Marciana Veloso de Sousa

**Efeitos do tabagismo sobre os fenótipos renal e cardíaco
em camundongos císticos por inativação do gene *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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Marciana Veloso de
Efeitos do tabagismo sobre os fenótipos renal e
cardíaco em camundongos císticos por inativação do
gene Pkd1 / Marciana Veloso de Sousa. -- São Paulo,
2018.

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

Programa de Nefrologia.

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico
dominante 2.Tabagismo 3.Fibrose 4.Proliferação
celular 5.Estresse oxidativo 6.Ecocardiografia

USP/FM/DBD-429/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

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

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílio regular (n° 2015/17152-3) e bolsa de mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Maria**, uma mulher guerreira que, sempre transmitiu o valor do trabalho e esforço. Obrigada pelo exemplo e companheirismo. Te amo.

Ao meu esposo, **Ronaldo Gabriel**, por sempre estar ao meu lado, sorrindo com minhas alegrias e apoiando nas minhas tristezas. Obrigada por me amar e me motivar sempre. Te amo.

Ao meu avô, **Heygino**, minha referência de fé, amor e bondade que, partiu e deixou uma grande saudade.

Ao meu pai, **José**, homem de coração bom que, mesmo partindo tão precocemente, continua sendo minha estrela guia a orientar todos os meus passos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic, por ampliar as portas do conhecimento, por ser exemplo de inteligência e profissionalismo. Muito obrigada por está sempre presente e compartilhar as dificuldades e alegrias sempre com palavras de apoio.

À Andressa Amaral, exemplo de profissional, sempre pronta a ajudar com sua vasta experiência. Meus sinceros agradecimentos, não apenas pela colaboração neste projeto, mas também pela amizade, pelos conselhos e pelo estímulo nos momentos de dificuldade.

Ao Dr. Bruno Balbo, agradeço pela coloboração, pela dedicação, pela amizade, apoio e entusiasmo.

Ao Prof. Milton A. Martins e a Fernanda Lopes meus sinceros agradecimentos por disponibilizar o espaço do LIM-20 para exposição dos camundongos ao tabagismo, pelo suporte e auxílio.

Aos professores José E. Krieger e Vera Maria Cury Salemi, por permitir o uso do equipamento de ecocardiografia e aquisições de imagens deste projeto. E, também agradeço, pela ajuda dos ecocardiografistas Dr.Marcelo Dantas, Dr.Renato Hortegal e Dra.Camila Rocon.

À Profa. Maria Cláudia Irigoyen, agradeço por disponibilizar o seu laboratório e o técnico Leandro Souza para aferição da pressão arterial.

À Profa. Cláudia Helou, obrigada por permitir o uso dos equipamentos do seu laboratório e disponibilizar a técnica Mirela Santino para auxiliar no manuseio.

Ao Prof. Isac de Castro e Dr. Elieser Watanabe pela colaboração na análise estatística.

AGRADECIMENTOS

Ao técnico Victor Debbas que disponibilizou seu tempo e conhecimento para auxiliar nos experimentos de GSH.

Aos amigos do LIM-29, Jéssica, Will, Leandro, Mirtes, Eliene, Sr. Pedro, Precil, Andreia, Carlos, Livia, Vivian, Priscila, Cléo, Fernanda, Juliano, Renata agradeço pela amizade, apoio e companheirismo.

Agradeço a todos da Disciplina de Nefrologia.

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

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Resumo

Summary

Sumário

INTRODUÇÃO	2
Doença Renal Policística Autossômica Dominante: Epidemiologia e Manifestações Clínicas	2
Os Genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i> , Seus Produtos e Vias de Sinalização Envolvidas na DRPAD	3
Bases Genético-Moleculares da Cistogênese na DRPAD	5
Fatores Contribuintes à Progressão da Doença Renal Associada à DRPAD	6
Policistinas e Fenótipo Cardiovascular	7
Efeitos Adversos do Tabagismo	8
Efeitos Renais do Tabagismo	8
Efeitos Cardíacos do Tabagismo	9
Efeitos do Tabagismo sobre a DRPAD	10
Bases e Hipóteses que Ancoraram a Construção deste Estudo	10
OBJETIVOS.....	15
Objetivo Principal	15
Objetivos Específicos	15
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Aspectos Éticos e Eutanásia dos Camundongos	18
Modelo Animal.....	18
Genotipagem dos Camundongos	19
Exposição ao Tabagismo	20
Grupos Experimentais	22
Análises Bioquímicas	23
Ultrassonografia Renal	23
Análise Ecocardiográfica.....	24
Registro Direto da Pressão Arterial Média.....	26
Coleta dos Tecidos.....	26
Quantificação de Fibrose	27
Quantificação de Proliferação Celular.....	27
Quantificação de Apoptose.....	28
Avaliação da Concentração Renal de Glutathione	28
Determinação de Concentração Renal das Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	29

RT-PCR em Tempo Real.....	29
Análise Estatística.....	30
RESULTADOS	32
Viabilidade do Modelo Experimental e Efeitos Sistêmicos do Tabagismo	32
Avaliações Biométricas	33
Análises Bioquímicas	35
Análises por Ultrassonografia Renal	37
Análises por Ecografia.....	38
Análise da Pressão Arterial Média	43
Estudos de Proliferação Celular	44
Análises Quantitativas de Fibrose Renal	45
Análises Quantitativas de Fibrose Cardíaca	46
Análises de Apoptose em Tecido Renal	46
Análises de Apoptose em Tecido Cardíaco	48
Análise do Metabolismo Redox	48
Real time RT-PCR.....	49
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÕES.....	61
ANEXOS.....	63
REFERÊNCIAS	105

Figura 1.	Esquema ilustrativo do complexo PC1 e PC2, os produtos de <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i> , e representação de seus domínios fundamentais.....	4
Figura 2.	Representação esquemática dos efeitos do tabagismo.....	9
Figura 3.	Estratégia de construção do alelo <i>floxed Pkd1</i> (<i>Pkd1^{flox}</i>), utilizado para a geração dos camundongos císticos <i>Pkd1^{flox/flox}·Nestin^{cre}</i>	19
Figura 4.	Genotipagem dos camundongos por PCR para a presença ou ausência de Cre recombinase (A) e para a presença do alelo condicional <i>Pkd1^{flox}</i> (B).....	20
Figura 5.	Esquema ilustrativo da caixa de exposição ao tabagismo.....	21
Figura 6.	Fluxograma experimental do estudo.....	22
Figura 7.	Representação da metodologia aplicada para obtenção do volume renal e do índice cístico a partir de ultrassonografia.....	24
Figura 8.	Análise comparativa de sobrevida entre os grupos CI, CIF, NC e NCF.....	32
Figura 9.	Análises comparativas do peso corporal entre os quatro grupos experimentais.....	33
Figura 10.	Análises comparativas da razão peso renal/peso corporal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	34
Figura 11.	Análises comparativas da razão peso do coração/peso corporal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	34
Figura 12.	Análises comparativas da razão peso do fígado/peso corporal entre os camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	34
Figura 13.	Análises comparativas da concentração sérica de ureia entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	35
Figura 14.	Análises comparativas da fração de excreção sérica de Na ⁺ (FE _{Na}) (A) e K ⁺ (FE _K) (B) nos quatro grupos experimentais (CI, CIF, NC e NCF).....	36
Figura 15.	Análises comparativas das concentrações sérica de S _{Na} (A) e S _K (B) nos quatro grupos experimentais.....	36

Figura 16.	Análises comparativas do índice cístico renal global entre camundongos CI e CIF.....	37
Figura 17.	Análises comparativas da FEVE entre os quatro grupos experimentais CI, CIF, NC e NCF.....	39
Figura 18.	Análises comparativas da DIVEs/PC (A) e DIVEs/PC (B) entre os grupos CI, CIF, NC e NCF.....	40
Figura 19.	Análises comparativas de TRIVE entre os grupos CI, CIF, NC e NCF.....	40
Figura 20.	Análises comparativas da deformação miocárdica entre os quatro grupos experimentais CI, CIF, NC e NCF.....	42
Figura 21.	Análises comparativas da pressão arterial média (PAM) entre os quatro grupos experimentais CI, CIF, NC e NCF.....	43
Figura 22.	Análises comparativas da taxa de proliferação celular em epitélio renal tubular entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	44
Figura 23.	Análise comparativa da taxa de proliferação celular em epitélio cístico renal entre camundongos CI e CIF.....	45
Figura 24.	Análise comparativa do índice de fibrose renal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	45
Figura 25.	Análise comparativa do índice de fibrose cardíaca entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	46
Figura 26.	Análises comparativas da taxa de apoptose em epitélio renal tubular entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	47
Figura 27.	Análise comparativa da taxa de apoptose em epitélio cístico renal entre camundongos CI e CIF.....	47
Figura 28.	Análises comparativas da taxa de apoptose em tecido cardíaco entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	48
Figura 29.	Análise comparativa de TBARS (A) e GSH (B) em tecido renal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	49
Figura 30:	Análise da expressão dos genes em tecido renal A) <i>Il1b</i> e B) <i>Tgfb1</i> nos quatro grupos experimentais CI, CIF, NC e NCF.....	50

Tabela 1.	Teores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono na fumaça de cigarros da marca Derby.....	22
Tabela 2.	Peso corporal, razão peso renal/peso corporal, razão peso do coração/peso corporal e razão peso do fígado/peso corporal em camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	35
Tabela 3.	Concentração sérica de ureia, fração de excreção de Na^+ , fração de excreção de K^+ , concentração sérica de Na^+ e concentração sérica de K^+ em animais CI, CIF, NC e NCF.....	37
Tabela 4.	Parâmetros ecocardiográficos em animais CI, CIF, NC e NCF.....	41
Tabela 5.	Parâmetros de deformação cardíaca em camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	43
Tabela 6.	Níveis de GSH e TBARS em tecido renal de camundongos CI, CIF, NC e NCF.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AE	átrio esquerdo
Akt	<i>protein kinase B</i>
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
Cdk2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
CI	genótipo <i>Pkd1</i> ^{flox/flox} : <i>Nestin</i> ^{cre}
CIF	genótipo <i>Pkd1</i> ^{flox/flox} : <i>Nestin</i> ^{cre} exposto ao tabagismo
CRISP	<i>Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease</i>
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPVE	diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo
DRC	doença renal crônica
DREF	doença renal em estágio final
DRP	doença renal policística
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante tipo 1
DRPAD2	doença renal policística autossômica dominante tipo 2
DRPAR	doença renal policística autossômica recessiva
DSIV	diâmetro do septo interventricular
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio

LISTA DE ABREVIATURAS

FC	frequência cardíaca
FE _{Na}	fração de excreção de sódio
FE _K	fração de excreção de potássio
FEnVE	fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
Flp	<i>flippase</i>
<i>Floxed</i>	<i>flanked by loxP</i>
FRT	<i>flippase recognition target</i>
GANAB	<i>glucosidase II α subunit</i>
<i>Gapdh</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GMPC	guanosina monofosfato cíclico
GPS	<i>G protein-coupled receptor proteolytic site</i>
GSH	glutathiona
HAS	hipertensão arterial sistêmica
iECA	inibidores da enzima conversora da angiotensina
<i>Il1b</i>	interleucina-1 beta
IR	isquemia/reperfusão
IPM	índice de performance miocárdica
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MDA	malondialdeído
MDCK	<i>madin-Darby canine kidney</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MVE	massa do ventrículo esquerdo
NC	genótipo <i>Pkd1</i> ^{flox/flox}

LISTA DE ABREVIATURAS

NCF	genótipo <i>Pkd1</i> ^{flox/flox} exposto ao tabagismo
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	peso corporal
PC1	policistina-1
PC2	policistina-2
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>PKD1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>PKD2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
<i>PKHD1</i>	<i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
PMAP	pressão média da artéria pulmonar
REJ	<i>receptor for egg jelly</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
S'	pico da velocidade da onda S' medida ao nível septal basal
S _{Cr}	concentração sérica de creatinina
SDS	dodecil sulfato de sódio
S _K	concentração sérica de potássio
S _{Na}	concentração sérica de sódio
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
SSA	ácido 5-sulfosalicílico dihidratado
S _U	concentração sérica de uréia

LISTA DE ABREVIATURAS

TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBST	<i>tris-buffered saline</i> acrescida de <i>tween</i> 0,1%
TCIV	tempo de contração isovolumétrica
TD	tempo de desaceleração da onda E mitral
TFG	taxa de filtração glomerular
<i>Tgfb1</i>	<i>transforming growth factor-1</i>
T-PER	<i>Tissue Protein Extraction Reagent</i>
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
TRIV	tempo de relaxamento isovolumétrico
TRS	terapia renal substitutiva
U _{Cr}	concentração urinária de creatinina
U _K	concentração urinária de potássio
U _{Na}	concentração urinária de sódio
VRT	volume renal total
VTI _{VSVD}	integral velocidade-tempo do fluxo sistólico total em via de saída de ventrículo direito

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
Ca^{2+}	cálcio
cm	centímetros
p	coeficiente de significância estatística
π	constante matemática PI (3,14159265)
g	força g
g	gramas
°C	graus Celsius
OH^-	hidroxila
h	hora
=	igual
L	litro
L/min	litros/minutos
> e <	maior e menor
$\geq$ e $\leq$	maior ou igual e menor ou igual
$\pm$	mais ou menos
mHz	megahertz
μg	micrograma
$\mu\text{g/g}$	micrograma/grama
μL	microlitros
$\mu\text{L/mL}$	microlitro/mililitro
μm	micrometro
mEq/L	miliequivalente/litro
mg	miligrama
mg/dL	miligrama/decilitro
mg/g	miligrama/grama
mg/ μL	miligrama/microlitros
mL	mililitros
mg/mL	miligrama/mililitro
mL/min	mililitros/minutos
mm	milímetro
mmHg	milímetros de mercúrio
mM	milimolar
mmol	milimolar
mmol/mg	milimol por miligrama
min	minutos

LISTA DE SÍMBOLOS

ms	milisegundo
ms/mmHg	milisegundo/milímetros de mercúrio
M	molar
CO	monóxido de carbono
nm	nanômetro
n	número de uma amostra
NO	óxido nítrico
O ₂	oxigênio
pb	pares de base
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
%	porcentagem
K ⁺	potássio
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	segundo
Na ⁺	sódio
O ₂ -	superóxido
UA	unidades arbitrárias
UI/mL	unidade internacional/mililitro
x	vezes

RESUMO

Sousa MV. *Efeitos do tabagismo sobre os fenótipos renal e cardíaco em camundongos císticos por inativação do gene Pkd1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma das doenças hereditárias humanas mais comuns, apresentando uma prevalência de 1:543 a 1:4000 em diferentes populações. Esta enfermidade é essencialmente causada por mutação em um de dois genes: *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) ou *PKD2*. A maior parte dos casos decorre de mutações em *PKD1*. O tabagismo foi associado independentemente com progressão da doença renal na DRPAD. Em um estudo recente, contudo, tabagismo não influenciou a sobrevida renal nesta doença. Vários estudos também revelam que a deficiência em *PKD1/Pkd1* ou *PKD2/Pkd2* se associam a disfunção cardíaca. Para analisar os efeitos potenciais da exposição crônica ao tabagismo sobre os fenótipos renal e cardíaco associados à DRPAD, utilizamos como modelo experimental um animal cístico ortólogo fenotipicamente semelhante à DRPAD humana, o camundongo *Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}*. Animais machos foram expostos ao tabagismo da concepção até a idade de 18 semanas. Os níveis séricos de ureia foram mais elevados em camundongos *Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}* fumantes (CIF) que em *Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}* não fumantes (CI) e em animais *Pkd1^{flox/flox}* fumantes (NCF) que em *Pkd1^{flox/flox}* não fumantes (NC). O índice cístico renal foi maior nos animais CIF que CI. A taxa de proliferação de células de revestimento cístico, mas não de apoptose, mostrou-se aumentada em camundongos CIF comparados a CI. As taxas de proliferação e apoptose de células tubulares renais foram mais altas nos rins CI que NC e nos rins CIF que NCF. Observamos, ainda, tais taxas mais elevadas em NCF que NC. Camundongos CIF desenvolveram maior índice de fibrose renal que CI. O mesmo efeito do tabagismo foi detectado em camundongos NCF, porém sua intensidade foi muito menor. As expressões renais de *Il1b* e *Tgfb1* não diferiram significativamente entre os grupos. Os níveis renais de glutatona foram mais baixos em camundongos CIF que CI e em animais NCF que NC. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi reduzida em camundongos CIF e CI em comparação a NC, mas não foi detectada diferença entre CIF e CI. Parâmetros cardíacos estruturais também se mostraram alterados em animais CIF comparados a CI e NCF. Interessantemente, *strain* circunferencial e a taxa de *strain* circunferencial foram menores em camundongos CIF que CI e NCF. A pressão arterial média foi mais baixa em animais CIF que CI hipertensos, atingindo níveis que não diferiram de NC e NCF. A taxa de apoptose em tecido cardíaco foi maior em animais CI que NC, mas não diferiu entre CIF e CI nem entre NCF e NC. A

RESUMO

taxa de fibrose cardíaca foi mais elevada em camundongos CIF e CI que NC e NCF. Os grupos não diferiram quanto à sobrevida em 18 semanas, mas o peso corporal foi menor em animais CIF que CI em 16 semanas. Nossos achados indicam que a exposição crônica ao tabagismo desde a concepção agravou os fenótipos renal e cardíaco de camundongos císticos deficientes em *Pkd1*. Dadas as similaridades entre a DRPAD humana e o modelo animal ortólogo estudado, os efeitos deletérios do tabagismo observados devem provavelmente se aplicar a pacientes com DRPAD.

