Willian Pereira Felix

**Efeitos do insulto por isquemia/reperfusão renal sobre a indução de
estresse de retículo endoplasmático em camundongos haploinsuficientes
para *Pkd1***

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Felix, Willian Pereira

Efeitos do insulto por isquemia/reperfusão renal sobre a indução de estresse de retículo endoplasmático em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* / Willian Pereira Felix. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante 2.Doenças renais policísticas 3.Mutação 4.Estresse do retículo endoplasmático 5.Isquemia 6.Traumatismo por reperfusão

USP/FM/DBD-451/16

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Investigação Médica 29, Divisão de Nefrologia, Hospital
das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo (FMUSP).**

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

DEDICATÓRIA

*A **DEUS**, autor de toda criação, e a seu filho amando Senhor Jesus Cristo, os quais são minha fonte de força e inspiração, por me guiarem e permitirem chegar até este momento tão especial.*

*À minha mãe, **Sonia Augusta**, pelo amor, carinho, conselhos e criação. Por não ver barreiras mesmo quando elas se apresentaram das mais diversas formas. Pelo seu constante otimismo e fé na vida.*

*À minha esposa, **Leilane Bravo**, pelo amor, paciência e suporte durante estes longos anos de estudos e períodos de ausência. Pelos abraços e mimos, pelo carinho, dedicação e companheirismo.*

*Ao meu irmão, **Marcelo Felix**, que sempre me serviu de inspiração e modelo de paz e serenidade. Por cuidar de mim por várias vezes na infância. Pelos conselhos, conversas, troca de ideias e pelo amor.*

Ora, àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera, a esse glória na igreja, por Jesus Cristo, em todas as gerações, para todo o sempre. Amém

Efésios 4; 20-21

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao **Professor Luiz Fernando Onuchic**, meu orientador, por seu amor incondicional pela ciência, pelo brilho nos olhos que me inspiraram desde a primeira conversa. Pela dedicação e profissionalismo, pela serenidade e humanidade. Pelo suporte durante todos estes anos. Pela paciência e constante otimismo de que as coisas sempre vão dar certo. De fato, um exemplo, não só como orientador, mas também como pessoa e de conduta. Meus sinceros e ternos agradecimentos.*

*À **Andressa**, pessoa fundamental na realização deste trabalho e na condução do laboratório. Pela amizade, pela dedicação incondicional, por tudo de que se absteve para que mais este projeto fosse concluído. Pelos preciosos insights, pelo admirável intelecto e domínio dos diversos aspectos deste mundo tão complexo que é o da DRPAD. De coração, meus sinceros agradecimentos.*

AGRADECIMENTOS

À professora Irene L. Noronha, ao professor Humberto Dellê e ao Dr. Rodrigo Ramalho, que primeiramente abriram as portas do LIM-29 para mim, minha eterna gratidão.

Ao Dr. Elieser Hitoshi Watanabe, pelo auxílio tão importante nesta última etapa do projeto, pela grande amizade e constante disponibilidade e momentos de descontração mesmo quando sob grande pressão.

Aos professores Niels Olsen e Emerson Bernardes, por permitirem o uso das câmaras de hipóxia durante a primeira etapa deste projeto. E, também, aos seus alunos Matheus, Andrea e Sofia, pelo auxílio técnico e manuseio do equipamento.

Aos amigos do LIM-29, Marciana, Jéssica, Eliene, Chris, Jow, Zena, Bruno, Leandro, Sr. Pedro, Mirtes, Ana, Ane, Filipe, Rafael, Alexandre, Priscila, Talita, Margoth, Cléo e Rita, pelas risadas e compartilhamento de ideias.

A todos os amigos do departamento de nefrologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Lista de Siglas

Lista de Símbolo

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO.....	1
Doença Renal Policística Autossômica Dominante: Epidemiologia e Manifestações	
Clínicas.....	2
Os Genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i> , Seus Produtos e Alterações Celulares Associadas à DRPAD.....	3
Patogênese Molecular da DRPAD.....	6
Implicações Terapêuticas dos Avanços na Compreensão da Patogênese da DRPAD.....	9
Isquemia/Reperusão Renal.....	11
Isquemia/Reperusão Renal na DRPAD.....	12
Estresse de Retículo Endoplasmático.....	13
Estresse de Retículo e Isquemia/Reperusão.....	17
Estresse de Retículo e Inflamação.....	17
Isquemia/Reperusão Renal e Estresse de Retículo.....	19
DRPAD e Estresse de Retículo.....	20
Isquemia/Reperusão e Estresse de Retículo na DRPAD.....	22
PRIMEIRO PERÍODO DO PROJETO.....	24
OBJETIVOS.....	25
Objetivos.....	26
Objetivos Específicos.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
Ética em Experimentação Animal.....	29
Camundongos Geneticamente Modificados com Diferentes Perfis de Deficiência em <i>Pkd1</i>	29
Isolamento e Cultura de Células de Filamentos Ductais da Medula Renal Interna de Camundongos Adultos <i>Pkd1</i> ^{+/+} e <i>Pkd1</i> ^{+/-}	30
Isolamento e Cultura de Células Embrionárias Renais (EmR) de Camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/+} e <i>Pkd1</i> ^{-/-}	31
Determinação do Fenótipo Celular das Culturas Primárias.....	33
Imunofenotipagem.....	33
Imunocitoquímica para E-Caderina.....	34

SUMÁRIO

Método in vitro de Insulto por Hipóxia e Hipóxia/Reoxigenação.....	35
Ensaios para Avaliação do Grau de Lesão e Resposta Celular aos Insultos por Hipóxia e Hipóxia/Reoxigenação.....	35
<i>Análise de Apoptose</i>	35
<i>Análise de Proliferação Celular</i>	36
Análises de Expressão Gênica de <i>p21</i> e <i>Hif1a</i>	37
Avaliação do Estresse de Retículo Endoplasmático.....	39
<i>Avaliação Semiquantitativa de Splicing Não Convencional do Gene Xbp1</i>	39
RESULTADOS.....	40
Estabelecimento das culturas primárias de filamentos ductais da medula renal interna e de rim embrionário.....	41
Caracterização fenotípica das células MRI e EmR.....	42
Ensaio de insulto celular por hipóxia e hipóxia/reoxigenação.....	44
Respostas celulares aos insultos por hipóxia e hipóxia/reoxigenação.....	46
PCR quantitativa em tempo real para <i>p21</i>	51
PCR quantitativo em tempo real para <i>Hif1a</i>	51
Análise semiquantitativa de estresse de retículo.....	52
DISCUSSÃO.....	54
SEGUNDO PERÍODO DO PROJETO.....	61
OBJETIVOS.....	62
Objetivos Central.....	63
Objetivos Específicos.....	63
MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
Ética em Experimentação Animal.....	66
Camundongos Geneticamente Modificados.....	66
Modelo Experimental de Isquemia/Reperusão.....	67
Avaliação da função renal.....	67
Análises de Expressão Gênica de <i>Hspa5</i> , <i>Ddit3</i> e <i>Hif1a</i>	68
Avaliação Semiquantitativa de Splicing Não Convencional para o Gene <i>Xbp1</i>	68
Avaliação da Expressão das Proteínas BIP e XBP1.....	69
Avaliação da Expressão de Citocinas em Tecido Renal e Soro.....	70
Análise Estatística.....	71
RESULTADOS.....	72
O Insulto Renal Induzido por Isquemia/Reperusão foi Leve.....	73

SUMÁRIO

Camundongos Haploinsuficientes para <i>Pkd1</i> Apresentam Expressão Renal da Proteína XBP1s mais Elevada que Camundongos Selvagens após Insulto I/R Leve, mas não de BIP.....	75
Insulto I/R Leve Reduz a Razão de Expressão de Transcritos <i>Xbp1s/Xbp1u</i> em Rins de Camundongos Deficientes em <i>Pkd1</i>	77
Insulto I/R Leve não Altera Significativamente a Expressão Gênica de <i>Hspa5</i> e <i>Ddit3</i> em Rins de Camundongos Haploinsuficientes para <i>Pkd1</i>	78
A Resposta Citocinérgica à I/R Renal Leve não é Significante em Camundongos Deficientes em <i>Pkd1</i>	79
DISCUSSÃO.....	82
CONCLUSÕES.....	89
ANEXOS.....	91
REFERÊNCIAS.....	112

Índice de figuras

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático e domínios da policistina-1 e policistina-2, produtos dos genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i>	4
Figura 2.	Esquema representativo das vias de estresse de retículo endoplasmático.....	16
Figura 3.	Fotomicrografia representativa do estabelecimento das culturas de células MRI <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> e EmR <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{-/-}</i>	42
Figura 4.	Citometria de fluxo para o marcador E-caderina-APC em células EmR <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{-/-}</i>	43
Figura 5.	Imunocitoquímica para E-caderina.....	44
Figura 6.	Representação morfológica de células MRI <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> em condições basais, após 24h de hipóxia e após 24h de hipóxia/72h de reoxigenação....	45
Figura 7.	Representação morfológica de células EmR <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{-/-}</i> em condições basais, após 24h de hipóxia e após 24h de hipóxia/72h de reoxigenação....	46
Figura 8.	Análises de citometria de fluxo para Caspase-3 ativa e Ki-67 em células EmR <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{-/-}</i> em condição basal e após 24h de hipóxia.....	48
Figura 9.	Porcentagem de células embrionárias renais <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{-/-}</i> com marcação para caspase-3 ativa e Ki-67 em condição basal e após hipóxia de 24h.....	49
Figura 10.	Análises de citometria de fluxo para E-Caderina, Ki-67 e caspase-3 ativa em células MRI <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> , em condição basal, após 24h de hipóxia e após 24h de hipóxia/72h de reoxigenação.....	50
Figura 11.	Análise comparativa da expressão do RNAm de p21 em células MRI <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> , nas condições basal, após 24h de hipóxia e após 24h de hipóxia/72h de reoxigenação.....	51
Figura 12.	Análise comparativa da expressão quantitativa de <i>Hif1α</i> em células MRI <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> , nas condições basal, após 24 h de hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação.....	42
Figura 13.	Análise do splicing não convencional do RNAm de <i>Xbp1</i> em células MRI <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> , nas condições basal, após 24h de hipóxia e após 24h de hipóxia/72h de reoxigenação.....	53

- Figura 14.** Análises comparativas da concentração sérica de ureia entre camundongos: A) esquerda - selvagens sham (WT Sham) pré-intervenção, haploinsuficientes para *Pkd1* sham (HT Sham) pré-intervenção, selvagens teste (WT IR) pré-I/R e haploinsuficientes para *Pkd1* teste (HT IR) pré-I/R; e direita - WT Sham 48 h pós-intervenção, HT Sham 48 h pós-intervenção, WT IR 48 h pós-I/R e HT IR 48 h pós-I/R. B) Variações da concentração de ureia sérica pós/pré-intervenção para animais WT Sham (n=7), HT Sham (n=6), WT IR (n=7) e HT IR (n=6).....73
- Figura 15.** Análise comparativa da expressão renal de *Hif1 α* entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR)..... 74
- Figura 16.** Análise comparativa da expressão renal das proteínas XBP1s e BIP entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). A) Imagem representativa da análise por *western blot*; B) Análise comparativa quantitativa da expressão de XBP1s entre os grupos WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR; e C) Análise comparativa quantitativa da expressão de BIP entre os grupos WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR.....76
- Figura 17.** Análises comparativas da razão de expressão renal de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). A) Imagem representativa da análise por PCR semiquantitativa. 1: marcador de massa molecular; 2: controle negativo; 3: controle positivo, representado por células IMCD3 tratadas com tunicamicina 5 μ g/mL por 5-6 h. B) Análise comparativa semiquantitativa da razão de expressão renal de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* entre os grupos WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR..... 77
- Figura 18.** Análise comparativa da expressão renal dos genes *Hspa5* (A) e *Ddit3* (B) entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR).....78

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 19.** Análise comparativa da expressão renal de IL1 β (A), IL6 (B), IL10 (C), MCP1 (D), RANTES (E) e TNF α (F) entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR).....79
- Figura 20.** Análise comparativa dos níveis séricos de IL1 β (A), IL6 (B), IL10 (C), MCP1 (D), RANTES (E) e TNF α (F) entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR).....81

Índice de tabelas

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Expressão gênica em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/+} (WT) e <i>Pkd1</i> ^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R).....	75
Tabela 2.	Expressão renal de proteínas envolvidas no ER em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/+} (WT) e <i>Pkd1</i> ^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R).....	76
Tabela 3.	Expressão renal de citocinas em camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/+} (WT) e <i>Pkd1</i> ^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R).....	80
Tabela 4.	Níveis das citocinas séricas de camundongos <i>Pkd1</i> ^{+/+} (WT) e <i>Pkd1</i> ^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R).....	81

Lista de siglas

LISTA DE SIGLAS

AKT	<i>Protein kinase B</i>
AMPc	Adenosine monophosphate cíclico
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AQP11	Aquaporina-11
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
BIP	<i>Immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bZIP	<i>Leucine-zipper</i>
Cdk2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CLD	<i>C-type lectin domain</i>
CTF	<i>C-terminal fragment</i>
DHPAD	Doença hepática policística autossômica dominante
DRCt	Doença Renal Crônica Terminal
DRPAD	Doença Renal Policística Autossômica Dominante
DRPAD1	Doença renal policística autossômica dominante do tipo 1
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2α</i>
ER	Estresse de Retículo
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERSE	<i>ER stress response element</i>

LISTA DE SIGLAS

GANAB	<i>glucosidase II α subunit</i>
GPS	<i>G-protein coupled receptor cleavage site</i>
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>
Herp	<i>Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein</i>
HIF1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HK-2	<i>Human Kidney – 2</i>
I/R	<i>Isquemia/reperfusão</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
IL-8	<i>Interleucina-8</i>
IRA	<i>Injúria renal aguda</i>
IRE1 α	<i>Inositol-requiring kinase 1α</i>
JAK/STAT	<i>Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal protein kinase</i>
LDL-A	<i>low-density lipoprotein receptor domain class A</i>
LRR	<i>Leucine rich repeats</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NLRP3	<i>NRL Family, pyrin domain containing 3</i>
NO	<i>Óxido nítrico</i>

LISTA DE SIGLAS

NTA	Necrose tubular aguda
NTF	<i>N-terminal fragment</i>
ORP150	<i>Oxygen-regulated protein</i>
PC1	Policistina-1
PC2	Policistina-2
PCK	<i>Polycystic kidneys</i>
PERK	<i>Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER-kinase</i>
PKD	<i>polycystic kidney disease</i>
PKD1	<i>polycystic kidney disease 1</i>
PKD2	<i>polycystic kidney disease 2</i>
R1-R16	Repetições PKD
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RE	Retículo endoplasmático
REJ	<i>receptor for egg jelly</i>
RV2VP	Antagonista do receptor V2 da vasopressina
Sec63	<i>Protein-transporting protein SEC63</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
sXBP1	<i>spliced XBP1</i>
TEMPO	<i>Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor – α</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>

LISTA DE SIGLAS

TRS	Terapia Renal Substitutiva
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
TXNIP	Proteína de interação com a tireodoxina
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VRT	Volume renal total
WSC	<i>Cell-wall and stress-response component</i>
XBP1	<i>X-box-binding protein 1</i>

Lista de símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

aa	aminoácidos
Ca^{2+}	cálcio
cm^2	centímetros quadrados
g	força g
lacZ	gene que codifica a beta galactosidase
grama	grama
°C	graus Celsius
h	hora
kDa	kilodalton
kb	kilobase
L	litro
$> \text{ e } <$	maior e menor
$\geq \text{ e } \leq$	maior ou igual e menor ou igual
m^2	metros quadrados
μg	micrograma
μl	microlitros
μg	micrometro
mg	miligrama
mL	mililitros
mmol	milimolar
min	minutos
M	molar
CO_2	monóxido de carbono

LISTA DE SÍMBOLOS

ng	nanograma
NO	óxido de nitrogênio
O ₂	oxigênio
pb	pares de base
pg	picograma
%	porcentagem
s	segundos

Resumo

RESUMO

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) constitui-se na enfermidade humana monogênica com risco de óbito mais frequente, responsabilizando-se por 4,4 a 10,0% dos casos de doença renal terminal em diferentes populações. Na quase totalidade dos pacientes, a doença é causada por mutação em um de dois genes: *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) ou *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*). Tais genes codificam, respectivamente, as proteínas policistina-1 (PC1) e policistina-2 (PC2). Mutações em *PKD1*, por sua vez, respondem pela ampla maioria dos casos de DRPAD. Camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}), o gene ortólogo a *PKD1* neste animal, consistem num modelo não cístico de deficiência de atividade deste gene. Em um estudo anterior, mostramos que animais *Pkd1*^{+/-} apresentam lesão renal mais severa que camundongos selvagens (*Pkd1*^{+/+}) quando submetidos a isquemia/reperfusão (I/R) renal. Esse estudo sugeriu, portanto, que a capacidade de regeneração renal pós-I/R esteja prejudicada em camundongos *Pkd1*^{+/-} e em pacientes com DRPAD. O insulto por I/R constitui-se em uma causa importante de indução de estresse de retículo endoplasmático (ER), podendo ativar as vias UPR (*unfolded protein response*) e ERAD (*ER-associated degradation*). Além disso, a ativação de vias envolvidas no ER determinado por I/R exerce um efeito de agravamento da lesão decorrente deste insulto. O ER pode, ainda, ativar e ser induzido pela resposta inflamatória. Estudos prévios revelaram que as policistinas também se relacionam com este processo. A expressão de PC2 pode ser super-regulada pela ativação de um dos braços da via UPR, enquanto a ativação da via ERAD estimula sua degradação. A superexpressão de XBP1, por sua vez, atenua o fenótipo cístico em camundongos deficientes em *Pkd1*, revelando que a ativação da via UPR pode mitigar a formação cística. Para analisar a relação entre ER e suscetibilidade aumentada a I/R na deficiência de *Pkd1*, avaliamos diferentes marcadores de ER em camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} submetidos a um insulto leve por I/R renal associado a 32 min de isquemia. A razão de expressão renal dos mRNAs *Xbp1s/Xbp1u* mostrou-se menor em camundongos *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} 48 h após I/R, enquanto a expressão proteica de XBP1s foi maior em rins *Pkd1*^{+/-} comparados a *Pkd1*^{+/+} após o insulto. Não detectamos diferença na expressão renal do gene *Hspa5* e de seu produto BIP/GRP78, assim como na expressão de *Ddit3*, gene que codifica CHOP, após intervenção sham e após I/R. Também não observamos diferenças entre os níveis renais e séricos de IL1β, IL6, IL10, TNFα e RANTES entre camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} pós-procedimento sham e pós-I/R, embora tendências não significantes de elevação de MCP1 tenham sido detectadas nos rins submetidos ao insulto para ambos os genótipos. As variações em sentidos opostos de XBP1s e *Xbp1s/Xbp1u* determinadas por I/R em rins *Pkd1*^{+/-} são consistentes com uma maior suscetibilidade destes animais à indução de ER. Esses achados sugerem que a indução de ER em resposta a um insulto leve por I/R possa aumentar a atividade de PC1 e exercer um efeito de atenuação sobre a maior suscetibilidade de camundongos deficientes em *Pkd1* a I/R renal.

Summary

SUMMARY

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common life-threatening monogenic disease in humans, accounting for 4.4 to 10.0% of the end-stage kidney disease cases in different populations. In almost all patients, this disorder is caused by a mutation in one of two genes: *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) or *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*). These genes encode, respectively, the proteins polycystin-1 (PC1) and polycystin-2 (PC2). Mutations in *PKD1*, in turn, are responsible for the large majority of ADPKD cases. *Pkd1*-haploinsufficient mice (*Pkd1*^{+/-}), the gene orthologous to *PKD1* in this animal, constitute a non-cystic model of this gene's deficiency. In a previous study, we showed that *Pkd1*^{+/-} animals develop a more severe renal injury than wild-type mice (*Pkd1*^{+/+}) when submitted to renal ischemia/reperfusion (I/R). This study suggested, therefore, that the capacity of renal regeneration following I/R is impaired in *Pkd1*^{+/-} mice and in ADPKD patients. The I/R insult is an important cause of endoplasmic reticulum stress (RS) induction, potentially leading to activation of the UPR (*unfolded protein response*) and ERAD (*ER-associated degradation*) pathways. The activation of pathways involved in RS determined by I/R exerts an aggravating effect on the injury resulting from the insult. In addition, RS can activate and be induced by the inflammatory response. Previous studies revealed that polycystins also relate to this process. PC2 expression can be upregulated by the activation of one of the UPR pathway branches, while activation of the ERAD pathway stimulates its degradation. XBP1 overexpression, in turn, attenuates the cystic phenotype in *Pkd1*-deficient mice, revealing that activation of UPR can mitigate cyst formation. To analyze the relationship between RS and the increased susceptibility to I/R associated to *Pkd1* deficiency, we evaluated different RS markers in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} mice submitted to a mild I/R insult determined by 32-min ischemia. The renal expression ratio of mRNA *Xbp1s/Xbp1u* was lower in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} mice 48 h after I/R, while the XBP1s protein expression was higher in *Pkd1*^{+/-} compared to *Pkd1*^{+/+} kidneys after the insult. We have not detected differences in renal expression of the *Hspa5* gene and its product BIP/GRP78, as well as in *Ddit3* expression, the gene that encodes CHOP, post-sham intervention and post-I/R. We have also not observed differences in the renal and serum levels of IL1 β , IL6, IL10, TNF α and RANTES between *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} mice post-sham procedure and post-I/R, although non-significant trends of MCP1 increase have been detected in kidneys submitted to the insult for both genotypes. The variations in different directions of XBP1s and *Xbp1s/Xbp1u* induced by I/R in *Pkd1*^{+/-} kidneys are consistent with a higher susceptibility of these animals to RS induction. These findings suggest that the RS induction in response to a mild I/R insult can increase PC1 activity and exert an attenuating effect on the increased susceptibility of *Pkd1*-deficient mice to renal I/R.

Introdução

INTRODUÇÃO

Doença Renal Policística Autossômica Dominante: Epidemiologia e Manifestações Clínicas

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) constitui-se em uma das enfermidades monogênicas mais comuns, com uma prevalência populacional classicamente estimada em 1:400-1000 (1), embora um estudo recente sugira que seja menor (2). Sua penetrância é virtualmente completa, traduzindo-se na necessidade de terapia renal substitutiva (TRS) em cerca da metade dos casos antes do final da sexta década de vida. De fato, a se considerar individualmente as diferentes glomerulopatias, a DRPAD configura-se na terceira causa de doença renal crônica terminal (DRCt) (3).

Embora as manifestações da DRPAD possam ocorrer em qualquer faixa etária, a doença manifesta-se classicamente nas terceira e quarta décadas de vida. Esta moléstia caracteriza-se pelo desenvolvimento de cistos renais bilateralmente, aumento progressivo do volume do órgão, comprometimento severo da arquitetura dos rins e perda gradual da função renal (4,5). Além da evolução para DRCt, tais alterações se traduzem frequentemente em complicações como dor em flanco, lombar ou abdominal, déficit de concentração urinária, hemorragia intracística ou hematúria, infecções de cisto ou de trato urinário e nefrolitíase (1,3).

Embora a maior parte dos pacientes cheguem à atenção médica por manifestações renais, a DRPAD consiste em uma desordem sistêmica, compreendendo também manifestações extra-renais. Entre elas, destaca-se o desenvolvimento de cistos hepáticos, a manifestação extra-renal mais comum, além de aneurismas intracranianos, anormalidades valvares e outras menos frequentes (6,7). O desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica

também merece destaque na DRPAD, ocorrendo em aproximadamente 60% dos casos antes de uma perda significativa de função renal. Vale notar que este fenótipo manifesta-se cerca de 10 anos mais cedo em pacientes com esta enfermidade que na população geral (8).

