM), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Running title: Heart dysfunction in *Pkd1* deficiency

Word count (abstract): 250

Word count (text): 3552

***Corresponding author:**

Luiz Fernando Onuchic, MD, PhD

Departamento de Medicina, Divisões de Nefrologia e Medicina Molecular

Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina

Avenida Dr. Arnaldo, 455 – Sala 4304. São Paulo, SP, 01246-903. Brazil

Phone: 55-11-3061-8399. Fax: 55-11-3061-8361. Email: lonuchic@usp.br

ABSTRACT

Myocardial abnormalities stand out among ADPKD cardiovascular manifestations. To elucidate their pathogenesis, we analyzed the cardiac phenotype in distinct models of *Pkd1*-deficiency. We evaluated *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} (CY) cystic, hypertensive mice at 20-24 weeks of age, and *Pkd1*^{+/-} (HT) noncystic mice at 10-13 weeks, a model of haploinsufficiency. Conventional and speckle-tracking echocardiographic analyses revealed decreased left ventricle ejection fraction and cardiac deformability in CY and HT mice, as well as E/A ratios and deceleration times consistent with diastolic dysfunction in CYs, when compared to their controls *Pkd1*^{cond/cond} (noncystic; NC) and *Pkd1*^{+/+} (wild type, WT). CY and HT hearts presented higher apoptotic rates and mild fibrosis, without TGF- β 1 increased expression. In this scenario, we investigated galectin-3 (Gal-3) as a potential modifier of the ADPKD cardiac phenotype. Double-mutants *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}.*Lgals3*^{-/-} (CYG-) and *Pkd1*^{+/-}.*Lgals3*^{-/-} (HTG-) displayed improved systolic and deformability parameters compared to single-mutants, while such values did not differ from NC and WT controls. HTG-s presented improvement in deceleration time. CYG- and HTG- hearts showed decreased apoptosis and fibrosis. Western blot analyses revealed higher Gal-3 expression in CY than NC hearts. CYG- and HTG- animals showed no difference in serum urea nitrogen compared to CYs and HTs. We also analyzed a more severe cystic model, homozygous for an allele that hinders polycystin-1 cleavage at the GPS site (*Pkd1*^{V/V}; VV), and showed that *Pkd1*^{V/V}.*Lgals3*^{-/-} mice present longer survival than VVs. Our findings demonstrate myocardial dysfunction and abnormal deformability in different *Pkd1*-deficient models, reproducing human ADPKD, and reveals that suppression of Gal-3 expression significantly rescues this phenotype.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common monogenic renal disease, affecting 1 in 400-1,000 individuals (1). Mutations in one of two genes, *PKD1* (*Polycystic kidney disease 1*) or *PKD2*, cause this disorder, and 85% of the cases are linked to *PKD1* in clinically identified populations (1, 2). Kidney cysts result in progressive distortion of the parenchyma and loss of nephron units, which, in association with inflammation and fibrosis, contributes to a gradual decline in renal function (3). Extrarenal manifestations are also common, including liver cysts, intracranial aneurysms and other cardiovascular abnormalities (4).

Following the availability of renal replacement therapy, cardiovascular disease became the most common cause of death in ADPKD (5, 6). Systemic arterial hypertension (SAH) is an early finding, occurring in ~60% of patients prior to a significant decline in glomerular filtration rate (GFR) (7). Left ventricular hypertrophy (LVH) and cardiac valve abnormalities are also often observed (8, 9), while idiopathic dilated cardiomyopathy constitutes a finding just recently described (10).

Polycystin-1 (PC1) and polycystin-2 (PC2), the *PKD1* and *PKD2* protein products, are essential for the development of the heart (11, 12). Homozygous *Pkd1* and *Pkd2* knockout (KO) mice, in fact, exhibit embryonic lethality due to severe cardiac defects (13-15). Few studies, however, have addressed the potential heart abnormalities in viable animal models orthologous to ADPKD (10, 15-18). Critical points relating *Pkd1/Pkd2* deficiency, including human ADPKD, and cardiac function and structure, therefore, remain to be elucidated. To address this fundamental concept, we sought to analyze the cardiac phenotype in three mouse models with distinct profiles of *Pkd1*-deficiency: noncystic *Pkd1*-haplonsufficient (18-20), cystic *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre} (18, 19, 21) and severely cystic *Pkd1*^{V/V} mice (22).

Galectin-3 (Gal-3) has recently emerged as a key regulator of fibrosis through its transforming growth factor (TGF)- β -mediated effects in heart, liver and kidney (23-25). Elevated Gal-3 circulating levels, moreover, have been associated with heart failure (26) and, in the renal context, with incident chronic kidney disease and rapid GFR decline in nephropathies (27). The interaction between Gal-3 and PKD has been previously explored (28). This protein plays a role in terminal differentiation of collecting ducts and is expressed in cyst epithelia, where it associates with primary cilia. Interestingly, Gal-3 KO aggravated the cystic phenotype in *cpk* mice, a model nonorthologous to autosomal recessive PKD (28).

Based on the reported observations, we postulated that Gal-3 could potentially be a modifier of cardiac and renal phenotypes resulting from *PKD1/Pkd1*-deficiency. In the present work, therefore, we also evaluated the interaction between *Pkd1* and *Lgals3* at the cardiac and renal levels, by knocking out *Lgals3* in each of the *Pkd1*-deficient models. Our results revealed that *Pkd1*-haplonsufficient and *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre} mice develop cardiac abnormalities that mimic human ADPKD. Notably, this phenotype was rescued by knocking out Gal-3, an effect associated with decrease in apoptosis and fibrosis. In the *Pkd1*^{V/V} model, moreover, which includes early end-stage renal disease and mortality, we showed that Gal-3 KO improved survival, a finding associated with apoptosis decline in heart and cell proliferation reduction in kidney. Our data suggest that different patterns of *Pkd1*

deficiency can lead to cardiac dysfunction and that Gal-3 has a role in intensifying such a phenotype and limiting survival, effects potentially applicable to human ADPKD.

RESULTS

Pkd1-deficient mouse models and double mutants associated with Lgals3 knockout

We have used three mouse models with distinct patterns of *Pkd1* deficiency to investigate the potential effects of different *Pkd1* expression deficits on cardiovascular and renal phenotypes. These models were also bred to *Lgals3* KO animals to generate double mutants that allowed evaluation of potential genetic interaction between the two loci. All mouse lines were established on the C57BL/6 background and all experiments were performed in males.

The first model, a heterozygous mouse with a null mutation (*Pkd1*^{+/-}; HT), reproduces the systemic *Pkd1*-haploinsufficient background found in ADPKD1 patients but with no renal cysts by 15 weeks (wk) of life. Wild-type littermates (*Pkd1*^{+/+}; WT) were used as controls. Homozygous mice for a *Pkd1*-floxed allele, in turn, with a mosaic pattern of gene inactivation driven by a Nestin-Cre transgene and excision of exons 2-4 (*Pkd1*^{cond/cond}; Nestin^{cre}; CY) (18, 19), developed a milder renal phenotype in our animal-care facility than in another center (18, 21). The CY mice present cystic kidneys and early hypertension (18), reproducing the ADPKD phenotype, however do not have a systemic *Pkd1*-haploinsufficiency background. Noncystic animals (*Pkd1*^{cond/cond}; NC) were their controls. The third model, represented by homozygous mice for a *Pkd1*-knockin hypomorphic allele that prevents PC1 cleavage at the GPS site (*Pkd1*^{V/V}, VV), develop early-onset, post-natal, massive cystic disease, characterized by distal nephron involvement, uremia and early mortality (22).

To combine the described *Pkd1*-deficient models to the absence of Gal-3 expression, we bred them with homozygous mice for a *Lgals3*-null mutation (*Lgals3*^{-/-}, G-) (29), generating *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-} (HTG-), *Pkd1*^{cond/cond};*Lgals3*^{-/-} (CYG-) and *Pkd1*^{V/V};*Lgals3*^{-/-} (VVG-) double mutants.

Pkd1-haploinsufficient and Pkd1-deficient cystic mice display systolic and diastolic dysfunction as well as abnormal myocardial deformation

Echocardiographic analyses revealed reduced left ventricle ejection fraction (LVEF) in HT compared to WT mice (43.2±8.2% vs 55.3±8.5%; p<0.01) and in CY compared to NC animals (44.1±14.4% vs 62.3±8.1%; p<0.01) (Figure 1, Table 1), demonstrating systolic dysfunction. The E/A wave ratio was higher in CY than NC mice (1.74 [1.45-2.25] vs 1.21 [1.11-1.30]; p<0.001); whereas a similar trend was detected in HTs (Figure 2, Table 1). These data were supported by the finding of shorter mitral valve deceleration time (DT) in CY mice (20.1±2.3 vs 25.9±2.2 ms; p<0.01); the same trend was observed in HTs.

CY mice showed a higher myocardial performance index (MPI) compared to NCs (0.73±0.12 vs 0.40±0.21; p<0.01), a finding consistent with global cardiac dysfunction (Table 1). E/e' wave ratios were also higher in CY than NC mice

(40.6 ± 7.2 vs 24.7 ± 8.7 ; $p < 0.05$) and in HTs than WT (40.3 ± 10.3 vs 28.4 ± 4.4 ; $p < 0.01$). HT mice displayed LV hypertrophy (LVH) compared with WT (78.2 ± 19.1 vs 58.6 ± 15.5 mg of LV mass (LVM); $p < 0.05$) (Table 1). These results are in line with a higher LV posterior wall diameter (LVPWD) in HT (0.73 mm [0.68 - 0.73]) than WT hearts (0.66 mm [0.55 - 0.69]; $p < 0.05$) (Table 1). No significant increase in LVM and LVPWD, however, were observed in CY mice.

Myocardial tissue deformation can be assessed as measures of tissue strain and strain rate (SR) (30-31). CY mice presented decreases in all but one strain parameters, and even this displayed a similar trend (Figure 3, Table 2). HT animals also showed reduced short axis radial SR and longitudinal strain compared with WT, and three other strain parameters followed the same trend.