Descritores: rim policístico autossômico dominante; tabagismo; fibrose; proliferação celular; estresse oxidativo; ecocardiografia.

SUMMARY

Sousa MV. *Effects of smoking on renal and cardiac phenotypes in cystic mice due to inactivation of the Pkd1 gene* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most common human inherited diseases, with a prevalence of 1:543 to 1:4000 in different populations. This disease is essentially caused by mutation in one of two genes: *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) or *PKD2*. Most cases result from mutations in *PKD1*. Smoking has been independently associated with renal disease progression in ADPKD. In a recent study, however, smoking did not influence renal survival in this disease. Several studies also revealed that *PKD1/Pkd1* or *PKD2/Pkd2* deficiency are associated with cardiac dysfunction. To analyze the potential effects of chronic exposure to smoking on renal and cardiac phenotypes associated with ADPKD, we used an orthologous cystic animal phenotypically similar to human ADPKD as experimental model, the *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} mouse. Male animals were exposed to smoking from conception to the age of 18 weeks. Serum urea nitrogen was higher in *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} submitted to smoking (CYS) than in *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} not submitted to smoking (CY) and in *Pkd1*^{flox/flox} submitted to smoking (NCS) than in *Pkd1*^{flox/flox} not submitted to smoking (NC). Renal cystic index was higher in CY mice than CY. Proliferation rate of cyst-lining cells, but not apoptotic rate, was increased in CY mice compared to CY. The proliferation and apoptotic rates of renal tubular cells were higher in CY kidneys than NC and in CY kidneys than NCS. We also observed increase in such rates in NCS compared to NC. CY mice developed a higher renal fibrosis index than CY animals. Although the same effect of smoking was detected in NCS mice, its intensity was much lower than in cystic animals. Renal expression of *Il1b* e *Tgfb1* did not significantly differ among the groups. Renal levels of glutathione were lower in CY mice than CY and in NCS animals than NC. Left ventricular ejection fraction was reduced in CY and CY mice compared to NC, but no difference was detected between CY and CY. Cardiac structural parameters were also altered in CY animals in comparison to CY and NCS. Interestingly, circumferential strain and circumferential strain rate were lower in the CY mice than CY and NCS. MAP was lower in CY animals than in the hypertensive CY mice, reaching normotensive levels that did not differ from NC and NCS. The apoptotic rate in cardiac tissue was higher in CY animals than NC, but did not differ between CY and CY and between NCS and NC. The rate of cardiac fibrosis was also higher in CY and CY mice than in NC and NCS. Survival at 18 weeks did not differ among the groups but body weight

SUMMARY

was lower in CYS animals than CY at 16 weeks of age. Our findings show that chronic exposure to smoking since conception aggravated the renal and cardiac phenotypes of *Pkd1*-deficient cystic mice. Given the similarities between human ADPKD and the studied orthologous animal model, the observed deleterious effects of smoking are likely to apply to ADPKD patients.

Descriptors: polycystic kidney autosomal dominant; tobacco use disorder; fibrosis; cell proliferation; oxidative stress; echocardiography.

Introdução

INTRODUÇÃO

Doença Renal Policística Autossômica Dominante: Epidemiologia e Manifestações Clínicas

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma das enfermidades monogênicas mais comuns, com uma prevalência que varia de 1:543 a 1:4000 entre diferentes populações ¹. Seu fenótipo renal caracteriza-se pelo desenvolvimento bilateral de múltiplos cistos, levando a uma distorção progressiva da morfologia do órgão. Os cistos podem se originar de qualquer segmento tubular do néfron, porém os derivados dos ductos coletores tendem a serem maiores e mais numerosos ². A doença evolui por muitos anos com aumento progressivo do volume dos rins associado a uma função renal estável ou lentamente declinante; segue-se, então, uma fase de declínio significativo da taxa de filtração glomerular (TFG). Vale destacar que apenas cerca de 50% dos pacientes atingem os 58 anos de idade sem progredir para doença renal em estágio final (DREF) ^{3,4}.

Esta doença é responsável por 5% a 10% dos pacientes que evoluem para DREF, representando sua principal manifestação clínica ¹. Um estudo nacional mostrou que esta desordem é a causa da doença renal em 7,5% dos pacientes em hemodiálise no sul do Brasil ⁵. Outro estudo, conduzido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, revelou que 8,4% dos pacientes em terapia renal substitutiva (TRS) eram acometidos por DRPAD ⁶. Nesse cenário, e consideradas as diferentes glomerulopatias independentemente, a DRPAD constitui a terceira causa mais frequente de DREF.

As complicações renais mais comuns da DRPAD compreendem déficit de concentração urinária, dor em flanco, lombar ou abdominal, hemorragia intracística ou hematúria, infecção de trato urinário e nefrolitíase ⁷⁻⁹. A doença, contudo, é sistêmica, associando-se também a manifestações extra-renais. Entre estas, destacam-se o desenvolvimento de cistos hepáticos e pancreáticos, aneurismas intracranianos e anormalidades valvares cardíacas ¹⁰. A hipertensão arterial sistêmica (HAS), por sua vez, constitui-se em uma das complicações mais relevantes da DRPAD, atingindo aproximadamente 60% dos pacientes antes de uma perda significativa de função renal ¹¹. Vale notar que a mesma é detectada nesta enfermidade cerca 10 anos antes que na população geral e que eventos cardiovasculares consistem na causa mais frequente de morte nessa moléstia ^{12,13}.

Os Genes *PKD1* e *PKD2*, Seus Produtos e Vias de Sinalização Envolvidas na DRPAD

A DRPAD é geneticamente heterogênea, sendo causada por mutação no gene *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) em 64-85% dos casos ou em *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*) em 15-36% dos pacientes. *PKD1* se localiza na região cromossômica 16p13.3 e codifica a proteína policistina-1 (PC1), enquanto *PKD2* mapeia em 4q21 e codifica policistina-2 (PC2). A doença decorrente de mutações no gene *PKD1* denomina-se DRPAD tipo 1, enquanto a forma associada a mutações em *PKD2* é chamada DRPAD tipo 2 ¹⁴⁻¹⁶. É importante mencionar, no entanto, que um estudo bastante recente identificou mutações no gene *GANAB* em sete famílias com DRPAD, para as quais mutações em *PKD1* e *PKD2* não haviam sido identificadas. Este gene localiza-se em 11q12.3 e codifica a subunidade α da glicosidase II ¹⁷. Mutações em *PKD1* associam-se a um fenótipo e prognóstico mais severos que variantes patogênicas em *PKD2*; mutações em *PKD1* que determinam truncamento da proteína, por sua vez, associam-se a uma menor idade de início de DREF que mutações nesse locus que não causam truncamento ¹⁸.

PC1 constitui-se em uma glicoproteína integral de membrana de 4.303 aminoácidos (aa). Tal proteína apresenta uma porção extracelular N-terminal com mais de 3.000 aa, 11 domínios transmembrânicos e uma cauda C-terminal intracitosólica curta ^{19, 20}. Seus domínios extracelulares, frequentemente envolvidos em interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato, incluem motivos de intensa repercussão morfo-funcional, tais como domínios ricos em leucina, domínios PKD semelhantes a sequências encontradas em imunoglobulinas e o domínio REJ (*receptor for egg jelly*). Além disso, PC1 pode sofrer clivagem no sítio GPS (*G-protein-coupled receptor cleavage site*), localizado em sua porção extracelular, processo associado a importantes consequências estruturais e funcionais sobre o néfron distal ²¹. PC2 também se constitui em uma glicoproteína integral de membrana, neste caso com 968 aa. Esta molécula contém seis domínios transmembrânicos e ambas as terminações intracitosólicas ²². A porção C-terminal da PC1 apresenta vários sítios de fosforilação e um domínio helicoidal essencial para sua interação física com a porção C-terminal da PC2 ²³. Esta proteína constitui um canal de cátions não seletivo permeável a Ca^{2+} , enquanto admite-se que PC1 funcione como um receptor de membrana plasmática, capaz de modular a atividade da PC2. Além disso, PC1 interage com o citoesqueleto e desempenha funções consistentes com as de uma molécula de adesão ^{24, 25}. Esta propriedade é fundamental para entender seu papel nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrativo do complexo PC1 e PC2, os produtos de *PKD1* e *PKD2*, e representação de seus domínios fundamentais. NTF: porção N-terminal da PC1; MP: membrana plasmática e CTF: porção C-terminal da PC1

A patogênese de muitas doenças renais císticas, incluindo a DRPAD e a doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR), se associa a anormalidades do cílio apical primário. O complexo PC1/PC2 e a poliductina/fibrocistina - produto do gene *PKHD1* (*polycystic kidney and hepatic disease 1*), mutado na DRPAR - localizam-se no cílio apical primário de células tubulares/ductais renais. Essas proteínas são necessárias para a indução de transientes de Ca^{2+} em resposta ao curvamento ciliar determinado pelo fluxo de fluido tubular. Sabemos que PC1 interage com o receptor de inositol 1,4,5-trifosfato^{26, 27} e que PC2 interage com outras proteínas que atuam como canais de Ca^{2+} ^{28, 29}. Não conhecemos com precisão, todavia, como a homeostase intracelular de Ca^{2+} é modificada na DRPAD, visto que diferentes situações experimentais originaram resultados inconsistentes³⁰. A maioria desses estudos revelou, no entanto, níveis diminuídos de Ca^{2+} intracelular basal em células e tecidos com doença renal policística (DRP) de modelos animais e pacientes. Essa redução do nível de Ca^{2+} citosólico se associa a aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) em tecidos císticos³¹. Diferentes hipóteses podem explicar esse aumento, 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 guanosina monofosfato cíclico (GMPc)^{32, 33}. É importante atentar, por fim, que AMPC exerce efeitos opostos

INTRODUÇÃO

em células renais humanas corticais e células DRP. Enquanto nas células de rim normal AMPc inibe proliferação, o mesmo estimula vias pró-proliferativas em células DRPAD, induzindo uma resposta hiperproliferativa anormal ³¹.

PC1 também pode funcionar como um receptor de superfície celular acoplado a proteína G, regulando proliferação, diferenciação celular, apoptose e secreção de fluido. Sua ativação pode ativar JAK2 (*Janus kinase 2*), induzindo a fosforilação e a formação de homodímeros STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*). Esses dímeros translocam-se ao núcleo e se ligam ao promotor do gene *p21*, promovendo sua supra-regulação, inibição da atividade de Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*) e parada celular em G0/G1 ³⁴. PC1 pode ainda ativar Akt dependente de fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3 quinase) ³⁴ e sua cauda C-terminal pode interagir com tuberina, o produto do gene *TSC2* (*Tuberous Sclerosis 2*), modulando a atividade de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ³⁵. Atado à membrana, o domínio C-terminal da PC1 protege a tuberina de fosforilação mediada por Akt no resíduo S939, mantendo-a na membrana e permitindo que iniba a via mTOR ³⁶. Estudos recentes reportam, ainda, que este domínio citosólico C-terminal de PC1 é clivado e migra para o núcleo, onde se propõe que influencie a transcrição gênica ³⁷. Agindo de forma independente, tal domínio desencadeia vias exclusivas de sinalização envolvida na morfogênese tubular ³⁸.

Bases Genético-Moleculares da Cistogênese na DRPAD

Em um estudo clássico publicado em 1996, Qian *et al* propuseram um modelo knudsoniano de dois eventos para o mecanismo de formação focal de cistos renais na DRPAD. De acordo com esse modelo, todas as células tubulares renais de um paciente com essa doença apresentam um dos alelos *PKD1* ou *PKD2* com a mutação germinativa, a qual constitui o primeiro evento. Uma mutação somática no alelo previamente normal, por sua vez, que ocorre em algum momento da vida e é particular à célula acometida, representa o segundo evento ³⁹. Dessa forma, embora a DRPAD apresente transmissão genética dominante, no nível celular e molecular o mecanismo de cistogênese é recessivo, requerendo inativação ou intensa redução da atividade de ambos os alelos.

O modelo de dois eventos foi aprimorado nos últimos anos. Em 2007, Piontek *et al* mostraram que a inativação de *Pkd1* em camundongos antes do 13º dia de vida pós-natal resultou em doença renal cística grave em três semanas, enquanto sua inativação induzida após essa fase seguiu-se de desenvolvimento cístico bem mais tardio ⁴⁰. Um estudo posterior revelou que a inativação de *Pkd1* não foi suficiente para a indução de cistogênese no rim maduro ⁴¹. Um terceiro

estudo, por fim, demonstrou que a inativação de ambas as cópias de *Pkd1* não foi capaz de determinar cistogênese renal rápida e ampla em camundongos adultos, traduzindo-se apenas em formação focal de cistos ⁴². Essas observações sugeriram que o desenvolvimento significativo de cistos requiera um terceiro evento em rim maduro e apoiaram que o fenótipo renal cístico dependesse da idade em que *Pkd1* é inativado. Esse conceito foi demonstrado por Takakura *et al*, por meio da indução de isquemia/reperfusão (IR) renal unilateral em camundongos submetidos à inativação tardia de ambas as cópias de *Pkd1* ⁴³. O rim submetido ao insulto desenvolveu cistogênese rápida e ampla, enquanto o rim contralateral não apresentou esse fenótipo. Nosso grupo de pesquisa estendeu esse conceito, mostrando que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* desenvolveram microcistos renais seis semanas após IR ⁸. Este trabalho revelou, ainda, que tais animais cursaram com fibrose renal aumentada após o insulto, quando comparados a seus controles selvagens.

Fatores Contribuintes à Progressão da Doença Renal Associada à DRPAD

É importante realçar que outros fatores também são determinantes no curso da doença renal cística da DRPAD. Em 1997, Merta *et al* demonstraram que pacientes com DRPAD apresentam o sistema pró-inflamatório mais ativado e o sistema anti-inflamatório menos ativo que seu grupo controle ⁴⁴. Interessantemente, Zheng *et al* mostraram que a excreção urinária de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) encontra-se aumentada na maior parte dos pacientes com DRPAD, podendo essa elevação ocorrer mesmo antes de um declínio significativo da função renal ⁴⁵.