Os Genes *PKD1* e *PKD2*, Seus Produtos e Alterações Celulares Associadas à DRPAD

A DRPAD é causada por mutações no gene *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*), mapeado na região cromossômica 16p13.3, ou no gene *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*), localizado em 4q21. Mutações em *PKD1* são responsáveis por ~85% dos casos da doença, enquanto mutações em *PKD2* respondem por ~15% (9,10). *PKD1* compreende 46 éxons distribuídos por uma região genômica de ~52kb e origina um RNAm de 14,2 kb, o qual codifica policistina-1 (PC1), uma glicoproteína integral de membrana de 4303 aminoácidos (aa) (9,11). O gene *PKD2*, por sua vez, apresenta 15 éxons dispostos em um segmento genômico de ~68 kb e resulta em um transcrito de 5,4 kb. Este transcrito codifica policistina-2 (PC2), também uma glicoproteína integral de membrana, neste caso com 968 aa (12). Vale mencionar, contudo, que um estudo bastante recente revelou mutações no gene *GANAB* (*glucosidase II alpha subunit*) em sete famílias afetadas por DRPAD para as quais não haviam sido identificadas mutações em *PKD1* e *PKD2*. Este gene mapeia em 11q12.3 e codifica a subunidade α da glicosidase II (13).

PC1 possui uma porção extracelular N-terminal com mais de 3.000 aa, 11 domínios transmembrânicos e uma extremidade C-terminal intracitosólica curta. Sua região extracelular compreende 16 cópias de uma repetição de 80 aa semelhante a regiões de imunoglobulina, denominadas domínios PKD; uma sequência sinal; repetições ricas em leucina; domínios WSC, lectina tipo-C e LDL-A; um módulo REJ (*receptor for egg jelly*); e um domínio GPS (*G-protein-coupled receptor cleavage site*). O domínio GPS é particularmente importante por

INTRODUÇÃO

se constituir no sítio de clivagem da PC1, um processo que se associa a importantes consequências estruturais e funcionais renais (14,15). Em sua cauda C-terminal, PC1 apresenta um domínio helicoidal, denominado *coiled-coil*, e diversos sítios de fosforilação (16). Por meio de seu domínio helicoidal, PC1 interage fisicamente com a região C-terminal intracitosólica de PC2, demonstrando que ambos os produtos fazem parte de uma mesma via molecular (17). PC2 funciona como um canal de cátions não seletivo com alta permeabilidade a Ca^{2+} , cuja atividade é modulada pela PC1. Esta, por sua vez, comporta-se como um receptor de membrana, mas também atua como uma molécula de adesão (18,19,20) (Figura 1).

Figura 1. Desenho esquemático e domínios da polícistina-1 e da polícistina-2, produtos dos genes *PKD1* e *PKD2*. GPS: *G-protein coupled receptor proteolytic site*; REJ: *Receptor for egg-jelly*; R1-R16: repetições PKD; CLD: *C-type lectin domain*; LRR: repetições ricas em leucina; NTF: Fragmento N-terminal; CTF: Fragmento C-terminal

No nível subcelular, PC1 é encontrada no cílio apical primário, em vesículas citoplasmáticas, na membrana plasmática em desmossomos, adesões focais e junções aderentes e, possivelmente, no retículo endoplasmático e no núcleo (3). PC2, por sua vez, localiza-se

INTRODUÇÃO

predominantemente no retículo endoplasmático, mas também no cílio primário, membrana plasmática, centróssomo e fusos mitóticos de células em divisão (19). O fenótipo apresentado pelas células de revestimento cístico, portanto, constitui-se na tradução da perda ou severo comprometimento da atividade de PC1 ou PC2. Tal fenótipo inclui desdiferenciação celular, alterações de polaridade, defeitos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, elevadas taxas de proliferação e apoptose, e conversão de um padrão reabsortivo em secretor (21,22,23,24). De fato, Boletta e cols mostraram, em células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) cultivadas em gel de colágeno de três dimensões, que a transfecção de *PKDI* e a consequente expressão de PC1 reduziu a taxa de proliferação celular, promoveu resistência à apoptose e induziu tubulogênese espontânea (25).

O complexo PC1/PC2 e a poliductina/fibrocistina - produto do gene *PKHD1* (*polycystic kidney and hepatic disease 1*), mutado na doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR) – localizados no cílio apical primário de células tubulares/ductais renais, são necessários para a indução de transientes de Ca^{2+} em resposta ao dobramento ciliar determinado pelo fluxo de fluido tubular (26). Embora saibamos que PC1 interaja com o receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (27) e PC2 interaja com outras proteínas que funcionam como canais de Ca^{2+} (28), ainda não conhecemos com precisão como a homeostase intracelular de Ca^{2+} é alterada na DRPAD, uma vez que diferentes condições experimentais se acompanharam de resultados inconsistentes. A maior parte dos estudos mostra, contudo, níveis reduzidos de Ca^{2+} intracelular basal em células e tecidos com DRP humanos e animais. Este cenário de redução do nível citosólico de Ca^{2+} se associa a níveis aumentados de AMP cíclico (AMPc) em tecidos císticos (29). Várias hipóteses podem explicar tal elevação, incluindo ativação da adenil ciclase 6 inibível por Ca^{2+} , inibição da fosfodiesterase 1 dependente de Ca^{2+} - calmodulina e inibição indireta da fosfodiesterase 3 inibível por GMPc. Vale mencionar, por fim, que AMPc exerce efeitos opostos em células renais humanas de córtex renal e células DRP. Enquanto nas

primeiras AMPc inibe proliferação, em células DRPAD estimula vias proliferativas, promovendo uma resposta hiperproliferativa anormal (30).

Resultados de Bhunia e cols sugerem que alterações na via JAK/STAT possam constituir um dos mecanismos associados ao fenótipo celular proliferativo encontrado na DRPAD. Segundo seus achados, a ativação da PC1, obedecendo a um processo dependente de PC2, induz a ativação de JAK2 (*janus kinase 2*), a qual promove fosforilação e a formação de dímeros STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*). Esses dímeros translocam-se ao núcleo, ligando-se à região promotora do gene *p21* e promovendo sua super-regulação. A expressão aumentada de *p21* reduz, então, a atividade de Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*), levando à parada do ciclo celular em G0/G1 (31). Outro estudo demonstrou que o domínio citoplasmático da PC1 tem efeito ativador sobre AP-1 (*activator protein 1*), um fator de transcrição envolvido em processos de proliferação, diferenciação celular e apoptose (32). Merece atenção, ainda, a observação de que a via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) encontra-se ativada na DRPAD (33). Interessantemente, Dere e cols mostraram que o domínio C-terminal da PC1 interage diretamente com a tuberina, o produto do gene *TSC2* (*tuberous sclerosis complex 2*), um dos genes mutados na esclerose tuberosa) (34). Este fragmento da molécula, atado à membrana, protege a tuberina de fosforilação mediada por AKT (*protein kinase B*) no resíduo S939, mantendo-a na membrana e permitindo que iniba a via mTOR. Várias outras vias também se encontram alteradas na doença renal policística, fazendo da patogênese da DRPAD um processo bastante complexo (35,36).

Patogênese Molecular da DRPAD

Ainda na década de 90, um estudo clássico de Qian e cols propôs o modelo molecular fundamental para o mecanismo de formação focal de cistos na DRPAD, o qual obedece a um

padrão *knudsoniano* (37). De acordo com esse modelo, todas as células tubulares renais de um paciente com DRPAD do tipo 1 (associada a mutação em *PKD1*) apresentam uma das cópias desse gene com a mutação germinativa, que se constitui no primeiro evento. No entanto, é apenas no momento em que uma dada célula sofre uma mutação somática em seu alelo previamente normal, consistindo no segundo evento, que ocorre a expansão clonal e formação do cisto. Dessa forma, embora a DRPAD se constitua em uma enfermidade de transmissão genética dominante, no nível molecular/celular o mecanismo de cystogênese é recessivo, requerendo a inativação ou a redução significativa da atividade de ambos os alelos. Vale dizer que quando o cisto atinge um determinado tamanho ele se separa do segmento tubular de origem, individualizando-se como estrutura. Um estudo posterior desse grupo mostrou que este modelo também se aplicava aos cistos hepáticos (38). Estudos adicionais, por sua vez, estenderam o mesmo mecanismo à DRPAD do tipo 2 (associada a mutação em *PKD2*) (39).

Nos últimos nove anos, o modelo de dois eventos foi expandido e aprimorado por estudos fundamentais. Em 2007, Piontek e cols mostraram, utilizando camundongos geneticamente modificados, que a inativação de ambas as cópias de *Pkd1* antes do 13º dia de vida determinava cystogênese renal rápida e maciça, ao passo que a inativação em momento posterior a essa janela traduzia-se em cystogênese apenas em fase muito tardia (40). Em suporte a tais achados, um estudo posterior revelou que a inativação de ambos os alelos de *Pkd1*, induzida em rins maduros, se traduzia apenas em doença cística focal (41).

Trabalhando com camundongos submetidos a inativação de *Pkd1* na quinta semana de vida, Takakura e cols mostraram recentemente que um insulto renal unilateral por isquemia/reperfusão (I/R), induzido três semanas após, determinou cystogênese rápida e intensa no rim submetido à agressão, enquanto o mesmo não foi observado no órgão controle contralateral (42). Esses resultados sugeriram que no rim adulto o desenvolvimento amplo e rápido de cistos dependa de um terceiro evento, e que o insulto por I/R possa se comportar

como tal. Admite-se que esse efeito decorra da reativação de programas de desenvolvimento renal e/ou do aumento da taxa de proliferação celular, deflagrados pela lesão renal. Paralelamente, Bastos e cols analisaram essa questão em nosso laboratório, utilizando um outro modelo de deficiência do gene *Pkd1*, representado por um camundongo heterozigoto para uma mutação nula nesse gene (43). Uma vez que tais animais virtualmente não desenvolvem cistos renais na idade avaliada, o camundongo empregado consistiu em um modelo de haploinsuficiência pura de *Pkd1*. Este estudo demonstrou que animais haploinsuficientes desenvolveram microcistos renais seis semanas após o insulto I/R, não detectados nos camundongos controle selvagens. Esse achado apoia, portanto, o conceito de que I/R possa funcionar como um evento adicional para a cystogênese. Associados a outros estudos relevantes, esses dados levaram à proposição do modelo molecular atual de cystogênese, baseado no conceito de limiar de atividade para *PKD1* e *PKD2* (44). De acordo com esse modelo, a formação e a manutenção da estrutura tubular renal depende de um nível mínimo de atividade funcional de *PKD1* e *PKD2*. Assim, quando a atividade combinada de ambos os alelos de um desses genes cai abaixo desse limiar em uma dada célula, segue-se a formação do cisto. Esse limiar de atividade, contudo, depende de uma série de fatores, como a fase de desenvolvimento orgânico, efeitos ambientais, variantes genéticas de *loci* modificadores e demandas específicas, como em resposta à isquemia/reperusão.

A clivagem de PC1 também se constitui em um importante aspecto da tubulogênese renal que, quando comprometida, se traduz em cystogênese intensa das porções distais do néfron. Em 2002, Qian e cols demonstraram que a clivagem de PC1 em seu domínio GPS depende da integridade do domínio REJ adjacente (45). Mais recentemente, o mesmo grupo analisou o papel da clivagem de PC1 *in vivo*, por meio da geração de um camundongo *knockin* para *Pkd1* que expressa apenas a forma não clivada da molécula (alelo *Pkd1^V*) (15). Notavelmente, camundongos homozigotos para esta mutação dirigida desenvolvem um

fenótipo hipomórfico, caracterizado por início pós-natal de cistogênese envolvendo ductos coletores e túbulos distais. Vale notar que tais animais morrem entre duas e seis semanas de vida, presumivelmente devido à falência renal dada a elevação significativa da concentração sérica de uréia. Este estudo estabelece, portanto, um papel crítico mas restrito para a forma clivada da PC1, e sugere funções distintas para as formas clivada e não clivada da molécula.

Implicações Terapêuticas dos Avanços na Compreensão da Patogênese da DRPAD

A maior compreensão da patogênese molecular e celular da DRPAD permitiu nos últimos anos a identificação de drogas potencialmente capazes de atenuar sua progressão. Antagonistas do receptor V2 da vasopressina (RV2VP) mostraram-se capazes de diminuir os níveis de AMPc no túbulo distal e nos ductos coletores, segmento classicamente acometido pela formação cística nesta doença. Essas drogas inibiram o desenvolvimento ou a progressão da doença renal cística em modelos animais geneticamente modificados ortólogos à DRPAR, à nefronoftise da adolescência e à DRPAD humanas (46,47,48). O estudo clínico *Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes* (TEMPO) avaliou recentemente os efeitos do tratamento com este fármaco, um antagonista potente e seletivo do RV2VP humano, sobre a progressão da doença renal associada à DRPAD (49). Seus resultados indicaram um efeito benéfico do tolvaptan, traduzido em uma lentificação do aumento do volume renal total (VRT), marcador substituto da progressão da doença renal nesta enfermidade. Um efeito positivo também foi observado sobre a progressão da função renal.

Vale dizer que a ingestão muito aumentada de água também foi analisada no rato PCK, um modelo ortólogo à DRPAR humana, com o intuito de suprimir os níveis de vasopressina e reduzir o conteúdo intracelular de AMPc no epitélio renal (50). Tal manobra de fato atenuou o

INTRODUÇÃO

fenótipo da doença renal cística nesses animais, sugerindo que o mesmo efeito possa ser obtido em pacientes com DRPAD. Outra observação relevante consiste no fato de que a cafeína aumenta os níveis intracelulares de AMPc *in vitro* em epitélio DRPAD, ativando a via ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e promovendo aumento da taxa de proliferação celular e da secreção transepitelial de fluido (51).

A somatostatina e seus análogos exercem efeito inibitório sobre a geração de AMPc, inibindo a secreção de Cl⁻ e a proliferação celular nos cistos hepáticos e renais. Nesse contexto, a ação da octreotida foi avaliada em pacientes com fígados policísticos associados à DRPAD e à doença hepática policística autossômica dominante (DHPAD), revelando um efeito de redução do volume hepático no primeiro ano e controle de crescimento no segundo ano (52). Efeitos benéficos também foram observados para a lanreotida (53), embora a interrupção da terapia tenha se acompanhado do recrudescimento do crescimento hepático.

O uso de um inibidor de mTOR mostrou-se benéfico em um modelo murino ortólogo à DRPAD humana (54). Dois estudos clínicos maiores com everolimo e sirolimo, contudo, não confirmaram tais efeitos na população DRPAD avaliada (55,56). Merece destaque o estudo HALT-PKD, recentemente concluído (57). Este estudo mostrou que o controle rigoroso da pressão arterial em pacientes com DRPAD e TFG > 60 mL/min/1,73 m² se associou a um aumento mais lento do VRT comparado ao controle convencional. A combinação entre lisinopril e telmisartan, contudo, não alterou significativamente a taxa de crescimento do VRT na DRPAD precoce.

O uso de lovastatina reduziu a severidade da doença renal cística em ratos Han:SPRD, um modelo não ortólogo à DRPAD humana (58). Nessa linha, um estudo recente dirigido a crianças e adultos jovens com esta doença mostrou que o tratamento com pravastatina resultou em menor elevação percentual do VRT ajustado por altura. Vale notar que este efeito benéfico

ocorreu independentemente dos níveis de colesterol (59). Além dos fármacos mencionados, várias outras drogas se mostraram benéficas em estudos pré-clínicos, abrindo possibilidades adicionais a estudos clínicos voltados à terapêutica para a doença humana.

Isquemia/Reperusão Renal

A lesão por I/R consiste numa causa frequente de injúria renal aguda (IRA), incluindo pacientes com DRPAD. Esta lesão é resultante de anormalidades hemodinâmicas, celulares e moleculares, acompanhando-se da redução da taxa de filtração glomerular (TFG) (60). Outra consequência do insulto por I/R renal prolongado é o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, cuja intensidade varia em função do tempo e do grau da isquemia. Essa resposta inflamatória inicia-se pela ativação do sistema complemento, amplificando o recrutamento de células inflamatórias para o local da isquemia, principalmente através de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células endoteliais. Nessa fase inicial, destaca-se também a participação das espécies reativas de oxigênio geradas pelo desequilíbrio de óxido-redução (61). A necrose tubular aguda (NTA) pode então se instalar, envolvendo disfunção endotelial, inflamação e morte de células tubulares, acompanhadas do desprendimento de células epiteliais para a luz tubular (60). Deve-se destacar, ainda, que a morte celular induzida pela injúria renal por I/R pode também resultar da ativação de vias de apoptose.

A recuperação da NTA, por sua vez, depende do repovoamento celular das áreas lesadas (62). É interessante observar que células renais quiescentes avançam no ciclo celular após a lesão renal aguda, processo que se segue da indução de inibidores do ciclo celular, particularmente de p21 (63). O aumento da expressão desta proteína parece estar envolvido na coordenação adequada do ciclo celular, voltada à recuperação da lesão da célula epitelial renal (64).

Isquemia/Reperusão Renal na DRPAD

Uma vez que a PC1 atua na regulação da taxa de proliferação celular, da diferenciação celular e da apoptose, nosso grupo formulou há vários anos a hipótese de que sua menor atividade biológica pudesse favorecer um maior grau de lesão quando o rim fosse exposto a um insulto, particularmente à I/R. Além disso, o papel protetor de p21 sobre a agressão por I/R era bem documentada (63) e a reconhecida elevação da atividade de p21 induzida pela PC1 poderia ser consistente com uma maior suscetibilidade à isquemia em pacientes com DRPAD1 e em modelos animais ortólogos. Por fim, a incapacidade de diferenciação adequada e/ou de inibição da apoptose durante o processo de regeneração também poderiam dificultar a recuperação renal pós-lesão.

Nesse cenário, Bastos e cols avaliaram, em nosso laboratório, os efeitos da isquemia/reperusão renal em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (43). De fato, animais heterozigotos para uma mutação nula nesse *locus* (*Pkd1*^{+/-}) apresentaram maior suscetibilidade à lesão renal induzida por I/R que seus controles selvagens (*Pkd1*^{+/+}). Tal efeito foi observado tanto para parâmetros funcionais, relativos à filtração glomerular e à disfunção tubular, como no nível histológico. Uma vez que pacientes com DRPAD apresentam cistos renais dispostos em um *background* orgânico de haploinsuficiência para *PKDI*, esses achados sugerem que tais indivíduos também apresentem maior suscetibilidade ao dano renal instituído por tal insulto. Os resultados desse estudo sugerem, ainda, que a maior suscetibilidade a I/R observada nos rins *Pkd1*^{+/-} se deva, ao menos parcialmente, à incapacidade desses animais de super-regularem *p21* em resposta à agressão. Tais observações foram corroboradas por Prasad e cols em camundongos haploinsuficientes para *Pkd2* (65). Esses investigadores mostraram que os níveis de expressão de *Pkd2* influenciam tanto a suscetibilidade quanto a natureza da resposta de reparo que se segue à injúria renal. De forma similar, a expressão tubular de p21

em camundongos *Pkd2*^{+/-} também se revelou mais baixa que em animais *Pkd2*^{+/+} seguindo-se à lesão renal.

Vale notar que um estudo recente reportou que HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) apresenta altos níveis de expressão em dois modelos animais císticos não ortólogos à DRPAD humana (66). Essas observações apoiam os resultados prévios de nosso grupo, sugerindo que eventos de I/R contribuam para a aceleração da doença renal na DRPAD. Um aspecto interessante e importante do estudo de Bastos e cols foi o envolvimento de túbulos coletores na lesão renal verificada nos camundongos *Pkd1*^{+/-} (43). Esse padrão não pode ser considerado uma surpresa, na medida em que estudos anteriores demonstraram que PC1 se expressa particularmente no néfron distal e em túbulos coletores (20).

Estresse de Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é constituído por uma rede ramificada de túbulos e vesículas achatadas interconectadas através de sua luz, associando-se a várias funções celulares. O RE é uma das maiores organelas da célula, delimitando seu conteúdo interno do citossol por meio de uma bicamada lipídica (67). Tal organela atua na síntese, enovelamento e maturação de um grande contingente das proteínas celulares, incluindo as destinadas à membrana plasmática, complexo de Golgi, lisossomos e ao próprio RE. A maior parte das proteínas secretadas pela célula também iniciam seu processamento no RE. A ausência ou insuficiência de tais funções, essenciais à fisiologia da célula, pode, portanto, se traduzir em desordens ou enfermidades clínicas (68).

Alterações do balanço homeostático do RE, denominadas estresse de retículo (ER), comprometem sua capacidade funcional. Entre os estímulos associados a esta disfunção,

INTRODUÇÃO

destacam-se o acúmulo de proteínas não enoveladas ou mal enoveladas e a presença de proteínas mutadas em seu lúmen. Hipóxia e distúrbios na regulação de espécies reativas de oxigênio também constituem estímulos capazes de induzir ER (69). Diferentes vias de sinalização, por sua vez, são ativadas em resposta aos distúrbios deflagradores de ER, integrando programas denominados *unfolded protein response* (UPR) e *ER-associated degradation* (ERAD) (70).

Entre as vias de sinalização deflagradas a partir de cenários indutores de ER, destaca-se a IRE1 α (*inositol-requiring kinase 1 α*), uma endoribonuclease responsiva ao ER. Esta nuclease encontra-se presente na membrana das vesículas do RE e se associa a BIP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*, também denominada GRP78), exercendo função sensorial. Ao longo do processo de ER, BIP dissocia-se do complexo BIP/IRE1 α , ligando-se às proteínas alteradas presentes no lúmen do RE. IRE1 α , por sua vez, sofre homodimerização e autofosforilação, reações que ativam sua função de endoribonuclease e determinam a clivagem do RNAm de *XBPI* (*X-box-binding protein 1*). Nesse processo, IRE1 α realiza o *splicing* não convencional de um segmento intrônico de 26 nucleotídeos do mRNA de *XBPI*. O resultado desse *splicing* é a mudança na fase de leitura do mRNA, criando um novo stop códon e dando origem a uma isoforma de XBP1 com 54 kDa, denominada XBP1s (*spliced XBP1*). XBP1s migra para o núcleo celular e atua como um fator de transcrição da família bZIP, ligando-se a ERSE (*ER stress response element*) e regulando, dessa forma, a expressão de diversos genes associados às vias UPR e ERAD (70). O mRNA de XBP1 que não passa pelo *splicing* não convencional gera uma isoforma de 33 kDa denominada XBP1u (*unspliced XBP1*), uma proteína instável que, uma vez formada, é degradada no citoplasma, impedindo sua migração para o núcleo celular.

As vias PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER-kinase*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*) atuam em paralelo e de maneira complementar no resgate

INTRODUÇÃO

funcional do RE (71). Frente aos insultos que promovem ER, PERK fosforila eIF2 α (*eucaryotic translation initiation factor 2 α*), determinando atenuação da síntese proteica e consequente redução do trânsito de proteínas no RE. Nesse sentido, PERK regula de maneira negativa a expressão da ciclina D1, promovendo parada do ciclo celular dependente da UPR (72). Conjuntamente, PERK ativa a formação de ATF4 (*activating transcriptional factor 4*), um fator de transcrição da família bZIP, que também controla a expressão de diversos genes associados à UPR e ERAD (71). ATF6, por sua vez, é translocado da membrana do RE para o complexo de Golgi. Nesta organela essa proteína sofre proteólise, originando um subtipo de ATF6 que, ao migrar para o núcleo celular, liga-se à região promotora ERSE. Tal ligação regula, então, a expressão de diversos genes, incluindo *GRP78* e *XBPI* (73) (Figura 2).

Vale ressaltar que, frente a um estresse de retículo persistente no qual as vias de UPR já não se mostram suficientes para o resgate funcional do RE, mecanismos apoptóticos são deflagrados. Entre estes mecanismos, um dos mais representativos é a ativação de CHOP (*C/EBP homologous protein*) via PERK, IRE1 e ATF6. CHOP é um fator de transcrição que age inibindo a ação anti-apoptótica de Bcl-2, conduzindo a célula à apoptose. Adicionalmente, IRE1 medeia a ativação da via JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*), com posterior envolvimento de TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) e ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*). Em camundongos, caspase-12 também foi implicada em morte celular estimulada por ER (74).