Pkd1 deficiency can lead to primary and hypertension-related cardiac dysfunction

HT animals were shown not to be hypertensive at 13 wk of age in the 129Sv background (18). In this study we have confirmed this finding in the C57BL/6 background, by showing that the mean arterial pressure (MAP) difference between HT and WT mice was not significant (Figure 1, Table 3). These data suggest that the cardiac dysfunction of *Pkd1*-haploinsufficient mice is not primordially driven by long-term elevated blood pressure (BP); instead, it likely represents a primary abnormality associated with decreased *Pkd1* activity. We have previously shown that CY mice develop SAH by 5 wk of age in the C57BL/6 background (18). These animals were also documented to have higher MAP than NCs at 13 wk but, interestingly, only a trend was detected at 24 wk. This finding, confirmed in the present study (Figure 1, Table 3), has been interpreted as heart damage likely secondary to long-term SAH. The CY heart dysfunction, therefore, appears to have two components: one primarily dependent on decreased *Pkd1* activity and another secondary to long-term SAH.

BP invasive measurement allowed the analysis of baroreflex activity. HT mice displayed a nonsignificant trend of lower baroreflex effectiveness index (BEI) compared with WT, however the baroreflex sensitivity index (BRS) did not significantly change in both models compared with their controls (Table 3).

Pkd1-haploinsufficient and Pkd1-deficient cystic mice show increased cardiac apoptosis and interstitial fibrosis

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) analyses revealed higher apoptotic rates in HT than WT hearts (41.7 [28.5 - 60.3] vs $9.6/10,000$ cells [6.9 - 15.4]; $p < 0.01$) and in CY than NC organs (71.4 [42.8 - 81.4] vs $14.6/10,000$ cells [0 - 29.4]; $p < 0.01$) as well as (Figure 4). As expected, cardiac cell proliferation was virtually absent in both models and controls (data not shown).

The cardiac interstitial fibrosis index, assessed by Sirius red staining, was mild but higher in HT compared to WT hearts (0.21% [0.17 - 0.26] vs 0.06% [0.06 - 0.07]; $p < 0.01$) and in CY than NC mice (0.44% [0.41 - 1.02] vs 0.05% [0.03 - 0.06]; $p < 0.001$) (Figure 4).

Galectin-3 expression, but not TGF- β 1, is increased in $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$ hearts

Western blot analyses showed elevated Gal-3 expression in CY compared with NC hearts, a pattern not observed between HT and WT mice (Figure 5). TGF- β 1 expression, on the other hand, was heterogeneous within the groups and did not differ between the $Pkd1$ -deficient mice and their controls.

Lgals3 knockout largely rescues the heart phenotype in $Pkd1$ -haploinsufficient and $Pkd1$ -deficient cystic mice

HTG- mice displayed higher LVEF than HTs ($61.6 \pm 6.3\%$ vs $43.2 \pm 8.2\%$; $p < 0.001$), a pattern also observed in CYG- animals when compared with CYs (61.1 ± 5.3 vs $44.1 \pm 14.4\%$; $p < 0.05$) (Figure 1, Table 1). The values obtained in HTG-s and CYG-s reached equivalent levels to WT and NCs, indicating complete rescue of systolic function. The E/A ratio was lower in HTG- than HT mice ($1.36 [1.14-1.83]$ vs $1.98 [1.57-2.77]$; $p < 0.05$), while both E/A ratio and DT did not differ between HTG- and WT animals (Figure 2, Table 1). CYG- mice, however, did not show improvement in E/A ratio and DT compared to CYs (Figure 2, Table 1). The E/e' ratio was lower in HTG- than HT mice and MPI was decreased in CYG- compared to CY animals, a pattern consistent with cardiac function rescue.

In support to the rescuing effect of $Lgals3$ KO, almost all strain parameters were rescued in CYG- and HTG- mice (Figure 3, Table 2). In addition, LVM was not different between HTG- and WT mice (Figure 1, Table 1). The improvement effect was extended to down-ramp BEI in haploinsufficient mice, since higher values were observed in HTG- compared to HT mice (0.33 ± 0.09 vs 0.18 ± 0.07 ; $p < 0.05$) (Table 3). Our data suggest that the primary component of heart dysfunction is largely rescuable by removing Gal-3 expression, whereas the dysfunction imposed by SAH could be potentially influenced by the referred knockout.

The heart phenotype attenuation determined by $Lgals3$ knockout in $Pkd1$ -deficient mice is associated with reduction in apoptosis and fibrosis

Cardiac apoptotic rates were lower in HTG- than HT mice ($8.01 [6.58-17.87]$ vs $41.74/10,000$ cells [$28.54-60.35$]; $p < 0.001$) and in CYG- compared to CY animals ($17.27 [13.26-23.99]$ vs $71.36/10,000$ cells [$42.81-81.37$], reaching similar levels to WT and NCs (figure 4). These data support the rescue of apoptotic phenotype in both models by suppressing Gal-3 expression. Our analyses also revealed lower fibrotic indexes in HTG- than HT hearts ($0.04\% [0.03-0.05]$ vs $0.21\% [0.17-0.26]$; $p < 0.001$) and in CYG- compared to CY hearts ($0.10\% [0.07-0.14]$ vs $0.44\% [0.41-1.02]$; $p < 0.001$), approaching the WT and NC levels (Figure 4). Such findings also support a cardiac fibrosis phenotype rescue.

Renal phenotype in $Pkd1$ -haploinsufficient and $Pkd1$ -deficient cystic mice

Serum urea nitrogen (SUN) did not differ between HT and WT and between CY and NC mice (Figure 5, Table 4). No differences in fractional excretion of Na^+ (FE_{Na}), K^+ (FE_K) and Cl^- (FE_{Cl}) between such groups were detected either (Table 4). Ultrasound analysis confirmed absence of renal cysts in WT, HT and NC animals, showed no

cysts in HTG-s, and confirmed the presence of renal cysts in CY mice (Figure 6, Table 4).

A higher tubular cell proliferation rate was detected in HT than WT mice (135.40 [108.50-163.50] vs 27.08/10,000 cells [22.34-36.41]; $p<0.001$) and in CY than NC kidneys (97.28 [71.53-135.90] vs 27.66/10,000 cells [21.83-30.41]; $p<0.05$) (Figure 7). HT animals showed increased tubular apoptotic rates compared to WTs (11.95 [10.37-14.73] vs 2.93/10,000 cells [2.64-4.53]; $p<0.01$), a difference also found between CY and NC kidneys (18.04 [16.31-30.11] vs 2.81/10,000 cells [2.05-3.56]; $p<0.001$) (Figure 7). Though mild, renal fibrosis was higher in HT than WT mice (0.31% [0.21-0.44] vs 0.04% [0.02-0.04]; $p<0.001$) and in CYs than NCs (1.32% [0.73-2.47] vs 0.03% [0.01-0.05]; $p<0.001$) (Figure 7).

Lgals3 knockout rescues the tubular cell proliferation, apoptosis and fibrosis phenotypes in Pkd1-haploinsufficient and Pkd1-deficient cystic kidneys

The absence of Gal-3 rescued the tubular cell proliferation phenotype in HTG-kidneys, decreasing its rate (44.29 [23.59-57.73]) in comparison to HTs ($p<0.05$), and in CYG- mice, reaching lower values (10.97 [9.19-14.94]) than in CYs ($p<0.05$) (Figure 7). *Lgals3*-knockout also rescued the tubular apoptotic phenotype in HTG-kidneys, reducing its rate (2.88 [1.40-4.79]) when compared to HTs ($p<0.05$), while a similar trend was observed in CYG- kidneys (Figure 7). The renal interstitial fibrosis phenotype was also rescued in HTG- mice, displaying a lower index (0.10% [0.09-0.16]) than HTs ($p<0.05$), whereas a similar trend was detected in CYG- kidneys (Figure 7). No variations in FE_{Na} , FE_K and FE_{Cl} , however, were verified in HTG- and CYG- animals (Table 4). Ultrasound analyses, in turn, did not reveal different cystic indexes between CYG- and CY mice (Figure 6, Table 4).

Lgals3 knockout prolongs survival and decreases cardiac apoptosis and fibrosis in Pkd1^{V/V} mice

The systemic lack of Gal-3 expression increased survival, extending it from 21 days (d) [20-24] in VV to 30 d [26-33] in VVG- mice ($p<0.001$) (Figure 8). Interestingly, VV animals showed increased cardiac apoptosis than WTs at P18 (36.94 [31.85-40.61] vs 17.33/10,000 cells [11.07-18.07]; $p<0.01$), a phenotype that was rescued by Gal-3 suppression in VVG- mice (21.56/10,000 [13.86-23.21]; $p<0.05$) (Figure 9). We found no difference, however, in heart fibrosis (Figure 9).

Although higher than WTs, SUN did not differ between VV and VVG- mice at P18 (Figure 9). The rate of renal tubule cell proliferation was higher in VV than WT animals (24.87 [22.92-27.54] vs 8.40/100 cells [7.86-9.19]; $p<0.001$), a phenotype that was rescued in VVG-s (14.46 [12.44-16.79]; $p<0.05$ vs VVs) (Figure 9). A similar behavior was observed for the tubular apoptotic rate, with higher rates in VV than WT kidneys (117.4 [98.5-134.5] vs 4.1/10,000 cells [1.5-4.5]; $p<0.001$), while a trend of rescue was verified in VVG-s (Figure 9). A higher fibrotic index was also observed in VV than WT kidneys at P18 (1.88% [1.62-2.83] vs 0.08% [0.06-0.12]; $p<0.001$), with a trend of rescue shown in VVG-s (Figure 9).

DISCUSSION

In recent years, substantial progresses have been achieved towards the underlying mechanisms driving cyst formation and growth and the course of kidney disease in ADPKD (32). A considerably lower number of studies, however, have investigated the basis of cardiovascular abnormalities, in spite of their leading role in mortality and major play in morbidity associated with this disease (5-7). Moreover, most of the attention has been directed to SAH, while the basic mechanisms potentially implicated in ADPKD cardiac dysfunctions have received limited input (10). To elucidate fundamental aspects of this major problem, in the present study we evaluated the cardiac phenotype in two viable mouse models orthologous to ADPKD.