Um estudo experimental revelou que camundongos DBA/2-*pcy*, um modelo de DRP não ortólogo à enfermidade humana, progrediram para fibrose renal progressiva ⁴⁶. No mesmo sentido, resultados adicionais indicam que quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento derivados do cisto resultam em progressão para fibrose renal na DRPAD ⁴⁷. Por fim, o perfil de expressão gênica em cistos de rins com DRPAD tipo 1 inclui respostas imunes/inflamatórias e transição epitélio-mesenquimal ⁴⁸.

Anormalidades no metabolismo redox também podem participar da patogênese e afetar a evolução da DRPAD ⁴⁹. O estado de desbalanço do sistema redox caracteriza-se por uma produção de agentes oxidantes que ultrapassa a capacidade antioxidante, condição denominada estresse oxidativo. As principais consequências da geração elevada de espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem apoptose ⁵⁰, indução de inflamação ⁵¹, peroxidação lipídica e dano do DNA ⁵². Vale notar que a relação oxidantes/antioxidantes impacta o perfil de expressão gênica ^{53, 54}. É importante

mencionar que as concentrações de glutathiona peroxidase e superóxido dismutase encontram-se reduzidas em pacientes com DRPAD ^{55, 56}. Em apoio a este conceito, observaram-se níveis plasmáticos e renais de glutathiona peroxidase reduzidos em ratos Han: SPRD e camundongos cpk, modelos não ortólogos à DRPAD, enquanto os produtos de peroxidação lipídica malondialdeído e 4-OH- 2(E)-nonenal apresentaram níveis aumentados ⁵⁷.

Policistinas e Fenótipo Cardiovascular

PC1 e PC2 são fundamentais para o desenvolvimento do coração ^{58, 59}. É importante destacar que camundongos homozigotos *knockout* para *Pkd1* e *Pkd2* apresentam letalidade embrionária associada a defeitos cardíacos graves ⁶⁰⁻⁶². No cenário clínico, após o acesso dialítico amplo à população, a doença cardiovascular passou a se responsabilizar pela maior parte dos óbitos de pacientes com DRPAD ^{11, 63}. Além disso, como vimos, o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica é precoce nesta doença e se correlaciona fortemente com o desenvolvimento de hipertrofia do ventrículo esquerdo na DRPAD ⁶⁴⁻⁶⁶. Estudos mais recentes, entretanto, mostram que pacientes DRPAD normotensos também podem apresentar maior índice de massa do ventrículo esquerdo, assim como disfunção diastólica biventricular ¹³ e cardiomiopatia dilatada idiopática ⁶⁷. Esses estudos sugerem que deficiência de PC1 e/ou PC2 podem cumprir papel primário na disfunção cardíaca associada à DRPAD. Nesse sentido, um importante estudo conduzido em nosso laboratório mostrou que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}), animais não císticos e normotensos, apresentaram disfunção sistólica caracterizada por diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e redução na deformidade cardíaca. Camundongos císticos e hipertensos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}, por sua vez, além de apresentarem disfunção sistólica também cursaram com alterações diastólicas ⁶⁸. Análise de tecido cardíaco de animais *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} apresentaram, ainda, índices de apoptose aumentados e fibrose discreta.

A relevância do fenótipo cardiovascular na DRPAD não surpreende, na medida em que as policistinas se expressam em tecido cardíaco ⁶⁹. À semelhança do que acontece nas células renais, alterações de cálcio também podem contribuir para a gênese das alterações cardiovasculares presentes na DRPAD. Pedrozo *et al* demonstraram, tanto *in vitro* quanto *in vivo* que PC1 é necessária para o desenvolvimento de hipertrofia induzida por estiramento e hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão. Interessantemente, PC1 atua na estabilização do canal de cálcio do tipo L, permitindo o desenvolvimento de hipertrofia induzida por cálcio ⁷⁰. Outro estudo, conduzido em *zebrafish*, mostrou que animais mutantes apresentaram menor débito cardíaco e bloqueio atrioventricular. Vale notar que o coração desses animais mostrou alterações na ciclagem de cálcio

INTRODUÇÃO

intracelular ⁶⁷. Um estudo subsequente revelou também que camundongos *Pkd2*^{+/-} apresentam um acoplamento excitação-contração dessensibilizado e contratilidade aumentada em resposta a estímulo adrenérgico ⁷¹. Por fim, Kuo et al mostraram que camundongos *Pkd2*^{+/-} de nove meses de idade apresentaram paredes ventriculares esquerdas mais finas, consistentes com cardiomiopatia dilatada, e fração de ejeção do ventrículo esquerdo diminuída ⁷².

Efeitos Adversos do Tabagismo

O tabaco constitui-se na principal causa de morte evitável na maior parte dos países. A fumaça do cigarro compreende mais de 4.700 substâncias, particuladas ou gasosas, incluindo irritantes e tóxicos sistêmicos, como cianeto de hidrogênio, dióxido sulfúrico, monóxido de carbono, amônia e formaldeído. Entre esses componentes, destacam-se aproximadamente 70 compostos cancerígenos. A grande maioria destes pertence a três grupos: a) hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas e nitrosaminas; b) agentes mutagênicos, como arsênico, cromo, nitrosamidas e benzopireno; e c) substâncias químicas tóxicas capazes de afetar a reprodução humana, como nicotina, cádmio e monóxido de carbono ⁷³. Vale mencionar que os efeitos adversos do tabagismo podem se associar não apenas ao hábito ativo, mas também à exposição regular passiva.

No longo prazo, o uso do tabaco leva a danos e estresse oxidativo em células endoteliais ⁷⁴. A superprodução de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, tais como superóxido (O₂), peroxinitrito (ONOO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e hidroxila (OH), por sua vez, pode induzir morte celular por necrose ou apoptose, através da interação destas espécies com lipídios, proteínas e DNA ⁷⁵.

Efeitos Renais do Tabagismo

O tabagismo eleva o risco de câncer e doenças cardiovasculares ⁷⁶, além de ter um efeito adverso sobre a função renal e se constituir em fator de risco para progressão de doenças renais ⁷⁷.

Estudos realizados nos últimos anos comprovaram o efeito negativo do tabagismo sobre a função renal em humanos. O tabagismo aumenta a concentração urinária de albumina e/ou proteínas ⁷⁸, efeito dependente da intensidade da exposição, assim como o risco de pacientes com doença renal crônica (DRC) evoluírem para DREF ⁷⁹. É importante atentar que sua nefrotoxicidade

INTRODUÇÃO

é maior em indivíduos idosos e que o sexo masculino parece ser mais suscetível a seus efeitos lesivos ⁷⁹. Outro aspecto importante da toxicidade do tabaco é que órgãos sem contato direto com a fumaça desenvolvem aumento da parede das arteríolas em resposta ao tabagismo, resposta que inclui os rins ^{80, 81}. De fato, o tabaco aumenta a pressão arterial (PA) e induz lesão renal, associando-se à exacerbação do sistema nervoso simpático e aumento da resistência vascular renal, efeitos que causam diminuição da TFG e do fluxo plasmático renal ^{79, 82, 83}. Por fim, em pacientes transplantados renais, o tabagismo se associa a um risco aumentado de deterioração da função do enxerto ⁸⁴.

Vale notar que o tabaco promove progressão de todas as fases da nefropatia diabética, incluindo diabetes tipo 1 e 2, favorecendo o desenvolvimento de microalbuminúria e acelerando a transição de microalbuminúria para macroalbuminúria ⁸⁰. Tabagistas são expostos a quantidades significativas de cádmio e chumbo, tóxicos que se acumulam preferencialmente em tecido renal ^{85, 86}. Além disso, o tabaco interage com fármacos anti-hipertensivos e, em indivíduos saudáveis, o tabagismo reduz o efeito anti-hipertensivo dos β bloqueadores. ⁸⁷ (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática dos efeitos do tabagismo.

Efeitos Cardiacos do Tabagismo

O tabagismo também se associa a aumento do risco de doença cardiovascular em pacientes com DRC e de calcificação arterial em pacientes com DREF⁸⁸.

Entre os malefícios de fumar, as alterações cardiovasculares ocupam lugar de destaque. O tabagismo é um importante fator de risco independente para doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular e doença cardiovascular aterosclerótica total⁸⁹. Além disso, a incidência de um infarto do miocárdio é multiplicada por seis em fumantes do sexo feminino e três vezes em homens que fumam pelo menos 20 cigarros por dia, comparados a indivíduos não fumantes⁹⁰. A exposição à fumaça do tabaco aumenta todas as causas de morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com disfunção ventricular esquerda⁹¹. Vale notar que análises ecocardiográficas em ratos submetidos à exposição da fumaça do cigarro por 30 dias mostrou aumento do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, diminuição da fração de encurtamento sistólica e diminuição da FEVE⁹².

Efeitos do Tabagismo sobre a DRPAD

Há alguns anos, Orth *et al* mostraram que o tabagismo favorece a evolução para DREF em indivíduos do sexo masculino com DRPAD⁹³. Pacientes tabagistas não tratados com inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) apresentaram maior predisposição a cursar para DREF, enquanto tabagistas tratados com esses fármacos não apresentaram tal predisposição.

Em um estudo recente, Ozkok *et al* observaram que 93 pacientes com DRPAD progressores rápidos e 78 pacientes eram progressores lentos e, estes grupos foram definidos de acordo com as taxas médias de declínio TFG por ano, sendo 1 ml/min/ano. Pacientes progressores rápidos foram mais propensos a terem uma história de tabagismo do que os progressores lentos, também foi significativamente maior o número de maços por anos fumado, indicando que o tabagismo pode acelerar a progressão da DREF⁹⁴. No entanto, um estudo recente revelou que o tabagismo não influencia sobrevida renal⁹⁵.

Bases e Hipóteses que Ancoraram a Construção deste Estudo

Como vimos, estudos anteriores revelaram efeitos negativos do tabagismo sobre a função renal e o risco de progressão da DRC, colocando o tabaco entre os fatores de risco relevantes ao curso das nefropatias. Vale notar que uma ação deletéria também foi observada em determinados

pacientes com DRPAD. Essa observação traz um importante questionamento: dada a natureza dos efeitos adversos dos componentes do tabaco e as propriedades moleculares e celulares da policistina-1, não sabemos se parte considerável dos efeitos do tabagismo sobre a DRPAD é específica a esta enfermidade, em adição aos efeitos comuns do tabagismo sobre as nefropatias em geral. Essas ações específicas poderiam incluir favorecimento ao crescimento cístico, cystogênese, fibrose renal e/ou disfunções hemodinâmicas. No momento não se sabe se ambas ações, comuns às nefropatias e específicas à DRPAD, ou apenas um desses conjuntos de efeitos, se aplicam à influência do tabagismo sobre a progressão da doença renal na DRPAD. Nosso estudo aborda robustamente essa questão.

As propriedades celulares da PC1 compreendem efeitos de modulação/redução da proliferação celular e da apoptose, além de indução de diferenciação celular. Tais ações foram bem documentadas em células MDCK (*Madin-Derby Canine Kidney*)⁹⁶. De fato, a transfecção de tais células com *PKD1* determinou redução da taxa de proliferação e de apoptose em cultura de gel tridimensional, e promoveu tubulogênese espontânea, efeito não observado nas células controle. Vale notar, ainda, que a ação de PC1 via proteína G é potencialmente capaz de regular proliferação e diferenciação celular, apoptose e secreção de fluido^{97, 98}. Por outro lado, vários estudos demonstram o papel da inflamação renal e sua evolução para fibrose na progressão da doença renal associada à DRPAD⁴⁶. Achados sólidos documentam, também, a ação deletéria do estresse oxidativo para o fenótipo renal^{49, 50}. Anormalidades do estresse oxidativo parecem participar do processo inflamatório associado à DRPAD, contribuindo para tal efeito negativo⁴⁹. Vale destacar que um estudo anterior mostrou que EROs inibiram a atividade de canal PC2 em sinciciotrofoblasto humano⁹⁹.

Substâncias presentes na fumaça do cigarro, por outro lado, apresentam efeitos potencialmente mutagênicos⁷³, pró-proliferativos, inflamatórios, indutores de desbalanço redox¹⁰⁰, pró e anti-apoptóticos^{101, 102} e hemodinâmicos renais adversos⁷⁹. Um dos componentes tóxicos mais conhecidos da fumaça do tabaco é a nicotina. Ela se associa indiretamente a processos oncogênicos, atuando como mediador de nitrosação e favorecendo, assim, a produção de nitrosaminas específicas. É importante atentar para o fato da nicotina propiciar a proliferação de células cancerosas e ser eliminada na urina, o que amplia seu potencial de ação adversa renal. Estudos evidenciam que a nicotina presente no tabaco consiste na principal relação entre gravidez e disfunções cardio-respiratórias, uma vez que atravessa a placenta¹⁰³, e que pode estimular a proliferação de células não neuronais de tecido nervoso¹⁰⁴. A nicotina também favorece a proliferação de células musculares lisas da aorta, células epiteliais brônquicas e células cancerosas de pulmão, via receptor nicotínico^{101, 105}. West *et al* mostraram, em cultura de células de vias

INTRODUÇÃO

respiratórias normais e tumorais, a ativação de Akt pela nicotina ¹⁰⁶. Um estudo que avaliou camundongos expostos ao tabagismo do nascimento a 120 dias de vida revelou que quanto mais cedo os animais são expostos ao tabaco mais potente é seu efeito ¹⁰⁷. Outro estudo sugeriu elevação de citocinas pró-inflamatórias e redução dos níveis pulmonares de glutathione em camundongos C57BL/6J expostos ao tabagismo ¹⁰⁰. Os efeitos hemodinâmicos renais do tabagismo, por fim, são potencialmente capazes de limitar a perfusão renal e induzir áreas específicas de isquemia no órgão ¹⁰⁸.

Para investigar a natureza dos efeitos adversos renais do tabagismo sobre a progressão da doença renal associada à DRPAD, utilizamos um modelo de camundongo cístico ortólogo à DRPAD tipo 1, que reproduz fenotipicamente a doença humana: o camundongo *Pkd1*^{flox/flox};*Nestin*^{cre}. Para abordar a questão central deste projeto, esses animais e seus respectivos controles foram expostos a uma câmara de fumo desde sua concepção, e submetidos a análises funcionais, morfológicas, moleculares e celulares renais voltadas às particularidades descritas da patogênese da DRPAD. Enquanto a inativação ou intensa redução da atividade funcional de ambos os alelos *PKD1/Pkd1* é suficiente para determinar cistogênese no rim em desenvolvimento, no rim maduro a cistogênese rápida e ampla requer, além da inativação/redução da atividade de ambos os alelos, um terceiro evento. O primeiro evento é representado, no paciente com DRPAD, pela mutação germinativa, enquanto o segundo evento é representado por uma mutação somática no alelo previamente normal, que ocorre em algum momento da vida. Quanto ao terceiro evento, até o momento se demonstrou que a lesão renal decorrente de isquemia/reperfusão pode se comportar como tal. Admite-se, nesse cenário, que no rim maduro a formação do cisto seja deflagrada pela reativação de programas de desenvolvimento renal e/ou aumento da proliferação renal decorrentes da lesão renal, em células previamente portadoras de ambos os alelos *PKD1/Pkd1* mutados. Tais alterações reproduziriam as condições existentes no rim em desenvolvimento, necessárias à cistogênese. Essa seria a razão, portanto, do rim em desenvolvimento não requerer um terceiro evento para cistogênese rápida e ampla, mas apenas a mutação germinativa e a mutação somática ocorrida em determinadas células. Como este projeto se dirigiu à “prova de princípio” de que o tabagismo pode acelerar a doença cística, trabalhamos com um modelo experimental bastante sensível a todas as ações potenciais de aceleração da doença cística por parte deste agente agressor. Nesse sentido, nosso modelo contempla: a) Ações potenciais de indução de mutações somáticas do tabagismo em células do rim em desenvolvimento onde o sistema Cre-lox - apesar dos sítios loxP estarem presentes em ambos os alelos - tenha inativado apenas uma cópia de *Pkd1*, o que já foi descrito para um percentual significativo de células usando-se outros promotores e outros genes alvo ^{109, 110}. Tal quantificação ainda não foi feita para o promotor de *Nestin*. Esta situação

INTRODUÇÃO

mimetizaria ações de indução do segundo evento, relevantes para a cistogênese no rim em desenvolvimento; b) Ações potenciais de indução de mutações somáticas do tabagismo em células do rim maduro onde o sistema Cre-lox tenha inativado apenas uma cópia de *Pkd1*. Essa situação também mimetizaria ações de indução do segundo evento em células pós-desenvolvimento renal, passíveis de evoluir para cistogênese na presença de um terceiro evento; tais ações são relevantes para a cistogênese no rim maduro; e c) Efeito potencial do tabagismo sobre o crescimento cístico, outro componente importante de aceleração da doença, potencialmente presente tanto no rim em desenvolvimento quanto no órgão pós-desenvolvimento.