Figura 2. Esquema representativo das vias envolvidas no estresse de retículo endoplasmático. IRE1α: inositol-requiring kinase 1α, BIP: immunoglobulin heavy chain binding protein, XBP1: X-box-binding protein 1, ERSE: ER stress response element, PERK: double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER-kinase, ATF4: activating transcriptional fator 4, ATF6: activating transcription factor 6, eIF2α: eucaryotic translation initiation factor 2α, UPR: unfolded protein response, ERAD: ER-associated degradation.

Estresse de Retículo e Isquemia/Reperusão

Entre os distúrbios que afetam a homeostase do RE, destacam-se os associados ao insulto por I/R (75). Este insulto suprime o aporte de oxigênio e nutrientes às células e induz a formação de óxido nítrico (NO) e de outras espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, canais de Ca^{2+} associados ao retículo endoplasmático podem ter seus resíduos de cisteína oxidados na presença de EROs, causando depleção dos estoques deste cátion no RE (74). De maneira isolada ou conjuntamente, tais fatores podem acarretar no acúmulo de proteínas não enoveladas no lúmen desta organela, resultando em estresse de retículo endoplasmático.

Várias evidências indicam que a ativação de vias envolvidas no ER determinado pelo insulto I/R atua como fator de agravamento do mesmo. Nesse contexto, um efeito deletério pós-insulto de maior magnitude tem sido atribuído a CHOP, associando sua ativação a encaminhamento da célula para apoptose (74). A partir dessas observações, passou-se a investigar o potencial terapêutico da inibição de vias envolvidas no ER frente à agressão por I/R. Vários estudos confirmaram, de fato, que tal abordagem pode se constituir em alternativa eficaz à limitação do dano celular e tecidual produzido por tal insulto (76,77).

Estresse de Retículo e Inflamação

Embora a inflamação consista em resposta fisiológica voltada à manutenção dos sistemas biológicos, em inúmeras situações tal resposta se associa à indução de anormalidades e doenças. A disponibilidade e o recrutamento de mecanismos efetores da inflamação variam de acordo com a categoria, intensidade e ordem do agente gerador do insulto. No intuito de fornecer uma proteção de ordem primária frente à injúria, a resposta inflamatória, em sua fase aguda, tem o objetivo de impedir a expansão da lesão a sítios e tecidos adjacentes (78). A resposta imunológica inata, desencadeada posteriormente à injúria tecidual, é orquestrada pela

ativação do sistema complemento, monócitos, neutrófilos e citocinas (79). As citocinas operam como mediadores dos processos inflamatórios através da modulação refinada da transdução de sinais, que se traduzem na estimulação ou na inibição da atividade celular. Nesse processo, agem sobre o recrutamento e mobilização de diversas populações de linfócitos que, apesar de comporem classicamente a resposta imunológica adquirida, também têm sido associados à resposta inata (79,80).

Nos últimos anos, diversos estudos têm apontado para uma conexão entre ER e inflamação. De fato, diversos estudos têm revelado uma ação mediadora dos agentes efetores do ER sobre a ativação da resposta inflamatória. Entre elas, destaca-se a observação de que IRE1 α induz a proteína de interação com a tiredoxina (TXNIP) a ativar o inflamassoma NLRP3 (*NRL Family, pyrin domain containing 3*) e promovendo morte celular. Estudos recentes também mostraram o envolvimento das vias PERK, IRE1 e ATF6 na intermediação de programas transcricionais pró-inflamatórios autônomos (81). A ativação de IRE1 α por intermédio de TRAF2 é capaz de recrutar I κ B kinase (IKK) para o RE. A interação IRE1 α -TRAF2-IKK, por sua vez, ativa o fator de transcrição NF- κ B (*nuclear factor κ B*) que, subsequentemente, se transloca para o núcleo celular e induz a transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo TNF- α (*tumor necrosis factor- α*). Nesse cenário, segue-se a indução de morte celular deflagrada inicialmente por ER. Vale notar que CHOP constitui-se em um importante mediador da resposta inflamatória na sepse, atuando como amplificador dessa resposta (82,83). Por fim, a ativação de JNK por IRE1 constitui-se em outro mecanismo de ligação entre ER e inflamação, na medida em que ativa o fator de transcrição AP-1, super-regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (84).

Isquemia/Reperfusão Renal e Estresse de Retículo

A lesão renal causada por I/R apresenta-se como uma das principais causas de lesão renal aguda, sendo caracterizada por necrose e disfunção tubular (61). Vale notar que, no cenário de transplante renal, a I/R renal constitui-se em um importante fator de risco para o desenvolvimento de função retardada do enxerto (85). Um número crescente de estudos tem demonstrado o envolvimento das vias de ER na patogênese da lesão por I/R (86,87). É importante mencionar, também, que ER tem sido atribuído progressivamente com maior peso como contribuinte aos mecanismos fisiopatológicos associados a doenças renais de diferentes etiologias. No âmbito da lesão renal por I/R, é essencial reconhecer que a hipóxia e a depleção de nutrientes são fatores estimuladores das vias de ER (88). É importante notar, contudo, que o estresse metabólico por privação de glicose comporta-se como fator indutor do ER frente à lesão isquêmica, enquanto a hipóxia isolada parece ser insuficiente para desencadear tal resposta (89). Paralelamente, demonstrou-se que o estresse metabólico foi capaz de gerar resposta inflamatória tubular, ao induzir a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (interleucina-6), IL-8(interleucina-8), TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), MCP-1(*monocyte chemoattractant protein-1*) e RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*). Este estudo também revelou a ativação da via NF- κ B, além de um papel mediador da via IRE1, componente essencial da UPR, na inflamação tubular determinada pelo estresse metabólico (89). Merece destaque, por fim, o desencadeamento posterior das vias de ER pela reoxigenação pós-isquêmica, caracterizando tal mecanismo como um contribuinte adicional à indução de ER.

Dong e cols mostraram que a expressão de CHOP após insulto renal por I/R acompanhou o curso temporal da lesão, e que a inativação deste gene diminuiu os níveis de apoptose e atenuou a lesão. Na mesma linha, Noh e cols mostraram que camundongos *CHOP*

^{1/-} apresentaram redução substancial da resposta inflamatória pós-I/R renal. Um terceiro estudo, envolvendo pré-tratamento de células HK-2 (*Human Kidney - 2*) com barberina, um extrato alcaloide de ervas, mostrou que as células pré-tratadas submetidas a insulto por hipóxia/reoxigenação apresentaram atenuação da lesão associada a inibição das vias de estresse de retículo e mitocondrial (86,87,90). Intermedina, membro da família dos produtos de genes relacionados à calcitonina, também apresentou efeito protetor frente à lesão renal por I/R em ratos Sprague Dawley, reduzindo os níveis de expressão das proteínas GRP78/BIP, CHOP e caspase-12 (91). Outro estudo conduzido em células HK-2 infectadas com um lentivírus contendo um construto capaz de expressar catelicidina PR-39, um peptídeo com efeitos anti-inflamatórias e associado a reparo de úlceras, mostrou recentemente inibição da apoptose induzida pela via da caspase-12 ER-dependente, seguindo-se a insulto por hipóxia/reoxigenação (92). Além disso, animais submetidos a condicionamento pós-isquêmico, baseado na realização de 6 ciclos de 10s de reperfusão e 10s de isquemia imediatamente após o insulto isquêmico, foram aparentemente protegidos da lesão renal, uma vez que tal condicionamento apresentou efeito supressor sobre o ER (93). ORP150 (*oxygen-regulated protein*), por fim, uma chaperona induzida por ER, também foi capaz de conferir um efeito citoprotetor a células epiteliais renais pós-I/R, pautada na supressão de morte celular (94).

DRPAD e Estresse de Retículo

Relações entre ER e DRPAD foram investigadas nos últimos anos. Yang e cols mostraram que a expressão de PC2 é super-regulada por ER associado à fosforilação de eIF2 α em várias linhagens celulares de mamíferos (95). Herp (*homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein*), por sua vez, uma proteína encontrada na membrana do RE e responsiva a

INTRODUÇÃO

estímulos indutores de ER, está envolvida na ERAD e regula a expressão de PC2 por meio da promoção e consequente modulação de sua degradação (96). Outros achados revelaram, ainda, um papel importante da PC2 na homeostase do RE. De fato, PC2 promove a fosforilação de eIF2 α por meio de uma reação mediada por PERK. Esta fosforilação atenua a síntese global de proteínas, evitando o acúmulo de proteínas mal-enoveladas no interior do RE e, portanto, protegendo a célula do ER (97). Em sintonia com esses resultados, formas mutadas da PC2 perdem a capacidade de modular a proliferação celular e a fosforilação de eIF2 α , favorecendo o desenvolvimento de ER. Dada sua natureza, tal disfunção tem sido sugerida como um fator coadjuvante à patogênese da DRPAD (97).

Estudos recentes mostraram que a inativação de *Sec63* (*protein-transporting protein SEC63*), o ortólogo de camundongo a um dos genes mutados na doença hepática policística autossômica dominante humana, reduz a atividade funcional de PC1, causando doença cística renal e hepática (98). Vale notar que o produto deste gene está envolvido na translocação das proteínas sintetizadas no RE e no processo de controle de qualidade desses polipeptídeos. Nesse cenário, a deficiência funcional deste gene associa-se a prejuízo da biossíntese de PC1 (98). Em estudo subsequente, este mesmo grupo mostrou que a inativação de *Sec63* induz a via UPR, a qual interessantemente apresenta um papel protetor contra a formação cística. Esses investigadores demonstraram que a inativação concomitante de *Sec63* e *Xbp1* ampliou o fenótipo renal policístico em camundongos, por meio da inibição da clivagem de PC1 no domínio GPS. Em consonância com tal observação, a expressão induzida de XBP1s aumentou esta clivagem em células deficientes em *Sec63*, enquanto a superexpressão de XBP1 *in vivo* melhorou a doença cística em camundongos deficientes em PC1 não associados à inativação de *Sec63* (99). Esses achados revelaram que SEC63 regula a ativação de IRE1 α /XBP1 e que SEC63 e XBP1 são necessários para a clivagem e maturação de PC1. Tais dados demonstraram,

ainda, que a ativação de XBP1 exerce um efeito anti-cistogênico num cenário de biogênese prejudicada de PC1.

Ao analisar o fenótipo de camundongos sem expressão de aquaporina 11 (AQP11), Inoue e cols. observaram, interessantemente, o desenvolvimento de rins policísticos (100). Diante de tais achados, esses pesquisadores formularam a hipótese de que a ausência de AQP11 no RE poderia comprometer o tráfego celular de PC1 e PC2. Surpreendentemente, os rins de animais sem expressão de AQP11 apresentaram expressão aumentada de PC1 e reduzida de PC2. Além disso, PC1 extraída desses rins apresentou mobilidade eletroforética alterada, causada por um processo de N-glicosilação anormal, além de tráfego celular prejudicado para a membrana. Tais achados sugerem que o desenvolvimento do fenótipo renal policístico nesses camundongos tenha ocorrido devido a glicosilação inapropriada e tráfego aberrante da molécula.

Isquemia/Reperfusão e Estresse de Retículo na DRPAD

Apesar dos avanços obtidos na elucidação de relações entre as policistinas e o ER, o envolvimento e a influência desta resposta na lesão renal induzida por I/R no contexto de deficiência de *PKD1* ou *PKD2* ainda não é conhecida. Por um lado, a indução de ER associada à fosforilação de eIF2 α é capaz de aumentar a expressão de PC2 em células de mamíferos, sugerindo que a ativação deste ramo da via UPR possa se constituir em um efeito atenuador do ER sobre a lesão renal por I/R num cenário de deficiência de *PKD2*, e talvez de *PKD1*. Por outro lado, a proteína Herp promove a degradação de PC2, sugerindo que a ativação da via ERAD possa ampliar o efeito lesivo do insulto renal por I/R no contexto de deficiência de *PKD2*, e potencialmente de *PKD1*. O papel relevante de PC2 na homeostase do RE ampara tais hipóteses.

As observações de que a inativação de *Xbp1* em camundongos com inativação de *Sec63* piorou o fenótipo renal policístico e de que sua superexpressão atenuou tal fenótipo em camundongos deficientes em PC1 introduziu um elemento adicional fundamental a tal discussão. Tais resultados sugerem que a ativação deste ramo da via UPR possa ter um efeito atenuador da progressão da doença cística num cenário de deficiência de atividade de PC1, particularmente associado a um aumento da expressão de XBP1. Nesse contexto, a ativação da via UPR poderia minimizar o efeito lesivo do ER sobre a lesão renal induzida por I/R em rins deficientes em *PKDI*. Diante de tais achados, não sabemos se a indução de ER por I/R renal contribui para a maior suscetibilidade de camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* a tal insulto, ou se exerce um efeito atenuador desta maior suscetibilidade. Para enfrentar esta questão, analisamos perfis de expressão proteica de BIP e XBP1s, assim como o perfil de expressão dos genes *Xbp1*, *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif1 α* em rins de camundongos selvagens e heterozigotos para uma mutação nula em *Pkd1*, em condições basais e após insulto por I/R. Para ampliação desta análise, estendemos nosso estudo à determinação dos níveis de diferentes citocinas no soro e no rim desses animais.

Primeiro Período do Projeto

Objetivos

O projeto correspondente ao primeiro período de meu mestrado tinha como título “Efeitos de diferentes perfis de deficiência do gene *Pkd1* sobre a resposta de células renais à hipóxia/reoxigenação”, pois esse era o plano a ser seguido. Trabalhei nessa linha até meu exame de qualificação, com a geração dos resultados e dos planos de ação apresentados a seguir. Infelizmente, contudo, o equipamento fundamental empregado em meu modelo experimental – externo a nosso laboratório - sofreu danos que impediram seu conserto em tempo hábil para o prosseguimento de meu trabalho. Nesse cenário, depois de vários meses aguardando a restauração de seu funcionamento que não ocorria, decidimos mudar o projeto para que eu pudesse concluir meu programa de mestrado. Nesse contexto, decidimos abordar um outro aspecto relevante e interessante relacionado ao mesmo problema fundamental analisado em meu projeto inicial, envolvendo a relação isquemia/reperfusão na DRPAD/estresse de retículo endoplasmático. Esta estratégia deu origem ao segundo período de meu mestrado, intitulado “Efeitos do insulto por isquemia/reperfusão renal sobre a indução de estresse de retículo endoplasmático em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*”. Passo agora a apresentar os resultados do primeiro período. Ao final do mesmo seguirei para o trabalho correspondente ao segundo período, objeto concluído de meu trabalho e artigo submetido.

Objetivos

O objetivo central deste primeiro período do projeto foi analisar a participação primária de células renais deficientes em *Pkd1* no processo de maior suscetibilidade renal ao insulto por I/R. Para tanto, culturas primárias de células derivadas de filamentos ductais da medula renal interna de rins adultos e de rins embrionários de camundongos, com diferentes níveis de deficiência de *Pkd1* (células adultas *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} e células embrionárias *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-}) foram submetidas à hipóxia (HO) e hipóxia/reoxigenação (HO/R) e avaliadas quanto a intensidade da lesão e fenótipos celulares.

OBJETIVOS

Objetivos Específicos

1. Estabelecer e padronizar a metodologia de cultura primária para células derivadas de estrias ductais da medula renal interna de camundongos adultos com os genótipos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, assim como de células derivadas de rim embrionário de camundongos com os genótipos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-}.
2. Determinar o fenótipo celular das culturas primárias estabelecidas no item #1, por meio de marcadores de células epiteliais, células tubulares renais.
3. Estabelecer a metodologia de aplicação dos insultos hipóxia e hipóxia/reoxigenação nas culturas estabelecidas.
4. Avaliar as respostas de viabilidade celular e morte celular por apoptose aos insultos HO e HO/R.
5. Analisar a resposta proliferativa celular determinada pelos insultos HO e HO/R em células deficientes e suficientes em *Pkd1*.
7. Avaliar e comparar a expressão quantitativa dos genes *p21*, *Hif1a* e *Il6* em células deficientes e suficientes em *Pkd1*, em condições basais e após submissão a HO e HO/R.
8. Analisar e comparar o estresse de retículo induzido pelos insultos HO e HO/R em células deficientes e suficientes em *Pkd1*.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

Ética em Experimentação Animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, seguindo os padrões nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais. A eutanásia foi realizada com o camundongo em estado de anestesia/inconsciência induzida pela administração intraperitoneal de tiopental sódico 0,4 mg/g de peso corpóreo (PC).

Camundongos Geneticamente Modificados com Diferentes Perfis de Deficiência em *Pkd1*

O modelo animal com mutação nula em *Pkd1* utilizado neste estudo foi gerado por Piontek e cols na Universidade Johns Hopkins (101); seguiram-se, então, cruzamentos apropriados para a transferência desta mutação para o *background* C57BL/6. A construção desse alelo baseou-se na substituição de parte do éxon 2 e todo o éxon 3 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 terminação de transcrição, determinando inativação de *Pkd1*. Camundongos heterozigotos para esta mutação (*Pkd1*^{+/-}) representam genotipicamente o estado de haploinsuficiência que ocorre na DRPAD humana, mas não a representam fenotipicamente, uma vez que virtualmente não desenvolvem cistos renais em estágios relativamente avançados de vida.

O procedimento de genotipagem iniciou-se com a extração de DNA de pequenos fragmentos da cauda dos animais, seguindo-se da aplicação do método de *salting-out*. Realizou-se, então, reação em cadeia da polimerase (PCR) com o DNA genômico extraído,

MATERIAIS E MÉTODOS

utilizando os seguintes *primers*: KF1 *forward* (5'-AATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3') e dois *reverse*: um específico para o alelo selvagem, KR1 (5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3') e outro específico para o alelo *knockout*, M3-2B (5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'). Após a reação de PCR, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe DNA gel Stain (LifeTechnologies, Carlshad, CA) e visualizados em foto-documentador. Camundongos com apenas uma banda de 180 pares de base (pb) foram identificados como selvagens ($Pkd1^{+/+}$); os com duas bandas, 180 pb e 220 pb, como heterozigotos ($Pkd1^{+/-}$); e aqueles com uma única banda de 220 pb como homozigotos para o alelo $Pkd1$ nulo ($Pkd1^{-/-}$). A geração de animais $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ se baseou em cruzamentos entre macho $Pkd1^{+/-}$ e fêmea $Pkd1^{+/+}$, enquanto embriões $Pkd1^{-/-}$ e $Pkd1^{+/+}$ foram obtidos a partir de cruzamentos entre macho e fêmea $Pkd1^{+/-}$. Células MRI $Pkd1^{+/-}$ e seus controles $Pkd1^{+/+}$ foram isoladas de animais adultos machos e fêmeas entre 8 -12 semanas de idade, enquanto células EmR $Pkd1^{-/-}$ e seus controles $Pkd1^{+/+}$ foram obtidas de embriões machos e fêmeas entre 14 e 15 dias de vida, dada a letalidade embrionária associada ao genótipo $Pkd1^{-/-}$.

Isolamento e Cultura de Células de Filamentos Ductais da Medula Renal Interna de Camundongos Adultos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$

Os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico 0,4 mg/g de PC, submetidos a higienização superficial com digliconato de clorexidina 2% e álcool 70% para, então, terem seus rins removidos e colocados em solução estéril PBS (NaCl 137 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mmol/L, KH_2PO_4 2,0 mmol/L, pH 7,4) gelada, suplementada com anfotericina B na concentração de 2 mg/L (Cristália, São Paulo, Brasil) e penicilina/estreptomicina 1% (Invitrogen, Carlshad, CA). A seguir, sob condições estéreis, os

rins foram cortados no eixo sagital para exposição da medula interna/papila renal. Com o auxílio de um estereoscópio Nikon SMZ645 (Nikon, Melville, NY), a medula interna/papila renal foi removida e dissecada sob cama de gelo, até a obtenção de pequenos filamentos. Em seguida, os fragmentos resultantes foram submetidos a digestão enzimática em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) baixa glicose (1 g/L) (Invitrogen, Carlsbad, CA) com collagenase tipo IV (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e hialuronidase (0,2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 45 min a 37°C, sob agitação constante. O produto resultante da digestão foi lavado 3x em PBS e ressuspensionado em DMEM alta glicose (4,5 g/L) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 10%, penicilina/estreptomicina 1% e D-valina 92 mg/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). D-valina foi acrescida ao meio de cultura para evitar crescimento de fibroblastos. As células foram cultivadas em placas previamente revestidas com colágeno tipo I 0,04% (BD, Blandford, MA) em estufa úmida, com atmosfera controlada de O₂ 95% e CO₂ 5% a 37°C. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias.

Isolamento e Cultura de Células Embrionárias Renais (EmR) de Camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-}

Uma vez que camundongos *Pkd1*^{-/-} apresentam mortalidade pré-natal, as células EmR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-} foram coletadas de embriões no 14º-15º dia de vida embrionária. As fêmeas prenhas foram eutanasiadas por meio da administração intraperitoneal de uma alta dose de tiopental sódico (0,8 mg/g de PC). Tais fêmeas foram submetidas a higienização local com digliconato de clorexidina 2% e álcool 70%, de modo a permitir a remoção do útero com os embriões em ambiente estéril, seguida da separação da placenta do tecido embrionário. Com o auxílio de um estereoscópio, os fetos foram posicionados em decúbito ventral para, a seguir,

MATERIAIS E MÉTODOS

se realizar uma incisão lateral para exposição e remoção dos rins. Os rins dos embriões foram condicionados em solução PBS estéril gelada, suplementada com penicilina/estreptomicina 1% (Invitrogen, Carlshad, CA). Uma pequena amostra de cauda foi obtida para extração de DNA, genotipagem e sexagem dos embriões. Os rins foram submetidos a digestão enzimática com o tampão de digestão descrito anteriormente por 15 min e a 37°C, sob agitação constante. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e ressuspensas em meio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlshad, CA) alta glicose (4,5 g/L), suplementando com 10% SFB (Invitrogen, Carlshad, CA), penicilina/estreptomicina 1%, ITS (Insulina 5 ug/mL, Transferrina 5 ug/mL e Selenio 5 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Dexametasona (5 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Triiodotironina (1 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), EGF (10 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e D-valina 92 mg/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Assim como para as células MRI, as células EmR foram cultivadas em placas previamente revestidas com colágeno tipo I 0,04%, em estufa úmida com atmosfera de O₂ 95% e CO₂ 5% a 37°C, e o meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias.

Para a genotipagem e sexagem dos embriões, amostras de DNA genômico foram extraídas através da técnica de *salting-out*. A genotipagem dos embriões foi realizada utilizando a mesma técnica descrita para o procedimento conduzido nos camundongos adultos. A reação de PCR realizada para sexagem foi do tipo multiplex, com *primers* específicos para os genes *Sry* (*sex determining region Y*), localizado no cromossomo Y, e *Myog* (*myogenin*), um gene constitutivo (102). As sequências dos *primers* específicos para *Sry* foram 5'-TCATGAGACTGCCAACCACAG-3' (*foward*) e 5'-CATGACCACCACCACCAAA-3' (*reverse*). Para *Myog*, as sequências dos *primers* específicos foram 5'-TTACGTCCATCGTGGACAGC-3' (*foward*) e 5'-TGGGTCGGGTGTTAGTCTTA-3' (*reverse*). As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 5 s e 67°C por 40 s e, por fim, 1 ciclo de 72°C por 1 min. Essa técnica permite a identificação de

dois produtos de PCR de tamanhos distintos: um de 245 pb, referente à presença do gene *Myog* e utilizado como controle interno da reação, e outro de 441 pb, referente à presença do gene *Sry* e encontrado apenas nas amostras de camundongos machos. Dessa forma, os embriões com banda única de 245 pb foram identificados como fêmeas, enquanto os com ambas as bandas, de 245 e 441 pb, foram classificados como embriões machos. Os amplicons resultantes dessa PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR safe DNA gel Stain (LifeTechnologies, Carlshad, CA) e visualizados em fotodocumentador.