The models were complementary, allowing analyses of heart function and structure under two scenarios of *Pkd1*-deficiency: *Pkd1*-haploinsufficiency mice display homogeneous diminishment of gene activity, not associated with renal cystogenesis nor significantly elevated BP while *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} animals represent a mosaic cardiac background of *Pkd1*-knockout and *Pkd1*-wild-type cells, associated with SAH and preserved renal function (18). Echocardiography analyses revealed lower LVEF in HT and CY mice than their controls, supporting the presence of systolic dysfunction in both models. The findings of increased E/A ratio and decreased DT in CY animals, in addition, demonstrated diastolic dysfunction in these mice. A similar trend was observed in *Pkd1*-haploinsufficient mice. These results suggest that different profiles of *Pkd1*-deficiency can lead to systolic dysfunction. Hypertension, in turn, appears to play a role in diastolic dysfunction, while *Pkd1*-deficient backgrounds may contribute to it. Despite the absence of significantly elevated BP, HT mice also presented higher LVM. This finding suggests that the LV hypertrophic response observed in ADPKD may prescind from prior development of hypertension. Those data are in accordance with recently published data reporting increased prevalence of idiopathic dilated cardiomyopathy in ADPKD patients (10). Analysis of cardiac deformation has substantially improved the assessment of LV performance in recent time (30). Both HT and CY groups displayed lower heart deformability than their controls, corroborating the previously documented findings. These data reproduce early findings reported in rodents and patients with cardiomyopathies related to other disorders (31). Interestingly, the trend of lower BEI detected in HTs may extend the implications of our study, suggesting that vascular abnormalities associated with *Pkd1*-haploinsufficiency may impair short-term responses to hemodynamic instability.

Two conclusions with significant implications could be drawn from our findings. Firstly, cardiac dysfunction was detected in mouse models with different profiles of *Pkd1* deficiency, with and without increased BP, suggesting that PC1 activity must be preserved at the cell and the myocardium levels to preclude the development of cardiomyopathy. This dependence is likely also applied to *Pkd2*-deficiency, since the lack of PC2 in zebrafish led to low cardiac output and atrioventricular block and ADPKD2 patients are particularly prone to develop idiopathic dilated cardiomyopathy (10). These authors showed that PC2 regulates intracellular Ca⁺⁺ cycling, suggesting that the disruption of this process contributes to the progression of heart failure. In this scenario, we postulate that the cardiac deterioration observed in *Pkd1*-deficient animals may share a similar mechanism. Future studies, therefore,

should analyze intracellular Ca^{++} cycling in CY and HT hearts. The second conclusion is that cardiac dysfunction, although present in both models, was more severe in the hypertensive CY animals. This observation suggests that the cardiac dysfunction observed in ADPKD is associated with two components: a primary effect dependent on decreased PC1 activity and a secondary effect dependent on long-term SAH. Notably, the higher rate of LV hypertrophy verified in normotensive ADPKD patients than in healthy controls (8-9), as well as the increased prevalence of cardiac complications in hypertensive ADPKD individuals compared to normotensive ones (33), support this conclusion.

PC1 is a critical modulator of cell proliferation, apoptosis and fibrosis (32, 34); alterations in these cell processes, in turn, can be potentially involved in the development of heart failure (35, 36). This hypothesis was investigated in our *Pkd1*-deficient mice. The absence of cell proliferation changes in CY and HT hearts suggest that alterations in this process do not significantly contribute to the observed myocardial phenotype. Although heart fibrosis was increased in both models, this abnormality was mild and the expression of TGF- β 1 not increased, characterizing a fibrotic phenotype much less severe than those observed in other heart disorders (34). Hassane et al, on the other hand, reported significant fibrosis and elevated TGF- β /Smad signaling in kidneys of *Pkd1* animal models and ADPKD patients (34). Our and these authors' findings suggest that fibrosis and TGF- β activity are not as intense in *Pkd1*-deficient hearts as they are in kidneys, suggesting that fibrosis may not be a key contributor to the cardiac abnormalities. Our models, however, displayed significantly elevated cardiac apoptosis, suggesting that increased programmed cell death plays a major role in the development of the cardiac dysfunction associated with *Pkd1* deficiency.

The multifunctional protein Gal-3 is the most studied member of the galectin family (37, 38). Acting in the intracellular milieu, Gal-3 regulates gene expression, cell cycle and apoptosis, while its extracellular roles include regulation of organogenesis and cell-cell and cell-matrix interactions (37, 38). At the tissue level, in turn, this molecule has been reported to be involved in heart and kidney disorders. In failing hearts, *LGALS3* is one of the most overexpressed genes (39), *Lgals3* KO attenuates heart failure in REN2 rats (23), and Gal-3 infusion can induce cardiac dysfunction in normal hearts (40). Interestingly, higher Gal-3 circulating levels have been associated with incident heart and kidney diseases (27, 41), and characterized as a biomarker for cardiac disorders.

Based on the prior observations, we hypothesized that Gal-3 could be a modifier of the cardiac phenotype associated with ADPKD. The investigation of this possibility was enabled by the generation of *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre};*Lgals3*^{-/-} and *Pkd1*^{+/-};*Lgals3*^{-/-} mice. Both double mutants showed improved systolic performance compared to their respective single mutants, a finding associated with decreased cardiac apoptosis and fibrosis. The return of such parameters to the NC and WT baselines supported the rescue of such phenotypes by knocking out *Lgals3*. Myocardial deformability was also rescued in both models, with more intensity in CY mice. Taken together, our results suggest that the correction of the apoptotic rate played a major role in the functional and strain rescuing effects associated with Gal-3 KO. Additional studies are needed, however, to elucidate whether this effect occurs due to abrogation of a direct Gal-3-PC1 interaction or to the attenuation of pro-apoptotic pathways directly or indirectly modulated by Gal-3.

Diastolic dysfunction, on the other hand, was significant in CY mice and associated with a trend in HTs; only *Pkd1*-haploinsufficient animals, however, were benefited from knocking out Gal-3. These results suggest that the diastolic alterations are probably not determined by increased apoptosis, and that the primary rescuing mechanism observed in HTs is distinct from the one that underlies the rescue of systolic function. Interestingly, the Gal-3 effect on the heart phenotype of our *Pkd1*-deficient animals did not follow the previously proposed protective effect of Gal-3 on *cpk* mouse kidneys (28). The reasons to explain this organ-specific difference, however, are still unclear. The increased expression of Gal-3 in CY but not HT hearts compared to their controls suggests, in fact, that Gal-3 tissue levels may quantitatively modulate the cardiac dysfunction, since the heart is more severely affected in CYs than HTs. Improvement in down-ramp BEI was also observed in HTG- animals, suggesting that *Lgals3* KO may also improve the effectiveness of BP control in these mice.

Lgals3 KO showed no renal function impact on CY and HT mice. The lack of apparent renal dysfunction in both models, however, prevents definite conclusions about potential effects of Gal-3 on GFR. Notably, CYG- kidneys did not present increased cystic index compared with CYs, while in *cpk* mice Gal-3 KO led to a more severe renal cystic burden (28). While no clear reason for this differential effect is yet available, it must be noted that the relatively mild cystic phenotype in CYs may have contributed to it. Gal-3 KO, however, reduced cell proliferation, apoptosis and fibrosis in HT kidneys, decreased proliferation in CYs and similar apoptosis and fibrosis trends were detected in CYs. Longer observational periods, however, are necessary to investigate potential implications of such findings on the progression of renal function.

Our analyses were also extended to the severely cystic VV mice. VVG- animals displayed increased survival, characterizing a partial rescuing effect of the systemic phenotype by Gal-3 KO. Although the main contributor to this effect is yet uncertain, improvements in heart and kidney phenotypes are good candidates for it, since VVG-hearts presented decreased apoptotic rates and VVG- kidneys showed reduced cell proliferation rates compared to VVs. One must consider, moreover, that the mentioned differences might become more robust or significant at older ages than P18, when the presented data were obtained.

Our findings demonstrate cardiac dysfunction and abnormal myocardial deformability in mouse models with different profiles of *Pkd1* deficiency. Our results also suggest that a primary effect dependent on PC1 decreased activity and a secondary effect driven by long-term hypertension may play significant roles in the development of this phenotype. We have shown, in addition, that Gal-3 KO rescues the systolic dysfunction and the strain phenotypes in cystic and *Pkd1*-haploinsufficient mice, an effect associated with reduction in cardiac apoptosis, and prolongs survival of *Pkd1*^{V/V} animals. Given the orthologous nature of the evaluated *Pkd1*-deficient models, our data provide key insights to the understanding of the human ADPKD cardiac phenotype, as well as to the potential use of Gal-3 as a biomarker and as a target for future therapies directed to heart dysfunction in this disease.

CONCISE METHODS

Mouse models

We have previously reported a mouse line with a *Pkd1* null allele, characterized by the replacement of part of exon 2 and the entire exon 3 with lacZ cloned in frame to the remainder of exon 2 and followed by the neomycin resistance gene (*neor*) (18-20). A three-primer PCR assay was employed to genotype the animals. The absence of renal cysts in heterozygotes for the *Pkd1*-null mutation (*Pkd1*^{+/-}, HT) by 15 wk of age makes such animals a pure *Pkd1*-haploinsufficiency model (18).

The cystic mice were created based on the generation of a *Pkd1* floxed allele (*Pkd1*^{cond}) with lox P sites positioned in introns 1 and 4 (19). This *Pkd1*^{cond} line was crossed with mice carrying a nestin-Cre transgene. The expression of Cre recombinase, under the regulation of the nestin promoter, leads to excision of exons 2-4 following a mosaic pattern, with consequent formation of the inactive allele *Pkd1*^{del2-4}. The identification of the *Pkd1*/*Pkd1*^{cond} alleles and the nestin-Cre transgene was performed using specific PCR reactions. The relatively slow development of renal cysts in *Pkd1*^{cond/cond}:Nestin^{cre} animals, in turn, reproduces the human ADPKD phenotype.