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo Principal

O objetivo central desse estudo é analisar os efeitos do tabagismo sobre a progressão da doença renal e do fenótipo cardíaco associados à doença renal policística autossômica dominante, utilizando como modelo experimental o camundongo *Pkd1^{flox/flox}:Nestin^{cre}*, modelo cístico ortólogo à DRPAD tipo 1.

Objetivos Específicos

Nossas análises foram conduzidas em camundongos machos, de modo a evitar heterogeneidade experimental. Quatro grupos experimentais foram compostos da seguinte maneira: camundongos *Pkd1^{flox/flox}:Nestin^{cre}* (cístico; CI), *Pkd1^{flox/flox}:Nestin^{cre}* exposto ao tabagismo (cístico fumante; CIF), *Pkd1^{flox/flox}* (controle não cístico; NC), e *Pkd1^{flox/flox}* exposto ao tabagismo (não cístico fumante; NCF). Para responder à questão central acima mencionada, nossos objetivos específicos compreenderam:

1. Determinar e analisar a concentração sérica de ureia (S_U), as concentrações séricas de Na^+ (S_{Na}) e K^+ (S_K) e as frações de excreção de Na^+ e K^+ em todos os camundongos, na idade de 17 semanas.
2. Avaliar e analisar a evolução da doença cística renal por ultrassonografia de alta resolução nos dois grupos císticos, na idade de 16 semanas.
3. Avaliar e analisar a função cardíaca por ecocardiografia de alta resolução nos quatro grupos de animais, na idade de 16 semanas.
4. Determinar e analisar o peso corporal dos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais na idade de 16 e 18 semanas, assim como os pesos renais, cardíaco e hepático na idade de 18 semanas.
5. Quantificar e analisar a taxa de proliferação celular nos rins dos quatro grupos de camundongos e a taxa de apoptose nos rins e coração dos grupos experimentais mencionados, utilizando marcação para Ki-67 e caspase-3 ativa, na idade de 18 semanas.

OBJETIVOS

- 6.** Quantificar e analisar fibrose renal e cardíaca nos quatro grupos de animais por meio da técnica de picrosírius, na idade de 18 semanas.
- 7.** Analisar o perfil de resposta inflamatória renal nos grupos experimentais mencionados por meio de RT-PCR em tempo real para *Il1b* e *Tgfb1*.
- 8.** Determinar os níveis renais de glutathione total e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos quatro perfis de camundongos mencionados.
- 9.** Analisar a sobrevivência dos camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais.
- 10.** Mensurar a pressão arterial média (PAM) dos quatro perfis experimentais de animais na idade de 13 semanas.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Éticos e Eutanásia dos Camundongos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#098/2015), seguindo as normas nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais. A eutanásia dos camundongos foi realizada em estado de anestesia/inconsciência induzida pela administração intraperitoneal de tiopental na dose de 0,4 mg/g de peso corporal (PC).

Modelo Animal

Neste estudo utilizamos um modelo de camundongo geneticamente modificado, gerado no *background* C57BL/6 e baseado na construção de um alelo *floxed* (*flanked by loxP*) de *Pkd1*¹¹¹. Este alelo contém sítios loxP posicionados nos íntrons 1 e 4 de *Pkd1* e um cassete de neomicina flanqueado por sítios FRT (*flippase recognition target*) no íntron 1 (Figura 3). Os sítios loxP podem ser induzidos a recombinar via enzima Cre recombinase, de forma a excisar os éxons 2, 3 e 4 e produzir um novo alelo, *Pkd1*^{del2-4}, agora inativo. Em camundongos TgN(balancer2)3Cgn, a expressão de Cre recombinase é controlada pelo promotor do gene de rato nestina (*Nestin*), gerando animais que expressam a Cre recombinase de forma aleatória em parte das células do animal. A linhagem *Pkd1*^{flox} foi cruzada com a linhagem balancer Cre, de forma a inativar o alelo *floxed* em mosaico no rim e em outros órgãos e gerar animais com fenótipo cístico renal que se assemelha à doença humana (*Pkd1*^{flox/flox};*Nestin*^{cre}).

Os animais foram mantidos com acesso livre a água e comida, em gaiolas armazenadas em estante ventilada, com temperatura controlada a 22°C e 12 h de ciclo de luz.

Figura 3. Estratégia de construção do alelo *floxed Pkd1* ($Pkd1^{lox}$), utilizado para a geração dos camundongos císticos $Pkd1^{lox/lox};Nestin^{cre}$.

Genotipagem dos Camundongos

A geração de animais císticos e seus respectivos controles baseou-se no cruzamento de fêmeas $Pkd1^{lox/lox}$ com machos $Pkd1^{lox/lox};Nestin^{cre}$. Após o nascimento, os membros da prole foram submetidos a genotipagem, que se inicia com a extração de DNA genômico pelo método ‘salting out’ a partir de amostras/fragmentos de cauda. A genotipagem foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em um processo constituído por dois passos. No primeiro, identifica-se a presença ou ausência do gene que codifica a Cre recombinase, enquanto no segundo fazemos a confirmação de homozigose para o alelo $Pkd1^{lox}$. Na primeira reação utilizamos dois *primers* específicos para Cre recombinase: um *primer forward* (CreF, 5'-TTGCTGTCACTTGGTCGTGGC-3') e um *reverse* (CreR, 5'-GGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC-3'). A segunda reação envolveu a utilização dos *primers* F4 (5'-CCTGCCTTGCTCTACTTTCC-3') e R5 (5'-AGGGCTTTTCTTGCTGGTCT-3'). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR Safe DNA gel Stain (Life Technologies, Carlsbad, CA) e visualizados em fotodocumentador. Na primeira reação, a identificação de um produto de 200 pb indica a presença do gene que codifica a Cre recombinase, enquanto a ausência dessa banda indica que o animal não apresenta esse transgene (Figura 4A). Na segunda reação, o genótipo de interesse homozigoto para $Pkd1^{lox}$ foi identificado por meio da visualização de uma única banda de 250 pb (Figura 4B). Camundongos homozigotos para tal alelo e que expressam Cre recombinase, denominados $Pkd1^{lox/lox};Nestin^{cre}$, desenvolvem fenótipo cístico renal similar ao da DRPAD humana, enquanto animais que não expressam a Cre recombinase, $Pkd1^{lox/lox}$, não apresentam fenótipo alterado e foram utilizados

como controles.

Figura 4. Genotipagem dos camundongos para a presença ou ausência de Cre recombinase (A) e para a presença do alelo condicional *Pkd1*^{flox} (B). A) Os animais M1, M2 e M5 são positivos para o transgene da Cre recombinase, enquanto M3 e M4 são negativos. B) Os animais M1-M5 apresentam o genótipo *Pkd1*^{flox/flox}. CN: controle negativo; PM: marcador de tamanho de fragmentos de DNA (os intervalos entre as bandas são de 100 pb). Genótipos finais: M1, M2 e M5 - *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}; M3 e M4 - *Pkd1*^{flox/flox}.

Exposição ao Tabagismo

Fêmeas *Pkd1*^{flox/flox} em idade reprodutiva foram expostas ao tabagismo e acasaladas com machos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} não expostos ao tabagismo e com 8 a 15 semanas de idade. O sistema de acasalamento foi temporário e poligâmico. A cópula foi detectada pela observação diária da presença do tampão genital (*plug*) nas fêmeas e, uma vez detectado, as fêmeas prenhas foram separadas e mantidas em gaiolas individuais. A exposição ao tabaco seguiu por todo o período gestacional e todo o período experimental pós-nascimento. Esse desenho experimental permitiu que camundongos císticos (*Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}) e seus respectivos controles (*Pkd1*^{flox/flox}) fossem expostos à fumaça de cigarro desde a concepção até 18 semanas de idade. Os grupos controle incluíram animais císticos e não císticos não expostos ao tabagismo.

Nosso protocolo de exposição à fumaça do cigarro baseou-se em estudos prévios que utilizam um número de cigarros e tempo equivalentes aos que nossos camundongos foram expostos¹¹²⁻¹¹⁴. O protocolo de exposição à fumaça de cigarro foi realizado em dois períodos de 30 min, com intervalo mínimo de 4 h entre eles, cinco vezes por semana. A exposição foi realizada em uma caixa de polipropileno de 53 x 39 cm de base e 15 cm de altura, no interior de uma capela de exaustão de gases. A caixa plástica possui três aberturas: uma na parte superior, para saída de ar e fumaça, e duas laterais, uma para entrada de ar sintético e outra para entrada de fumaça de cigarro

(Figura 5). O fluxo de entrada de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado a um torpedão de ar comprimido e mantido em 1,5-2,0 L/min. A fumaça de cigarro foi aspirada para dentro da caixa por um sistema Venturi conectado a um cigarro aceso. Esse sistema foi constituído por uma tubulação suavemente cônica, onde o fluxo laminar de ar comprimido passa de uma região de maior para uma de menor diâmetro. Com isso, há aceleração do fluxo de ar e consequente redução da pressão nesse ponto (efeito Venturi), permitindo a aspiração da fumaça do cigarro. A redução na pressão ocorrida no ponto de redução do diâmetro do tubo é dependente do fluxo de ar mantido e é monitorada por um manômetro de coluna de água acoplado ao sistema Venturi. Desse modo, o controle da pressão e do fluxo de ar sintético na segunda entrada permite a regulação da quantidade de fumaça aspirada para o interior da caixa.

A concentração alvo de monóxido de carbono (CO) no interior da caixa foi de 250 a 350 ppm, variação equivalente a níveis não tóxicos de carboxiemoglobina no sistema de exposição empregado ¹¹⁵. Esse cenário corresponde à queima de sete a nove cigarros por período de 30 min. A monitorização da concentração de CO no interior da caixa foi realizada por um sensor de CO (Toxi-Oxy, Biosystems, Connecticut, EUA). Os cigarros utilizados foram da marca Derby (maço vermelho, Souza Cruz); os teores de alcatrão, nicotina e CO presentes na fumaça estão apresentados na tabela 1.

Figura 5. Esquema ilustrativo do sistema de exposição ao tabagismo.

Tabela 1. Teores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono na fumaça de cigarros da marca Derby (maço vermelho).

Componente	Concentração
Alcatrão	10 mg/cigarro
Nicotina	0,8 mg/cigarro
Monóxido de carbono	10 mg/cigarro

Grupos Experimentais

Nosso estudo incluiu quatro grupos experimentais: 1) camundongos machos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} (Cístico, CI); 2) *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} expostos ao tabagismo (Cístico Fumante, CIF); 3) *Pkd1*^{flox/flox} não expostos ao tabagismo (Não Cístico, NC) e 4) *Pkd1*^{flox/flox} expostos ao tabagismo (Não Cístico Fumante, NCF). É importante ressaltar que a exposição materna gestacional ao tabagismo é capaz de induzir programação fetal associada a complicações renais ¹¹⁶. Dessa forma, a inclusão do grupo controle de camundongos não císticos expostos à fumaça de cigarro foi fundamental. Ao permitir a análise dos efeitos potenciais da exposição ao tabagismo sobre o fenótipo renal de camundongos selvagens, pudemos distinguir seus efeitos sobre a doença renal associada à deficiência de *Pkd1* de seus efeitos deletérios basais.

O fluxograma experimental relacionado a cada análise experimental aplicada encontra-se apresentado na figura 6.

Figura 6. Fluxograma experimental do estudo.

Análises Bioquímicas

Os camundongos foram submetidos a coleta de sangue por acesso retro-ocular. Após coagulação, as amostras foram centrifugadas, de modo a obter o soro. A mensuração da ureia sérica (S_U) foi realizada por método enzimático-colorimétrico, utilizando o kit Uréia CE de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, MG, Brasil). A concentração de creatinina sérica (S_{Cr}) e urinária (U_{Cr}) foram obtidas por ensaio colorimétrico baseado na reação de Jaffé modificada, utilizando respectivamente os kits Creatinina KB02-H1D e K002-H1, (Arbor Assays, Ann Arbor, Michigan, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As determinações das concentrações séricas de Na^+ (S_{Na}) e K^+ (S_K) foram realizadas utilizando o analisador de eletrodo seletivo de íons Easylyte (Medica Corp., Bedford, MA), obedecendo aos protocolos de uso, manutenção e calibração fornecidas pelo fabricante. As mensurações das concentrações urinárias de Na^+ (U_{Na}) e K^+ (U_K) foram realizadas utilizando a mesma metodologia. As frações de excreção de Na^+ (FE_{Na}) e K^+ (FE_K) foram obtidas a partir das equações $FE_{Na} = (U_{Na} \times S_{Cr}) / (S_{Na} \times U_{Cr}) \times 100$ e $FE_K = (U_K \times S_{Cr}) / (S_K \times U_{Cr}) \times 100$, respectivamente.

Ultrassonografia Renal

A análise ultrassonográfica renal foi realizada com o equipamento de ultrassom Vevo 2100 (VisualSonics Inc., Toronto, Canada), com transdutor de 40 mHz, em animais CI e CIF de 16 semanas de idade. Os camundongos foram pré-anestesiados em uma câmara fechada, ventilada com mistura titulável de oxigênio e isoflurano. Em seguida, o animal foi retirado desta câmara e colocado em decúbito ventral em placa aquecida a 40°C, com a extremidade cranial introduzida em tubo com aporte contínuo de isoflurano. As patas foram fixadas a eletrodos que convertem o sinal em frequência cardíaca e curva eletrocardiográfica, utilizadas para monitoração durante o procedimento. Uma vez fixados na placa aquecida, os animais foram submetidos a tricotomia da região dorsal. A seguir, uma camada de gel foi aplicada entre a pele e o transdutor para obtenção das imagens. A partir de então imagens bidimensionais foram adquiridas para cada rim e as medidas dos três eixos renais realizadas, com o objetivo de mensurar o volume renal total (VRT) (Figura 7) ¹¹⁷. Este valor foi calculado com base na equação modificada de volume do elipsoide:

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

Em seguida, o transdutor percorreu cada rim de um pólo a outro, gerando um filme de cortes axiais composto por 200 imagens e com duração de 3 s. A análise desta sequência foi utilizada para o cálculo do volume de cada cisto, uma vez que as sequências obtidas permitem identificar o maior diâmetro dos mesmos (Figura 7). Utilizamos a média de dois eixos perpendiculares para determinar o diâmetro médio de cada cisto e, assim, estimar seu volume. Assumindo uma estrutura aproximadamente esférica para os cistos, seu volume foi calculado a partir da equação:

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

Após a etapa de varredura, o procedimento foi encerrado, substituindo o fluxo de isoflurano por oxigênio de modo a permitir a recuperação anestésica do animal.

O índice cístico global (ambos os rins) foi obtido a partir da equação abaixo.

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

Soma dos volumes renais

Figura 7. Metodologia aplicada para obtenção do volume renal e do índice cístico a partir de ultrassonografia. Rim esquerdo em animal de genótipo *Pkd1^{flox/flox}·Nestin^{cre}*. (A) corte sagital, com medida do maior eixo; (B) corte axial, com medida do eixo dorso-ventral e da largura renal. Em verde, a medida dos eixos perpendiculares de um cisto em seu maior diâmetro.