Determinação do Fenótipo Celular das Culturas Primárias

Imunofenotipagem

Buscando confirmar o fenótipo epitelial das células isoladas das estrias ductais da medula renal interna/papila de camundongos adultos, avaliamos a expressão do marcador E-caderina (ECAD) por citometria de fluxo. As células isoladas e cultivadas foram desprendidas das placas de cultura utilizando *TrypLE Express* (Life Technologies, Carlshad, CA) em volume suficiente para cobrir toda a superfície da mesma durante 10-15 min a 37°C. A seguir, adicionamos à placa meio de cultura completo 2x o volume de TrypLE para inativar a tripsina. As células foram centrifugadas, lavadas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

Sequencialmente, as células foram incubadas com o anticorpo específico para camundongo Mouse E-Cadherin APC-conjugated antibody (R&D Systems, Mineapollis, MN) diluído em PBS contendo CaCl₂ 0,90 mM e MgCl₂ 0,49 mM. A aquisição de dados foi realizada no citômetro BD FACSCanto II através do *software* BD FACSDiva (BD Biosciences San Jose, CA). A análise dos dados adquiridos no citômetro foi conduzida através do *software* FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

Imunocitoquímica para E-Caderina

Para os ensaios de imunocitoquímica, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas previamente tratadas com colágeno tipo I 0,04% (BD, Blandford, MA) e cultivadas até confluência de 70-80%. Em seguida, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% à temperatura ambiente por 10 min e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 25 min. Utilizamos para a análise imunocitoquímica de E-caderina o método LSAB-AP (*Labeled Streptavidin-Biotin Alkaline Phosphatase* – Dako, Carpinteria, CA). O bloqueio da biotina endógena, assim como de sítios de ligação de biotina e avidina e de receptores de biotina, foi realizado com o kit Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector, Burlingame, CA). Esse procedimento de bloqueio foi realizado em duas etapas. Primeiro aplicou-se a solução de avidina D por 10 min à temperatura ambiente, depois a solução de biotina também por 10 min e à temperatura ambiente. O bloqueio de proteína inespecífica foi realizado com *Protein Block* (Spring Bioscience, Pleasanton, CA) por 30 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo primário anti-ECAD (Dako, Carpinteria, CA) pronto para uso, por 2 h. Após incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas e destinadas à aplicação do anticorpo secundário LSAB+ System-AP (Dako, Carpinteria, CA). Primeiramente as lamínulas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado por 15 min à temperatura ambiente, procedimento seguido da aplicação da estreptavidina conjugada com a enzima fosfatase alcalina, também por 15 min e à temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram lavadas novamente e reveladas em solução contendo *fast red* 0,1% (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO), naftol fosfato AS-MX 0,54 mM (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO) e levamisol 2 mM em tampão Tris-HCl pH 7,2 (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO). A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100 X e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 15 min. As lamínulas foram então contracoradas com hemalumen de

Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 min, lavadas em água destilada e montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Método *in vitro* de Insulto por Hipóxia e Hipóxia/Reoxigenação

Após o procedimento de isolamento descrito acima, cada *pool* de células renais foi dividido em 3 placas de cultura de 10 cm² e cultivado até confluência de aproximadamente 80%. Ao atingir a confluência ideal, as placas foram divididas em 3 grupos experimentais: basal (BA), hipóxia de 24 h (HO) e hipóxia de 24 h/reoxigenação de 72 h (HO/R). No grupo BA, as células foram mantidas em condições de normóxia em estufa úmida com atmosfera controlada de O₂ 95% e CO₂ 5% a 37°C por 24 h. Nos grupos HO e HO/R, as células foram expostas à hipóxia por 24 h em uma incubadora modular úmida INVIVO₂ 300 (Ruskin, Bridgend, BG) a 37°C, com atmosfera controlada de O₂ 1%, CO₂ 5% e N₂ 94% para balancear. Após o período de hipóxia, as células do grupo HO/R tiveram seu meio de cultura trocado e foram realocadas para as condições de normóxia por 72 h. Ao final dos respectivos períodos de incubação, as células foram colhidas para as análises posteriores.

Ensaio para Avaliação do Grau de Lesão e Resposta Celular aos Insultos por Hipóxia e Hipóxia/Reoxigenação

Análise de Apoptose

A avaliação da apoptose celular foi realizada por citometria de fluxo, usando o anticorpo *PE Rabbit Anti-Active Caspase-3* (BD Pharmingen, San Jose, CA). Inicialmente, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 800 x g por 5 min para recuperação de células apoptóticas que se desprenderam da placa. As células aderidas foram desprendidas das placas

de cultura utilizando *TrypLE Express* (Life Technologies, Carlsbad, CA) em volume suficiente para cobrir toda a superfície da placa durante 10-15 min a 37°C. A seguir, meio de cultura completo 2x o volume de TrypLE foi adicionado à placa para inativar a tripsina. As células em suspensão foram transferidas para o tubo inicial com as células do sobrenadante, centrifugadas a 800 x g por 5 min, lavadas em PBS e contadas em câmara de Neubauer. Subsequentemente, as células foram permeabilizadas com etanol 70% gelado (0,5 mL/10⁵ células) por 1 h a 4°C, seguida de 2 lavagens em PBS acrescido de SFB 1% e Triton X-100 0,25% (PST).

As células foram incubadas com o anticorpo anti-caspase 3 ativa em 100 µl de tampão PST por 30 min à temperatura ambiente, na ausência de luminosidade. Concomitantemente à marcação de caspase-3 ativa, realizamos a marcação para E-caderina utilizando o anticorpo Mouse E-Cadherin APC-conjugated antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN). Ao final do período de incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em 0,3 mL de PBS.

A aquisição de dados foi realizada no citômetro BD FACSCanto II através do *software* BD FACSDiva (BD Biosciences San Jose, CA). A análise dos dados adquiridos no citômetro foi conduzida através do *software* FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

Análise de Proliferação Celular

A avaliação de proliferação celular foi realizada através da técnica de citometria de fluxo utilizando o anticorpo primário anti-Ki-67 (ABCAM, Cambridge, CB) específico para camundongo, seguido da incubação com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Para esta análise, as células seguiram o mesmo procedimento de tripsinização e permeabilização descrito anteriormente para detecção de apoptose.

Após a permeabilização, as células foram lavadas e ressuspensas em 100 µl de tampão PST. Seguiu-se a incubação com o anticorpo anti-Ki-67 por 30 min à temperatura ambiente, 2 lavagens em PST e, por fim, incubação com 100 µl do anticorpo secundário diluído a 1,25 µl/mL de PBS, por 30 min e à temperatura ambiente, na ausência de luminosidade. Também utilizamos nesse experimento o anticorpo anti-E-caderina (Mouse E-Cadherin APC-conjugated antibody - R&D Systems, Minneapolis, MN) para marcar as células epiteliais. Ao final do período de incubação as células foram lavadas e ressuspensas em 0,3 ml de PBS. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro BD FACSCanto II através do *software* BD FACSDiva (BD Biosciences San Jose, CA), enquanto para a análise dos dados adquiridos também utilizamos o *software* FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

Análises de Expressão Gênica de *p21* e *Hif1α*

A expressão de *p21* foi avaliada por PCR em tempo real utilizando o corante SYBR Green (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Baseamo-nos no trabalho de Cui e cols para escolher o gene *Pgk1* como controle endógeno para nossas reações de qPCR. Nesse estudo, os autores avaliaram a expressão de 16 genes de referência amplamente utilizados em um modelo animal de doença renal cística bem caracterizado e concluíram que os genes *Pgk1*, *Ppia* e *Gapdh* foram os que tiveram menores variações ao longo do estudo (103).

As células controle e submetidas aos insultos HO e HO/R tiveram seu RNA total extraído usando o kit ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega Corporation, Madison, WI), ideal para extração de RNA a partir de quantidade limitada de células, e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Aproximadamente 200 ng de RNA total de cada amostra foram submetidos a uma reação de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) usando o sistema ImProm II™

MATERIAIS E MÉTODOS

Reverse Transcription (Promega Corporation, Madison, WI). O cDNA resultante foi utilizado nas análises seguintes. A reação de PCR em tempo real para *p21* incluiu os *primers* específicos *forward* (5'-GTGATTGCGATGCGCTCATG-3') e *reverse* (5'-TCTCTTGCAAGACCAATC-3'), enquanto as mensurações correspondentes ao gene *Pgk1* basearam-se nos *primers* KiCqStart SYBR Green (Sigma, St. Louis, MO), padronizados para a quantificação de expressão gênica utilizando o corante SYBR Green. As sequências desses *primers* não são fornecidas pelo fabricante. A cinética da reação para *p21* e *Pgk1* incluiu um ciclo inicial de 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s. Ao final dos 40 ciclos, os produtos de amplificação foram submetidos à curva de dissociação para a verificação de amplicons únicos para cada reação. A eficiência das reações foi calculada para cada par de *primers* através da construção de curvas de diluição seriada de um cDNA padrão. Definimos como critério de inclusão para essa análise eficiência $\geq 95\%$.

A análise de expressão gênica quantitativa para *Hif1 α* empregou o sistema *Taqman* (Applied Biosystems, Warrington, CHS). Utilizamos neste ensaio o gene *Gapdh* como controle interno endógeno (97). As sequências dos *primers* e das sondas não são fornecidas pelo fabricante. Os ensaios utilizados foram *HIF1 α* (Mm00468878_m1) e *Gapdh* (Mm99999915_g1).

As quantificações relativas da expressão de *p21* e *Hif1 α* foram realizadas utilizando a metodologia $\Delta\Delta C_t$ e os resultados são apresentados em unidades arbitrárias.

Avaliação do Estresse de Retículo Endoplasmático

Avaliação Semiquantitativa de Splicing Não Convencional do Gene Xbp1

A avaliação semiquantitativa do *splicing* não convencional do RNAm codificado por *Xbp1*, ortólogo de camundongo do gene *XBPI*, foi realizada através da técnica de PCR *end-point*. A extração de RNA total e a reação de transcrição reversa foram realizadas de acordo com o protocolo descrito para a análise de expressão de *p21* e *Hif1 α* . O cDNA resultante foi usado na técnica de PCR convencional para detecção dos transcritos de *Xbp1*. O amplicon de 289 bp refere-se ao transcrito normal de *XBPI*, enquanto o amplicon de 263 bp refere-se ao transcrito que sofreu *splicing* não convencional, indicando indução de ER. Para controle positivo da reação de PCR, células IMCD3 foram tratadas com tapsigargina 500 nM por 10-12 h para indução de ER. Os produtos de PCR foram separados através da técnica de eletroforese em gel de agarose na concentração de 2%, corado com SYBR safe DNA gel Stain (LifeTechnologies, Carlshad, CA) e visualizado em fotodocumentador. Utilizamos β -actina como controle interno endógeno da reação de PCR. Os primers utilizados nas reações descritas foram *XBPI forward* (5'-GAACCAGGAGTTAAGAACACG-3'), *XBPI reverse* (5'-AGGCAACAGTGTCAGAGTCC-3'), β -actina *forward* (5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3') e β -actina *reverse* (5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3').

Resultados

RESULTADOS

Estabelecimento das culturas primárias de filamentos ductais da medula renal interna e de rim embrionário

Iniciamos este período do projeto procurando estabelecer e padronizar as culturas primárias de células derivadas de filamentos ductais da medula renal interna/papila de camundongos adultos com os genótipos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$, e de células embrionárias renais com os genótipos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{-/-}$. Na cultura primária de animais adultos, observamos a presença de células com morfologia epitelial, com tempo médio para confluência de 70-80% de 7 dias para ambos os genótipos, $Pkd1^{+/+}$ (Figura 3A) e $Pkd1^{+/-}$ (Figura 3B). A morfologia apresentada mostrou-se similar à de outros estudos (104). Observamos nas células MRI $Pkd1^{+/-}$, ainda, a presença de algumas células na região central com aparência fusiforme (Figura 3B), indicando uma possível heterogeneidade nessa população celular. Verificamos também, nas culturas derivadas de rins de embriões, monocamada de células com características epiteliais para os dois genótipos avaliados, $Pkd1^{+/+}$ (Figura 3C) e $Pkd1^{-/-}$ (Figura 3D). O tempo para confluência destas células, contudo, foi substancialmente menor, de aproximadamente de 2 a 3 dias. É provável que este fenômeno ocorra devido ao estágio de desenvolvimento em que estas células se encontram, uma vez que as células MRI não apresentaram redução no tempo de crescimento mesmo quando cultivadas com o meio de cultura utilizado para as células EmR.

Figura 3. Fotomicrografia representativa do estabelecimento das culturas primárias de células MRI com os genótipos *Pkd1*^{+/+} (A) e *Pkd1*^{+/-} (B) e de células EmR com os genótipos *Pkd1*^{+/+} (C) e *Pkd1*^{-/-} (D). Seta: célula fusiforme. Aumento original, X100.

Caracterização fenotípica das células MRI e EmR

Nossas análises por citometria de fluxo confirmaram a adequação fenotípica das células EmR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-}, revelando positividade virtualmente total para marcação para ECAD (Figura 4). No momento em estas análises foram realizadas, não tínhamos animais em idade adequada – 8 a 10 semanas – para inclusão nestes experimentos.

Figura 4. Citometria de fluxo para o marcador E-caderina-APC em células EmR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-}. As células não marcadas estão representadas em azul e as marcadas em vermelho. A porcentagem de positividade para E-caderina está indicada em cada subpainel como Ecad⁺.

Com objetivo de analisar o perfil de expressão subcelular de ECAD nas células MRI, realizamos análises imunocitoquímicas para este marcador em células MRI *Pkd1*^{+/+} (Figura 5). Este resultado também confirmou a adequação fenotípica das células MRI, revelando marcação para ECAD na membrana plasmática para a quase totalidade das células, perfil esperado para esta proteína e esta célula.

Figura 5. Imunocitoquímica para E-caderina. (A) células MRI *Pkd1*^{+/+} positivas para E-caderina; (B) células de origem mesenquimal utilizadas como controle negativo. Células em P0. Contra coloração com Hemalúmen de Mayer. Aumento original X100.

Ensaio de insulto celular por hipóxia e hipóxia/reoxigenação

Os ensaios de indução de insulto por hipóxia e hipóxia/reoxigenação sobre as células MRI e EmR consistiram no cultivo das células em atmosfera controlada de O₂ 1%, CO₂ 5% e N₂ 94%, por 24 h; no insulto HO/R, as células tiveram seu meio de cultivo trocado e voltaram para as condições de normóxia por 72 h. Para validar esse modelo, avaliamos as características morfológicas das células antes e depois dos insultos. Após 24 h de hipóxia, o cultivo de células MRI apresentou células com morfologia diferente da morfologia epitelial encontrada em condição basal (Figura 6 A-D). Tais células apresentaram características de células mesenquimais, com destaque para algumas células do genótipo *Pkd1*^{+/-}, nas quais podemos observar células com estruturas alongadas e aspecto ramificado (Figura 6D). Após 72h de reoxigenação, a maior parte das células apresentou morfologia diferente da inicial, fenômeno observado de forma homogênea para ambos os genótipos (Figura 6E e F).

Figura 6. Representação morfológica de células MRI *Pkd1*^{+/+} (A, C, E) e *Pkd1*^{+/-} (B, D, F), em condição basal (A, B), após 24 h de hipóxia (C, D) e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação (E, F). Células em P0. Setas: células com morfologia alterada. Cabeças de seta: células alongadas e com aspecto ramificado. Aumento original, X100.

Após 24 de hipóxia, observamos nas culturas de células EmR regiões contendo células com características mesenquimais, tanto para células *Pkd1*^{+/+} (Figura 7C) como *Pkd1*^{+/-} (Figura 7D), embora ainda tenhamos observado regiões de células com morfologia aparentemente epitelial. Após insulto HO/R, por fim, as células EmR tiveram sua morfologia consideravelmente alterada para ambos os genótipos (Figura 7E e F).

Figura 7. Representação morfológica de células EmR *Pkd1*^{+/+} (A, C, E) e *Pkd1*^{-/-} (B, D, F) em condição basal (A, B), após 24 h de hipóxia (C, D) e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação (E, F). Células em P0. Setas: células com características mesenquimais. Aumento original, X100.

Respostas celulares aos insultos por hipóxia e hipóxia/reoxigenação

Realizamos experimentos com células EmR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-} nas condições basal e após 24 h de hipóxia. Esses experimentos foram pareados em função do tempo, porém o limitado tamanho amostral (n=3 para EmR *Pkd1*^{+/+} e n=2 para EmR *Pkd1*^{-/-}) não nos permitiu

RESULTADOS

análise estatística. Interessantemente, nossos achados sugerem uma discreta tendência numérica de aumento das taxas de apoptose e de proliferação celular em células EmR *Pkd1*^{+/+} após o insulto HO (Figuras 8 e 9).

Analizamos, também, a expressão do marcador E-caderina e dos marcadores de proliferação (Ki-67) e apoptose (caspase-3 ativa) em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} nas condições basal, 24 h pós-hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação (Figura 10). Esses experimentos foram pareados em função do tempo e, devido ao número limitado de células ao final de cada período experimental, fizemos um *pool* de células de 2 animais *Pkd1*^{+/+} e de 2 animais *Pkd1*^{+/-} para adquirir os dados no citômetro. O número limitado de células também nos impediu de adquirir o número ideal de 10000 eventos e, portanto, adquirimos o máximo possível de eventos em cada condição. Uma análise qualitativa dos dados mostrou que a morfologia das células foi alterada pós-HO e mais ainda após HO/R. Mostramos, ainda, a presença de uma maior quantidade de *debris* celulares e de uma menor porcentagem de células nos *gatings* de análise nessas condições pós-insulto. Observamos, por fim, um discreto deslocamento para a direita no eixo de marcação para Ki-67 nas células MRI *Pkd1*^{+/-} após HO e HO/R, comparadas com as células MRI *Pkd1*^{+/+} submetidas aos mesmos insultos. Esse achado sugere uma maior taxa de proliferação nas células haploinsuficientes para *Pkd1* que nas células selvagens.

RESULTADOS

Figura 8. Análises de citometria de fluxo para Caspase-3 ativa e Ki-67 em células EmR *Pkd1*^{-/-} e *Pkd1*^{+/+}, em condição basal e após 24 h de hipóxia. Os resultados são apresentados como *gating* (acima) e *dot plot* (abaixo) para cada condição experimental. As células não marcadas estão representadas em azul, as marcadas para caspase-3 ativa em vermelho e as positivas para Ki-67 em verde. As representações em *dot plot* incluem os quadrantes Q1 (ECAD- e Ki67+ ou CASP+), Q2 (ECAD+ e Ki67+ ou CASP+), Q3 (ECAD+ e Ki67- ou CASP-) e Q4 (ECAD- e Ki67- ou CASP-). NM: controle não marcado.

Figura 9. Porcentagem de células embrionárias renais *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-} com marcação para caspase-3 ativa (A) e Ki-67 (B) em condição basal e após hipóxia de 24 h.

Figura 10. Análises de citometria de fluxo para E-Caderina, Ki-67 e caspase-3 ativa em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{-/-}, em condição basal, após 24 h de hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação. Os resultados são apresentados como *gating* (esquerda) e *dot plot* (demais) para cada condição experimental. As células não marcadas estão representadas em azul, as marcadas para E-caderina em roxo, para Ki-67 em verde e para caspase-3 ativa em vermelho.

RESULTADOS

PCR quantitativa em tempo real para *p21*

Para a realização dos experimentos de PCR em tempo real utilizando a técnica de SYBR Green. Avaliamos a expressão quantitativa de *p21* em células MIR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} nas três condições experimentais: basal, após 24 h de hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação (Figura 11). O limitado tamanho amostral (n=2 para MRI *Pkd1*^{+/+} em BA, n=3 para MRI *Pkd1*^{+/+} em HO e HO/R e n=2 para MRI *Pkd1*^{+/-} em BA, HO e HO/R), contudo, não nos permitiu realizar análise estatística dos resultados. Observamos, entretanto, uma tendência numérica de diminuição da expressão de *p21* após 24 h de hipóxia, seguida de retorno aos níveis basais ou aumento após HO/R, para ambos os genótipos. Esses resultados sugerem uma desregulação do ciclo celular após os insultos em células MIR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}.

Figura 11. Análise comparativa da expressão do RNAm de *p21* em células MIR *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, nas condições basal, após 24 h de hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação. WT: células MIR *Pkd1*^{+/+}; HT: células MIR *Pkd1*^{+/-}.

RESULTADOS

PCR quantitativa em tempo real para *Hif1 α*

Com o objetivo de avaliar a intensidade do insulto hipóxico em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} submetidas a HO e HO/R, analisamos a expressão quantitativa do gene *Hif1 α* , marcador molecular de indução de tal lesão, nas três condições experimentais analisadas (Figura 12). Tais experimentos foram conduzidos utilizando o sistema *Taqman*. À semelhança das análises para *p21*, o número limitado de amostras não permitiu análise estatística dos dados (n=2 para MRI *Pkd1*^{+/+} em BA, n=3 para MRI *Pkd1*^{+/+} em HO e HO/R e n=2 para MRI *Pkd1*^{+/-} em BA, HO e HO/R). Nossos achados sugerem, contudo, um aumento discreto da expressão de *Hif1 α* nas células MRI submetidas a HO/R, possivelmente maior em células *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+}.

Figura 12. Análise comparativa da expressão quantitativa de *Hif1 α* em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, nas condições basal, após 24 h de hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação. WT: células MRI *Pkd1*^{+/+}; HT: células MRI *Pkd1*^{+/-}.

Análise semiquantitativa de estresse de retículo

Analisamos o *splicing* não convencional do RNAm de *Xbp1* para avaliar a indução de estresse de retículo em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, submetidas aos insulto HO e HO/R (Figura 13). Não observamos indução de estresse de retículo em células *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, em

RESULTADOS

nenhuma das condições experimentais. Novamente, o número limitado de amostras não permitiu análise estatística dos dados (n=2 para MRI *Pkd1*^{+/+} em BA, n=3 para MRI *Pkd1*^{+/+} em HO e HO/R e n=2 para MRI *Pkd1*^{+/-} em BA, HO e HO/R).

Figura 13. Análise do *splicing* não convencional do RNAm de *Xbp1* em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, nas condições basal, após 24 h de hipóxia e após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação. WT: células MRI *Pkd1*^{+/+}; HT: células MRI *Pkd1*^{+/-}; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo: células IMCD3 tratadas com taspargina 500 nM por 10-12 h. Marcador de peso molecular de 100 pb à esquerda.

Discussão

DISCUSSÃO

A identificação de uma maior suscetibilidade ao insulto renal por isquemia/reperfusão em camundongos heterozigotos para mutação nula em *Pkd1* abriu um novo cenário dentro da patogênese da DRPAD, demonstrando um efeito lesivo associado à haploinsuficiência gênica (43). Vale notar que tal efeito estendeu-se aos vários componentes da injúria renal, incluindo lesão histológica mais intensa, maior redução da TFG e intensificação da disfunção tubular. Tais resultados sugerem que o tecido renal não cístico de pacientes com DRPAD seja mais suscetível à agressão renal, particularmente à I/R. Interessantemente, achados deste estudo também sugeriram que a incapacidade dos animais *Pkd1*^{+/-} super-regulem p21 em resposta ao insulto renal contribui de forma bastante relevante para a diminuição da resposta de defesa contra esta agressão. Vale notar que a maior parte dos resultados obtidos em nosso modelo animal foram confirmados por Prasad e cols em camundongos haploinsuficientes para o gene *Pkd2* (65). A observação de níveis renais elevados de HIF1 α em dois modelos animais císticos não ortólogos à DRPAD humana (66), por sua vez, é consistente com o conceito de que eventos de I/R devam contribuir para a aceleração da doença renal na DRPAD. O efeito celular protetor da PC2 em relação ao desenvolvimento de ER, por fim, dependente de sua modulação da fosforilação de eIF2 α e da proliferação celular, apoia os efeitos pró-lesivos e de potencial aceleração da doença renal dos estados de deficiência das policistinas.