The *Pkd1* knockin T3041V allele, obtained by the replacement of an ACT codon with a GTT one, prevents the autoproteolytic cleavage of polycystin-1 (PC1) at the GPS site (22). *Pkd1*^{V/+} mice show normal survival and display no kidney cysts. *Pkd1*^{V/V} homozygotes, on the other hand, present no gross phenotype by P8, but develop rapid and progressive distal nephron dilatation thereafter. This severe renal phenotype, translated into renal failure, is apparently responsible for the early mortality that occurs between the 2nd and 6th wk.

Lgals3^{-/-} mice have been previously reported, based on a null allele generated by interruption of exon 5 with the *neor* gene (29). These animals are fertile, have ~11% fewer glomeruli and present a higher urinary chloride excretion (42). The double-mutant mice were generated by breeding these mice with each of the *Pkd1*-deficient models.

All experiments were conducted in male mice to avoid potential gender-related heterogeneity. The current study was performed in accordance with international standards of animal care and experimentation.

Echocardiographic analyses

Echocardiographic analyses were performed using the Vevo 2100® (VisualSonics Inc, Toronto, Canada) device with a 40 mHz transducer, in *Pkd1*^{+/-}, *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-}:*Lgals3*^{-/-} mice at 12-13 wk of age and in *Pkd1*^{cond/cond}:Nestin^{cre}, *Pkd1*^{cond/cond} and *Pkd1*^{cond/cond}:Nestin^{cre}:*Lgals3*^{-/-} animals at 22-23 wk. The mice were anesthetized with a titratable mixture of oxygen and isoflurane and placed on a 40°C-heated plate at dorsal decubitus. Heart rate and the electrocardiographic trace were monitored aiming to a 400-bpm target and thoracic trichotomy was performed. Echocardiography was conducted with M-mode, color Doppler and tissue Doppler imaging (DTI), followed by the calculation of LVEF (%), LV fractional shortening (LVFS; %), LVM (g) and MPI (43).

Strain measures of myocardial deformation based on speckle-tracking

Extensional strain of a soft tissue in a pre-specified direction is defined as the change in length of a segment divided by its original length ($[L1-L0]/L0$), where strain rate (SR) is the rate of change of this deformation over time ($[L1-L0]/L0 \times s^{-1}$) (30). Using speckle-tracking based strain analysis of 2D gray scale echocardiographic images acquired from the parasternal long- and short-axis, strain and SR were quantified in the longitudinal, radial, and circumferential axes. Long-axis views provided the most reproducible myocardial views for longitudinal strain analyses in mice. All images were acquired at a rate of 200 frames/s and a depth of 11 mm, and image acquisition was conducted by a single trained investigator using the speckle-tracking algorithm (VevoStrain, VisualSonics, Toronto, Canada).

Adequate B-mode loops were selected from digitally-acquired echocardiographic images based on visualization of the endocardial border and absence of image artifacts. Three consecutive cardiac cycles were selected for analysis. Semi-automated tracing of the endocardial and epicardial borders were performed over all three cardiac cycles and corrected as needed to achieve good quality tracking throughout each cine loop. Tracked images were then processed in a frame-by-frame manner for strain measurements. Strain measures were averaged over the obtained cardiac cycles, yielding the curvilinear strain and SR data. In this study strain and SR results were global, resulting from data averaged across all six standardized segments and derived from peak values. Forty out of 53 echocardiograms, for which technically appropriate data were obtained, were submitted to strain analyses.

Renal ultrasonographic evaluation

Renal ultrasonographic analyses were carried out with the same equipment applied to the echocardiography evaluation, at the age of 12-13 wk in HT, HTG- and WT mice and at 22-23 wk in CY, CYG- and NC animals. The same methodological plan was followed, except for a ventral decubitus and dorsal trichotomy. Bidimensional images were acquired for each kidney and measurements related to the three axes obtained. Each kidney was submitted to a 200-image scan, acquired in axial cut within 3-s periods, starting just before the kidney superior pole and ending just after the inferior pole. Renal volume was attained by applying the modified ellipsoid volume approach (44) while, assuming a spherical configuration for the cysts and having their diameter measured, cyst's individual volumes were obtained. The renal cystic index was then calculated, as the ratio between the sum of all cyst volumes of both kidneys and the total volume of the organs.

Direct assessment of mean arterial pressure

The HT, HTG- and WT groups were submitted to direct MAP determination at 13 wk, to warrant an age associated to absence of renal cysts. CY, CYG- and NC mice, on the other hand, had the MAP measured at 24 wk, to guarantee a significant and long-term kidney cystic burden. To avoid potential interferences of other procedures on MAP, independent animal groups were assigned to this protocol. After submission to anesthesia with 1.5% isoflurane inhalation, a 4.0-cm-long catheter with 0.4-mm external diameter and 0.25-mm internal diameter (Micro-Renathane, Braintree Science Inc., Braintree, USA) was inserted into the right carotid artery

(45). Prior to implantation, the catheter was filled with saline solution containing heparin 50 IU/mL and occluded with a metal pin. Once finished the procedure, it was exteriorized at the nape with a trocar and the incision was sutured. The catheter was then connected to a pressure transducer linked to a data acquisition system (BIOPAC Systems, Santa Barbara, USA) for measurement in mmHg. MAP was assessed 24 h after surgery, allowing animals to recover and return to baseline conditions.

Baroreflex analysis

This analysis was based on the “sequence method” previously described (46). Following the recording of each evaluated BP point, an interactive program was used to eliminate aberrances of the tracing. Calculation was extended to beat-to-beat pulse intervals (PIs) obtained from consecutive systolic peaks. Further analysis allowed calculation of 24-h mean systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), MAP, and heart rate. A designed program also identified when SBP and PI had progressively increased (+PI/+SBP sequences) or decreased (-PI/-SBP sequences) over three or more consecutive beats. The threshold change was set at 1 mmHg for SBP and 6 ms for PI. The regression coefficient or slope was then taken as a measure of the baroreflex sensitivity index (ms/mmHg). The number of +PI/+SBP or -PI/-SBP sequences during the 24 h of recording reflected the number of BP ramps. BEI was defined as the ratio between the number of baroreflex sequences and the total number of beat series in which SBP progressively increased or decreased, irrespective of whether these changes were or were not followed by reflex changes in the PIs.

Biochemical determinations

Blood samples were drawn by retro-orbital puncture from HT, HTG- and WT mice at the age of 10-11 wk and from *Pkd1*^{cond} CY, CYG- and NC at 20-21 wk. In VV mice and corresponding controls, blood samples were obtained at the sacrifice time P18. Twelve h after blood collection the animals were housed for 12 h for urine collection, without food and water. The blood samples were allowed to clot and centrifuged to obtain serum. SUN was determined using the Crocker's colorimetric assay (Celm, Barueri, Brazil) while serum and urine creatinine were measured according to another colorimetric assay (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). FE_{Na} was calculated using the equation $FE_{Na} = (U_{Na} \times S_{Cr}) / (S_{El} \times U_{Cr}) \times 100$, where U_{Na} is the urine Na^+ . FE_K and FE_{Cl} were obtained following a similar approach.

Histological assessment preparation

Kidneys and hearts were harvested from HT, HTG- and WT at 13 wk of age, from CY, CYG- and NC animals at 23 wk of age, and from VV mice and respective controls at P18. The first two models were anesthetized with intraperitoneal thiopental (80 µg/g of BW) and subjected to thoracotomy, a catheter insertion in the LV, and a right atrial cut to drain the blood. They were then perfused with saline at a 2-mL/min rate using the Miniplus 3 pump (Gilson Inc., Middleton, WI, USA) until complete exsanguination; the procedure was finalized with the organ collection. The third model followed the same protocol described, except for saline perfusion, due to

the animal small size. Kidneys and hearts were fixed with 4% buffered paraformaldehyde, paraffin embedded, sectioned at 4 μ m, and submitted to hematoxylin/eosin (H&E) and Sirius red staining.

Immunohistochemical evaluation of apoptosis, cell proliferation and Gal-3 expression

Apoptosis was quantified in heart and kidney using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Spleen tissue served as positive control while negative control was achieved by incubation without TdT. Ten myocardial fields and 10 kidney fields (eight representing renal cortex and two renal medulla) were analyzed for each mouse. In both cases TUNEL-positive nuclei were quantified using light microscopy at x400 magnification and the results were expressed as number of positive cells/10,000 cells ratios.

Cell proliferation rates were determined by quantifying Ki-67-positive cells following immunohistochemistry with a monoclonal antibody (Ab) against such an antigen (Abcam, Cambridge). Spleen tissue served as positive control while negative control was achieved by incubation without Ab. This analysis included similar fields to the ones used in the apoptosis evaluation, as well as the same quantification process, with data represented as number of positive cells/10,000 or 100 cells ratios.

The Gal-3 expression profile was also evaluated by immunohistochemistry, employing an anti-Gal-3 monoclonal Ab that recognizes the N-terminal portion of the molecule (M3/38 hybridoma, generated in our institution). The experimental protocol included secondary Abs conjugated with the avidin-biotin-peroxidase complex (Dako, Carpinteria, CA, USA). Peroxidase activity was examined using diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Sections were counterstained with Harry's hematoxylin.

Tissue fibrosis analyses

Kidney and heart sections were submitted to 0.2% picrosirius staining (Sirius Red, Direct Red 80, Milwaukee, USA). Staining quantification was performed using an optical microscope (Olympus BX-51, Japan) equipped with a light polarizer coupled to an image analyzer; a photographic camera coupled to the microscope provided images on a monitor. Twelve myocardial fields and 12 kidney fields (10 representing renal cortex and two renal medulla) were randomly digitized at x400 magnification for each animal. The images were processed using the Image ProPlus 6.0 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, USA), allowing collagen quantification by selecting the red, orange or green birefringent tonalities. The results were expressed as collagen content area/total area ratios.

Western blot analyses

Heart tissue was homogenized in T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) with a Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants were collected. Total protein extracts (100 μ g/lane) were resolved in 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and probed with the anti-Galectin-3 Ab previously

described at 1:150, anti-TGF- β 1 Ab (1:4000, BD Biosciences) and anti-GAPDH Ab (1:5000; Sigma-Aldrich), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary Abs. The proteins were detected with ECL Prime Western Blotting Detection reagent (Amersham, GE Healthcare). Bands were detected by the image acquisition chemiluminescence system (ALLIANCE 4.7, UVITEC, Cambridge, USA) and were quantified by densitometry analysis; the Galectin-3 and TGF- β 1 the results were expressed as Gal-3/GAPDH and TGF- β 1/GAPDH ratio.