Análise Ecocardiográfica

O estudo ecocardiográfico foi realizado no mesmo aparelho utilizado para a ultrassonografia renal. Os procedimentos básicos foram semelhantes aos descritos para

ultrassonografia renal, exceto pelo posicionamento do animal na placa aquecida, que foi de decúbito dorsal, com o tórax submetido à tricotomia. As aquisições realizadas utilizando o modo unidimensional (modo M) permitiram analisar os seguintes parâmetros: diâmetro do septo interventricular na diástole (DSVI), diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE) na diástole (DPPVE), diâmetro interno do VE na sístole (DIVEs), diâmetro interno do VE na diástole (DIVEd) e o diâmetro do átrio esquerdo (AE). O DSVI, DPPVE, DIVEs e DIVEd foram utilizados para calcular a fração de encurtamento do VE (FEnVE) e a massa do VE (MVE). As aquisições de imagens no modo bidimensional (modo B) foram utilizadas para a análises do volume do VE na sístole (VVEs) e do volume do VE na diástole (VVEd), medidas utilizadas no cálculo da fração de ejeção do VE (FEVE) pelo método de Simpson ¹¹⁸. Analisamos também as aquisições de imagens de Doppler tecidual, pico de velocidade sistólica (S'), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), tempo de contração isovolumétrica (TCIV), tempo de ejeção (b), seguida do cálculo do índice de performance do miocárdio (IPM) e índice de performance miocárdica do ventrículo direito (IPM_{VD}) ¹¹⁹.

A pressão média da artéria pulmonar (PMAP) foi estimada através do tempo de aceleração (TA) pulmonar medido por Doppler pulsátil na sístole da artéria ¹²⁰. Análisamos ainda, a integral velocidade-tempo do fluxo sistólico total em via de saída de ventrículo direito (VTI_{VSVD}).

Fórmulas:

$$\text{FEn (\%)} = 100 \times (\text{DIVEd} - \text{DIVEs}) / \text{DIVEd}$$

$$\text{FEVE (\%)} = 100 \times (\text{VVEd} - \text{VVEs}) / \text{VVEd}$$

$$\text{MVE} = 0,8 \times [(\text{DIVEd} + \text{DPPVE} + \text{DSIV})^3 - (\text{DIVEd})^3] + 0,6$$

$$\text{IPM} = \text{TCIV} + \text{TRIV} / \text{b}$$

$$\text{PMAP} = 79 - (0,45 \times \text{TA})$$

Por fim, avaliamos as medidas de deformação miocárdica (*strain*) e da taxa de deformação (*strain rate*), obtidas através do rastreamento das marcas acústicas (*speckle-tracking*) derivadas de ecocardiografia bidimensional nos eixos curto e longo da região para-esternal ¹²¹ (Bauer et al., 2011). Todas as imagens foram adquiridas a uma frequência de 200 quadros/s e a uma profundidade de 11 mm. A aquisição das imagens foi conduzida por um investigador experiente, utilizando um algoritmo de análise previamente validado (VevoStrain, VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) (Bauer et al., 2011).

Registro Direto da Pressão Arterial Média

A aferição da pressão arterial média (PAM) foi realizada em animais com 13 semanas de idade em grupos experimentais exclusivos para esta análise. O registro foi realizado em animais com 13 semanas de idade. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano inalatório, em dose (1,5% em O₂) suficiente para sedação completa mas sem comprometimento autonômico perceptível. Um catéter de 4,0 cm de comprimento (Micro-Renathane, Braintree Science Inc, EUA), 0,40 mm de diâmetro externo e 0,25 mm de diâmetro interno foi inserido na artéria carótida direita¹²². Antes da implantação, o catéter foi preenchido com solução de NaCl 0,9% heparinizada (50 UI/mL) e ocluído com um pino de metal. O catéter foi então exteriorizado na nuca do animal com auxílio de um trocáter. Após sutura das incisões, o mesmo foi acoplado a um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA) para aferição da PAM (mmHg). O protocolo de registro dos dados foi efetuado 24h após o procedimento cirúrgico, de modo a permitir recuperação e adaptação do animal ao sistema.

Coleta dos Tecidos

Seguindo-se ao procedimento anestésico, os camundongos foram submetidos a toracotomia, inserção de um catéter no ventrículo esquerdo e um corte no átrio direito para drenagem do sangue. Seguiu-se, então, perfusão com solução salina 2 mL/min usando a bomba Minipuls3 (Gilson Inc., Middleton, WI, EUA), até exsanguinação completa. O procedimento foi finalizado com a coleta dos órgãos e tecidos. Os rins, fígado, pulmões e coração foram pesados, avaliados macroscopicamente e destinados a processamento histológico ou criopreservação. O rim direito, parte do fígado e parte do coração foram fixados em formaldeído 4% por cerca de 24 h e, a seguir, processados em uma série graduada de etanol, incluídos em parafina e submetidos a cortes histológicos com espessura de 3 µm. O rim esquerdo, parte do tecido cardíaco, parte do fígado e pulmões, por sua vez, foram congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 °C e utilizados nas análises de natureza molecular.

Quantificação de Fibrose

Cortes histológicos de rim e coração foram corados pela técnica picrossírius 0,2% (Sirius Red, Direct Red 80, Milwaukee, EUA) e analisados em microscópio óptico equipado com um polarizador de luz. O sistema constitui-se em uma câmara fotográfica acoplada a um microscópio Olympus BX-51, do qual foram obtidas imagens em monitor. Cada lâmina foi digitalizada em quinze campos aleatórios para tecido renal, sendo 12 corticais e três medulares e 10 campos aleatórios para tecido cardíaco com aumento de até 400x. Essas imagens foram então processadas no *software* Image ProPlus 6.0, de modo a permitir a quantificação do colágeno através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas, alaranjadas ou esverdeadas. O resultado foi expresso pela razão entre a área do conteúdo de colágeno e a área total^{123, 124}.

Quantificação de Proliferação Celular

A análise de proliferação celular foi realizada pela reação de imunohistoquímica para o marcador Ki-67. Para tanto, as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em uma bateria de xilol-álcool e submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato (10 mM, pH 6,0) por calor úmido em panela a vapor durante 40 min. Após o resfriamento das lâminas, as mesmas foram lavadas em água destilada e submersas em solução de bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂ 3%), 2 vezes por 10 min. Para redução de sinais inespecíficos na reação, foi realizada incubação em PBS (*Phosphate Buffered Saline*; 0,01 M, pH 7,4) com leite em pó desnatado 6% (Molico, Nestlé, Brasil) por 30 min a 37°C. Posteriormente, cada lâmina foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-Ki-67 (rabbit Monoclonal, ab16667, ABCAM, Cambridge, UK), diluído 1:50 em PBS acrescido de albumina sérica bovina (BSA) 1%. Em cada reação foi incluída uma lâmina controle negativo, na qual o anticorpo primário foi substituído apenas pelo diluente, assim como uma lâmina controle positivo, contendo secção de baço de camundongo. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o polímero EnVision + Dual Link System-HRP (Dako, Carpinteria, EUA) durante 30 min à temperatura ambiente (TA). A seguir, as lâminas foram lavadas novamente com PBS e reveladas com o substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, EUA) por aproximadamente 10 min e contracoradas com Hematoxilina (Dako, Carpinteria, EUA). Foram contados núcleos positivos e núcleos totais em dez campos diferentes. Em cada secção renal foram analisados oito campos corticais e dois medulares, no aumento de 400x. As taxas de proliferação

celular foram expressas como a relação entre o número de núcleos positivos para Ki-67 e o número total de núcleos contados.

Quantificação de Apoptose

A análise de apoptose celular foi realizada pela técnica de imunohistoquímica para caspase-3 clivada. As lâminas foram inicialmente desparafinizadas, hidratadas e submetidas a recuperação antigênica em panela de vapor por 35 min em tampão citrato pH 6,0 (Target retrieval solution concentrated 10X, Dako, Carpinteria, EUA). Após lavagens em água corrente e água destilada procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena da mesma forma que foi descrito para proliferação celular. Para evitar ligações inespecíficas, realizamos ainda um bloqueio com o reagente Rodent Block M (BioCare Medical, Concord, CA) por 30 min a 37°C e um bloqueio de cargas com o reagente CAS-BlockTM (Invitrogen, San Fransisco, EUA) por 10 min a 37°C. Cada lâmina foi então incubada com um o anticorpo primário *overnight* a 4°C (CP229B, BioCare Medical, Concord, CA), diluído em PBS e acrescido de BSA 1% (1:50 para tecido cardíacos e 1:100 para tecido renal). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o polímero Rabbit on Rodent HRP-Polymer (BioCare Medical, Concord, CA) durante 30 min a 37°C. Após lavagem em PBS, as lâminas foram reveladas com o substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, EUA) por 5 min e contracoradas com hematoxilina de Carazzi. Em cada secção de tecido foram analisados 10 campos no aumento de 400x, sendo no rim oito campos corticais e dois medulares e no coração 10 campos aleatórios. As taxas de apoptose foram expressas como a relação entre o número de células positivas e o número total de células contadas.

Avaliação da Concentração Renal de Glutathiona

A determinação da concentração renal de glutathiona (GSH) foi realizada utilizando o *Glutathione Fluorescent Detection kit* (K006-F1, Arbor Assays, Michigan, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O tecido foi inicialmente lavado repetidamente em PBS gelado e, em seguida, transferido para papel de filtro para registro de seu peso na ausência de umidade. O tecido foi então homogeneizado a 10 mg/250 µL em tampão fosfato 100 mM gelado, pH 7. A seguir o homogenato foi centrifugado a 16.000 g por 10 min a 4°C e uma alíquota do sobrenadante foi coletada para determinação da concentração de proteína. Uma segunda alíquota do sobrenadante foi adicionada a um volume igual de SSA 5% (ácido 5-sulfosalicílico dihidratado) gelado para desproteinização. Essa mistura foi então incubada por 10 min a 4°C, centrifugada a 16.000 g por 10

min a 4°C e o sobrenadante coletado. Pipetou-se 50 µL do sobrenadante nas placas de reação e em seguida adicionou-se 25 µL do reagente ThioStar, seguido de um período de incubação de 15 min à TA. Em sequência adicionou-se 25 µL de uma mistura de reagentes contendo NADPH 10% e glutatona redutase 10%, diluídos em tampão fornecido pelo kit. Após um segundo período de incubação de 15 min, o produto fluorescente foi lido a um comprimento de onda de 510 nm em um leitor de placas fluorescentes com excitação a 390 nm. A quantidade total de GSH medida foi então normalizada para o conteúdo de proteína.

Determinação de Concentração Renal das Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Utilizamos o kit de ensaio Oxiselect TBARS assay kit (Cell Biolabs, San Diego, CA) para mensuração de TBARS. Inicialmente o tecido renal foi pesado e homogeneizado a 100 mg/mL suspenso em PBS contendo hidroxitolueno butilado (BHT). O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado para ensaio de acordo com o protocolo do fabricante. 100 µL de solução de lise contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados a 100 µL do homogenato ou do padrão de malondialdeído (MDA) e incubados à TA por 5 min. Cada amostra e padrão foram incubados com 250 µL de reagente ácido tiobarbitúrico (TBA) 5,2 mg/mL (pH 3,5) a 95°C por 50 min e então lidos em espectrofotômetro em 532 nm. O conteúdo de MDA nas amostras foi determinado usando a curva padrão do MDA. Os resultados foram normalizados para o conteúdo de proteína.

RT-PCR em Tempo Real

As amostras de tecidos congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C foram utilizadas para extração de RNA total com o reagente TrizolTM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fragmentos dos tecidos renais foram pesados e homogeneizados em Trizol na proporção de 100 mg de tecido/mL. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 5 min e foi acrescentado clorofórmio 200 µL/mL de Trizol. A seguir o material foi vigorosamente agitado e centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo limpo com 500 µL de isopropanol/mL de Trizol para precipitação do RNA. Seguiu-se uma nova centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi então removido e descartado, enquanto o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 75% com centrifugação a 7.500 g por 10 min a 4°C.

Após secagem, o RNA foi ressuscitado em água livre de RNase. A quantificação de RNA foi realizada em espectrofotômetro Qubit 2.0, utilizando o kit *RNA Broad Range (BR)* (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Também avaliamos a integridade do RNA por meio de eletroforese capilar no equipamento Tape Station 2200 (Agilent, California, EUA).

A síntese de cDNA foi feita a partir de 2 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm. As amostras de RNA foram previamente tratadas com DNase (*RQ1 RNase free DNase*, Promega, Fitchburg, WI, EUA) e direcionadas para a reação de transcrição reversa utilizando o kit ImProm-II (Promega), seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Thermo-Fisher) utilizando o kit *TaqMan* (Applied Biosystems, Warrington, UK) para ensaios específicos para os genes, *Il1b* (Mm00434228_m1) e *Tgfb1* (Mm01178820_m1), e para o gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) como controle endógeno das reações. Os resultados dos produtos das reações de qPCR foram quantificados pelo método relativo $\Delta\Delta C_t$ e apresentados em unidades arbitrárias (UA).

Análise Estatística

Os dados foram classificados em paramétricos e não paramétricos com base no teste de Shapiro-Wilks. Os dados paramétricos foram expressos por média e desvio padrão da amostra. Quando comparados quatro grupos independentes com variâncias semelhantes de acordo com o teste de Bartlett, utilizamos análise de variância de uma via para medidas não repetidas com pós-teste de Tukey, pós-teste de diferença mínima significativa (teste de Tukey modificado) ou pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Quando comparados quatro grupos independentes com variâncias diferentes de acordo com o teste de Bartlett, foi utilizada análise de variância de uma via para medidas não repetidas e não homocedásticas com pós-teste de Dunnett C. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e quartis inferior e superior, e comparados entre si através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn, Simes-Hochber ou Benjamini, Krieger e Yekutieli. Consideramos para todo o estudo risco $\alpha \leq 5\%$ de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco $\beta \leq 20\%$ de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie. Os programas estatísticos empregados foram SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY), Systat 13.0 (Systat Software, San Jose, CA) e GraphPad 7.0 (Prism Software, GraphPad Software, La Jolla, CA).

Resultados

RESULTADOS

Viabilidade do Modelo Experimental e Efeitos Sistêmicos do Tabagismo

A exposição ao tabagismo foi realizada da concepção até 18 semanas de idade. Para confirmação da viabilidade do protocolo experimental, analisamos alguns parâmetros fundamentais. O primeiro foi o tamanho médio das ninhadas. Em nossas condições experimentais cada fêmea prenha pariu em média sete filhotes por ninhada. De acordo com o *Jackson Laboratory*, especializado em animais geneticamente modificados, o tamanho médio das ninhadas de animais isogênicos C57BL6 é de sete filhotes, indicando que nosso protocolo experimental não é embrionicamente letal ¹²⁵. Observamos também que a frequência genotípica seguiu o padrão mendeliano de herança, com 51% de filhotes com a presença do transgene da Cre recombinase e 49% com ausência do mesmo. Esses dados demonstram que a exposição ao tabagismo não exerceu pressão seletiva deletéria sobre os animais císticos durante o desenvolvimento embrionário. De forma similar, não observamos seleção da exposição ao tabagismo em relação ao sexo dos animais.

Não observamos diferença significativa de sobrevida na idade de 18 semanas entre os quatro grupos analisados. Observamos, entretanto, uma tendência não significativa de redução de sobrevida nos animais CIF comparados a NC ($p=0,083$; Figura 8).

Figura 8. Análise comparativa de sobrevida entre os grupos CI (n=14), CIF (n=21), NC (n=20) e NCF (n=20). Os dados foram comparados utilizando o teste de Log-rank.