Os mecanismos fundamentais associados à maior suscetibilidade à I/R renal induzida pela haploinsuficiência de *Pkd1*, contudo, ainda não foram elucidados. Desconhece-se se a diminuição da capacidade de defesa contra o insulto decorre de uma disfunção primária e predominante da célula tubular renal, associada a um nível mais baixo de atividade de *Pkd1*, ou de ações exercidas por fatores produzidos e liberados pelo endotélio e/ou outras células não epiteliais sobre as células tubulares. Para abordar essa questão central, neste primeiro período

do projeto decidimos analisar os efeitos diretos da hipóxia e da hipóxia/reoxigenação sobre células epiteliais tubulares renais deficientes em *Pkd1*. Uma vez que a maior parte dos cistos renais é derivada de ductos coletores na DRPAD (41), que a expressão de PC1 endógena é baixa mas predomina no néfron distal e em túbulos coletores (20) e que Bastos e cols observaram envolvimento de túbulos coletores na lesão renal presente nos camundongos haploinsuficientes (43), decidimos conduzir nosso estudo em células do ducto coletor. Além disso, visto que tais células predominam vastamente na medula interna renal, decidimos isolá-las por meio de culturas primárias desta região dos rins adultos *Pkd1*^{+/-} analisados. Contudo, células com o outro genótipo relevante, associado ao estado de deficiência gênica completa, não poderiam ser obtidas de rins adultos, dada a letalidade embrionária observada em camundongos *Pkd1*^{-/-}. Nesse cenário, células renais com *knockout* completo de *Pkd1* foram obtidas a partir de rins embrionários de animais *Pkd1*^{-/-}.

A caracterização do fenótipo celular das culturas primárias mostrou-se fundamental para a condução de nossos estudos. A morfologia das células MRI e EmR empregadas mostrou-se consistente com o fenótipo epitelial em condições basais, indicando adequação de nossos modelos celulares. Além disso, a virtual totalidade das células EmR analisadas por citometria de fluxo foi positiva para E-caderina e as células MRI revelaram expressão desta proteína na membrana plasmática, padrões consistentes com o fenótipo epitelial.

O insulto hipóxico sobre as células deficientes e suficientes em *Pkd1* consistiu na aplicação de uma atmosfera de 1% de O₂. As alterações morfológicas identificadas nas células MRI e EmR após hipóxia e hipóxia/reoxigenação são sugestivas da ação deletéria de tal insulto. A presença de uma maior quantidade de *debris* celulares e de uma menor porcentagem de células MRI nos *gatings* de uma análise conduzida nessas condições pós-insulto apoiam esse efeito. O aumento numérico discreto da expressão de *Hif1α* observado nas células MRI

submetidas a HO/R também sugere ação hipóxica sobre tais células, porém indica um efeito de intensidade aquém da desejada. O fato das células MRI *Pkd1*^{+/-} terem apresentado uma elevação aparentemente um pouco maior que as células *Pkd1*^{+/+}, por sua vez, pode sugerir que as células haploinsuficientes para *Pkd1* sejam mais sensíveis à hipóxia/reoxigenação.

Observamos taxas de apoptose e proliferação celular consistentes com o estado basal em células EmR e MRI ECAD+ *Pkd1*^{+/+}. Encontramos, contudo, apenas um possível e discreto aumento das taxas de apoptose e de proliferação celular em células EmR ECAD+ *Pkd1*^{+/+} após o insulto HO, efeito não observado em células EmR ECAD+ *Pkd1*^{-/-}. Não temos resultados, entretanto, para o insulto HO/R nas células EmR, a condição experimental apropriada para análise comparativa com os resultados obtidos por Bastos e cols em tecido renal (43). Observamos, contudo, uma marcação para Ki-67 discretamente maior em células MRI *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} após HO e HO/R, achado sugestivo de uma maior taxa de proliferação de células haploinsuficientes para *Pkd1* após o insulto. Vale notar, no entanto, e mais uma vez, que o número de amostras EmR e MRI avaliado foi muito limitado e não permitiu tratamento estatístico.

Nossos resultados de qPCR nesta primeira etapa do projeto, também bastante limitados, sugeriram uma tendência numérica de redução da expressão de *p21* em células MRI após 24 h de hipóxia, seguida de retorno aos níveis basais ou elevação após 24 h de hipóxia/72 h de reoxigenação, tanto em células *Pkd1*^{+/+} como *Pkd1*^{+/-}. Esses resultados são sugestivos de desregulação do ciclo celular após o insulto hipóxico, porém não reproduzem no nível celular isolado os achados de Bastos e cols no nível tecidual renal de camundongos haploinsuficientes, em que se observa uma incapacidade de super-regulação de *p21* após insulto por I/R (43).

Observamos, portanto, que parte de nossos resultados nesta fase do projeto pode ser compatível com a hipótese de que o aumento da suscetibilidade à I/R renal observada em

camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* seja determinada, ao menos parcialmente, por uma menor capacidade de resposta primária da célula tubular ao insulto renal. Outros resultados parciais, contudo, não se mostraram consistentes com tal hipótese. Uma vez que alguns fenótipos não se distinguiram entre células deficientes e suficientes em *Pkd1* após os insultos HO e HO/R, nossos achados iniciais parecem reproduzir apenas parcialmente os encontrados *in vivo* por Bastos e cols. Este cenário poderia ser explicado por uma de duas possibilidades: 1) alguns componentes da maior suscetibilidade à I/R de células deficientes em *Pkd1* dependem de fatores externos à célula epitelial tubular renal; ou 2) nosso modelo, nas condições experimentais, não foi o mais adequado para abordar a questão científica de interesse. Se a segunda possibilidade for a correta, o problema poderia residir em um dos seguintes pontos: a) o estímulo hipóxico aplicado às nossas células de cultura primária não foi suficiente para reproduzir o grau de isquemia aplicado aos camundongos haploinsuficientes no estudo de Bastos e cols; b) as células MRI e EmR não se constituem no melhor modelo à análise de lesão hipóxica, apesar das considerações a favor das mesmas feitas anteriormente; c) as células MRI, provenientes da medula interna renal, podem ser particularmente resistentes à hipóxia, impedindo uma análise totalmente apropriada da suscetibilidade aos insultos HO e HO/R. O mesmo pode potencialmente ocorrer com células EmR, uma vez que são provenientes de um ambiente embrionário; e d) células mais resistentes à hipóxia podem ter sido selecionadas durante o processo de estabelecimento das culturas primárias.

A documentação anterior de um efeito protetor da PC2 em relação ao desenvolvimento de estresse de retículo (97) sugere que a PC1 possa apresentar indiretamente uma ação funcionalmente semelhante. Nesse cenário, a maior suscetibilidade de animais *Pkd1*^{+/-} à I/R renal poderia depender não apenas das respostas celulares anormais verificadas por Bastos e cols após o insulto, como também do desenvolvimento de um grau aumentado de ER após a agressão renal. Com base nesta hipótese, também analisamos um parâmetro associado ao ER

em nosso modelo celular isolado: a expressão de *spliced Xbp1*. Nossos resultados iniciais, contudo, novamente bastante limitados, não revelaram expressão de *spliced Xbp1* em células MRI *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, nas três condições experimentais: BA, HO e HO/R. Esses resultados preliminares apresentam como possibilidade de interpretação a não participação do estresse de retículo na suscetibilidade aumentada à I/R renal em camundongos *Pkd1*^{+/-}, porém paralelamente também abrem como alternativas: a) o insulto hipóxico sobre as células MRI não foi suficiente para deflagrar ER; b) as células MRI não são um modelo adequado para a investigação de ER induzido por hipóxia; e c) as células MRI, provenientes da medula interna renal, podem ser particularmente resistentes à hipóxia e, portanto, mais resistentes ao desenvolvimento de ER.

Esta etapa de nosso estudo foi desenhada para distinguir os componentes potencialmente participantes da suscetibilidade aumentada à I/R renal em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* entre os dependentes de elementos externos à célula tubular renal daqueles primariamente associados à deficiência gênica celular. Entretanto, a observação de fenótipos diferentes ou indistinguíveis, dependendo da resposta avaliada, entre células deficientes em *Pkd1* e seus controles, após os insultos HO e HO/R, sugere que não estávamos trabalhando com o melhor protocolo experimental para abordar o problema de interesse. Por fim, essas considerações, associadas aos resultados de expressão de *Hif1* α , são sugestivas de que a intensidade da agressão hipóxica não tenha sido a mais apropriada para nosso modelo celular.

Ao fim desta fase do estudo, apesar de estarmos com as metodologias experimentais adequadamente estabelecidas e padronizadas e nossa intenção fosse seguir com o aumento da intensidade do insulto hipóxico de O₂ 1% para O₂ 0,1%, nos deparamos com a quebra da câmara de hipóxia seguida por um longo período de impossibilidade de sua utilização. Neste

período efetuei o trancamento da matrícula no programa por 180 dias. Dada a natureza dos experimentos e à dificuldade logística que se instalou, uma vez que a câmara havia sido transferida para o Instituto de pesquisas energéticas e nucleares (IPEN), e que a mesma ainda se encontrava inativada, realizamos um segundo pedido de trancamento de matrícula. Desta vez, contudo, decidimos deixar o projeto inicial e iniciar um outro, dependente apenas de nossa estrutura laboratorial. Passamos, então, a abordar outro aspecto extremamente interessante envolvendo o cenário de isquemia/reperfusão na DRPAD, voltado a suas relações com o estresse de retículo endoplasmático. Seguindo essa mudança, iniciamos o projeto que passamos a apresentar a seguir, intitulado “Efeitos do insulto por isquemia/reperfusão renal sobre a indução de estresse de retículo endoplasmático em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*”.

Segundo Período do Projeto

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo Central

O objetivo fundamental do segundo período de nosso estudo foi avaliar a participação potencial do estresse de retículo endoplasmático no processo de maior suscetibilidade renal ao insulto por isquemia/reperfusão em camundongos deficientes em *Pkd1*. Para tanto, marcadores de ER e inflamatórios foram analisados em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (HT, *Pkd1*^{+/-}) e selvagens (WT, *Pkd1*^{+/+}) submetidos a insulto renal leve por isquemia/reperfusão e a intervenção sham. Esta meta foi atingida por meio dos objetivos específicos descritos a seguir.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar a função renal por meio da determinação da concentração sérica de ureia em camundongos WT e HT, pré e após 48 h do insulto renal por isquemia de 32 min/reperfusão e pré e após intervenção sham.
2. Comparar os níveis de expressão das proteínas XBP1s e BIP em rins de animais WT e HT submetidos ao insulto por isquemia/reperfusão renal descrito acima e à intervenção sham, removidos 48 h após o procedimento, utilizando o método de *western blot*.
3. Comparar os níveis de expressão dos genes *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif1a* em rins de camundongos submetidos ao insulto por isquemia/reperfusão descrito no primeiro objetivo específico e à intervenção sham, removidos 48 h após o procedimento, empregando a técnica de RT-PCR em tempo renal.

OBJETIVOS

4. Comparar os valores da razão de expressão de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* em rins de animais submetidos ao insulto por isquemia/reperfusão descrito previamente e à intervenção sham, removidos 48 h após o procedimento, utilizando a técnica de quantificação semi-quantitativa por RT-PCR.

5. Comparar os níveis de expressão das citocinas IL1 β , IL6, IL10, MCP1, RANTES e TNF α em rins de camundongos submetidos ao insulto por isquemia/reperfusão previamente descrito e à intervenção sham, removidos 48 h após o procedimento, assim como no soro desses animais, empregando ensaios multiplex.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

Ética em Experimentação Animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, seguindo os padrões nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais. A eutanásia foi realizada com o camundongo em estado de anestesia/inconsciência induzida pela administração intraperitoneal de tiopental sódico 0,4 mg/g de peso corpóreo (PC).

Camundongos Geneticamente Modificados

O modelo animal utilizado nessa etapa do projeto é o mesmo utilizado na primeira parte do projeto e consiste em uma linhagem de camundongo 129Sv com um alelo *Pkd1* nulo (101). A construção do modelo animal e a metodologia empregada para a genotipagem dos mesmos já foi descrita em Materiais e Métodos - Primeira parte do projeto. Nessa etapa, entretanto, a geração de animais *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} se baseou em cruzamentos entre macho *Pkd1*^{+/-} e fêmea *Pkd1*^{+/+}. Na genotipagem, camundongos com apenas uma banda de 180 pb foram identificados como selvagens (*Pkd1*^{+/+}) e os com duas bandas, 180 pb e 220 pb, como heterozigotos (*Pkd1*^{+/-}). Este estudo foi dirigido a camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} com idade entre 10 a 12 semanas e, por fim, todos os experimentos foram realizados em camundongos machos.

Modelo Experimental de Isquemia/Reperusão

Os animais foram inicialmente pesados e então submetidos ao protocolo de insulto por isquemia/reperusão. Após anestesia xilazina 20 µg/g de PC e cetamina 80 µg/g de PC administradas por via intraperitoneal (IP), foi feita uma incisão na parte central do abdômen, os dois pedículos renais foram expostos por dissecação e se induziu isquemia renal bilateral por meio do clampeamento de ambos os pedículos renais. A cavidade abdominal foi coberta com gaze estéril umidificada com PBS e o camundongo permaneceu sobre uma mesa térmica de 37 °C durante o procedimento cirúrgico. Depois de 32 min, os pedículos foram liberados para restabelecimento da perfusão renal. Os animais foram hidratados com 400 µl de solução salina administrados por via IP imediatamente após a reperusão renal. A incisão abdominal foi então suturada e a recuperação cirúrgica realizada em gaiola convencional, com livre acesso a água e dieta. Tal procedimento foi realizado em camundongos WT e HT, para a formação dos grupos submetidos a I/R. A mesma intervenção, com exceção do procedimento de clapeamento temporário dos pedículos renais utilizado para indução deste insulto, foi realizada em animais de ambos os genótipos para a constituição dos grupos *sham*.

Avaliação da função renal

A coleta de sangue foi realizada por acesso ocular, pré-isquemia e 48 h após o insulto isquêmico e pré e pós- procedimento sham. As amostras de sangue foram centrifugadas após coagulação, de modo a obter soro. A mensuração da concentração sérica de ureia (S_U) foi realizada por método enzimático-colorimétrico utilizando-se o kit Ureia CE da Labtest, (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

Análises de Expressão Gênica de *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif1 α*

Os rins dos animais submetidos e não submetidos ao insulto I/R tiveram seu RNA total extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE). A seguir, as amostras de RNA foram tratadas com o *kit* RQ1 RNase free DNase (Promega Corporation, Madison, WI) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico. Três μ g de RNA total de cada amostra foram submetidos a uma reação de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) usando o sistema ImProm II™ Reverse Transcription (Promega Corporation, Madison, WI). O cDNA resultante foi utilizado nos ensaios seguintes.

A análise de expressão gênica quantitativa para *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif1 α* empregou o sistema *Taqman* (Applied Biosystems, Warrington, UK). Utilizamos neste ensaio o gene *Gapdh* como controle interno endógeno (103). As sequências dos *primers* e das sondas não são fornecidas pelo fabricante. Os ensaios utilizados foram *Hspa5* (Mm01333323_g1), *Ddit3* (Mm01135937_g1), *Hif1 α* (Mm 00468869_m1) e *Gapdh* (Mm99999915_g1).

As quantificações relativas da expressão dos genes avaliados foram realizadas utilizando a metodologia $\Delta\Delta C_t$ e os resultados são apresentados em unidades arbitrárias.

Avaliação Semiquantitativa de *Splicing* Não Convencional para o Gene *Xbp1*

A avaliação semiquantitativa do *splicing* não convencional do RNAm codificado por *Xbp1*, ortólogo de camundongo do gene *XBPI*, foi realizada através da técnica de PCR *end-point*. A extração de RNA total e a reação de transcrição reversa foram realizadas de acordo com o protocolo descrito para a análise de expressão de *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif-1 α* . O cDNA resultante foi usado na técnica de PCR convencional para detecção dos transcritos de *Xbp1*. A

MATERIAIS E MÉTODOS

metodologia empregada nesta etapa do projeto sofreu algumas alterações em relação à primeira etapa do projeto. O amplicon de 289 pb refere-se ao transcrito *Xbp1u*, enquanto o amplicon de 263 pb refere-se ao transcrito *Xbp1s*. Para controle positivo da reação de PCR, células IMCD3 foram tratadas com tunicamicina 5µg/ml por 5-6 h para indução de ER. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose na concentração de 3%, corado com SYBR safe DNA gel Stain (LifeTechnologies, Carlsbad, CA), visualizado em foto-documentador ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, UK) e quantificado por densitometria pelo *software* UVIband (UVITEC, Cambridge, UK). Os resultados foram expressos como a razão entre *Xbp1s/Xbp1u*. Utilizamos *Gapdh* como controle interno endógeno da reação de PCR. Os primers utilizados nas reações descritas foram XBP1 *forward* (5'-GAACCAGGAGTTAAGAACACG-3'), XBP1 *reverse* (5'-AGGCAACAGTGTCTCAGAGTCC-3'), *Gapdh forward* (5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3') e *Gapdh reverse* (5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3').

Avaliação da Expressão das Proteínas BIP e XBP1

Os rins dos animais submetidos e não submetidos ao insulto I/R foram homogeneizados em tampão T-PER *Tissue Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, MA), contendo um coquetel de inibidores de proteases e fosfatase (*Halt Protease and Phosphatase Inhibitor*, Thermo Scientific). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 min a 4° C para remover núcleos e debris celulares. A quantificação proteica foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (kit *Bio-Rad Protein Assay*, Hercules, CA). As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo 0,1 M de DTT (Ditiotreitol) e fervidas em banho seco por 5 min. Quantidades equitativas de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e, a seguir, transferidas para

membrana de PVDF de 0,45 μm (BioAgency, Londres, UK). As membranas foram então incubadas por 1 h em solução bloqueadora contendo leite desnatado 5%, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas, e em seguida incubadas *overnight* a 4° C com os anticorpos primários anti-BIP (1:1000, ABCAM, Cambridge, UK), anti-XBP1 (1:500, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) e anti-GAPDH (1:5000; Sigma-Aldrich, Londres, UK). Vale mencionar que o anticorpo anti-XBP1 é capaz de detectar a proteína regular de 33 kDa (XBP1u) e a proteína resultante do *splicing* não convencional de XBP1 de 54 kDa (XBP1s). Uma vez que a proteína regular é rapidamente degradada, neste ensaio detectamos essencialmente apenas a proteína resultante do *splicing* não convencional de *Xbp1*. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Life Technologies, Carlsbad, CA), diluído 1:10000 em leite desnatado 5%, por 1 h. Após lavagens, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL *Prime Western Blotting Detection reagent* (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). O sinal quimioluminescente foi detectado pelo sistema digital de aquisição de imagens ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, UK) e quantificado por densitometria pelo *software* UViband (UVITEC, Cambridge, UK). Os resultados foram normalizados pela proteína GAPDH e representados em unidades arbitrárias.

Avaliação da Expressão de Citocinas em Tecido Renal e Soro

Para avaliação do perfil citocinérgico dos animais, utilizamos o *kit* MYCITOMAG-70K-06 Milliplex (Millipore, Darmstadt, Alemanha). A extração de proteínas e a coleta do soro para estes experimentos seguiram os mesmos protocolos empregados, respectivamente, nas análises de *western blot* e mensuração de S_U . Os ensaios de multiplex foram realizados em laboratório da Rede PREMIUM FMUSP, seguindo a metodologia e protocolos descritos pelo fabricante. Os valores foram expressos em $\text{pg}/\mu\text{g}$ de proteína para as mensurações das citocinas em tecido renal e pg/mL para as mensurações das citocinas no soro.

Análise Estatística

Os dados contínuos e semi-contínuos foram inicialmente comparados com a curva de Gauss, determinando-se presença ou ausência de normalidade para cada variável. Visto que todos os dados correspondentes às variáveis apresentaram comportamento não-paramétrico, os mesmos foram representados por mediana e quartis.

Dado o pequeno tamanho amostral dos grupos, optou-se por realizar ajuste dos dados à curva normal através da conversão logarítmica na base dez. Por haver diferença das variâncias entre os grupos, ou seja, comportamento heterocedástico, utilizamos a análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado (diferença mínima significativa). Foi considerado para todo o estudo risco $\alpha \leq 0,05$ de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco $\beta \leq 0,20$ de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie. As análises foram realizadas utilizando o programa de estatística SPSS 19.0 (IBM, North Castle, NY).

Resultados

RESULTADOS

O Insulto Renal Induzido por Isquemia/Reperusão foi Leve

Os níveis de S_U pré-intervenção não diferiram entre camundongos WT e HT (Figura 14A). Não detectamos, também, diferenças significantes de S_U entre animais WT e HT 48 h após intervenção sham e 48 h após o insulto I/R (Figura 14A). Vale dizer, contudo, que apenas camundongos HT apresentaram uma diferença numérica positiva de S_U , embora não significante, entre as condições pós-I/R e pós-procedimento sham (Figura 14B). A não elevação de S_U em animais WT e HT indica que o insulto I/R induzido foi leve

Figura 14. Análises comparativas da concentração sérica de ureia entre camundongos: A) esquerda - selvagens sham (WT Sham) pré-intervenção, haploinsuficientes para *Pkd1* sham (HT Sham) pré-intervenção, selvagens teste (WT IR) pré-I/R e haploinsuficientes para *Pkd1* teste (HT IR) pré-I/R; e direita - WT Sham 48 h pós-intervenção, HT Sham 48 h pós-intervenção, WT IR 48 h pós-I/R e HT IR 48 h pós-I/R. B) Variações da concentração de ureia sérica pós/pré-intervenção para animais WT Sham (n=7), HT Sham (n=6), WT IR (n=7) e HT IR (n=6). Comparações realizadas usando o teste de qui-quadrado, com dados representados como mediana e intervalos interquartis.

A expressão gênica de *Hif1 α* em rim não diferiu entre camundongos WT e HT pós-intervenção sham e após I/R (Figura 15, Tabela 1). A expressão deste gene também não se

RESULTADOS

elevou da condição sham para I/R em animais de ambos os genótipos. Estes resultados mostraram-se, portanto, de acordo com um grau leve de lesão renal.

Figura 15. Análise comparativa da expressão renal de *Hif1α* entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). Análise realizada usando análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado, com valores expressos como mediana e intervalos interquartis.

RESULTADOS

Tabela 1. Expressão gênica em camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT) e *Pkd1*^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R)

Gene	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
PCR em tempo real				
<i>Hspa5</i>	0,84 (0,82-1,14)	1,42 (0,68-1,46)	1,30 (0,74-1,83)	1,35 (1,34-2,07)
<i>Ddit3</i>	0,83 (0,68-1,49)	1,26 (0,63-1,85)	2,06 (1,79-2,54)	1,51 (1,06-2,11)
<i>Hif1a</i>	0,96 (0,91-1,10)	1,15 (0,96-1,58)	0,99 (0,81-1,69)	1,37 (0,84-2,10)
PCR convencional				
<i>Xbp1s/Xbp1u</i>	8,22 (6,48-9,54)	9,00 (8,24-9,14)	10,29 ^c (9,48-12,18)	6,59 ^{a,b} (5,85-7,05)

Dados não paramétricos foram comparados usando análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós teste de Tukey modificado com valores expressos como mediana e intervalos interquartis. ^ap<0,001 vs WT IR; ^bp<0,01 vs HT; ^cp<0,05 vs WT.