Statistical analyses

The data were classified in parametric or nonparametric applying the test of Komolgorov–Smirnov. When three groups were compared, we used one-way analysis of variance with Tukey's or LSD post-test for similar variances (Bartlett test), or Dunnett's C post-test for different variances. When the data were nonparametric, we employed the Mann-Whitney test for two-group comparisons, or the Kruskal–Wallis test with Müller–Dunn, Conover-Inman or Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner post-test for three-group comparisons. The survival analysis was performed using the Kaplan-Meier Curve with the Log-rank test. We have accepted α risk $\leq 5\%$ and β risk $\leq 20\%$. The tests were applied using SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY), Systat 13.0 (Systat Software, San Jose, CA) and GraphPad 5.0 (Prism Software, GraphPad Software, La Jolla, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Flávio M. Ferreira, Milena C. Motta, Cynthia M. Santos, Jaqueline Nascimento, Selmo Silva, Robison Cruz, Lucy Ebsui, Carlos Lemos, Leandro Iannuzzi and Pedro Alcântara for significant animal care support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2010/17424-0 to LFO) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant 141881/2010-0 to BEB and LFO), and Laboratórios de Investigação Médica da Universidade de São Paulo. These studies utilized resources provided by the NIDDK-sponsored Baltimore Polycystic Kidney Disease Research and Clinical Core Center (grant P30DK090868).

STATEMENT OF COMPETING FINANCIAL INTERESTS

No.

REFERENCES

1. Torres VE, Harris PC: Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 76: 149-168, 2009
2. Bastos AP, Onuchic LF: Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res* 44: 606-617, 2011
3. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI: Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 7: 556-566, 2011
4. Luciano RL, Dahl NK: Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrol Dial Transplant* 29(2): 247-254, 2014
5. Perrone RD, Ruthazer R, Terrin NC: Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: Contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis* 38: 777-784, 2001
6. Ecker T, Schrier RW: Cardiovascular abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5: 221-228, 2009
7. Rahbari-Oskoui F, Williams O, Chapman A: Mechanisms and management of hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* Epub ahead of print, 2014
8. Chapman AB, Johnson AM, Rainguet S, Hossack K, Gabow P, Schrier RW: Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 8: 1292-1297, 1997
9. Bardaji A, Veal AM, Gutierrez C, Ridao C, Richart C, Oliver JA: Left ventricular mass and diastolic function in normotensive young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 32: 970-975, 1998
10. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IY, Yuan S, Sun Z, Harris PC, Torres VE, Ehrlich BE: Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 58: 199-208, 2013
11. Geng L, Segal Y, Pavlova A, Barros EJ, Löhning C, Lu W, Nigam SK, Frischauf AM, Reiders ST, Zhou J: Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol* 272: F451-459, 1997
12. Markowitz GS, Cai Y, Li L, Wu G, Ward LC, Somlo S, D'Agati VD: Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol* 277: F17-25, 1999
13. Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R: Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12174-12179, 2001
14. Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S: Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet* 24: 75-78, 2000
15. Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao K, Nakamura K, Tomita K, Kitamura T, Kurabayashi M, Nagai R, Higashihara E, Harris PC, Katsuki M, Horie S:

- Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet.* 11(15): 1731-1742, 2002
16. Kurbegovic A, Côté O, Couillard M, Ward CJ, Harris PC, Trudel M: *Pkd1* transgenic mice: adult model of polycystic kidney disease with extrarenal and renal phenotypes. *Hum Mol Genet* 19: 1174-1189, 2010
 17. Stypmann J, Engelen MA, Orwat S, Bilbilis K, Rothenburger M, Eckardt L, Haverkamp W, Horst J, Dworniczak B, Pennekamp P: Cardiovascular characterization of Pkd2 (+/LacZ) mice, an animal model for the autosomal dominant polycystic kidney disease type 2 (ADPKD2). *Int J Cardiol* 120: 158-66, 2007
 18. Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM, Piontek Irigoyen MC, Watnick TJ, Onuchic LF: Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in Pkd1-deficient mice. *Kidney Int* 85(5): 1137-1150, 2014
 19. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG: A functional floxed allele of *Pkd1* that can be conditionally inactivated *in vivo*. *J Am Soc Nephrol* 15:3035-3043, 2004
 20. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, Fonseca II, Germino GG, Onuchic LF: Pkd1 haploinsufficiency increases renal damage and induces microcysts formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 20(11): 2389-2402, 2009
 21. Shillingford JM, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T: Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol* 21: 489-497, 2010
 22. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García-González MA, Menezes LF, Xu H, Germino GG, Zuo J, Qian F: Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18688-18693, 2007
 23. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, van der Harst P, Pitt B, Goldstein IJ, Korts JA, van Veldhuisen DJ, Bank RA, van Gilst WH, Silljé HH, de Boer RA: Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Cir Heart Fail* 6(1): 107-117, 2013
 24. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T: Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5060–5065, 2006
 25. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T: Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol* 172: 288–298, 2008
 26. van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM: Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 48: 1217–1222, 2006

27. O'Seaghdha CM, Hwang SJ, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS: Elevated galectin-3 precedes the development of CKD. *J Am Soc Nephrol* 24: 1470-1477, 2013
28. Chiu MG, Johnson TM, Woolf AS, Dahm-Vicker EM, Long DA, Guay-Woodford, Hillman KA, Bawumia S, Venner K, Hughes RC, Poirier F, Winyard PJ: Galectin-3 associates with the primary cilium and modulates cyst growth in congenital polycystic kidney disease. *Am J Pathol* 169: 1925-1938, 2006
29. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT: Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 156: 1073-1083, 2000
30. Bauer M, Cheng S, Jain M, Ngoy S, Theodoropoulos C, Trujillo A, Lin FC, Liao R: Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Cir Res* 108: 908-916, 2011
31. Kramann R, Erpenbeck J, Schneider RK, Röhl AB, Hein M, Brandenburg VM, van Diepen M, Dekker F, Marx N, Floege J, Becker M, Schlieper G: Speckle tracking echocardiography detects uremic cardiomyopathy early and predicts cardiovascular mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol* [Epub ahead of print] 2014
32. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S: Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 118-130, 2010
33. Schrier RW: Renal volume, renin-angiotensin-aldosterone system, hypertension, and left ventricular hypertrophy in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 20: 1888-1893, 2009
34. Hassane S, Leonhard WN, van der Wal A, Hawinkels LJ, Latinga-van Leeuwen IS, ten Dijke P, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ: Elevated TGF beta-Smad signaling in experimental Pkd1 models and human patients with polycystic kidney disease. *J Pathol* 222: 21-31, 2010
35. Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekhar Y. Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure – seeing hope in death. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: 681-8, 2006
36. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K: Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* 115: 888-95, 2007
37. Krzeslak A, Lipinska A: Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 9: 305-28, 2004
38. Dumic J, Dabelic S, Flögel M: Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 1760: 616-35, 2006
39. Schroen B, Heymans S, Sharma U, Blankesteijn WM, Pokharel S, Cleutjens JP, Porter JG, Evelo CT, Duisters R, van Leeuwen RE, Janssen BJ, Debets JJ, Smits JF, Daemen MJ, Crijns HJ, Bornstein P, Pinto YM: Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy. *Cir Res* 95: 515-22, 2004
40. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Bertlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM: Galectin-3 marks activated

- macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 110: 3121-8, 2004
41. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ: Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 11: 811–817, 2009
 42. Bichara M, Attmane-Elakeb, A, Brown D, Essing M, Karim Z, Muffat-Joly M, Micheli L, Eude-Le Parco I, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Bonvalet JP, Poirier F, Farman N: Exploring the role of galectin 3 in kidney function: a genetic approach. *Glycobiology* 16: 36-45, 2006
 43. Ramires FJ, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, Martins DG, Billate A, Neto EC, Mady C: Aldosterone antagonism in an inflammatory state: evidence of myocardial protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 162-167, 2006
 44. Nishiura JL, Neves RF, Eloi SR, Cintra SM, Ajzen SA, Heilberg IP: Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 4 :838-844, 2009
 45. Ceroni A, Moreira ED, Mostarda CT, Silva GJ, Krieger EM, Irigoyen MC: Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37: 490-495, 2010
 46. Parati G, Di Rienzo M, Bertinieri G, Pomidossi G, Casadei R, Groppelli A, Pedotti A, Zanchetti A, Mancia G: Evaluation of the baroreflex-heart rate reflex by 24-hour intra-arterial blood pressure monitoring in humans. *Hypertension* 12: 214-22, 1988

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Cardiac dysfunction in *Pkd1*-deficient mice. Comparative analyses of (A, G) mean arterial pressure (MAP), (B, H) left ventricle ejection fraction (LVEF), (C, I) myocardial performance index (MPI), (D, J) isovolumetric contraction time (IVCT), (E, K) E/e' ratio, and (F, L) left ventricular mass (LVM) among WT, HT and HTG- mice (A-F) at 12-13 wk of age for echocardiographic parameters and 13 wk for MAP; and among NC, CY and CTG- animals (G-L) at 22-23 wk for echocardiography parameters and 24 wk for MAP. M-mode images used for LVEF calculation in (M) WT, HT, and HTG- and (M) NC, CY and CYG- mice. Parametric data were compared using ANOVA one way, with results presented as mean±SD. Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test, with results expressed as median (lower to upper quartile). A-F: * $p < 0.05$ vs WT; ** $p < 0.01$ vs WT; † $p < 0.05$ vs HT; and ††† $p < 0.001$ vs HT. G-L: * $p < 0.05$ vs NC; ** $p < 0.01$ vs NC; † $p < 0.05$ vs CY; †† $p < 0.01$ vs CY.