Avaliações Biométricas

Nossos resultados revelaram PC significativamente menor em camundongos CIF comparados a CI na idade de 16 semanas [23,0 g (22,1-23,7) vs 27,2 g (26,1-28,0); $p<0,001$] e uma tendência de diminuição em comparação a NC ($p=0,056$) (Figura 9, Tabela 2). Os animais CI também apresentaram maior PC que NC [vs 24,6 g (22,7-27,1); $p<0,05$] e que NCF [vs 24,0 g (22,9-25,6); $p<0,001$].

Avaliamos também o peso renal, peso do coração e peso do fígado normalizados pelo PC obtido no final do período experimental, após a eutanásia dos animais na idade de 18 semanas. Animais CIF apresentaram a razão peso renal/PC maior que a dos animais NCF [18,7 mg/g (15,4-30,9) vs 13,2 mg/g (12,1-13,7); $p<0,001$] e que NC [vs 13,6 mg/g (12,3-14,8); $p<0,01$] (Figura 10, Tabela 2). Camundongos CI também apresentaram a razão peso renal/PC significativamente maior que a do grupo NCF [16,0 mg/g (13,4-21,1) vs 13,2 mg/g (12,1-13,7); $p<0,01$] e que a de NC [vs 13,6 (12,3-14,8); $p<0,05$].

A análise da razão peso do coração/PC não revelou diferenças significantes entre os quatro grupos (Figura 11, Tabela 2).

Também não observamos diferenças significantes para a razão peso do fígado/PC entre animais CI, CIF, NC e NCF (Figura 12, Tabela 2).

Figura 9. Análise comparativa do peso corporal entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. Os parâmetros foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis com os valores de p corrigidos para *False Discovery Rate (FDR)* usando o método proposto por Benjamini, Krieger and Yekutieli. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil.

* $p<0,05$ e *** $p<0,001$.

Figura 10. Análise comparativa da razão peso renal/peso corporal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF. Para essa comparação foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com os valores de p corrigidos para *False Discovery Rate (FDR)* usando o método proposto por Benjamini, Krieger and Yekutieli. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 11. Análise comparativa da razão peso do coração/peso corporal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF. Utilizamos para essas comparações o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 12. Análise comparativa da razão peso do fígado/peso corporal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF. Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para essas comparações, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Tabela 2. Peso corporal, razão peso renal/peso corporal, razão peso do coração/peso corporal e razão peso do fígado/peso corporal em camundongos CI, CIF, NC e NCF.

Parâmetros	CI	CIF	NC	NCF
PC (g)	27,2 (26,1-28,0) ^{bccc} n=12	23,0 (22,1-23,7) ^{aaab} n=8	24,6 (22,7-27,1) n=16	24,0 (22,9-25,6) n= 17
Razão Peso Renal/PC (mg/g)	16,0 (13,4-21,1) ^{bcc} n=12	18,7 (15,4-30,9) ^{bbccc} n=9	13,6 (12,3-14,8) n=15	13,2 (12,1-13,7) n=17
Razão Peso Coração/PC (mg/g)	5,37 (4,73-5,63) n=12	5,87 (5,16-6,67) n=9	5,31 (5,04-5,75) n=15	5,31 (4,86-6,01) n=17
Razão Peso Fígado/ PC (g)	42,5 (40,1-49,1) n=12	48,7 (45,6-50,1) n=9	44,1 (40,9-47,4) n=15	43,9 (35,4-49,7) n=17

Os dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. ^{aaa}p<0,001 vs CI; ^bp<0,05 vs NC; ^{bb}p<0,01 vs NC; ^{cc}p<0,01 vs NCF; ^{ccc}p<0,001 vs NCF.

Análises Bioquímicas

Analizamos os níveis de S_U como indicador da função renal nos quatro grupos experimentais, na idade de 17 semanas. Camundongos CIF apresentaram S_U mais elevada que seus controles císticos não fumantes [104,2 mg/dL (85,7-115,9) vs 75,6 mg/dL (67,8-82,2); p<0,05] e que animais não císticos não fumantes [vs 66,4 mg/dL (62,6-74,6); p<0,001] (Figura 13, Tabela 3). O grupo NCF também cursou com aumento de S_U em relação a seu controle NC [90,1 mg/dL (84,4-105,7) vs 66,4 mg/dL (62,6-74,6); p<0,01]. Não observamos, contudo, diferença significativa entre camundongos CI e NC e entre CIF e NCF.

Não observamos diferenças significantes de FE_{Na} e FE_K entre os grupos (Figura 14A e B, Tabela 3). Também não detectamos diferenças nas concentrações séricas de Na^+ e K^+ entre os grupos (Figura 15A e B, Tabela 3).

RESULTADOS

Figura 13. Análise comparativa da concentração sérica de ureia entre camundongos CI, CIF, NC e NCF. Essas comparações foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

Figura 14. Análises comparativas da fração de excreção de Na^+ (FE_{Na}) (A) e de K^+ (FE_{K}) (B) entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para essas comparações, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 15. Análises comparativas das concentrações séricas de Na^+ (A) e de K^+ (B) entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. Essas comparações foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil.

Tabela 3. Concentração sérica de ureia, fração de excreção de Na^+ , fração de excreção de K^+ , concentração sérica de Na^+ e concentração sérica de K^+ em animais CI, CIF, NC e NCF.

Parâmetros	CI	CIF	NC	NCF
S_U (mg/dL)	75,6 (67,8-82,2) n=10	104,2 (85,7-115,9) ^{abbb} n=12	66,4 (62,6-74,6) n=8	90,1 (84,4-105,7) ^{bb} n=9
FE_Na (%)	0,69 (0,57-0,85) n=8	0,45 (0,28-0,57) n=10	0,44 (0,34-0,58) n=8	0,59 (0,50-0,77) n=6
FE_K (%)	34,4 (25,0-40,9) n=8	33,5 (28,5-46,5) n=10	33,7 (30,4-38,8) n=8	34,0 (30,0-37,2) n=6
S_Na (mEq/L)	172,0 (168,8-174,0) n=8	172,8 (169,2-176,2) n=10	169,9 (164,6-175,5) n=11	172,5 (169,7-174,4) n=6
S_K (mEq/L)	5,39 (5,25-5,89) n=8	5,69 (5,30-6,31) n=10	5,40 (4,95-5,78) n=11	5,66 (5,15-5,87) n=6

S_U , FE_Na , FE_K , S_Na e S_K foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. ^a $p < 0,05$ vs CI; ^{bb} $p < 0,01$ vs NC; ^{bbb} $p < 0,001$ vs NC.

Análises por Ultrassonografia Renal

Os estudos de ultrassonografia renal foram realizados em animais CI e CIF com 16 semanas de idade. Camundongos CIF apresentaram um índice cístico renal global maior que animais CI [17,4% (6,0-31,7) vs 4,6% (2,7-8,4); $p < 0,05$] (Figura 16A). Imagens representativas dessa análise são mostradas na Figura 16B.

Figura 16. A) Análise comparativa do índice cístico renal global entre camundongos CI (n=11) e CIF (n=12). Esta comparação foi realizada usando o teste de Mann-Whitney, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil, * $p < 0,05$. B) Imagens representativas do fenótipo cístico renal na ausência e presença de tabagismo.

Análises por Ecografia

Nossas análises funcionais da FEVE por meio do método de Simpson revelaram diminuição da FEVE em animais CIF e CI comparados a NC ($34,4 \pm 10,5\%$ e $39,9 \pm 11,1\%$ vs $50,5 \pm 8,4\%$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 17, Tabela 4). Nossos dados revelaram redução da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEnVE) em camundongos CIF comparados a NCF ($17,3 \pm 8,4\%$ vs $24,9 \pm 6,8\%$; $p < 0,05$) e a NC (vs $26,7 \pm 6,0\%$; $p < 0,01$) (Tabela 4). Observamos, ainda, uma tendência de redução da FEnVE nos animais CI comparados a NC ($p = 0,065$). Observamos também uma tendência de redução no pico de velocidade sistólica (S') em camundongos CIF comparados a NC ($p = 0,083$).

Nossas análises estruturais revelaram aumento no diâmetro interno do VE na sístole/PC (DIVEs/PC) e no diâmetro interno do VE na diástole/PC (DIVEd/PC) em animais CIF em comparação com CI [$0,15 \pm 0,03$ mm/g vs $0,12 \pm 0,02$ mm/g; $p < 0,05$ e $0,20$ mm/g ($0,17-0,19$) vs $0,16$ mm/g ($0,15-0,17$); $p < 0,05$, respectivamente] e NCF [vs $0,12 \pm 0,02$ mm/g; $p < 0,05$ e $0,16$ mm/g ($0,15-0,18$); $p < 0,05$, respectivamente] (Figuras 18A e B). Observamos, ainda, uma tendência não significativa de redução de DIVEs/PC em animais CIF comparados a NC ($p = 0,055$). Nessa linha, o volume do VE na sístole/PC (VVEs/PC) foi maior em camundongos CIF que NCF ($2,32 \pm 0,94$ μ l/g vs $1,43 \pm 0,64$ μ l/g; $p < 0,05$) e uma tendência não significativa de aumento foi observada em animais CIF comparados a CI e NC ($p = 0,078$ e $p = 0,078$). Camundongos CIF apresentaram, também, aumento no diâmetro do átrio esquerdo/PC (AE/PC) em comparação com animais CI (Tabela 4). Não observamos diferenças significantes na relação massa do ventrículo esquerdo/PC (MVE/PC), no diâmetro do septo interventricular (DSIV) e no diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo (DPPVE).

A análise de parâmetros diastólicos não revelou diferenças significantes entre os grupos, apesar de tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIVE) ter sido numericamente maior nos animais CIF (Figura 19, Tabela 4). O tempo de desaceleração da onda E mitral (TD) não diferiu entre os grupos.

O índice de *performance* do miocárdio (IPM) não diferiu entre os grupos analisados (Tabela 4). As análises da integral velocidade-tempo do fluxo sistólico total em via de saída de ventrículo direito (VTI_{VSVD}) e o índice de *performance* miocárdica do ventrículo direito (IPMVD) não apresentaram diferenças significantes entre os grupos (Tabela 4). A pressão média da artéria

pulmonar (PMAP), entretanto, foi menor em camundongos CIF comparados a animais CI ($68,8 \pm 2,90$ mmHg vs $71,9 \pm 2,38$ mmHg; $p < 0,05$) e NC (vs $72,2 \pm 3,09$ mmHg; $p < 0,05$) (Tabela 4).

A deformação miocárdica (*strain*) circunferencial mostrou-se reduzida em camundongos CIF comparados a CI ($-9,8 \pm 4,8\%$ vs $-14,5 \pm 3,2\%$; $p < 0,05$), NCF (vs $-17,4 \pm 3,3\%$; $p < 0,01$) e NC (vs $-19,5 \pm 4,1\%$; $p < 0,001$) (Figura 20A, Tabela 5). Este parâmetro também foi menor em animais CI que em NC ($p < 0,05$). A taxa de deformação miocárdica (*strain rate*) circunferencial também foi menor em camundongos CIF que em CI [$-3,11\%/s$ ($-3,58$ – $-2,84$) vs $-4,54\%/s$ ($-5,80$ – $-3,82$); $p < 0,05$], NCF [vs $-5,39\%/s$ ($-5,70$ – $-4,86$); $p < 0,01$] e NC [vs $-6,31\%/s$ ($-7,16$ – $-5,18$); $p < 0,001$] (Figura 20B, Tabela 5). Esse parâmetro também foi diminuído em animais CI em comparação a NC ($p < 0,05$). Camundongos CIF apresentaram diminuição de *strain* radial em relação a animais NC [$13,4\%$ ($11,4$ – $18,0$) vs $26,5\%$ ($20,8$ – $31,2$); $p < 0,01$]. Observamos também uma tendência não significativa de redução de *strain* radial nos camundongos CIF comparados a NCF ($p = 0,087$) e nos animais CI comparados a NC ($p = 0,058$) (Figura 20C, Tabela 5). A taxa de *strain* radial, por sua vez, foi mais baixa em camundongos CIF que em NC [$4,23\%/s$ ($3,80$ – $4,60$) vs $6,33\%/s$ ($6,12$ – $8,17$); $p < 0,01$]. Observamos, também, tendência não significativa de redução na taxa de *strain* radial em animais CIF em comparação com CI ($p = 0,086$) e NCF ($P = 0,062$) (Figura 20D, Tabela 5). Camundongos CI, por sua vez, apresentaram uma tendência de redução na taxa de *strain* radial comparados a NC ($p = 0,086$).

Neste estudo, não observamos diferenças significantes nos parâmetros de deformação miocárdica no eixo longo entre os grupos analisados (Tabela 5).

Figura 17. Análises comparativas da FEVE entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. Esse parâmetro foi comparado por meio de ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Figura 18. Análises comparativas da DIVEs/PC (A) e DIVEs/PC (B) entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. Esse parâmetro foi comparado por meio de ANOVA de uma via com os valores de p corrigidos para *False Discovery Rate (FDR)* usando o método proposto por Benjamini, Krieger e Yekutieli. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. *p<0,05.

Figura 19. Análises comparativas de TRIVE entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para essas comparações, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Tabela 4. Parâmetros ecocardiográficos em animais CI, CIF, NC e NCF.

Parâmetros	CI	CIF	NC	NCF
Estrutura				
DSVI (mm)	0,73±0,16 n=13	0,69±0,10 n=8	0,75±0,07 n=8	0,69±0,07 n=11
DPPVE (mm)	0,68 (0,59-0,78) n=13	0,67 (0,62-0,75) n=8	0,68 (0,55-0,70) n=8	0,68 (0,65-0,81) n=11
MVE/PC (mg/g)	3,29±0,86 n=13	3,62±0,88 n=8	3,69±1,03 n=8	2,93±0,61 n=11
AE/PC (mm/g)	0,07±0,02 ^b n=13	0,09±0,01 ^a n=8	0,09±0,02 n=8	0,08±0,01 n=11
DIVeS/PC (mm/g)	0,12±0,02 n=13	0,15±0,03 ^{ac} n=8	0,13±0,03 n=8	0,12±0,02 n=11
DIVeD/PC (mm/g)	0,16 (0,15-0,17) n=13	0,20 (0,17-0,19) ^{ac} n=8	0,18 (0,15-0,19) n=8	0,16 (0,15-0,18) n=11
VVEs/PC (µl/g)	1,70±0,54 n=13	2,32±0,94 ^c n=8	1,57±0,53 n=8	1,43±0,64 n=11
VVEd/PC (µl/g)	2,79±0,56 n=13	3,36±0,75 n=8	3,06±0,97 n=8	2,67±0,87 n=11
Função Sistólica				
FEVE (%)	39,9±11,1 ^b n=11	34,4±10,5 ^{bb} n=7	50,5±8,4 n=8	43,1±9,6 n=8
FEn (%)	20,8±6,8 n=13	17,3±8,4 ^{bbc} n=8	26,7±6,0 n=8	24,9±6,8 n=11
S' (mm/s)	15,3±3,5 n=13	12,8±6,3 n=8	16,3±2,9 n=8	15,8±2,0 n=9
Função Diastólica				
TRIVE (ms)	25,6 (22,2-30,8) n=12	30,5 (24,9-39,2) n=8	26,7 (22,9-27,8) n=8	24,6 (21,4-28,4) n=10
TD (ms)	18,3±3,8 n=11	21,5±5,4 n=7	21,2±4,6 n=8	19,9±5,9 n=9
Outros Parâmetros				
IPM	0,67±0,17 n=13	0,77±0,22 n=7	0,64±0,08 n=7	0,71±0,15 n=10
IPM VD	0,37 (0,33-0,51) n=11	0,36 (0,27-0,63) n=6	0,38 (0,32-0,51) n=8	0,46 (0,34-0,71) n=8
VTI_{vsvd}	19,7±5,4 n=12	19,3±6,7 n=7	20,8±4,6 n=8	22,8±3,8 n=11
PMAP (mmHg)	71,9±2,4 n=12	68,8±2,9 ^{ab} n=6	72,2±3,1 n=8	70,5±2,6 n=10

DSIV: diâmetro do septo interventricular; **DPPVE:** diâmetro da parede posterior do ventrículo esquerdo; **MVE/PC:** massa do ventrículo esquerdo normalizada pelo peso corporal; **AE/PC:** diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal; **DIVeS/PC:** diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole normalizado pelo peso corporal; **DIVeD/PC:** diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole normalizado pelo peso corporal; **VVEs/PC:** volume sistólico do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal; **VVEd/PC:** volume diastólico do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal; **FEVE:** fração de ejeção do ventrículo esquerdo. **FEnVE:** fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; **S':** pico de velocidade sistólica; **TRIVE:** tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; **TD:** tempo de desaceleração da onda E mitral; **IPM:** índice de *performance* miocárdica; **IPMVD:** índice de *performance* miocárdica do ventrículo direito; **VTI_{vsvd}:** integral velocidade-tempo do fluxo sistólico total em via de saída de ventrículo direito; e **PMAP:** pressão média da artéria pulmonar. Os dados paramétricos foram comparados por meio de ANOVA de uma via, com resultados expressos em média e desvio-padrão. Os dados não paramétricos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. ^ap<0,05 vs CI; ^bp<0,05 vs NC; ^{bb}p<0,01 vs NC; ^cp<0,05 vs NCF.