Camundongos Haploinsuficientes para *Pkd1* Apresentam Expressão Renal da Proteína XBP1s mais Elevada que Camundongos Selvagens após Insulto I/R Leve, mas não de BIP

Seguindo-se ao insulto I/R, camundongos HT apresentaram maior expressão renal da proteína XBP1s que animais WT (0,67 vs 0,47, p<0,01) (Figuras 16A e B, Tabela 2). Não observamos diferenças, contudo, entre camundongos WT e HT após o procedimento sham, nem entre animais WT pós-I/R e os grupos sham.

Os níveis de expressão renal de BIP não diferiram significativamente entre camundongos WT e HT 48 h após a intervenção sham ou o insulto I/R (Figuras 16A e C, Tabela 2). Vale notar, no entanto, que rins HT submetidos a I/R apresentaram um valor numérico não significante de expressão de BIP discretamente maior que rins HT pós-intervenção sham.

Figura 16. Análise comparativa da expressão renal das proteínas XBP1s e BIP entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). A) Imagem representativa da análise por *western blot*; B) Análise comparativa quantitativa da expressão de XBP1s entre os grupos WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR; e C) Análise comparativa quantitativa da expressão de BIP entre os grupos WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR. ** $p < 0,01$. Comparações realizadas usando o teste análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado, com valores expressos como mediana e intervalos interquartis.

Tabela 2. Expressão renal de proteínas envolvidas no ER em camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT) e *Pkd1*^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R)

Proteína	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
XBP1s	0,48 (0,33-0,64)	0,47 (0,45-0,60)	0,48 (0,34-0,53)	0,67 ^a (0,55-0,72)
BIP	0,90 (0,59-1,34)	0,86 (0,76-0,92)	0,86 (0,78-0,97)	1,01 (0,92-1,06)

Comparações realizadas usando análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado, com valores expressos como mediana e intervalos interquartis.^a $p < 0,01$ vs WT IR.

RESULTADOS

Insulto I/R Leve Reduz a Razão de Expressão de Transcritos *Xbp1s/Xbp1u* em Rins de Camundongos Deficientes em *Pkd1*

A razão de expressão renal de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* não diferiu entre animais WT e HT após procedimento sham (Figura 17, Tabela 1). Após o insulto I/R, contudo, camundongos HT apresentaram uma razão *Xbp1s/Xbp1u* significativamente menor que animais selvagens (6,59 vs 10,29; $p < 0,001$). É importante notar que I/R reduziu esta razão em rins HT (6,59 vs 9,00; $p < 0,010$) e a aumentou levemente em rins WT (10,29 vs 8,22; $p < 0,05$) (Figura 17, Tabela 1).

Figura 17. Análises comparativas da razão de expressão renal de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). A) Imagem representativa da análise por PCR semiquantitativa. 1: marcador de massa molecular; 2: controle negativo; 3: controle positivo, representado por células IMCD3 tratadas com tunicamicina 5 $\mu\text{g/mL}$ por 5-6 h. B) Análise comparativa semiquantitativa da razão de expressão renal de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* entre os grupos WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Comparações conduzidas com o teste análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado; valores expressos como mediana e intervalos interquartis.

RESULTADOS

Insulto I/R Leve não Altera Significativamente a Expressão Gênica de *Hspa5* e *Ddit3* em Rins de Camundongos Haploinsuficientes para *Pkd1*

As análises de expressão gênica de *Hspa5* em rim não revelaram diferenças significantes entre animais WT e HT após intervenção sham ou após indução de I/R (Figura 18A, Tabela 1). Na mesma linha, o insulto I/R não se associou a um aumento da expressão deste gene em rins HT e WT.

Também não detectamos diferenças significantes na expressão gênica de *Ddit3* entre rins WT e HT após intervenção sham e depois do insulto I/R (Figura 18B, Tabela 1). À semelhança da análise anterior, I/R não induziu aumento da expressão deste gene em rins HT e WT.

Figura 18. Análise comparativa da expressão renal dos genes *Hspa5* (A) e *Ddit3* (B) entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). Análises comparativas realizadas usando o teste análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado; os dados encontram-se expressos como mediana e intervalos interquartis.

RESULTADOS

A Resposta Citocínérgica à I/R Renal Leve não é Significante em Camundongos Deficientes em *Pkd1*

A expressão renal de IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α e RANTES não foi significativamente diferente entre camundongos WT e HT seguindo-se à intervenção sham e ao insulto I/R (Figura 19, Tabela 3). A indução de I/R renal também não foi capaz de aumentar a expressão dessas citocinas em tecido renal de animais HT e WT. Rins WT submetidos a I/R, contudo, apresentaram uma tendência não significativa de maior expressão de MCP1 que rins WT sham ($p=0.077$). Um padrão semelhante foi observado para rins HT ($p=0.108$).

Figura 19. Análise comparativa da expressão renal de IL1 β (A), IL6 (B), IL10 (C), MCP1 (D), RANTES (E) e TNF α (F) entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). As análises comparativas foram realizadas com o teste análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado. Os resultados estão expressos como mediana e intervalos interquartis.

RESULTADOS

Tabela 3. Expressão renal de citocinas em camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT) e *Pkd1*^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R)

Citocina	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
IL1β (pg/ μ g)	9,24 (7,88-12,67)	9,51 (8,80-11,60)	9,46 (8,54-13,65)	8,90 (7,88-14,85)
IL6 (pg/ μ g)	27,94 (20,25-46,92)	24,06 (22,37-52,93)	24,97 (23,59-42,58)	38,96 (28,35-94,79)
IL10 (pg/ μ g)	77,31 (64,79-98,88)	86,25 (77,16-93,86)	79,70 (76,54-86,67)	77,02 (65,69-82,46)
MCP1 (pg/ μ g)	14,35 (13,02-18,76)	16,04 (13,53-18,61)	27,09 (18,81-28,47)	27,57 (19,35-48,54)
RANTES (pg/ μ g)	9,57 (8,12-12,50)	10,58 (9,37-11,44)	13,33 (10,71-16,45)	12,83 (10,17-14,16)
TNFα (pg/ μ g)	1,85 (1,57-2,05)	2,03 (1,19-2,25)	1,89 (1,71-2,87)	2,10 (1,57-3,05)

Comparações realizadas usando análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado, com valores expressos como mediana e intervalos interquartis.

Os níveis de IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α e RANTES no soro também não diferiram entre camundongos WT e HT após a intervenção sham e o insulto I/R (Figura 20, Tabela 4). Seus níveis também não se elevaram no soro de animais HT e WT em resposta a I/R.

RESULTADOS

Figura 20. Análise comparativa dos níveis séricos de IL1 β (A), IL6 (B), IL10 (C), MCP1 (D), RANTES (E) e TNF α (F) entre camundongos WT 48 h pós-intervenção sham (WT Sham), HT 48 h pós-intervenção sham (HT Sham), WT 48 h pós-I/R (WT IR) e HT 48 h pós-I/R (HT IR). As comparações foram realizadas usando o teste análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartis.

Tabela 4. Níveis das citocinas séricas de camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT) e *Pkd1*^{+/-} (HT) 48 h pós-intervenção Sham e 48 h pós-isquemia/reperfusão (I/R)

Citocina	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
IL1 β (pg/mL)	8,17 (5,35-24,71)	2,85 (0,86-14,43)	14,43 (5,35-24,71)	14,50 (6,73-21,20)
IL6 (pg/mL)	512,18 (260,42-876,42)	402,39 (293,45-6490,00)	641,68 (331,02-1090,00)	1315,50 (571,35-1763,00)
IL10 (pg/mL)	50,58 (12,78-143,83)	14,98 (11,40-18,71)	12,78 (10,08-51,53)	46,22 (8,81-178,98)
MCP1 (pg/mL)	111,77 (78,66-243,36)	81,69 (57,16-2987,00)	130,22 (85,54-185,76)	151,71 (92,28-180,56)
RANTES (pg/mL)	108,63 (47,67-138,87)	43,70 (21,84-62,25)	45,57 (39,29-81,27)	87,15 (80,66-138,24)
TNF α (pg/mL)	21,24 (15,20-23,54)	18,58 (13,72-75,09)	22,01 (18,20-44,04)	26,61 (17,07-39,18)

Comparações realizadas usando análise de variância para medidas não repetidas ajustadas a termo cúbico ponderado com pós-teste de Tukey modificado, com valores expressos como mediana e intervalos interquartis.

Discussão

DISCUSSÃO

O entendimento de que o fenótipo renal da DRPAD se estendia além da cystogênese, do crescimento cístico e de suas implicações no rim já maduro constituiu-se em um marco conceitual da compreensão desta enfermidade. De fato, camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* mostraram-se mais suscetíveis a I/R renal, demonstrando que células tubulares a princípio funcionalmente normais apresentavam menor capacidade de defesa frente a um insulto num contexto de deficiência parcial em *Pkd1*. Interessantemente, atribuiu-se à incapacidade dessas células super-regularem p21 pós-I/R um papel relevante na determinação da maior suscetibilidade ao insulto. Esta anormalidade associou-se, de fato, a uma coordenação disfuncional do ciclo celular, traduzida em níveis elevados de proliferação celular e de apoptose após I/R. Em paralelo, observou-se que os rins deficientes em *Pkd1* também desenvolviam uma resposta inflamatória maior a tal insulto, quando comparados a rins selvagens. Neste cenário, admitimos que medidas capazes de aumentar a atividade funcional de *Pkd1* ou de conter as maiores respostas apoptótica, inflamatória e mesmo proliferativa em rins deficientes em *Pkd1* poderiam potencialmente reduzir a maior suscetibilidade apontada.

Nos anos mais recentes passou-se a compreender que a ativação de vias moleculares participantes da resposta de ER secundária a I/R era capaz de intensificar a lesão decorrente do próprio insulto. Vale observar que além de ter sua homeostase comprometida por I/R, o ER pode ativar a resposta inflamatória e também ser induzido por inflamação (105). Neste ambiente de relações complexas, a documentação de contribuição do ER à patogênese de várias doenças renais vem se ampliando. No cenário de I/R renal, destacam-se as ações de CHOP, GRP78/BIP e caspase-12 na ampliação da lesão.

As relações estabelecidas até o momento entre DRPAD e ER são complexas. Enquanto a expressão de PC2 pode ser super-regulada pela ativação de um dos braços da via UPR - a fosforilação de eIF2 α - sua degradação é estimulada por ativação da via ERAD. Interessantemente, PC2 também participa da homeostase do RE, podendo determinar fosforilação de eIF2 α . Esta ação é particularmente importante, uma vez que reduz a síntese proteínas, defendendo a célula contra o ER. A observação de que a ativação da via UPR pode abrandar a formação cística estendeu a já complexa relação DRPAD/ER. De fato, a superexpressão de XBP1 atenuou o fenótipo cístico em camundongos deficientes em *Pkd1*, revelando que a ativação de XBP1 exerce uma ação antagônica ao desenvolvimento/crescimento de cistos num cenário de deficiência da atividade de *Pkd1*. Com base nesses dados e na associação entre redução da atividade de *Pkd1* e maior suscetibilidade a I/R renal, formulamos a hipótese de que a ativação do braço da via UPR dependente de XBP1, decorrente do insulto I/R, poderia mitigar a lesão determinada por tal insulto em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*. Por outro lado, uma maior ativação de outros ramos de UPR ou de ERAD nestes animais seguindo-se a I/R, comparados a camundongos selvagens, poderia contribuir para a maior suscetibilidade a I/R renal dos animais deficientes em *Pkd1*. É importante notar, por fim, que a depender da intensidade do insulto I/R renal, o perfil de ativação de vias associadas ao ER induzido poderia ter um efeito intensificador, atenuador ou nos dois sentidos sobre o grau de lesão determinado pelo insulto. Para analisar a relação entre ER e suscetibilidade aumentada a I/R na deficiência de *Pkd1*, portanto, avaliamos diferentes marcadores de ER em camundongos haploinsuficientes e selvagens pré e pós-I/R.

Com base no estudo de Bastos e cols, e com o objetivo de estabelecer associações com seus resultados, definimos em 32 min o tempo de isquemia ser aplicado. Apesar de equivalente, o período de isquemia utilizado não reproduziu a intensidade da lesão observada no estudo anterior, não se acompanhando da elevação dos níveis de ureia sérica (S_U) 48 h após I/R tanto

nos camundongos selvagens como nos animais haploinsuficientes para *Pkd1*. Esta diferença sugere variação/variações involuntárias entre os procedimentos realizados nos dois estudos. Entre as variações potencialmente responsáveis pelos diferentes níveis de intensidade da lesão renal, incluímos sua realização por operadores distintos e utilização de *clamps* de pedículos renais diferentes. De fato, apesar da interrupção de fluxo sanguíneo e de uma reperfusão homogênea terem sido comprovadas nos procedimentos realizados em ambos os casos, a diferença de cerca de oito anos entre os estudos impossibilitou sua condução pelo mesmo experimentador e com o mesmo material cirúrgico. Dessa forma, nossa intenção inicial de trabalhar em um cenário de insulto I/R moderado foi substituída por uma realidade de lesão leve. A observação de que a expressão de *Hif1a* não se elevou significativamente pós-I/R em rins WT e HT, embora tenha apresentado aumento numérico, é consistente com a natureza leve da lesão. Vale mencionar, contudo, que experimentos empregando um tempo de isquemia de 35 min encontram-se em andamento, reproduzindo as elevações de S_U observadas em camundongos haploinsuficientes e selvagens no estudo de Bastos e cols com duração de isquemia de 32 min. Vale notar que mesmo no contexto de insulto leve e embora não significativa, a diferença de S_U entre as condições pós-I/R e pós-sham foi numericamente maior nos camundongos deficientes em *Pkd1* que selvagens, uma observação consistente com a maior suscetibilidade ao insulto apresentada pelos animais haploinsuficientes. Um padrão semelhante tem sido observado entre camundongos haploinsuficientes e selvagens submetidos a um insulto de 35 min, neste caso associado a elevações de S_U pós-I/R (dados não mostrados). Não temos ainda, entretanto, uma explicação robusta para a observação de algumas variações negativas de S_U seguindo-se a este insulto I/R leve.

Num cenário de lesão renal leve, analisamos os perfis de expressão proteica e gênica de *Hspa5* (BIP) e *Xbp1* (XBP1), dadas suas posições relativamente a montante/iniciais na via UPR. Não detectamos diferença significativa da expressão proteica de BIP entre camundongos

WT e HT 48 h após intervenção sham. Também não observamos diferença entre os dois genótipos 48 h após I/R. Por fim, em ambos os casos não foram verificadas elevações significantes induzidas pelo insulto. Em consistência com tais achados, o perfil de expressão de *Hspa5* também não se acompanhou de diferenças significantes. É possível, entretanto, que aumentos da expressão de *Hspa5* e BIP venham a ser detectados em HTs, mas não em WTs, quando os animais forem submetidos a um insulto de 35 min.

Os resultados relativos à expressão renal de XBP1s foram bastante interessantes. Não detectamos diferença na expressão renal dessa proteína entre camundongos WT e HT sham, um achado consistente com as razões semelhantes de expressão gênica *Xbp1s/Xbp1u* observadas para animais WT e HT nessa condição. A expressão proteica de XBP1s, no entanto, foi maior em rins HT que WT após I/R. Notavelmente, a razão de expressão *Xbp1s/Xbp1u* mostrou-se significativamente menor em camundongos haploinsuficientes que selvagens após o insulto por I/R. Interessantemente, I/R determinou redução dessa razão em animais HT e uma discreta elevação em camundongos WT. As variações em sentidos opostos de XBP1 e *Xbp1s/Xbp1u* determinadas por I/R em rins haploinsuficientes, a princípio passíveis de serem consideradas discordantes, revelaram-se consistentes. De fato, Majumder e cols propuseram recentemente um modelo de regulação de expressão gênica durante estresse celular, que envolve aumento da estabilidade do mRNA *XBPIs* por meio da cooperação de *splicing* citoplasmático e inibição de sua tradução (106). De acordo com esse modelo, em células não submetidas a estresse a indução de UPR ativa IRE1 α , que promove *splicing* de *XBPI*. A fosforilação de eIF2 α determinada por PERK que ocorre em paralelo, por sua vez, inibe a tradução do mRNA *XBPIs*. A combinação de *splicing* citoplasmático e inibição da tradução resultam em baixo *turnover* do mRNA *XBPI* e consequente estabilização do mesmo. Este é o ponto provavelmente atingido pelos rins WT submetidos a I/R, onde o insulto renal ativou UPR de forma limitada, sem progressão da via. Dessa forma, a relação de transcritos *Xbp1s/Xbp1u*

se elevou discretamente mas a expressão da proteína XBP1 não se elevou. Majumder e cols mostraram, por outro lado, que células submetidas a estresse evoluíram de um estado de tradução ineficiente e baixo *turnover* do mRNA *XBP1s* para um estado de tradução eficiente do mRNA *XBP1s* acumulado e aumento do *turnover* deste transcrito, determinando desestabilização do mesmo. Esta condição provavelmente se reproduziu nos rins HT submetidos a I/R, por serem mais suscetíveis à indução de ER. Nesse cenário, a expressão da proteína XBP1 se elevou, enquanto a relação de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* diminuiu. As diferenças de perfis de expressão para *Xbp1s/Xbp1u* e *XPB1s* entre camundongos HT e WT sugerem, portanto, que o insulto I/R de baixa intensidade foi capaz de ativar a via UPR mais intensamente em rins haploinsuficientes que em rins selvagens. Tais achados demonstram, portanto, que animais HT são mais suscetíveis à indução de ER que camundongos WT em resposta a I/R.

Com o objetivo de analisar etapas mais avançadas da via UPR, avaliamos também o perfil de expressão renal de *Ddit3*, gene que codifica CHOP. Não observamos diferenças entre camundongos WT e HT após procedimento sham e após I/R, assim como aumento de expressão induzida por I/R para cada um dos grupos avaliados. Esses achados indicam que o insulto leve não foi capaz de levar a ativação da via UPR a seus estágios mais avançados, tanto em rins WT como HT. A submissão de tais animais a insultos renais mais prolongados de I/R será particularmente importante para avaliar se camundongos HT passam também a aumentar a expressão de CHOP em níveis de lesão aquém dos de animais WT.

Também avaliamos as implicações inflamatórias da indução de ER, por meio da quantificação renal e sérica de várias citocinas. Apesar da análise ter sido relativamente ampla, não detectamos diferenças significantes entre camundongos WT e HT pós-intervenção sham e após I/R para a expressão renal e sérica de IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α e RANTES. Vale

notar, contudo, que uma tendência não significativa de elevação de MCP1 foi observada em rins WT submetidos a I/R comparados a WT sham; observação similar parece também se aplicar a rins HT. Esses resultados sugerem que um insulto renal leve não promova um aumento significativo das respostas inflamatórias renal e sistêmica em animais deficientes em *Pkd1* comparados a seus pares selvagens. Nessa linha e nessa condição, a indução de ER não parece exercer efeito relevante sobre a resposta citocinérgica associada a I/R nesses camundongos. Faz-se importante atentar, contudo, que os perfis inflamatórios associados às situações pós-I/R podem se alterar substancialmente em função da intensidade do dano renal.

O perfil de expressão renal de XBP1s e *Xbp1s/Xbp1u* observado em nossos animais haploinsuficientes após submissão a I/R sugere, portanto, que a indução de ER em resposta a um insulto leve possa aumentar a atividade funcional de PC1 e, assim, exercer um efeito de atenuação sobre a maior suscetibilidade de camundongos deficientes em *Pkd1* a I/R renal. Futuras análises envolvendo inativação de *Xbp1* nesses animais, submissão a I/R renal e avaliações de proliferação celular, apoptose, inflamação e expressão de p21 serão fundamentais para confirmar tal hipótese. Ampliações do tempo de isquemia renal em camundongos haploinsuficientes também serão essenciais, visando a identificar a partir de que grau de lesão a indução de ER passa a ativar componentes sabidamente deletérios ao dano renal em animais deficientes em *Pkd1*. Tais informações poderão potencialmente identificar níveis de insulto onde efeitos protetores e deletérios coexistam, assim como níveis de lesão associados apenas a efeitos adversos. Com base nessas perspectivas experimentais, será possível entender como, quanto e em que sentido a indução de ER pode interferir na maior suscetibilidade de animais HT à I/R renal.

Conclusões

CONCLUSÕES

1. A expressão proteica de XBP1s foi maior em rins haploinsuficientes para *Pkd1* comparados a selvagens 48 h após insulto renal leve por isquemia/reperfusão.
2. A razão de expressão renal de transcritos *Xbp1s/Xbp1u* mostrou-se menor em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* que em animais selvagens após insulto renal leve por isquemia/reperfusão.
3. Uma tendência não significativa de elevação de MCP1 foi detectada em rins de camundongos selvagens submetidos a insulto leve por isquemia/reperfusão; um comportamento similar foi observado em rins haploinsuficientes para *Pkd1*.
4. As variações em sentidos opostos de XBP1s e *Xbp1s/Xbp1u* determinadas por isquemia/reperfusão leve em rins haploinsuficientes para *Pkd1* são consistentes com a ativação deste ramo da via UPR.
5. Nossos achados sugerem que a indução de estresse de retículo endoplasmático em resposta a um insulto leve por isquemia/reperfusão possa aumentar a atividade de policistina-1 e exercer um efeito de atenuação sobre a maior suscetibilidade de camundongos deficientes em *Pkd1* a isquemia/reperfusão renal.

Anexos

ARTIGO EM REVISÃO NO PERIÓDICO TRAFFIC

***Pkd1*-deficient mice show increased susceptibility to induction of endoplasmic reticulum stress following renal ischemia/reperfusion**

Willian P. Felix¹, Andressa G. Amaral¹, Andre F. Pires¹, Elieser H. Watanabe¹, Luiz F. Onuchic^{1*}.

¹Department of Medicine, Division of Nephrology, University of São Paulo School of Medicine, Avenida Dr. Arnaldo, 455 - 01246-903 - São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Luiz F Onuchic, lonuchic@usp.br

Running title: Reticulum Stress in *Pkd1*-Deficient Mice

Key words: ADPKD, *PKD1* gene, Ischemia/Reperfusion, Endoplasmic reticulum stress, XBP1, Cytokines

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease is the most common monogenic renal disease and is primarily caused by mutation in *PKD1* (most cases) or *PKD2*, genes that encode polycystin-1 and polycystin-2. *Pkd1*-haploinsufficient mice (*Pkd1*^{+/-}) constitute a non-cystic model that display increased susceptibility to renal ischemia/reperfusion (I/R). I/R is a cause of endoplasmic reticulum stress (RS) induction, and activation of RS pathways can aggravate the injury. Activation of an UPR branch can upregulate PC2 expression while ERAD activation stimulates its degradation. XBP1 overexpression, in turn, attenuates the cystic phenotype in *Pkd1*-deficient mice. In this study we show that the renal expression ratio of transcripts *Xbp1s/Xbp1u* was lower in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} mice while XBP1s protein expression was higher in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} 48h after a mild I/R insult. No renal expression differences were detected for *Hspa5*, its product BIP/GRP78 and *Ddit3*. Among the cytokines IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α and RANTES, only MCP1 displayed a non-significant trend of increase in kidneys of both genotypes following the insult. The XBP1s and *Xbp1s/Xbp1u* variations in different directions in *Pkd1*^{+/-} kidneys are consistent with increased susceptibility to RS induction and suggest that this RS response may attenuate the increased susceptibility of *Pkd1*-deficient mice to I/R.