Figure 2. Diastolic dysfunction in *Pkd1*-deficient mice. Comparative analyses of (A, E) E/A ratio, (B, F) deceleration time (DT), (C, G) isovolumetric relaxation time (IVRT), and (D, H) LA/Aorta ratio among WT, HT and HTG- mice (A-D) at 12-13 wk of age, and among NC, CY and CYG- animals (E-H) at 22-23 wk. Pulsed wave Doppler images showing representative E and A waves from (I) WT, HT and HTG- and (J) NC, CY and CYG- mice. Parametric data were compared using ANOVA one way, with results presented as mean±SD. Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test, with results expressed as median (lower to upper quartile). A-D: † $p < 0.05$ vs HT. E-H: * $p < 0.05$ vs NC; ** $p < 0.01$ vs NC; *** $p < 0.001$ vs NC.

Figure 3. Strain analyses in *Pkd1*-deficient mice. Comparative analyses of (A, E) short axis circumferential strain, (B, F) short axis radial strain, (C, G) long axis longitudinal strain, and (D, H) long axis radial strain among WT, HT and HTG- mice (A-D) at 12-13 wk of age, and among NC, CY and CYG- animals (E-H) at 22-23 wk. (I) Time-to-peak representative images for long axis longitudinal strain in WT, HT and HTG- mice, and (J) for short axis radial strain in NC, CY and CYG- animals. Parametric data were compared using ANOVA one way, with results presented as mean±SD. A-D: * $p < 0.05$ vs WT; † $p < 0.05$ vs HT; †† $p < 0.01$ vs HT. E-H: * $p < 0.05$ vs NC; ** $p < 0.01$ vs NC; † $p < 0.05$ vs CY; †† $p < 0.01$ vs CY.

Figure 4. Apoptosis and fibrosis in heart tissue. Comparative analyses of (A) TUNEL staining among WT (n=7), HT (n=9) and HTG- (n=7) mice; (B) TUNEL staining among NC (n=9), CY (n=7) and CYG- animals (n=8); (C) sirius red staining among WT (n=8), HT (n=11) and HTG- (n=8) mice; and (D) sirius red staining among NC (n=9), CY (n=7) and CYG- (n=6) animals. A, C: 13 wk; B, D: 23 wk. (E) Representative images of TUNEL staining in cardiac tissue. Original magnification, x400 (inset x800). (F) Representative images of sirius red staining on polarized light in heart tissue. Original magnification, x400. Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test, with results expressed as median (lower to upper quartile). A, C: ** $p < 0.01$ vs WT; ††† $p < 0.001$ vs HT. B, D: ** $p < 0.01$ vs NC; *** $p < 0.001$ vs NC; †† $p < 0.01$ vs CY; ††† $p < 0.001$ vs CY.

Figure 5. Galectin-3 and TGF- β 1 expression in heart tissue. Comparative western blot analyses of Gal-3 expression between (A) WT (n=7) and HT (n=9), and between (B) NC (n=5) and CY (n=5) mice; and comparative analyses of TGF- β 1 expression among (C) WT (n=7), HT (n=9) and HTG- (n=5), and among (D) NC (n=4), CY (n=4) and CYG- (n=4) animals. A, C: 13 wk; B, D: 23 wk; Immunoblots showing Gal-3 and TGF- β 1 expression relative to GAPDH in (E) WT, HT and HTG- and (F) NC, CY and CYH- mice. Non-parametric data were compared by Mann-Whitney test in A and B, and by ANOVA one way in C and D, with results presented as median (lower and upper quartile). B: *p<0.05 vs NC.

Figure 6. Renal phenotype in *Pkd1*-deficient mice. Comparative analyses of SUN among (A) WT, HT and HTG- mice at 10-11 wk of age, and among (B) NC, CY and CYG- animals at 20-21 wk; and comparative analyses of renal cystic index between (C) CY and CYG mice at 22-23 wk. (D) Representative images of Gal-3 staining in WT, HT, HTG-, NC, CY and CYG- kidneys. Original magnification, x400. (E) H&E representative images of kidney cysts in CY and CYG- mice, and absence of cysts in NC mice. Original magnification, x100. (F) Representative ultrasound images in longitudinal axis of NC, CY and CYG- kidneys. Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test (A, B) and Mann-Whitney test (C, D), with results expressed as median (lower to upper quartile).

Figure 7. Cell proliferation, apoptosis and fibrosis in renal tissue. Comparative analyses of tubular cell Ki-67 staining among (A) WT (n=6), HT (n=10) and HTG- (n=6) kidneys, and (D) NC (n=7), CY (n=5) and CYG- (n=7) organs; comparative analyses of tubular TUNEL staining among (B) WT (n=5), HT (n=6) and HTG- (n=5) mice, and (E) NC (n=7), CY (n=6) and CYG- (n=6) animals; and comparative analyses of area of interstitial fibrosis among (C) WT (n=8), HT (n=11) and HTG- (n=7) kidneys, and (F) NC (n=9), CY (n=7) and CYG- (n=7) organs. (G) Representative images of Ki-67 staining. (H) Representative images of TUNEL staining (Inset x800). (I) Representative images of Sirius red staining on polarized light. G-H: Original magnification, x400. Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test, with results expressed as median (lower to upper quartile). A-C: **p<0.01 vs WT; ***p<0.001 vs WT; †p<0.05 vs HT. D-F: *p<0.05 vs NC; ***p<0.001 vs NC. †p<0.05 vs CY.

Figure 8. Survival of *Pkd1*^{V/V} and *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-} mice. The median age of survival was 21 days [20-24] for VV mice (n=22) mice and 30 days [26-33] for VVG- animals (n=22). The data were compared with the Log-rank test. ***p<0.001 vs VV.

Figure 9. Cardiac and renal phenotypes in *Pkd1*^{+/+}, *Pkd1*^{V/V} and *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-} mice at P18. Comparative analyses of (A) TUNEL staining in heart tissue among WT (n=5), VV (n=6) and VVG- (n=7) mice; (B) area of interstitial fibrosis in heart tissue among WT (n=5), VV (n=6) and VVG- (n=7) animals; (C) SUN among WT (n=5), VV (n=6) and VVG- (n=8) mice; (D) Ki-67 staining in renal tissue among WT (n=5), VV (n=6) and VVG- (n=8) animals; (E) TUNEL staining in renal tissue among WT (n=5), VV (n=5) and VVG- (n=6) mice; and (F) area of interstitial fibrosis in renal tissue among WT (n=5), VV (n=6) and VVG- (n=8) animals.

Representative images of (G) Gal-3 expression in heart; (H) TUNEL staining in heart; (I) Sirius red staining in heart; (J) Gal-3 expression in kidney; (K) Ki-67 staining in kidney; (L) TUNEL staining in kidney; (M) Sirius red staining in kidney. Original magnification, x400; inserts x800. Non-parametric data were compared by Kruskal-Wallis test, with results expressed as median (lower to upper quartile). * $p < 0.05$ vs WT; ** $p < 0.01$ vs WT; *** $p < 0.001$ vs WT; † $p < 0.05$ vs VV.

TABLES

Table 1. Echocardiographic data in *Pkd1*-deficient models, their corresponding Gal-3 knockout double-mutants and respective controls.

Parameters	WT (n=8)	HT (n=12)	HTG- (n=8)	NC (n=9)	CY (n=7)	CYG- (n=9)
Heart Structure						
IVSD (mm)	0.57±0.06	0.66±0.12	0.68±0.13	0.65±0.10	0.70±0.13	0.63±0.09
LVPWD (mm)	0.66 (0.56-0.69)	0.73 (0.68-0.73)*	0.70 (0.65-0.81)	0.76 (0.69-0.81)	0.78 (0.72-1.02)	0.83 (0.66-0.92)
LA/AO ratio	0.87 (0.65-1.01)	1.06 (0.99-1.26)	1.07 (0.97-1.13)	1.03 (0.93-1.19)	1.21 (1.01-1.25)	1.11 (0.97-1.33)
LVM (mg)	58.6±15.5	78.2±19.1*	64.0±15.0	77.8±18.0	91.3±16.1	80.4±15.5
Systolic Function						
LVEF (%)	55.3±8.5	43.2±8.2**	61.6±6.3†††	62.3±8.1	44.1±14.4*	61.1±5.3†
LVSF (%)	28.4±5.6	21.1±4.8*	32.6±4.4†††	33.4±6.0	22.0±7.7*	32.3±3.6†
Diastolic Function						
E/A ratio	1.60 (1.33-1.62)	1.98 (1.57-2.77)	1.36 (1.14-1.83)†	1.21 (1.11-1.30)	1.74 (1.45-2.25)***	1.77 (1.27-2.02)***
DT (ms)	22.0±3.2	19.4±3.0	22.5±1.9	25.9±2.2	20.1±2.3**	20.5±4.0*
IVRT (ms)	18.6 (17.7-20.9)	18.6 (15.9-25.3)	18.2 (16.9-19.9)	17.8 (16.8-19.3)	19.5 (18.3-22.3)	20.8 (17.9-22.6)
Other Parameters						
MPI	0.50±0.16	0.66±0.19	0.58±0.10	0.40±0.21	0.73±0.12**	0.50±0.11††
IVCT (ms)	84.7 (77.3-88.8)	86.2 (79.6-101.6)	86.2 (82.8-99.5)	76.1 (65.5-81.9)	93.1 (85.8-97.5)***	86.9 (79.1-94.0)†††
S' (mm/s)	18.0 (16.7-19.1)	16.0 (13.7-19.8)	19.0 (16.7-19.9)	22.5 (19.4-27.9)	18.1 (14.4-21.4)	20.5 (17.5-23.1)
E/e' ratio	28.4±4.4	40.3±10.3**	31.3±6.0†	24.7±8.7	40.6±7.2*	31.0±11.6

IVSD: interventricular septum diameter. **LVPWD:** left ventricular posterior wall diameter. **LA/AO:** left atrium to aorta diameter ratio. **LVM:** left ventricle mass. **LVEF:** left ventricle ejection fraction. **LVSF:** left ventricle shortening fraction. **E/A ratio:** Ratio between E and A waves. **DT:** mitral valve deceleration time. **IVRT:** isovolumetric relaxation time. **MPI:** myocardial performance index. **IVCT:** isovolumetric contraction time. **S':** peak velocity at the septal basal level. **E/E' ratio:** Ratio between E and e' waves. Comparisons among parametric data were carried out using one-way ANOVA, with data expressed as mean and standard deviation. Comparisons among non-parametric data were carried out using the Kruskal-Wallis test, with data expressed as median (lower quartile to upper quartile). WT/HT/HTG- groups: *p<0.05 vs WT; **p<0.01 vs WT; †p<0.05 vs HT; †††p<0.001 vs HT. NC/CY/CYG- groups: *p<0.05 vs NC; **p<0.01 vs NC; ***p<0.001 vs NC; †p<0.05 vs NC; ††p<0.01 vs NC; †††p<0.001 vs NC.