Figura 20. Análises comparativas da deformação miocárdica no eixo curto entre os grupos CI, CIF, NC e NCF. **(A)** *strain* circunferencial, **(B)** taxa do *strain* circunferencial, **(C)** *strain* radial e **(D)** taxa de *strain* radial. Os dados paramétricos foram comparados por meio de ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey, com os resultados expressos em média e desvio-padrão. Os dados não paramétricos foram comparados com teste de Kruskal-Wallis com os valores de p corrigidos para *False Discovery Rate (FDR)* usando o método proposto por Benjamini, Krieger e Yekutieli. Os resultados foram apresentados em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 5. Parâmetros de deformação miocárdica em camundongos CI, CIF, NC e NCF.

Parâmetros	CI	CIF	NC	NCF
Eixo Curto (%)				
<i>Strain</i> circumferencial	-14,5±3,2 ^b n=10	-9,75±4,8 ^{abbccc} n=8	-19,5±4,1 n=7	-17,4±3,3 n=7
Taxa de <i>strain</i> circumferencial (xs ⁻¹)	-4,54 (-5,80--3,82) ^b n=10	-3,11 (-3,58--2,84) ^{abbccc} n=8	-6,31 (-7,16--5,18) n=7	-5,39 (-5,70--4,86) n=7
<i>Strain</i> radial	18,4 (14,5-23,4) n=10	13,4 (11,4-18,0) ^{bb} n=8	26,5 (20,8-31,2) n=7	25,0 (16,9-26,1) n=7
Taxa de <i>strain</i> radial (xs ⁻¹)	5,84 (4,87-6,34) n=10	4,23 (3,80-4,60) ^{bb} n=8	6,33 (6,12-8,17) n=7	5,74 (5,37-6,40) n=7
Eixo longo (%)				
<i>Strain</i> longitudinal	-11,1 (-11,6--9,60) n=10	-8,88 (-12,6--8,05) n=8	-12,7 (-15,7--9,59) n=7	-9,20 (-11,1--8,60) n=6
Taxa de <i>strain</i> longitudinal (xs ⁻¹)	-4,23±0,87 n=10	-3,58±1,58 n=8	-5,17±1,29 n=7	-5,77±2,92 n=6
<i>Strain</i> radial	15,0±6,32 n=10	13,6±6,89 n=8	19,0±3,97 n=7	15,0±3,20 n=6
Taxa de <i>strain</i> radial (xs ⁻¹)	5,60±1,20 n=10	4,36±2,19 n=8	5,17±1,04 n=7	5,80±2,46 n=6

Os dados paramétricos foram comparados por meio de ANOVA de uma via, com resultados expressos em média e desvio-padrão. Os dados não paramétricos foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. ^ap<0,05 vs CY; ^bp<0,05 vs NC; ^{bb}p<0,01 vs NC; ^{bbb}p<0,001; ^{cc}p<0,01 vs NCS.

Análise da Pressão Arterial Média

A aferição da PAM, realizada na idade de 13 semanas por método invasivo direto, revelou níveis mais elevados em animais CI comparados a CIF (159,6±23,4 vs 132,4±16,2 mmHg; p<0,01), NC (vs 136,9±6,3 mmHg; p<0,05) e NCF (vs 124,3±12,9 mmHg; p<0,01) (Figura 21).

Figura 21. Análise comparativa da pressão arterial média (PAM) entre os grupos CI (n=6), CIF (n=7), NC (n=6) e NCF (n=6). Esse parâmetro foi comparado por meio de ANOVA de uma via com os valores de p corrigidos para *False Discovery Rate (FDR)* usando o método proposto por Benjamini, Krieger e Yekutieli. Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão. *p<0,05 e **p<0,01.

Estudos de Proliferação Celular

As análises imunoistoquímicas para Ki-67 no epitélio renal tubular mostraram que em estado basal a marcação para Ki-67 é significativamente maior nos camundongos CI que NC [0,76% (0,53-1,60) vs 0,23% (0,19-0,27); $p<0,001$], efeito observado também entre CIF e NCF [2,36% (1,08-3,61) vs 0,92% (0,79-1,08); $p<0,05$] e NC [vs 0,23% (0,19-0,27); $p<0,001$] (Figura 22A). Essa análise também revelou que o tabagismo aumentou a taxa de proliferação de células tubulares renais em animais NCF comparados a NC [0,92% (0,79-1,08) vs 0,23% (0,19-0,27); $p<0,001$] (Figura 22). Embora não significativa, rins CIF apresentaram tendência de aumento da proliferação celular tubular em comparação a CI ($p=0,060$).

A taxa de proliferação de células de revestimento cístico, por sua vez, foi maior em camundongos císticos fumantes que císticos não fumantes [2,40% (1,54-3,16) vs 1,31% (0,79-1,50); $p<0,05$] (Figura 23A).

Figura 22. A) Análises comparativas da taxa de proliferação celular em epitélio renal tubular entre camundongos CI (n=9), CIF (n=10), NC (n=8) e NCF (n=8). Os dados foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Simes-Hochber. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p<0,05$ e *** $p<0,001$. B) Imagens representativas da marcação para Ki-67 em epitélio renal tubular de camundongos CI, CIF, NC e NCF. Aumento original, 400X.

A

B

Figura 23. A) Análise comparativa da taxa de proliferação celular em epitélio cístico renal entre camundongos CI (n=9) e CIF (n=10). Os dados foram comparados usando o teste de Mann-Whitney, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil, * $p<0,05$. B) Imagens representativas da marcação para Ki-67 em epitélio cístico de camundongos CI e CIF. Aumento original, 400X.

Análises Quantitativas de Fibrose Renal

A avaliação quantitativa de fibrose tecidual baseou-se na coloração de picrosírius. O índice de fibrose renal mostrou-se maior em camundongos CIF que em CI [1,20% (0,87-2,02) vs 0,34% (0,23-0,86); $p<0,05$], NCF [vs 0,13% (0,10-0,21); $p<0,001$] e NC [vs 0,06% (0,04-0,09); $p<0,001$] (Figura 24A). Também detectamos índice de fibrose renal mais alto em rins CI que NCF ($p<0,001$) e NC ($p<0,001$), e em rins NCF comparados a NC ($p<0,05$).

A

B

Figura 24. A) Análise comparativa do índice de fibrose renal entre camundongos CI (n=10), CIF (n=10), NC (n=8) e NCF (n=8). Os dados foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. *p<0,05 e ***p<0,001. **B)** Imagens representativas de fibrose renal nas quatro condições experimentais. Aumento original, 400X.

Análises Quantitativas de Fibrose Cardíaca

Camundongos CIF apresentaram aumento significativo do índice de fibrose cardíaca em relação a NCF [1,10% (0,80-2,66) vs 0,26% (0,16-0,43); p<0,01] e NC [vs 0,21 % (0,09-0,38); p<0,001] (Figura 25A). Animais CI também cursaram com maior fibrose cardíaca que NC [0,81% (0,70-1,49) vs 0,21 % (0,09-0,38); p<0,01] e NCF [vs 0,26% (0,16-0,43); p<0,05].

Figura 25. A) Análise comparativa do índice de fibrose cardíaca entre camundongos CI (n=10), CIF (n=10), NC (n=7) e NCF (n=8). Os dados foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Simes-Hochber. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. **B)** Imagens representativas de fibrose cardíaca nas quatro condições experimentais. Aumento original, 400X.

Análises de Apoptose em Tecido Renal

A avaliação realizada por marcação de caspase-3 ativa revelou uma taxa apoptótica no epitélio tubular renal maior nos rins CIF que NCF [0,27% (0,20-0,47) vs 0,04% (0,03-0,07); p<0,05] e NC [vs 0,02% (0,00-0,02); p<0,001] (Figura 26A). Um valor mais alto também foi

RESULTADOS

observado em rins CI que NC [0,09% (0,08-0,17) vs 0,02% (0,00-0,02); $p < 0,001$], efeito detectado também em rins NCF comparados a NC [0,04% (0,03-0,07) vs 0,02% (0,00-0,02); $p < 0,001$]. Não observamos aumento significativo da taxa apoptótica tubular em rins CIF comparados a CI.

A análise da taxa de apoptose em epitélio cístico também não revelou diferenças significantes entre camundongos CIF e CI (Figura 27A).

Figura 26. A) Análises comparativas da taxa de apoptose em epitélio tubular renal entre camundongos CI (n=10), CIF (n=11), NC (n=9) e NCF (n=8). Os parâmetros foram transformados em Log10 para normalização das amostras e os dados comparados por meio de ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. **B)** Imagens representativas da marcação para caspase-3 ativa em epitélio tubular renal de animais CI, CIF, NC e NCF. Aumento original, 400X.

Figura 27. A) Análise comparativa da taxa de apoptose em epitélio cístico renal entre camundongos CI (n=9) e CIF (n=11). Os dados foram comparados usando o teste de Mann-Whitney, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. **B)** Imagens representativas da marcação para caspase-3 ativa em epitélio cístico de camundongos

CI e CIF. Aumento original, 400X.

Análises de Apoptose em Tecido Cardíaco

A análise de marcação para caspase-3 ativa em tecido cardíaco revelou taxa apoptótica aumentada em camundongos CI comparados com corações NC [0,73% (0,44-1,03) vs 0,40% (0,23-0,60); $p < 0,05$] (Figura 28A). Uma tendência não significativa de valores mais altos também foi observada para animais CIF comparados a NC ($p = 0,053$).

Figura 28. A) Análise comparativa da taxa de apoptose em tecido cardíaco entre camundongos CI (n=12), CIF (n=11), NC (n=9) e NCF (n=8). Os parâmetros foram transformados em Log10 para normalização das amostras e os dados comparados usando ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$. **B)** Imagens representativas da marcação para caspase-3 ativa em coração de camundongos CI, CIF, NC e NCF. Aumento original, 400X.

Análise do Metabolismo Redox

Analisamos os níveis renais de GSH nos quatro grupos experimentais. Detectamos nível mais baixo em camundongos CIF que CI [107,9 $\mu\text{mol/mg}$ proteína (98,7-118,1) vs 148,0 $\mu\text{mol/mg}$ proteína (139,8-183,8); $p < 0,01$], NCF [vs 139,8 $\mu\text{mol/mg}$ proteína (124,1-159,0); $p < 0,01$] e NC [vs 186,1 $\mu\text{mol/mg}$ proteína (172,2-195,5); $p < 0,01$] (Figura 29 A, Tabela 6). Também detectamos níveis de GSH reduzidos em camundongos NCF comparados a NC ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A análise dos níveis de TBARS em tecido renal, contudo, não revelou diferenças significantes entre os grupos (Figura 29 B, Tabela 6).

Figura 29. Análises comparativas de GSH (**A**) e TBARS (**B**) em tecido renal entre camundongos CI, CIF, NC e NCF. Os dados foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Simes-Hochber. Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Tabela 6. Níveis de GSH e TBARS em tecido renal de camundongos CI, CIF, NC e NCF.

Parâmetros	CI	CIF	NC	NCF
GSH total ($\mu\text{mol/mg}$ proteína)	148,0 (139,8-183,8) n=9	107,9 (98,7-118,1) ^{aabcc} n=10	186,1 (172,2-195,5) n=9	139,8 (124,1-159,0) ^b n=10
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	0,91 (0,68-1,04) n=8	0,90 (0,86-1,16) n=9	0,78 (0,68-0,94) n=10	0,89 (0,80-1,13) n=10

GSH e TBARS foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ^{aa} $p < 0,01$ vs CY; ^b $p < 0,05$ vs NC; ^{bb} $p < 0,01$ vs NC; ^{cc} $p < 0,01$ vs NCS.

Real time RT-PCR

Analisamos os níveis de expressão dos genes *Il1b* e *Tgfb1* em tecido renal para avaliar o estado inflamatório. Tal análise foi realizada por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Não detectamos diferenças significantes de expressão para esses genes entre os quatro grupos analisados (Figura 30A e B).

Figura 30. Análise de expressão gênica em tecido renal para **A)** *Il1b* CI (n=7), CIF (n=7), NC (n=6) e NCF(n=6) e **B)** *Tgfb1* CI (n=7), CIF (n=7), NC (n=6) e NCF (n=7). Os dados foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis, com os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Discussão

DISCUSSÃO

A DRPAD se constitui na enfermidade humana monogênica com ameaça à vida mais comum. Sua penetrância é virtualmente completa, sendo que 70% dos pacientes evoluem para necessidade de TRS até a idade de 70 anos ¹²⁶. Nesse contexto, representa a terceira causa de necessidade de TRS, a se considerar as diferentes glomerulopatias individualmente ^{5, 6, 127}. Ao longo das últimas décadas, vários fatores de risco associados a progressão mais rápida da doença renal foram identificados para a DRPAD. Tais fatores incluem 1) o *locus* associado à doença, uma vez que a DRPAD tipo 1 se associa a uma evolução mais precoce para DREF que a DRPAD tipo 2 ^{128, 129}; 2) o tipo de mutação em *PKD1*, dado que mutações associadas ao truncamento da policistina-1 se associam a uma evolução mais rápida para DREF que mutações que determinam substituição de aminoácidos nessa proteína ^{7, 130}; 3) taxa de aumento do VRT elevada, visto que a taxa de aumento do VRT constitui-se, durante a fase da doença associada a uma relativa preservação da função renal, no principal marcador substituto para a taxa de declínio posterior da TFG ¹³¹; 4) hipertensão arterial, pois se associa com VRT aumentado antes da fase de declínio da função renal, e o início precoce de hipertensão arterial se associa a um pior prognóstico renal ¹³²⁻¹³⁴; 5) início precoce de sinais e sintomas, particularmente hematuria macroscópica ¹³⁵; 6) início precoce de proteinúria patológica ou de detecção de proteinúria por fita reagente ^{132, 136, 137}; 7) sexo masculino, risco mostrado para DRPAD tipo 1 em homens em alguns estudos ^{4, 132, 138}, mas não em todos ¹²⁹; 8) baixo peso ao nascimento ¹³⁸; 9) fluxo sanguíneo renal diminuído, revelado por um estudo por ressonância magnética realizado pelo consórcio CRISP ^{139, 140}; 10) índice de massa do ventrículo esquerdo aumentado ¹⁴¹; 11) Níveis séricos elevados de ácido úrico ¹⁴²; e 12) níveis aumentados de colesterol LDL ¹⁴³.