Introduction

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common life-threatening monogenic disease in humans, accounting for 4.4 to 10.0% of the end-stage kidney disease cases in different populations ^{1,2}. In almost all patients, this disorder is caused by a mutation in one of two genes: *PKD1* (polycystic kidney disease 1) or *PKD2* (polycystic kidney disease 2) ³. These genes encode, respectively, the proteins polycystin-1 (PC1) ⁴ and polycystin-2 (PC2) ⁵. Mutations in *PKD1*, in turn, are responsible for the large majority of ADPKD cases ⁶. This disease is characterized by bilateral development of renal cysts, progressive increase in kidney size, severe disruption of its architecture and, after many years of relatively preserved renal function, significant decline of glomerular filtration rate along the years ^{7,8}. In addition, the systemic nature of ADPKD adds to the clinical picture extra-renal manifestations, typically represented by liver cysts, intracranial aneurysms and cardiac valve abnormalities ⁹.

Pkd1-haploinsufficient mice (*Pkd1*^{+/-}), the gene orthologous to *PKD1* in this animal, constitute a non-cystic model of this gene's deficiency. In a previous study, we showed that *Pkd1*^{+/-} animals develop a more severe renal injury than wild-type mice (*Pkd1*^{+/+}) when submitted to renal

ischemia/reperfusion (I/R) ¹⁰. This study suggested, therefore, the capacity of renal regeneration following I/R is impaired in *Pkd1*^{+/-} mice and in ADPKD patients. The findings of this study suggested that the increased susceptibility to I/R observed in *Pkd1*^{+/-} kidneys is due, at least partially, to the lack of capacity of such animals to upregulate p21 in response to the insult. Such observations were corroborated by Prasad et al in *Pkd2*-haploinsufficient mice ¹¹.

The I/R insult is an important cause of endoplasmic reticulum stress (RS) induction, potentially leading to activation of the UPR (*unfolded protein response*) and ERAD (*ER-associated degradation*) pathways ¹². The activation of pathways involved in RS determined by I/R exerts an aggravating effect on the injury resulting from the insult ¹³. In Moreover, RS can activate and be induced by the inflammatory response ¹⁴. Previous studies revealed that polycystins also relate to this process. PC2 expression can be upregulated by the activation of one of the UPR pathway branches – phosphorylation of eIF2 α – in several cell lines derived from mammals ¹⁵, while Herp, a protein involved in the ERAD pathway, stimulates its degradation ¹⁶. Other studies revealed, in addition, a significant role of PC2 in the homeostasis of endoplasmic reticulum, protecting the cell against RS ¹⁷.

The SEC63 protein mediates the translocation and quality control of proteins synthesized in the endoplasmic reticulum. In this scenario, its functional deficiency has been reported to impair PC1 biosynthesis ¹⁸. Notably, inactivation of *Sec63* induces the UPR pathway. In a recent study, Fedeles et al showed that concomitant inactivation of *Sec63* and *Xbp1* amplified the polycystic kidney phenotype in mice by inhibiting PC1 cleavage at the GPS domain ¹⁹. In addition, XBP1 overexpression attenuated the cystic phenotype of *Pkd1*-deficient mice, revealing that activation of UPR can mitigate cyst formation.

To analyze the relationship between RS and the increased susceptibility to I/R associated to *Pkd1* deficiency, we evaluated different RS and inflammation markers in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} mice submitted to a mild I/R insult determined by 32-min ischemia. Our findings suggest that the RS induction in response to a mild I/R insult can increase PC1 activity and exert an attenuating effect on the increased susceptibility of *Pkd1*-deficient mice to renal I/R.

Results

The Renal Insult Induced by Ischemia/Reperfusion Was Mild

The pre-intervention SUN levels did not differ among WT and HT mice (Figure 1A). We have also not detected significant SUN differences between WT and HT animals 48 h after sham intervention and 48 h after the I/R insult (Figure 1A). It must be noted, however, that only HT mice presented a positive

numeric SUN difference, though not significant, between the post-I/R and post-sham procedure conditions (Figure 1B). The absence of SUN increase in WT and HT animals indicates that the induced I/R insult was mild.

Hif1 α gene expression did not differ between WT and HT kidneys after sham intervention and after I/R (Figure 2, Table 1). The expression of this gene also did not increase from the sham to the I/R condition in animals with both genotypes. These results agreed, therefore, with a mild degree of renal injury.

Pkd1-Haploinsufficient Mice Show Higher Renal Expression of XBP1s Protein than Wild-Type Mice after Mild I/R Insult, but not of BIP

Following the I/R insult, HT mice presented higher renal expression of XBP1s protein than WT animals (0.67 versus 0.48; $p < 0.01$) (Figures 3A and B, Table 2). We did not observe differences, however, between WT and HT mice after the sham procedure, nor between WT animals post-I/R and the sham groups.

Renal levels of BIP expression did not significantly differ between WT and HT mice 48 h after sham intervention or I/R insult (Figures 3A e C, Table 2). It should be noted, however, that HT kidneys submitted to I/R showed a non-significant numerical value of BIP expression slightly higher than HT kidneys submitted to sham intervention.

Mild I/R Insult Reduces the Ratio of Transcript Expression *Xbp1s/Xbp1u* in Kidneys of *Pkd1*-Deficient Mice

The renal expression ratio of transcripts *Xbp1s/Xbp1u* did not differ between WT and HT animals after sham intervention (Figure 4, Table 1). After the I/R insult, however, HT mice presented a significantly lower *Xbp1s/Xbp1u* ratio than wild-type animals (6.59 versus 10.29; $p < 0.001$). It is important to note that I/R decreased this ratio in HT kidneys (6.59 versus 9.00; $p < 0.01$) and slightly increased it in WT kidneys (10.29 versus 8.22; $p < 0.05$) (Figure 4, Table 1).

Mild I/R Insult Does Not Significantly Change Expression of the *Hspa5* e *Ddit3* Genes in *Pkd1*-Haploinsufficient Kidneys

Hspa5 gene expression analysis in kidney did not reveal significant differences between WT and HT animals after sham intervention or following I/R induction (Figure 5A, Table 1). Along the same line, the I/R insult was not associated with increased expression of this gene in HT and WT kidneys.

We also did not detect significant differences in *Ddit3* gene expression between WT and HT kidneys after sham intervention and after I/R insult (Figure 5B, Table 1). Similarly to the previous analysis, I/R did not induce increased expression of this gene in HT and WT kidneys.

The Cytokinergic Response to Mild Renal I/R Is Not Significant in *Pkd1*-Deficient Mice

Renal expression of IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α and RANTES was not significantly different between WT and HT mice following the sham intervention and the I/R insult (Figure 6, Table 3). Induction of renal I/R was also not able to increase the expression of such cytokines in HT and WT renal tissue. WT kidneys submitted to I/R, however, displayed a non-significant trend of higher MCP1 expression than sham WT kidneys ($p = 0.077$). A similar pattern was observed for HT kidneys ($p = 0.108$).

The serum levels of IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α and RANTES also did not differ between WT and HT mice after the sham intervention and the I/R insult (Figure 7, Table 4). Its levels also did not increase in HT and WT sera in response to I/R.

Discussion

The understanding that the ADPKD renal phenotype extends beyond cystogenesis, cyst growth and its implications in mature kidneys was a key concept within the comprehension of this disease. *Pkd1*-haploinsufficient mice, in fact, were shown to be more susceptible to renal I/R, revealing that tubular cells a *priori* functionally normal presented decreased defense capacity to an insult in the context of partial *Pkd1* deficiency¹⁰. Interestingly, a relevant role in determining this increased susceptibility to the insult was attributed to the inability of such cells to upregulate p21 post-I/R. This abnormality was associated, in fact, with a dysfunctional coordination of cell cycle, translated into increased levels of cell proliferation and apoptosis after I/R. In parallel, *Pkd1*-deficient kidneys also developed a larger inflammatory response to such an insult when compared to wild-type kidneys. In this scenario, we postulated that measures capable of increasing *Pkd1* functional activity or containing the larger apoptotic, inflammatory and even proliferative responses in *Pkd1*-deficient kidneys might potentially reduce the pointed out increased susceptibility.

In recent years, the activation of molecular participants of the RS response to I/R was shown to be able to intensify the insult-related injury^{20,21}. It must be noted that in addition to have its homeostasis hampered by I/R, the endoplasmic reticulum can activate the inflammatory response and also be induced by inflammation²². In this environment of complex relationships, the documentation of RS contribution to the pathogenesis of several renal diseases is expanding. And in the renal I/R scenario, the effects of CHOP, GRP78/BIP and caspase-12 on amplifying the injury stand out.

The relationships between ADPKD and RS established up to present are complex. While PC2 expression can be upregulated by the activation of

one of the UPR pathway arms – phosphorylation of eIF2 α ¹⁵ – its degradation is stimulated by activation of the ERAD pathway¹⁶. Interestingly, PC2 also participates in the endoplasmic reticulum homeostasis, being capable of determining phosphorylation of eIF2 α ¹⁷. This action is particularly important, since by reducing protein synthesis it protects the cell against the RS. The observation that UPR activation can attenuate cyst formation extended the yet complex ADPKD/RS relationship. Indeed, XBP1 overexpression mitigated the cystic phenotype in *Pkd1*-deficient mice, revealing that activation of XBP1 exerts an antagonistic effect to cyst development/growth in a *Pkd1*-deficiency scenario¹⁹. Based on these data and on the association of reduction of *Pkd1* activity and increased susceptibility to renal I/R, we postulated that activation of the XBP1-dependent arm of UPR secondary to I/R could diminish the injury induced by this insult in *Pkd1*-haploinsufficient mice. On the other hand, a stronger activation of other branches of UPR or ERAD following I/R in these animals, compared to wild-type mice, could contribute to the increased susceptibility to renal I/R in *Pkd1*-deficient animals. It is important to note that, depending on the intensity of the I/R insult, the activation profile of the pathways associated to induced RS could have an intensifying, attenuating or bidirectional effect on the injury degree determined by the insult. Therefore, to analyze the relationship between RS and increased susceptibility to I/R in *Pkd1*-deficiency, we evaluated different RS and inflammation markers in haploinsufficient and wild-type mice pre and post-I/R.

The 32-min ischemic insult applied to the mice was not followed by significant increase in SUN 48 h after I/R both in haploinsufficient and wild-type mice, indicating that the induced injury was mild. The observation that *Hif1 α* expression did not significantly increase in HT and WT kidneys post-I/R is consistent with the mild nature of the renal damage. It should be noted, however, that the SUN difference between the post-I/R and post-sham conditions was numerically higher in *Pkd1*-deficient than wild-type mice, a finding that is in line with the increased susceptibility to the insult displayed by the haploinsufficient animals. We do not have yet, however, a robust explanation for the observation of some SUN negative variations following this mild I/R insult.

In a mild-injury scenario, we analyzed the protein and gene expression profiles of *Hspa5* (BIP) and *Xbp1* (XBP1) given their relatively upstream position within the UPR pathway. We have not detected significant difference in BIP protein expression between WT and HT mice 48 h post-sham intervention. We have also not observed difference between the two genotypes 48 h after I/R nor significant elevations induced by the insult in both cases. In consistency with such a finding, the *Hspa5* expression profile was also not followed by significant differences.

The results related to XBP1s renal expression were very interesting. Renal expression of this protein did not differ between sham WT and HT mice, a finding

consistent with the similar ratios of gene expression *Xbp1s/Xbp1u* observed in WT and HT animals in this condition. The XBP1s protein expression, however, was higher in HT than WT kidneys after I/R. Notably, the expression ratio *Xbp1s/Xbp1u* was significantly lower in haploinsufficient than wild-type mice after the I/R insult. Interestingly, I/R determined reduction of this ratio in HT animals and a mild elevation in WT mice. The XBP1s and *Xbp1s/Xbp1u* variations in opposite directions determined by I/R in haploinsufficient kidneys, *a priori* liable for being considered discordant, came out as a consistent finding. In fact, Majumder et al recently proposed a model of gene expression regulation during cellular stress, which involves increase in XBP1s mRNA stability through cooperation of cytoplasmic splicing and its translation²³. According to this model, in cells exposed to mild stress the induction of UPR activates IRE1 α , which promotes splicing of *XBP1*. The parallel phosphorylation of eIF2 α mediated by PERK, in turn, inhibits the translation of *XBP1s* mRNA. The combination of cytoplasmic splicing and translation inhibition results in low turnover of *XBP1* mRNA and its consequent stabilization. This is the point likely reached by the WT kidneys submitted to I/R, where the renal insult activated UPR at a limited level, without progression of this pathway. In this context, the transcript ratio *Xbp1s/Xbp1u* slightly increased but XBP1 protein expression did not increase. Majumder et al showed, on the other hand, that the advance of UPR response in cells submitted to stress induces the progression of a state of inefficient translation and low turnover of *XBP1s* mRNA to a state of efficient translation of the accumulated *XBP1s* mRNA and increased turnover of this transcript, leading to its destabilization²³. This condition was probably reproduced in HT kidneys submitted to I/R because they are more susceptible to RS induction. In this scenario, XBP1 protein expression increased while the transcript ratio decreased. The differences of expression profiles for *Xbp1s/Xbp1u* and XBP1s between HT and WT mice suggest, therefore, that the low-degree I/R insult was able to activate the UPR pathway more intensely in haploinsufficient kidneys than in wild-type kidneys. Such findings demonstrate, therefore, that HT animals are more susceptible to RS induction in response to I/R than WT mice.

With the aim of analyzing more downstream stages of the UPR pathway, we also evaluated the renal expression profile of *Ddit3*, the gene that encodes CHOP. We have not observed differences between WT and HT following the sham procedure and after I/R, as well as increase in I/R-induced expression in both evaluated groups. These findings indicate that the mild insult was not capable of leading the UPR pathway activation to more advance phases, both in WT and HT kidneys. The submission of such animals to more prolonged I/R insults will be particularly important to evaluate whether HT kidneys will also increase CHOP expression at injury levels lower than the ones of WT kidneys.

We have also assessed the inflammatory implications of RS induction by renal and serum

quantification of several cytokines. In spite of a relatively broad analysis, we did not detect significant differences between WT and HT mice post-sham intervention and after I/R for IL1 β , IL6, IL10, MCP1, TNF α and RANTES renal and serum expression. It must be noted, however, that a non-significant trend of MCP1 elevation was observed in WT kidneys submitted to I/R compared to sham WT; a similar observation appears to be also applicable to HT kidneys. Such results suggest that a mild renal insult does not promote significant increase in systemic and renal inflammatory responses in *Pkd1*-deficient animals compared to their wild-type counterparts. In this line and this condition, RS induction does not seem to exert a relevant effect on the cytokinergic response associated with I/R in these mice. It is important to mind, however, that the inflammatory profiles associated with the post-I/R situations can substantially change depending on the renal damage intensity.

The XBP1s and *Xbp1s/Xbp1u* renal expression profiles observed in our haploinsufficient animals after submission to I/R suggest, therefore, that the RS induction in response to a mild insult can increase PC1 functional activity and therefore exert an attenuating effect upon the increased susceptibility of *Pkd1*-deficient mice to renal I/R. Future analyses including *Xbp1* inactivation in these animals, submission to renal I/R and assessment of cellular proliferation, apoptosis, inflammation and p21 expression will be fundamental to confirm such a hypothesis. Time extension of renal ischemia in haploinsufficient mice will be also essential, aiming to identify from which injury degree RS induction starts to activate components known to be deleterious to renal injury in *Pkd1*-deficient animals. This information will potentially lead to the identification of insult levels where protecting and deleterious effects coexist, as well as injury levels only associated with adverse effects. Based on these experimental perspectives, it will be possible to understand how, how much and in which direction RS induction can interfere in the increased susceptibility of HT animals to renal I/R.

Materials and Methods

Ethics in Animal Experimentation

This project was approved by the Research Ethics Committee of the University of São Paulo School of Medicine, following the national and international guidelines for animal care and experimentation. Euthanasia was performed in anesthetized/unconscious mice, a state induced by intraperitoneal administration of sodium thiopental 0.4 mg/g of body weight (BW).

Genetically-Modified Mice

The animal model employed in our study consists in an 129Sv mouse line with a null *Pkd1* allele²⁴. This allele was based on a construct with part of exon 2

and the entire exon 3 replaced with a reporter gene (*lacZ*) coupled in frame to the remainder of exon 2, and followed by a positive marker, the neomycin resistance gene (*neor*). The 5' *lacZ-neor* segment includes transcription termination sequences that hinder the expression of *Pkd1* 3' exons, at the same time that a PGK promoter independently promotes expression of the selectable marker *neor*. The successful construct integration resulted in *Pkd1* inactivation. Animal genotyping was performed using a 3-primer PCR reaction, with a common forward primer and different reverse primers for the wild-type and mutated alleles. Mice with only a 180-bp band were identified as wild-types while heterozygotes displayed two bands of 180 and 220 bp. The generation of *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{-/-} animals was based on crossing a *Pkd1*^{+/-} male with a *Pkd1*^{+/-} female. This study was conducted in male mice at ages ranging from 8 to 10 weeks.

Experimental Model of Renal Ischemia/Reperfusion

The mice were initially weighted and thereafter submitted to the renal I/R insult. Following anesthesia with xylazine 20 μ g/g BW (Agener União, São Paulo, Brazil) and ketamin 80 μ g/g BW (Ceva Laboratórios, São Paulo, Brazil) injected intraperitoneally, an incision was performed in the central portion of the abdomen, both renal pedicles were exposed by dissection and bilateral renal ischemia was induced by clamping the mentioned pedicles. The abdominal cavity was covered with sterile gauze humidified with PBS and the mouse stayed on a thermic table at 37 °C during the surgical procedure. When reperfusion was incomplete, the animal was euthanized and discarded. The mice were hydrated with 400 μ l of saline solution administered intraperitoneally immediately after renal reperfusion. The abdominal incision was then sutured and the surgical recovery conducted in a conventional cage, with free access to water and food. The same intervention, excluding the temporary clamping of both renal pedicles used to induce the I/R insult, was employed to generate the sham groups.

Analyses of Renal Function

Blood collection was performed by ocular access, at baseline and 48 h after the I/R insult as well as pre- and post-sham procedure. Blood samples were centrifuged after coagulation to obtain serum. The SUN measurement was performed using the Ureia CE kit (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), an enzymatic-colorimetric method, according to the manufacturer's instructions.

Analyses of *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif1 α* Gene Expression

The kidneys of mice submitted and not submitted to the I/R insult had total RNA extracted using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. The RNA samples were quantified using the NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) and treated with the RQ1 RNase free DNase kit

(Promega Corporation, Madison, WI) to exclude the possibility of contamination with genomic DNA. For each sample, 3 µg of total RNA were submitted to a RT-PCR reaction using the ImProm II™ Reverse Transcription system (Promega Corporation, Madison, WI). The resulting cDNA was then used in the following assays.

Quantitative analyses of *Hspa5*, *Ddit3* and *Hif1α* gene expression were performed using the Taqman system (Applied Biosystems, Warrington, UK). *Gapdh* expression was utilized as endogenous internal control²⁵. The primer and probe sequences are not provided by the manufacturer. The used assays included *Hspa5* (Mm01333323_g1), *Ddit3* (Mm01135937_g1), *Hif1α* (Mm 00468869_m1) and *Gapdh* (Mm99999915_g1).

The quantification of relative gene expression was performed using the $\Delta\Delta C_t$ methodology and the results are presented in arbitrary units.

Semiquantitative Evaluation of Xbp1 mRNA Non-Conventional Splicing

The semiquantitative assessment of non-conventional splicing of mRNA encoded by *Xbp1*, the mouse orthologue to human *XBP1*, was performed using the PCR end-point technique. Total RNA extraction and reverse transcription reaction were conducted following the protocol described for *Hspa5*, *Ddit3* e *Hif1α* expression analyses. The resulting cDNA was used in a conventional PCR reaction to detect the *Xbp1* transcripts. A 289-bp amplicon refers to the regular *Xbp1* transcript, while a 263-bp amplicon relates to the alternatively spliced transcript associated with RS induction. As a positive control for the PCR reaction, IMCD3 cells were treated with tunicamycin at 5 µg/mL for 5-6 h to induce RS. The PCR products were separated by 3% agarose gel electrophoresis, stained with SYBR safe DNA gel Stain (LifeTechnologies, Carlsbad, CA), visualized using the photo documentation system ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, UK) and quantified by densitometry using the UViband software (UVITEC, Cambridge, UK). The data are expressed as *Xbp1s/Xbp1u* transcript ratio. *Gapdh* expression was used as endogenous internal control. The used primers included *XBP1* forward (5'-GAACCAGGAGTTAAGAACACG-3'), *XBP1* reverse (5'-AGGCAACAGTGTCTCAGAGTCC-3'), *Gapdh* forward (5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3') and *Gapdh* reverse (5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3').

Protein Expression Analyses for BIP and XBP1

The kidneys submitted and not submitted to the I/R insult were homogenized in the buffer solution T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor, Thermo Scientific). The samples were centrifuged at 12000 g for 10 min at 4°

C after homogenization, to remove nuclei and cell debris. Protein quantification was performed using the Bradford colorimetric method (kit Bio-Rad Protein Assay, Hercules, CA). Equitable amounts of protein were submitted to 12% polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and thereafter transferred to a 0.45-µm PVDF membrane (BioAgency, London, UK). The membranes were incubated for 1 h in 5% nonfat milk blocking solution to minimize protein unspecific binding, and thereafter incubated overnight at 4° C with the primary antibodies anti-BIP (1:1000, ABCAM, Cambridge, UK), anti-XBP1 (1:500, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) and anti-GAPDH (1:5000; Sigma-Aldrich, London, UK). It must be noted that the anti-XBP1 antibody is capable of detecting the 33-kDa regular protein (XBP1u) and the 54-kDa unconventional-splicing resulting protein (XBP1s). Since the regular protein is rapidly degraded, our essay essentially detects only the protein related to *Xbp1* unconventional splicing. The secondary antibody was conjugated to HRP (Life Technologies, Carlsbad, CA). After appropriate washes, the membranes were incubated with ECL Prime Western Blotting Detection reagent (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) and the chemiluminescent signal was detected using the digital system ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, UK) and quantified by densitometry using the software previously described. The results were normalized to GAPDH and presented in arbitrary units.

Analyses of Cytokine Expression in Renal Tissue and Serum

We have used the MYCITOMAG-70K-06 Miliplex kit (Millipore, Darmstadt, Germany) to evaluate the cytokine profile of our mice. Protein extraction from kidneys and serum collection followed the protocols previously described for western blot and SUN. The multiplex essays were performed in a multi-user facility of our institution, following the manufacturer's orientations. The data are expressed as pg/µg of protein for cytokine measurement in renal tissue and pg/mL for measurements in serum.

Statistical Analyses

Continuous and semicontinuous data were initially compared to the Gaussian curve to determine presence or absence of normality for each variable. Since all data corresponding to the variables displayed a non-parametric behavior, they were represented as median and quartiles.

Given the small sample size of our experimental groups, we chose to adjust the data to the normal curve using logarithmic conversion to base 10. Due to the occurrence of variance differences among the groups, ie, heteroscedastic behavior, we used variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test (least significant difference). It was considered for the entire study α risk ≤ 0.05 and β risk ≤ 0.20 . The analyses were performed using the

statistical program SPSS 19.0 (IBM, North Castle, NY).