Table 2. Heart deformability in *Pkd1*-deficient models, their corresponding Gal-3 knockout double-mutants and respective controls.

Parameters	WT (n=6)	HT (n=7)	HTG- (n=7)	NC (n=8)	CY (n=5)	CYG- (n=7)
Short axis (%)						
Circumferential strain	-20.48±8.94	-19.08±5.18	-24.06±4.77	-24.33±6.53	-14.49±5.77**	-24.40±2.39††
Circumferential strain rate (×s⁻¹)	-8.23±2.77	-5.80±1.49	-9.29±2.82†	-8.79±2.57	-5.18±2.44 *	-8.72±2.43†
Radial strain	29.94±8.87	26.30±6.93	29.75±5.56	32.23±8.18	21.17±9.60*	33.71±3.89†
Radial strain rate (×s⁻¹)	8.21±0.76	5.68±0.67**	8.51±1.80††	10.04±2.67	6.34±2.86*	8.26±1.31
Long axis (%)						
Longitudinal strain	-15.44±1.93	-11.48±1.78*	-18.89±3.92†	-20.44±7.61	-12.16±4.80*	-16.69±4.30
Longitudinal strain rate (×s⁻¹)	-5.59±0.77	-4.50±1.38	-7.12±1.60†	-8.55±2.98	-4.07±2.15**	-6.91±1.91†
Radial strain	24.02±2.34	18.33±4.54	25.76±4.95††	27.14±11.27	20.61±7.38	32.16±4.85†
Radial strain rate (×s⁻¹)	7.06±0.91	6.24±1.09	7.74±1.55†	9.45±2.76	5.67±2.03**	9.36±1.67††

Comparisons among parametric data were carried out using one-way ANOVA with Tukey's post-test; the data were expressed as mean and standard deviation. WT/HT/HTG- groups: *p<0.05 vs WT; **p<0.01 vs WT; †p<0.05 vs HT; ††p<0.01 vs HT. NC/CY/CYG- groups: *p<0.05 vs NC; **p<0.01 vs NC; †p<0.05 vs CY; ††p<0.01 vs CY.

Table 3. Mean arterial pressure and baroreflex parameters in *Pkd1*-deficient models, their corresponding Gal-3 knockout double-mutants and respective controls.

Parameters	WT (n=5)	HT (n=6)	HTG- (n=5)	NC (n=6)	CY (n=6)	CYG- (n=6)
Hemodynamic Data						
MAP (mmHg)	119.8±8.6	130.8±11.1	118.2±9.1	131.6±13.1	140.0±7.2	132.5±11.5
Baroreflex Data						
AP ramps (n)	724.8±171.1	662.2±225.2	606.2±148.7	837.6±163.2	815.4±165.7	775.2±307.0
BEI	0.27±0.06	0.23±0.06	0.34±0.07	0.20±0.07	0.15±0.10	0.22±0.07
BEI-up	0.28±0.08	0.27±0.08	0.34±0.06	0.21±0.09	0.14±0.11	0.26±0.06
BEI-down	0.25±0.18	0.18±0.07	0.33±0.09†	0.19±0.05	0.15±0.10	0.17±0.09
BRS (ms/mmHg)	1.97 (1.49- 4.25)	2.11 (1.55- 4.65)	3.63 (2.34- 6.01)	1.58 (1.29- 2.62)	1.10 (0.75- 1.33)	1.94 (1.39- 3.38)

MAP: mean arterial pressure. **BEI:** baroreflex effectiveness index. **BRS:** baroreflex sensitivity. **BEI-up/down:** baroreflex effectiveness in sequences of hypertension/bradycardia and hypotension/tachycardia. Comparisons among parametric data were carried out using one-way ANOVA, with results expressed as mean and standard deviation. Comparisons among non-parametric data were carried out using Kruskal-Wallis test, with results expressed as median (lower quartile to upper quartile). WT/HT/HTG- groups: †p<0.05 vs HT.

Table 4. Renal phenotype in *Pkd1*-deficient models, their corresponding Gal-3 knockout double-mutants and respective controls.

Parameters	WT (n=8)	HT (n=12)	HTG- (n=8)	NC (n=9)	CY (n=7)	CYG- (n=9)
Biochemical Data						
SUN (mg/dL)	25.8 (21.7-30.1)	25.6 (24.3-30.7)	33.6 (20.9-34.9)	28.2 (26.2-32.8)	30.5 (25.3-33.0)	32.0 (27.8-37.4)
S_{Na} (mEq/L)	141.0 (140.0-142.0)	140.5 (140.0-142.0)	141.0 (138.0-141.0)	138.0 (134.5-140.5)	140.0 (140.0-141.0)	140.0 (138.5-142.5)
S_K (mEq/L)	4.2 (4.1-4.3)	4.4 (4.1-4.9)	4.3 (4.2-4.4)	4.9 (4.6-5.4)	4.8 (4.5-5.7)	5.0 (4.8-5.2)
S_{Cl} (mEq/L)	107.1±3.3	104.5±5.1	109.3±3.8	107.6±4.1	106.2±5.0	108.7±5.6
FE_{Na} (%)	0.58 (0.46-0.76)	0.76 (0.37-1.01)	0.78 (0.39-1.29)	0.47 (0.38-0.60)	0.52 (0.26-0.64)	0.78 (0.33-1.59)
FE_K (%)	31.5 (29.9-39.7)	36.2 (34.2-57.9)	47.2 (26.0-77.4)	29.0 (24.2-31.5)	24.2 (17.9-31.8)	56.60 (19.9-67.3)
FE_{Cl} (%)	0.73 (0.61-0.80)	0.80 (0.45-1.13)	0.97 (0.59-1.88)	0.62 (0.52-0.78)	0.74 (0.34-1.04)	0.85 (0.69-1.17)
Kidney Ultrasound Analysis						
Cystic Index (%)	Not applicable ^a				5.82 (3.64-9.94)	10.02 (2.61-13.63)

SUN: serum urea nitrogen. **S_{Na}:** serum Na⁺. **S_K:** serum K⁺. **S_{Cl}:** serum Cl⁻. **FE_{Na}:** fractional excretion of Na⁺. **FE_K:** fractional excretion of K⁺. **FE_{Cl}:** fractional excretion of Cl⁻. ^aUltrasound analyses revealed no cysts in WT, HT, HTG- and NC kidneys. Cystic index data were compared using the Mann-Whitney test, with results presented as median (lower quartile to upper quartile). In all other groups comparisons among parametric data were carried out using one-way ANOVA, with results expressed as mean and standard deviation, while comparisons among non-parametric data were carried out using the Kruskal-Wallis test, with results presented as median (lower quartile to upper quartile).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8

Figure 9

8 REFERÊNCIAS

Balbo BEP, Cavalcanti RM, Romão Jr JE, Barros RT, Zatz R, Abensur H. Profile of patients with end-stage renal disease before starting renal replacement therapy, derived from a tertiary nephrology center. *J Bras Nefrol.* 2007; 29: 203-8.

Bao Q, Hughes C. Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices *in vitro*. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2791-800.

Bardají A, Veá AM, Gutierrez C, Ridao C, Richart C, Oliver JA. Left ventricular mass and diastolic function in normotensive young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 1998; 32: 970-5.

Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins – Structure and function of a large family of animal lectins. *The journal of Biological Chemistry.* 1994; 269: 20807-10.

Bastos AP, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44: 606-17.

Bauer M, Cheng S, Jain M, Ngoy S, Theodoropoulos C, Trujillo A, Lin FC, Liao R. Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Cir Res.* 2011; 108: 908-16.

Bhunja AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. *PKD1* induces P21^{waf1} and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring *PKD2*. *Cell.* 2002; 109: 157-68.

Bichara M, Attmane-Elakeb A, Brown D, Essig M, Karim Z, Muffat-Joly M, Micheli L, Eude-Le Parco I, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Bonvalet JP, Poirier F, Farman N. Exploring the role of galectin-3 in kidney function: a genetic approach. *Glycobiology.* 2006; 16: 36-45.

Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R. Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the *Pkd1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 12174-9.

Cadnapaphornchai MA, George DM, McFann K, Gitomer B, Strain JD, Schrier RW. Effect of pravastatin on total kidney volume, left ventricular mass index, and microalbuminuria in pediatric autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 9: 889-96.

Ceroni A, Moreira ED, Mostarda CT, Silva GJ, Krieger EM, Irigoyen MC. Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37: 490-95.

Chapman, AB, Johnson AM, Rainguet S, Hossack K, Gabow P, Schrier RW. Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8: 1292-7.

Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Bae KT, Baumgarten DA, et al. Renal structure in early autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int*. 2003; 64: 1035-45.

Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010; 17: 153-63.

Chiu MG, Johnson TM, Woolf AS, Dahm-Vicker EM, Long DA, Guay-Woodford L, Hillman KA, Bawumia S, Venner K, Hughes RC, Poirier F, Winyard PJD. Galectin-3 associates with the primary cilium and modulates cyst growth in congenital polycystic kidney disease. *The American Journal of Pathology*. 2006; 169: 1925-38.

Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoche MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology*. 2002; 12: 329-37.

de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail*. 2009; 11: 811-7.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760: 616-35.

Ecder T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2009; 5: 221-8.

Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguen T, Xu XC. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate*. 2002; 50: 64-70.

Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Manco-Johnson ML, Duley IT, Everson GT. Factors affecting the progression of renal cystic disease. *Kidney Int*. 1992; 41: 1311-19.

Geng L, Segal Y, Pavlova A, Barros EJ, Löhning C, Lu W, Nigam SK, Frischauf AM, Reeders ST, Zhou J. Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol*. 1997; 272: 451-9.

Farris AB, Adams CD, Brousaides N, Della Pelle PA, Collins AB, Moradi E, Smith RN, Grimm PC, Colvin RB. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 176-86.

Fick GM, Johnson AM, Hammond WS, Gabow PA. Causes of death in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 5: 2048-56.

Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM, Piontek Irigoyen MC, Watnick TJ, Onuchic LF. Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in Pkd1-deficient mice. *Kidney Int*. 2014; 85: 1137-50.

Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010; 17: 118-30.

Gallager WM, Bergin OE, Rafferty M, Kelly ZD, Nolan IM, Fox EJ, Culhane AC, McArdle L, Fraga MF, Higes L, Currid CA, O'Mahony F, Byrne A, Murphy AA, Moss C, McDonnell S, Stallings RL, Plumb JA, Esteller M, Brown R, Dervan PA, Easty DJ. Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 1856-67.

Hateboer N, van Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggat-Malik AK, San Millan JL, Torra R, Breuning M, Ravine D. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet*. 1999; 353: 103-7.

Hassane S, Leonhard WN, van der Wal A, Hawinkels LJ, Latinga-van Leeuwen IS, ten Dijke P, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Elevated TGF beta-Smad signaling in experimental Pkd1 models and human patients with polycystic kidney disease. *J Pathol*. 2010; 222: 21-31.

Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 5060-65.

Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*. 2008; 172: 288-98.

Hikita C, Viajayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al Awqati Q. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin-3. *J Cell Biol*. 2000; 151: 1235-46.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WEG, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572: 232-54.

Hogan MC, Masyuk TV, Page LJ, Kubly VJ, Bergstralh EJ, Li X, Kim B, King BF, Glockner J, Holmes DR, Rossetti S, Harris PC, LaRusso NF, Torres VE. Randomized clinical trial of long-acting somatostatin for autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 1052-61.

Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 661-8.

Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier DR, Guay-Woodford LM. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the *cpk* mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*. 2002; 109: 533-540.

Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol*. 2000; 156: 1073-83.

Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, Gamble V, Harris PC. The polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*. 1995; 10: 151-60.

Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem*. 1997; 272: 11671-73.

Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, J H, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int*. 2007; 31: 655-62.

Kramann R, Erpenbeck J, Schneider RK, Röhl AB, Hein M, Brandenburg VM, van Diepen M, Dekker F, Marx N, Floege J, Becker M, Schlieper G. Speckle tracking echocardiography detects uremic cardiomyopathy early and predicts cardiovascular mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. [Epub ahead of print] 2014.

Krzelak A, Lipinska A: Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 9: 305-28, 2004.

Kurbegovic A, Côté O, Couillard M, Ward CJ, Harris PC, Trudel M: *Pkd1* transgenic mice: adult model of polycystic kidney disease with extrarenal and renal phenotypes. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 1174-89.

Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, André S, Gabius HJ, Carretero OA. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009, 296: 404-12.

Le Marer N. Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells. *Cell Biol Int*. 2000; 24: 245-51.

Lock D, van der Meer P, de La Porte PB, Lipsic E, van Wijngaarden J, van Veldhuisen DJ, Pinto YM. Galectin-3, a novel biomarker of macrophage activity, predicts outcome in patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49(Suppl. A): 98A[Abstract].

Luciano RL, Dahl NK. Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29: 247-54.

Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, Simpson AJ, Forbes SJ, Hirani N, Gauldie J, Sethi T. Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185: 537-46.

Markowitz GS, Cai Y, Li L, Wu G, Ward LC, Somlo S, D'Agati VD. Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol*. 2009; 277: 17-25.

Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*. 2007; 115: 888-95.

Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem*. 2000; 275: 36311-15.

Milting H, Ellinghaus P, Seewald M, Cakar H, Bohms B, Kassner A, Körfer R, Klein M, Krahn T, Truska L, El Banayosy A, Kramer F. Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27: 589-596.

Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao K, Nakamura K, Tomita K, Kitamura T, Kurabayashi M, Nagai R, Higashihara E, Harris PC, Katsuki M, Horie S. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet*. 2002; 11: 1731-42.

Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005; 10: 267-275.

Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekar Y. Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure – seeing hope in death. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3: 681-8.

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*. 2003; 33: 129-37.

Nishiura JL, Neves RF, Eloi SR, Cintra SM, Ajzen SA, Heilberg IP. Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4 :838-44.

Nunes AC, Milani V, Porsch DB, Rossato LB, Mattos CB, Roisenberg I, Barros EJ. Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. *Ren Fail*. 2008; 30: 169-73.

Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 246: 788-91.

Okamura DM, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, Collins S, Hsu DK, Liu FT, Eddy AA. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300: 245-53.

O'Seaghdha CM, Hwang SJ, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS. Elevated galectin-3 precedes the development of CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24: 1470-77.

Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IY, Yuan S, Sun Z, Harris PC, Torres VE, Ehrlich BE. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 58: 199-208.

Parati G, Di Rienzo M, Bertinieri G, Pomidossi G, Casadei R, Groppelli A, Pedotti A, Zanchetti A, Mancina G. Evaluation of the baroreflex-heart rate reflex by 24-hour intra-arterial blood pressure monitoring in humans. *Hypertension*. 1998; 12: 214-22.

Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, Pandolfi M, Ledda L, Di Loreto C, Damante G, Tell G. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 302: 545-53.

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*. 1998; 76: 402-412.

Perrone RD, Ruthazer R, Terrin NC. Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: Contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis*. 2001; 38: 777-84.

Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG. A functional floxed allele of *Pkd1* that can be conditionally inactivated *in vivo*. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 3035-43.

Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. *PKD1* interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet*. 1997; 16: 179-83.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends immunol*. 2002; 23: 313-30.

Ramires FJ, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, Martins DG, Billate A, Neto EC, Mady C. Aldosterone antagonism in an inflammatory state: evidence of myocardial protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006; 7: 162-7.

Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, Steige G, Wiese E, Küpper I, Becker C, Ott S, Nusser P, Yamamura K, Rechtsteiner G, Warger T, Pautz A, Kleinert H, Schidt A, Pieske B, Wenzel P, Münzel T, Löhler J. Interferon- γ induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2007;171:463-472.

Schrier RW. Renal volume, renin-angiotensin-aldosterone system, hypertension, and left ventricular hypertrophy in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 1888-93.

Schroen B, Heymans S, Sharma U, Blankesteyn WM, Pokharel S, Cleutjens JP, Porter JG, Evelo CT, Duisters R, van Leeuwen RE, Janssen BJ, Debets JJ, Smits JF, Daemen MJ, Crijns HJ, Bornstein P, Pinto YM: Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy. *Cir Res.* 2004; 95: 515-22.

Serra AL, Poster D, Kistler AD, Krauer F, Raina S, Young J, Rentsch KM, Spanaus KS, Senn O, Kristanto P, Scheffel H, Weishaupt D, Wüthrich RP. Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2010; 363: 820-9.

Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation.* 2004; 110: 3121-8.

Sharma U, Rhaleb NE, Pokharel S, Harding P, Rasoul S, Peng H, Carretero OA. Novel anti-inflammatory mechanisms of N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *Am J Physiol.* 2008; 294: 1226-32.

Shillingford JM, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T. Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 489-97.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H, Raz A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 2005; 65: 3535-37.

Silberberg M, Charron AJ, Bacallao R, Wandinger-Ness A. Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288: 1153-63.

Strufaldi B. *Prática de bioquímica clínica*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 1987, p.339.

Stypmann J, Engelen MA, Orwat S, Bilbilis K, Rothenburger M, Eckardt L, Haverkamp W, Horst J, Dworniczak B, Pennekamp P. Cardiovascular characterization of Pkd2 (+/LacZ) mice, an animal model for the autosomal dominant polycystic kidney disease type 2 (ADPKD2). *Int J Cardiol.* 2007; 120: 158-66.

Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS, Raz, A. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 4395–4406.

Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Palaniyandi SS, Zhang S, Muslin AJ, Kodama M, Aizawa Y. 14-3-3 Protein regulates ask1 signaling and protects against diabetic cardiomyopathy. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75: 1797-1806.

Torres VE, Keith DS, Offord KP, Kon SP, Wilson DM. Renal ammonia in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 1994; 45: 1745-53.

Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last three years. *Kidney Int.* 2009; 76: 149-168.

Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, Perrone RD, Krasa HB, Ouyang J, Czerwiec FS; TEMPO 3:4 Investigators. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2407-18.

U.S. Renal Data System, *USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003.

van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1217–22.

Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. *Bcl-2*-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell.* 1993; 75: 229-240.

Yamaguchi T, Hempson SJ, Reif GA, Hedge AM, Wallace DP. Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 178-87.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 6737-42.

Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2008; doi: 10.1017/S1462399408000719; 10: 1-24.

Yoshi T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A, Kubo T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2001; 18: 787-92.

Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 2002; 277: 6852-7.

Yu F, Finley Jr. RL, Raz A, Kim HRC. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Bio Chem*. 2002; 277: 15819-27.

Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García-González MA, Menezes LF, Xu H, Germino GG, Zuo J, Qian F. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 18688-93.

Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, van der Harst P, Pitt B, Goldstein IJ, Korts JA, van Veldhuisen DJ, Bank RA, van Gilst WH, Silljé HH, de Boer RA: Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Cir Heart Fail*. 2013; 6: 107-17.

Walz G, Budde K, Mannaa M, Nürnberger J, Wanner C, Sommerer C, Kunzendorf U, Banas B, Hörl WH, Obermüller N, Arns W, Pavenstädt H, Gaedeke J, Büchert M, May C, Gschaidmeier H, Kramer S, Eckardt KU. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2010; 363: 830-40.

Whittaker P, Kloner Ra, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994; 89: 397-410.

Winyard PJ, Bao Q, Hughes RC, Woolf AS. Epithelial galectin-3 during human nephrogenesis and childhood cystic diseases. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8:1647-57.

Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet.* 2000; 24: 75-8.

Zittema D, Boertien WE, van Beek AP, Dullaart RP, Franssen CF, de Jong PE, Meijer E, Gansevoort RT. Vasopressin, copeptin, and renal concentrating capacity in patients with autosomal polycystic kidney disease without renal impairment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012; 7: 906-13.