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Grant 2013/02162-8

References

- Schrier RW, McFann KK, Johnson AM. Epidemiological study of kidney survival in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2003;63:678-85.
- Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007;369:1287-301.
- Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 2009;76:149-68.
- The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 1994;78:725.
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996;272:1339-42.
- Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010;17:118-30.
- Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:556-66.
- Chang MY, Ong AC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances in pathogenesis and treatment. *Nephron Physiol* 2008;108:p1-7.
- Pirson Y. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010;17:173-80.
- Bastos AP, Piontek K, Silva AM, et al. *Pkd1* haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:2389-402.
- Prasad S, McDaid JP, Tam FW, Haylor JL, Ong AC. *Pkd2* dosage influences cellular repair responses following ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2009;175:1493-503.
- Montie HL, Kayali F, Haezebrouck AJ, Rossi NF, Degracia DJ. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:314-24.
- Dong B, Zhou H, Han C, et al. Ischemia/reperfusion-induced CHOP expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: the role of acidosis and GPR4. *PLoS One* 2014;9:e110944.
- Khan MM, Yang WL, Wang P. Endoplasmic reticulum stress in sepsis. *Shock* 2015;44:294-304.
- Yang J, Zheng W, Wang Q, Lara C, Hussein S, Chen XZ. Translational up-regulation of polycystic kidney disease protein PKD2 by endoplasmic reticulum stress. *FASEB J* 2013;27:4998-5009.
- Liang G, Li Q, Tang Y, et al. Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet* 2008;17:1109-19.
- Liang G, Yang J, Wang Z, Li Q, Tang Y, Chen XZ. Polycystin-2 down-regulates cell proliferation via promoting PERK-dependent phosphorylation of eIF2alpha. *Hum Mol Genet* 2008;17:3254-62.
- Fedeles SV, Tian X, Gallagher AR, et al. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet* 2011;43:639-47.
- Fedeles SV, So JS, Shrikhande A, et al. *Sec63* and *Xbp1* regulate IRE1α activity and polycystic disease severity. *J Clin Invest* 2015;125:1955-67.
- Yung HW, Korolchuk S, Tolkovsky AM, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Endoplasmic reticulum stress exacerbates ischemia-reperfusion-induced apoptosis through attenuation of Akt protein synthesis in human choriocarcinoma cells. *FASEB J* 2007;21:872-84.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115:2656-64.
- Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC, McGuckin MA. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol Cell Biol* 2012;90:260-70.
- Majumder M, Huang C, Snider MD, et al. A novel feedback loop regulates the response to endoplasmic reticulum stress via the cooperation of cytoplasmic splicing and mRNA translation. *Mol Cell Biol* 2012;32:992-1003.
- Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al. A functional floxed allele of *Pkd1*

that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2004 Dec;15 (12) :3035–43

25. Cui X, Zhou J, Qiu J, Johnson MR, Mrug M. Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. *Am J Nephrol*. 2009 Jan;30(5):413–7.

Figure Legends

Figure 1. Comparative analyses of serum urea nitrogen among the following mouse groups: A) left - wild type sham (WT Sham) pre-intervention, *Pkd1*-haploinsufficient sham (HT Sham) pre-intervention, wild type test (WT IR) pre-I/R and *Pkd1*-haploinsufficient test (HT IR) pre-I/R; and right - WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R. B) Post/pre-intervention SUN variations in WT Sham, HT Sham, WT IR e HT IR animals. Comparisons were performed using the chi-squared test, with data represented as median and interquartile intervals.

Figure 2. Comparative analyses of *Hif1 α* renal expression in among the mouse groups WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R. Analyses were performed using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test, with data expressed as median and interquartile intervals.

Figure 3. Comparative analyses of XBP1s and BIP protein expression in kidney among the mouse groups WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R mice. A) Representative image of western blot analysis; B) Quantitative comparative analysis of XBP1s renal expression among the WT Sham, HT Sham, WT IR and HT IR groups; and C) Quantitative comparative analysis of BIP renal expression among the WT Sham, HT Sham, WT IR and HT IR groups. ** $p < 0,01$. Comparisons were performed using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test, with results expressed as median and interquartile intervals.

Figure 4. Comparative analyses of the renal expression ratio of transcripts *Xbp1s/Xbp1u* among the mouse groups WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R. A) Representative image

of semiquantitative PCR analysis. 1: molecular mass marker; 2: negative control; 3: positive control, represented by IMCD3 cells treated with tunicamycin at 5 $\mu\text{g/mL}$ for 5-6 h. B) Comparative semiquantitative analysis of the renal expression ratio of transcripts *Xbp1s/Xbp1u* among the WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R groups. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Comparisons were conducted with variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test. The data are expressed as median and interquartile intervals.

Figure 5. Comparative analyses of *Hspa5* (A) and *Ddit3* (B) gene expression in kidney among the mouse groups WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R. Comparisons were performed using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test. The results are represented as median and interquartile intervals.

Figure 6. Comparative renal expression analyses of IL1 β (A), IL6 (B), IL10 (C), MCP1 (D), RANTES (E) and TNF α (F) among the mouse groups WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R. Comparisons were performed with variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test; the data are presented as median and interquartile intervals.

Figure 7. Comparative analyses of IL1 β (A), IL6 (B), IL10 (C), MCP1 (D), RANTES (E) and TNF α (F) serum levels among the mouse groups WT Sham 48 h post-intervention, HT Sham 48 h post-intervention, WT IR 48 h post-I/R and HT IR 48 h post-I/R. Comparisons were conducted using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test; the results are expressed as median and interquartile intervals.

Tables

Table 1. Gene expression in *Pkd1*^{+/+} (WT) and *Pkd1*^{+/-} (HT) mice 48 h after Sham intervention and 48 h after ischemia-reperfusion (I/R) injury

Gene	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
Real Time PCR				
<i>Hspa5</i>	0.84 (0.82-1.14)	1.42 (0.68-1.46)	1.30 (0.74-1.83)	1.35 (1.34-2.07)
<i>Ddit3</i>	0.83 (0.68-1.49)	1.26 (0.63-1.85)	2.06 (1.79-2.54)	1.51 (1.06-2.11)
<i>Hif1α</i>	0.96 (0.91-1.10)	1.15 (0.96-1.58)	0.99 (0.81-1.69)	1.37 (0.84-2.10)
End Point PCR				
<i>Xbp1s/Xbp1u</i>	8.22 (6.48-9.54)	9.00 (8.24-9.14)	10.29 ^c (9.48-12.18)	6.59 ^{a,b} (5.85-7.05)

The nonparametric data were compared by performing a variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test; the data are presented as median and interquartile intervals. ^ap<0.001 vs WT IR; ^bp<0.01 vs HT; ^cp<0.05 vs WT.

Table 2. Renal expression of proteins involved in RS in *Pkd1^{+/+}* (WT) and *Pkd1^{+/-}* (HT) mice 48 h after Sham intervention and 48 h after ischemia-reperfusion (I/R) injury

Protein	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
XBP1s	0.48 (0.33-0.64)	0.47 (0.45-0.60)	0.48 (0.34-0.53)	0.67 ^a (0.55-0.72)
BIP	0.90 (0.59-1.34)	0.86 (0.76-0.92)	0.86 (0.78-0.97)	1.01 (0.92-1.06)

Comparisons were performed using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test, with results expressed as median and interquartile intervals. ^ap<0.01 vs WT IR.

Table 3. Renal expression of cytokines in *Pkd1^{+/+}* (WT) and *Pkd1^{+/-}* (HT) mice 48 h after Sham intervention and 48 h after ischemia-reperfusion (I/R) injury

Cytokine	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
IL1β (pg/ μ g)	9.24 (7.88-12.67)	9.51 (8.80-11.60)	9.46 (8.54-13.65)	8.90 (7.88-14.85)
IL6 (pg/ μ g)	27.94 (20.25-46.92)	24.06 (22.37-52.93)	24.97 (23.59-42.58)	38.96 (28.35-94.79)
IL10 (pg/ μ g)	77.31 (64.79-98.88)	86.25 (77.16-93.86)	79.70 (76.54-86.67)	77.02 (65.69-82.46)
MCP1 (pg/ μ g)	14.35 (13.02-18.76)	16.04 (13.53-18.61)	27.09 (18.81-28.47)	27.57 (19.35-48.54)
RANTES (pg/ μ g)	9.57 (8.12-12.50)	10.58 (9.37-11.44)	13.33 (10.71-16.45)	12.83 (10.17-14.16)
TNFα (pg/ μ g)	1.85 (1.57-2.05)	2.03 (1.19-2.25)	1.89 (1.71-2.87)	2.10 (1.57-3.05)

Comparisons were performed using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test, with results expressed as median and interquartile intervals.

Table 4. Serum levels of cytokines in *Pkd1^{+/+}* (WT) and *Pkd1^{+/-}* (HT) mice 48 h after Sham intervention and 48 h after ischemia-reperfusion (I/R) injury

Cytokine	WT Sham (n=7)	HT Sham (n=6)	WT IR (n=7)	HT IR (n=6)
IL1β (pg/mL)	8.17 (5.35-24.71)	2.85 (0.86-14.43)	14.43 (5.35-24.71)	14.50 (6.73-21.20)
IL6 (pg/mL)	512.18 (260.42-876.42)	402.39 (293.45-6490.00)	641.68 (331.02-1090.00)	1315.50 (571.35-1763.00)
IL10 (pg/mL)	50.58 (12.78-143.83)	14.98 (11.40-18.71)	12.78 (10.08-51.53)	46.22 (8.81-178.98)
MCP1 (pg/mL)	111.77 (78.66-243.36)	81.69 (57.16-2987.00)	130.22 (85.54-185.76)	151.71 (92.28-180.56)
RANTES (pg/mL)	108.63 (47.67-138.87)	43.70 (21.84-62.25)	45.57 (39.29-81.27)	87.15 (80.66-138.24)
TNFα (pg/mL)	21.24 (15.20-23.54)	18.58 (13.72-75.09)	22.01 (18.20-44.04)	26.61 (17.07-39.18)

Comparisons were performed using variance analysis for non-repeated measures adjusted to cubic term weighted with the modified Tukey post-test, with results expressed as median and interquartile intervals.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

Figure 7.

Referências

1. Torres, V.E., Harris, P.C. & Pirson, Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 369, 1287-301 (2007).
2. Willey CJ, Blais JD, Hall AK, Krasa HB, Makin AJ, Czerwiec FS. Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;(0):1–8.
3. Bastos, a. P. & Onuchic, L.F. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44, 606-617 (2011).
4. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:556-66.
5. Chang MY, Ong AC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances in pathogenesis and treatment. *Nephron Physiol* 2008;108:p1-7.
6. Qian Q, Li A, King BF, et al. Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2003;37(1):164-71.
7. Pirson Y. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010;17:173-80.
8. Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*. 2010;17(2):153-63
9. Ward, C.J. et al. The Polycystic Kidney Disease 1 Gene Encodes a 14 kb Transcript and Lies within a Duplicated Region on Chromosome 16. *Cell* 77, 881-894 (1994).
10. Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, et al. Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics*. 1997;44(1):131-6.
11. Hughes J, Ward C, Peral B, Aspinwall R. The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature* 1995;10:151-160.
12. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science (New York, N.Y.)*. 1996;272(5266):1339-42.
13. Porath, Binu et al. Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *The American Journal of Human Genetics* , Volume 98 , Issue 6 , 1193 - 1207

14. Oatley P, Stewart AP, Sandford R, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging reveals the domain structure of polycystin-1. *Biochemistry* [Internet]. 2012 Apr 3;51(13):2879–88.
15. Yu, S. et al. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18688-93 (2007).
16. Li HP, Geng L, Burrow CR, Wilson PD. Identification of phosphorylation sites in the *PKD1*-encoded protein C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Jun 7;259(2):356–63.
17. Qian, F. et al. *PKD1* interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature genetics* 16, 179–183 (1997).
18. González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, et al. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(3):1182-7.
19. Vassilev, P.M. et al. Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca^{2+} homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 341-50 (2001).
20. Ibraghimov-Beskrovnaya, O. et al. Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6397-402 (1997).
21. Drummond I Polycystins, focal adhesions and extracellular matrix interactions. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(10):1322-6.
22. Takiar V, Caplan MJ. Polycystic kidney disease: pathogenesis and potential therapies. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(10):1337-43.
23. Goilav B. Apoptosis in polycystic kidney disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(10):1272-80.
24. Terryn S, Ho A, Beauwens R, Devuyt O. Fluid transport and cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(10):1314-21.

25. Boletta a, Qian F, Onuchic LF, et al. Polycystin-1, the gene product of *PKDI*, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Molecular cell*. 2000;6(5):1267-73
26. Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, Starremans PG, Luo Y, et al. Fibrocystin / Polyductin , Found in the Same Protein Complex with Polycystin-2 , Regulates Calcium Responses in Kidney Epithelia Fibrocystin / Polyductin , Found in the Same Protein Complex with Polycystin-2 , Regulates Calcium Responses in Kidney Epithel. 2007;27(8):3241–52.
27. Li Y1, Santoso NG, Yu S, Woodward OM, Qian F, Guggino WB. Polycystin-1 interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling with implications for polycystic kidney disease. *J Biol Chem*. 2009 Dec 25;284(52):36431-41.
28. Abdul-Majeed S, Nauli SM. Calcium-mediated mechanisms of cystic expansion. *Biochim Biophys Acta*; 2011 Oct; 1812(10):1281–90.
29. Mekahli D, Parys JB, Bultynck G, Missiaen L, De Smedt H. Polycystins and cellular Ca²⁺ signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(15):2697–712.
30. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(1):18–32.
31. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, et al. *PKDI* Induces p21 waf1 and Regulation of the Cell Cycle via Direct Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway in a Process Requiring PKD2. 2002;109:157-168.
32. Arnould, T. et al. The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *The Journal of biological chemistry* 273, 6013-8 (1998)
33. Shillingford, J.M. et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5466-71 (2006).
34. Dere, R., Wilson, P.D., Sandford, R.N. & Walker, C.L. Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PloS one* 5, e9239 (2010).
35. Olsan EE, Mukherjee S, Wulkersdorfer B, et al. Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) inhibition suppresses renal cyst growth in polycystic kidney disease. *PNAS*. 44,18067-18072,2011

36. Kim E, Arnould T, Sellin LK, et al. The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(8):4947-53.
37. Qian, F., Watnick, T.J., Onuchic, L.F. & Germino, G.G. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87, 979-87 (1996).
38. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, et al: Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 2:247-251, 1998
39. Pei, Y. et al. Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a “two-hit” model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10, 1524-9 (1999).
40. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez M a, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of *Pkd1*. *Nature medicine*. 2007;13(12):1490-5.
41. Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J. *Pkd1* inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(12):2351-63.
42. Takakura, A. et al. Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Human molecular genetics* 18, 2523-31 (2009).
43. Bastos, A.P. et al. *Pkd1* haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20, 2389-402 (2009).
44. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*. 2010;17(2):118-30.
45. Qian, F. et al. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16981-6 (2002).
46. Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med*. 2003 Oct [cited 2014 Dec 10];9(10):1323–6.

47. Torres VE, Wang X, Qian Q, Somlo S, Harris PC, Gattone VH. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med*. 2004 Apr 10(4):363–4.
48. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2014 Nov 20];367(25):2407–18.
49. Higashihara E, Torres VE, Chapman AB, Grantham JJ, Bae K, Watnick TJ, et al. Tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: three years' experience. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2014 Dec 10];6(10):2499–507.
50. Nagao S, Nishii K, Katsuyama M, Kurahashi H, Marunouchi T, Takahashi H, et al. Increased water intake decreases progression of polycystic kidney disease in the PCK rat. *J Am Soc Nephrol*
51. Vendramini LC, Nishiura JL, Baxmann a. C, Heilberg IP. Caffeine intake by patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2012 Sep [cited 2014 Dec 10];45(9):834–40.
52. Hogan MC, Masyuk T V, Page LJ, Kubly VJ, Bergstralh EJ, Li X, et al. Randomized clinical trial of long-acting somatostatin for autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 Dec 10];21(6):1052–61.
53. Gevers TJG, Chrispijn M, Wetzels JFM, Drenth JPH. Rationale and design of the RESOLVE trial: lanreotide as a volume reducing treatment for polycystic livers in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMC Nephrol* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012 Jan [cited 2014 Dec 10];13(1):17.
54. Tao Y, Kim J, Schrier RW, Edelstein CL. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Nov 26];16(1):46–51 Prasad S, McDaid JP, Tam FWK, Haylor JL, Ong ACM. Pkd2 dosage influences cellular repair responses following ischemia-reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2009;175(4):1493–503.
55. Nürnberger J, Wanner C, Sommerer C, Kunzendorf U, Banas B, Hörl WH, et al. Everolimus in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2010;363:830–40.

56. Krauer F, Raina S, Young J, Ph D, Rentsch KM, Spanaus KS, et al. Sirolimus and Kidney Growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2010;363:820–9.
57. Abebe KZ, Bost JE, Miskulin DC, Theodore I, Oskoui R, Kelleher C, et al. The HALT Polycystic Kidney Disease Trials – Analysis of baseline parameters. *Kidney Int*. 2013;81(6):577–85.
58. Klawitter J, Zafar I, Klawitter J, Pennington AT, Klepacki J, Gitomer BY, et al. Effects of lovastatin treatment on the metabolic distributions in the Han:SPRD rat model of polycystic kidney disease. *BMC Nephrol* [Internet]. *BMC Nephrology*; 2013 Jan [cited 2014 Dec 10];14(1):165.
59. Cadnapaphornchai MA, George DM, Masoumi A, Mcfann K, Strain JD, Schrier RW. Effect of statin therapy on disease progression in pediatric ADPKD: Design and baseline characteristics of participants. *Contemp Clin Trials*. 2011;32(3):437–45. Ravi Thadhani, Manuel Pascual, Joseph Bonventre. Acute Renal Failure. *N Engl J Med*. 1996;334:1448–60.
60. Ravi Thadhani, Manuel Pascual, Joseph Bonventre. Acute Renal Failure. *N Engl J Med*. 1996;334:1448–60.
61. Thurman JM. Triggers of Inflammation after Renal Ischemia/Reperfusion. *Clin Immunol*. 2008;123(1):7–13.
62. Schrier, r. W.; wang, w.; poole, b.; mitra, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.*, v. 114, n. 1, p. 5-14, 2004.
63. Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM. Coordination of the cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(4):F810-6.
64. Park J-Y, Schutzer WE, Lindsley JN, Bagby SP, Oyama TT, Anderson S, et al. P21 Is Decreased in Polycystic Kidney Disease and Leads To Increased Epithelial Cell Cycle Progression: Roscovitine Augments P21 Levels. *BMC Nephrol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Dec 11];8:12.
65. Prasad S, McDaid JP, Tam FWK, Haylor JL, Ong ACM. Pkd2 dosage influences cellular repair responses following ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2012 Oct 13];175(4):1493–503.

66. Bernhardt WM, Wiesener MS, Weidemann A, et al. Involvement of hypoxia-inducible transcription factors in polycystic kidney disease. *The American journal of pathology*. 2007;170(3):830-42.
67. Oakes S a, Papa FR. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol [Internet]*. 2014 Oct 27 [cited 2014 Nov 13];(October 2014):173–94.
68. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr Opin Pharmacol [Internet]*. Elsevier Ltd; 2010 Apr [cited 2014 Nov 1];10(2):156–65.
69. Inagi R, Ishimoto Y, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum-new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol [Internet]*. Nature Publishing Group; 2014 Apr 22 [cited 2014 Jun 9];1–10.
70. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d’Hellencourt C, Ravanani P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci [Internet]*. 2014 Jan [cited 2014 Aug 15];8(July):213.
71. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal [Internet]*. 2007 Dec [cited 2014 Jul 24];9(12):2277–93.
72. Brewer JW, Diehl J a. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2000 Nov 7;97(23):12625–30.
73. Yoshida H. Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. Involvement Of Basic Leucine Zipper Transcription Factors. *J Biol Chem [Internet]*. 1998 Dec 11 [cited 2014 Nov 12];273(50):33741–9.
74. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed J. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2656–64.
75. Montie HL, Kayali F, Haezebrouck AJ, Rossi NF, Degracia DJ. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF2 alpha kinase PERK. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:314-24.
76. Peralta C, Brenner C. Endoplasmic reticulum stress inhibition enhances liver tolerance to ischemia/reperfusion. *Curr Med Chem*. 2011;18(13):2016-24.
77. Xin Q, Ji B, Cheng B, Wang C, Liu H, Chen X, et al. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 2014;68(1):18–27.

78. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill L a J, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007;21(2):325–32.
79. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* ; 2009;130(1):41–50.
80. Dinarello C a. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(Suppl 1):S34–45.
81. Lerner AG, Upton J, Praveen PVK, Ghosh R, Nakagawa Y, Igbaria A, et al. IRE1 α Induces Thioredoxin-Interacting Protein to Activate the NLRP3 Inflammasome and Promote Programmed Cell Death under Irremediable ER Stress. *Cell Metab*. 2012;16(2):250–64.
82. Khan MM, Yang W-L, Wang P. Endoplasmic reticulum stress in sepsis. *Shock*. 2016;44(4):294–304.
83. Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;(December 2014):1–31.
84. Davis RJ. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*. 2000;103(2):239–52
85. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2002;62(5):1539–49.
86. Dong B, Zhou H, Han C, Yao J, Xu L, Zhang M, et al. Ischemia/reperfusion-induced chop expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: The role of acidosis and gpr4 e110944. *PLoS One*. 2014;9(10):1–11.
87. Noh MR, Kim JI, Han SJ, Lee TJ, Park KM. C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. B.V.; 2015;1852(9):1895–901.
88. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress in the kidney. *Clin Exp Nephrol*. 2008 Oct;12(5):317–25.
89. Fougeray S, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, Thervet E, et al. Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis*. 2011;2(4):e143
90. Yu W, Sheng M, Xu R, Yu J, Cui K, Tong J, et al. Berberine protects human renal proximal tubular cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibiting endoplasmic

- reticulum and mitochondrial stress pathways. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine*. 2013 Jan; 11(1):24.
91. Wang Y, Tian J, Qiao X, Su X, Mi Y, Zhang R, et al. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *BMC Nephrol. BMC Nephrology*; 2015;16:169.
92. Liu J, Xue W, Xiang H, Zheng J, Zhao Y, Jiao L, et al. Cathelicidin PR-39 peptide inhibits hypoxia/reperfusion-induced kidney cell apoptosis by suppression of the endoplasmic reticulum-stress pathway. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2016;48(8):714–22.
93. Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali M, Hauet T, Hadj-Ayed K, Miled A-H, Ghoul-Mazgar S, et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning application and trimetazidine treatment. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science*; 2012;19(1):71.
94. Bando Y et al. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J*. 2004 Sep;18(12):1401-3. Epub 2004 Jul 1.
95. Yang J, Zheng W, Wang Q, Lara C, Hussein S, Chen X-Z. Translational up-regulation of polycystic kidney disease protein PKD2 by endoplasmic reticulum stress. 27(12):4998–5009.
96. Liang G, Li Q, Tang Y, Kokame K, Kikuchi T, Wu G, et al. Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet*. 2008 Apr 15. 17(8):1109–19.
97. Liang G, Yang J, Wang Z, Li Q, Tang Y, Chen X-Z. Polycystin-2 down-regulates cell proliferation via promoting PERK-dependent phosphorylation of eIF2alpha. *Hum Mol Genet*. 2008;17(20):3254–62.
98. Federeles S V. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet*. 2011;43(7):639–47.
99. Fedeles S V., So JS, Shrikhande A, Lee SH, Gallagher AR, Barkauskas CE, et al. Sec63 and Xbp1 regulate IRE1a activity and polycystic disease severity. *J Clin Invest*. 2015;125(5):1955–67.
100. Inoue Y. Aberrant glycosylation and localization of polycystin-1 caused polycystic kidney in an AQP11 knockout model. *J Am Soc Nephrol*. 25(12):2789–99.

101. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al. A functional floxed allele of *Pkd1* that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2004 Dec;15(12):3035–43.
102. Mcclive PJ, Sinclair AH. Rapid DNA Extraction and PCR-Sexing of Mouse Embryos. *Mol Reprod Dev.* 2001;226(March):225–6.
103. Cui X, Zhou J, Qiu J, Johnson MR, Mrug M. Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. *Am J Nephrol.* 2009 Jan;30(5):413–7.
104. Khandrika L, Kim FJ, Campagna A, Koul S, Meacham RB, Koul HK. Primary culture and characterization of human renal inner medullary collecting duct epithelial cells. *J Urol* 2008 May; 179(5):2057–63.
105. Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC, McGuckin MA. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol Cell Biol* 2012;90:260-70.
106. Majumder M. et al. A novel feedback loop regulates the response to endoplasmic reticulum stress via the cooperation of cytoplasmic splicing and mRNA translation. 2012 Mar;32(5):992-1003