Além dos fatores de risco mencionados, chama atenção a identificação de outros fatores de risco associados à exposição ambiental, incluindo dieta. Esta observação é fundamental, pois permite supor que sua evitação, correção ou adequação possa prevenir a aceleração da doença renal associada à DRPAD ou lentificar sua progressão. Um desses fatores é o nível plasmático alto de coceptina, marcador substituto para a vasopressina ^{144, 145}, indicando que níveis elevados de vasopressina devam determinar aumento dos níveis renais de AMPc e promover aceleração da doença cística ¹⁴⁶. Essa constatação dá suporte à proposta atual de incluir no tratamento de pacientes com DRPAD aumento de ingestão hídrica ¹⁴⁷, embora o estudo clínico que esteja avaliando esta medida ainda esteja em curso ¹⁴⁸. Outro fator de risco associado à progressão do fenótipo renal da DRPAD é o aumento da excreção urinária de sódio. De fato, Torres *et al* mostraram recentemente que a restrição dietética de sal foi benéfica no seguimento de pacientes

com esta moléstia ¹⁴⁹. Outro estudo interessante, concluído já há algum tempo, mostrou em um sistema *in vitro* que cafeína inibiu a fosfodiesterase em epitélio cístico DRPAD, promovendo aumento dos níveis intracelulares de AMPc ¹⁵⁰. Tal elevação, por sua vez, determina ativação da via ERK com consequente aumento de proliferação celular, e promove aumento da secreção transepitelial de fluido. Nesse cenário, mostrou-se a potencialidade da cafeína promover aumento da taxa de crescimento cístico na DRPAD. Este estudo deu origem à proposta de recomendação de restrição de ingestão de cafeína a pacientes com a doença. Um estudo prospectivo longitudinal recente, contudo, não foi capaz de confirmar que tomar café se constitui em fator de risco para progressão mais rápida da DRPAD ¹⁵¹. Por outro lado, uma tese recentemente concluída revelou que o consumo elevado de cafeína da concepção à idade de 12 semanas acelerou a doença renal em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*, determinando aumento do índice cístico renal, aumento do volume dos rins e piora da função renal ¹⁵². Este estudo constituiu-se no primeiro estudo a avaliar os efeitos da cafeína sobre a progressão de DRPAD utilizando um modelo animal ortólogo à doença.

O tabagismo também tem sido avaliado como um fator de risco ambiental potencialmente associado à progressão da DRPAD. Vale notar que estudos anteriores já demonstraram que, pelo menos em homens, a exposição à fumaça de cigarro aumenta o risco de pacientes com DRC evoluírem para DREF ⁷⁹. Estudos pré-clínicos mostraram que nicotina aumenta os níveis de vasopressina ¹⁵³, enquanto um estudo clínico associou independentemente tabagismo e progressão da doença renal na DRPAD ⁹⁴. Outro estudo revelou que o tabagismo favorece a evolução para DREF em indivíduos do sexo masculino com DRPAD ⁹³. Interessantemente, contudo, enquanto o risco de evoluir para DREF foi substancialmente mais alto em fumantes sem história de tratamento com iECA, a razão de probabilidade para tal evolução em fumantes com história de tratamento com iECA não foi significativa. As razões desses achados permanecem incertas. Um trabalho recente, contudo, mostrou que tabagismo não afetou a sobrevida renal na DRPAD, não confirmando seu efeito sobre a aceleração da doença ⁹⁵. Além deste cenário não resolvido, não sabemos se o efeito renal negativo reportado do tabaco segue mecanismos comuns a todas as formas de DRC ou se baseiam principalmente em ações deletérias específicas à DRPAD. Para abordar com robustez essas questões, fazia-se fundamental estudar os efeitos do tabagismo em um modelo *in vivo* ortólogo à doença humana. Nosso estudo realizou tal análise.

Nosso trabalho contemplou todos os elementos fundamentais à melhor capacidade de tradução de um estudo experimental à realidade da doença humana. O modelo animal escolhido é ortólogo à DRPAD tipo 1 e o fenótipo renal desenvolvido pelos camundongos testes reproduz as manifestações da enfermidade humana. Além disso, dado que este trabalho seria um estudo de

prova de princípio, precisávamos submeter os animais ao tabagismo dentro de um protocolo capaz de estimular cystogênese e/ou crescimento cístico seguindo todos os mecanismos potenciais de patogênese. Precisávamos, também, de um modelo animal compatível com a análise de um agente agressor crônico e um seguimento longo o suficiente para detectar variações potenciais das várias anormalidades biológicas associadas à DRPAD. Para tanto, trabalhamos com doses altas de exposição à fumaça de cigarro, mas equivalentes às utilizadas em estudos prévios ¹¹²⁻¹¹⁴, durante todo o período de análise dos animais. Nesse sentido, a exposição ao tabagismo ocorreu da concepção à idade de 18 semanas e as análises fundamentais foram realizadas nas duas últimas semanas. Após demonstrar a viabilidade do desenho experimental, estudamos e comparamos os grupos experimentais quanto à função renal, carga cística renal, tamanho dos rins, proliferação celular, apoptose e fibrose renal, além de dois parâmetros sistêmicos, sobrevida e peso corporal. Analisamos, por fim, aspectos associados a outro órgão alvo da DRPAD, o coração. Tais análises e respectivas comparações incluíram função cardíaca, apoptose, fibrose e peso do órgão.

Após um período bastante longo de crescimento do volume dos rins, durante o qual a função renal se mantém preservada ou lentamente declinante, pacientes com DRPAD entram em uma fase de declínio relativamente rápido da TFG. A perda de função renal, particularmente a evolução para DREF, constitui-se no marco fenotípico funcional principal da DRPAD. Vale notar que o tabagismo, além de aumentar o risco de DRC atingir DREF, pode também causar albuminúria e/ou proteinúria ^{78, 79}. Estudos anteriores documentam que exposição à fumaça de cigarro promove aumento da parede das arteríolas dos rins e se associa a alterações hemodinâmicas renais capazes de reduzir a perfusão do órgão ^{79, 108}. Diante dessa realidade, analisamos os efeitos do tabagismo sobre a função renal de nossos camundongos císticos. Os resultados revelaram que camundongos císticos fumantes apresentaram ureia sérica elevada em relação a animais císticos não fumantes na idade de 17 semanas, evidenciando um efeito deletério do tabagismo sobre a função renal de camundongos *Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}*. Observamos, contudo, que a exposição ao tabagismo determinou ação semelhante sobre animais não císticos, sugerindo que esta ação renal deletéria do tabaco sobre os camundongos císticos seja em grande monta não específica à doença de base. É possível que um componente substancial deste efeito não específico decorra de ações hemodinâmicas consequentes à exacerbação do sistema nervoso simpático e aumento da resistência vascular renal, à semelhança de observações anteriores ^{82, 83}. Esses achados não se acompanharam, contudo, de alterações das frações de excreção de Na^+ e de K^+ , nem de seus níveis séricos.

As análises ultrassonográficas conduzidas em camundongos de 16 semanas mostraram que a exposição ao tabagismo da concepção ao momento de avaliação aumentou significativamente o

índice cístico renal. Este efeito, certamente específico à doença renal decorrente da deficiência de *Pkd1*, demonstra um efeito deletério seminal deste agente sobre o fenótipo mais clássico da DRPAD. A análise dos dados e das imagens indica que parte substancial desse efeito ocorreu devido à aceleração do crescimento cístico. Nossos resultados e metodologia não permitem afirmar, no entanto, se a ação do tabagismo se estendeu a aceleração da cistogênese. É possível que a ação potencialmente indutora de mutações do tabaco ⁷³ tenha contribuído para a formação de novos cistos renais, ao causar mutações somáticas no alelo previamente normal de células tubulares em que o sistema Cre-lox tenha inativado apenas uma cópia de *Pkd1*. Este fenômeno, previamente descrito para outros genes alvo ^{109, 110}, teria ocorrido durante a fase de desenvolvimento renal, comportando-se como o segundo evento determinante da cistogênese. Outra possibilidade é que ações potenciais de indução de mutações somáticas do tabagismo também tenham atingido células do rim maduro onde o sistema Cre-lox tenha inativado apenas uma cópia de *Pkd1*. Essa situação induziria segundos eventos em células pós-desenvolvimento, passíveis de evoluir para cistogênese na presença de um terceiro evento. Nesse cenário, áreas isquêmicas induzidas pelos efeitos hemodinâmicos do tabagismo ¹⁰⁸ poderiam sofrer o efeito de um terceiro golpe, cursando com a formação de novos cistos renais. A demonstração potencial de que o tabagismo aumentou a taxa de cistogênese, contudo, requer estudos posteriores com metodologias que permitam tal análise. Por ora, nossa observação de aceleração da doença cística induzida por exposição ao tabagismo em camundongos císticos sugere que a exposição crônica a este agente agressor atue sobre um pilar fundamental da progressão da doença renal na DRPAD: o crescimento cístico.

A proliferação anormalmente alta das células de revestimento cístico constitui uma das alterações clássicas do fenótipo renal da DRPAD. Em linha com os resultados anteriores, as análises imunoistoquímicas para Ki-67 revelaram que a taxa de proliferação celular no epitélio cístico foi maior nos animais fumantes que não fumantes. Pudemos constatar, contudo, que o efeito de aumento da proliferação celular determinado pelo tabagismo também ocorreu em células tubulares de rins de camundongos não císticos. É possível que a ausência de significância deste efeito em células tubulares de rins císticos tenha ocorrido pelo fato de tais células já apresentarem proliferação basal aumentada, uma vez que esta taxa foi maior em rins CI que NC. O aumento do índice cístico em resposta ao tabagismo sugere que o efeito pró-proliferativo do tabaco, embora não específico à deficiência de *Pkd1*, seja particularmente importante no nível das células de revestimento cístico, desempenhando um papel essencial no crescimento cístico induzido pelo tabagismo. A observação de que a nicotina promove proliferação de células musculares lisas da aorta ¹⁰¹, de células epiteliais brônquicas e de células não neuronais do tecido nervoso ¹⁰⁴, associada ao fato de ser eliminada na urina, levanta a hipótese de que a ação pró-proliferativa do tabagismo

em nossos animais possa ter sido exercida por esse componente.

As análises de fibrose renal foram também consistentes com um efeito deletério do tabagismo sobre o rim cístico. Embora um aumento de índice de fibrose renal tenha sido observado em rins císticos e não císticos de camundongos fumantes, o efeito sobre os rins císticos foi muito maior, revelando uma ação deletéria relativamente específica aos animais císticos deficientes em *Pkd1*. Vale notar, ainda, que nossos resultados confirmam achados anteriores de que rins císticos já apresentam de base um índice de fibrose renal maior que rins não císticos ⁶⁸. De fato, fibrose renal progressiva constitui-se em um processo criticamente associado à progressão da DRPAD ⁴⁶. Nosso achado de aceleração da fibrose renal determinada pelo tabagismo em camundongos císticos sugere que este agente atue sobre um segundo pilar do mecanismo de progressão da doença renal na DRPAD: a fibrose renal.

As observações de que o tabagismo determinou aumento do índice cístico nos animais CIF mas não se acompanhou de um aumento significativo da razão peso renal/peso corporal na idade de 18 semanas, mesmo na vigência de um menor peso corporal, sugere que o volume de parênquima renal tenha diminuído nos camundongos císticos fumantes. Essa observação é compatível com a piora de função renal apresentada pelos camundongos CIF, e sugere que o aumento detectado de fibrose renal possa ter sido um importante contribuinte para a provável redução do parênquima renal. Vale atentar que a razão peso renal/peso corporal não diferiu entre camundongos não císticos fumantes e não fumantes.

É importante destacar que o desenvolvimento progressivo de fibrose renal é consequente a um processo inflamatório prévio, que o tabagismo constitui-se num estímulo pró-inflamatório ¹⁰⁰ e que a inflamação exerce um papel significativo na evolução da doença renal associada à DRPAD ⁴⁴. De fato, o sistema pró-inflamatório encontra-se mais ativo e o sistema anti-inflamatório menos ativo em pacientes com DRPAD ⁴⁴, e a excreção urinária de MCP-1 é geralmente aumentada nesses indivíduos ⁴⁵. Nesse mesmo sentido, Karihaloo *et al* mostraram que macrófagos contribuem para o crescimento cístico em um modelo de camundongo cístico ortólogo à DRPAD tipo 1 ¹⁵⁴. Diante desse cenário, também avaliamos a expressão renal dos genes *Il1b* (*Interleukin1-beta*) and *Tgfb1* (*Transforming growth factor beta-1*) em resposta ao tabagismo. Não encontramos, contudo, aumento significativo de expressão desses genes em rins de animais CIF comparados a CI. É possível que estes resultados tenham ocorrido devido à grande variabilidade entre animais, uma vez que os níveis de *Il1b* and *Tgfb1* foram numericamente mais elevados em camundongos CIF que CI.

Outros elementos importantes ligados à patogênese da doença renal da DRPAD são a

apoptose ⁹⁶ e o desbalanço redox ⁴⁹. É interessante notar que pacientes com DRPAD apresentam níveis diminuídos de glutathiona peroxidase e superóxido dismutase ⁵⁶. No mesmo sentido, níveis plasmáticos e renais de glutathiona peroxidase mostraram-se reduzidos em modelos animais de doença renal policística ⁵⁷. Vale observar que entre as consequências mais expressivas da geração elevada de espécies reativas de oxigênio (ERO) estão a apoptose e a indução de resposta inflamatória ^{50, 51}. Dada a relação entre desequilíbrio oxidantes/antioxidantes e DRPAD somado ao fato de que o uso crônico de tabaco induz estresse oxidativo e lesões em células endoteliais ⁷⁴ e que substâncias do cigarro reduziram os níveis de glutathiona em células epiteliais de pulmão de camundongos ¹⁰⁰, também analisamos alterações potencialmente induzidas pelo tabagismo sobre o estado redox. Nesse contexto, quantificamos os níveis renais de TBARS e glutathiona nos grupos analisados de camundongos. Nossos resultados mostraram que o tabagismo reduziu os níveis de glutathiona nos rins císticos, um efeito também presente em animais não císticos. Esses dados sugerem que o estresse oxidativo também participe do efeito prejudicial que o tabagismo exerce sobre a doença renal associada à deficiência de *Pkd1*, embora esse efeito não tenha sido específico para essa condição.

Apoptose é outro elemento patogênico associado à DRPAD ⁹⁶. Nicotina, por sua vez, pode induzir ou inibir apoptose em diferentes tipos de células ^{101, 102}. Nesse cenário, analisamos os efeitos do tabagismo crônico sobre apoptose renal em nosso modelo animal. Nossos resultados mostraram, por meio de marcação para caspase-3 ativa, um aumento da taxa de apoptose em células tubulares de camundongos CI que NC, assim como em animais CIF que NCF e NC. Um pequeno efeito pró-apoptótico do tabagismo também foi detectado em rins não císticos, enquanto não foram observadas diferenças significativas entre os animais CIF e CI, tanto no nível de células tubulares quanto de epitélios císticos. Esses dados sugerem que aumento de apoptose não contribua para o efeito deletério do tabagismo sobre os rins císticos.

Estudos recentes, um deles de nosso grupo, marcaram a compreensão das bases moleculares, celulares e orgânicas da cardiomiopatia associada à DRPAD ^{67, 68, 70, 72}. Tais estudos amparam o papel fundamental da deficiência gênica, de *PKD1* ou de *PKD2*, no desenvolvimento deste fenótipo. É importante atentar, contudo, que outros fatores também podem contribuir para a deterioração cardíaca na DRPAD; entre eles, destaca-se a hipertensão arterial ¹⁵⁵. Dados os efeitos cardiovasculares nocivos associados ao tabagismo, bem como os efeitos celulares determinados por sua ação crônica, também analisamos os efeitos do tabagismo sobre o fenótipo cardíaco de camundongos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}. Nossa análise ecocardiográfica confirmou nossos dados anteriores de menor FEVE em camundongos CI que NC ⁶⁸. Ela também revelou valores reduzidos em animais CIF comparados a NC, enquanto não foi observada diferença significativa entre

camundongos císticos fumantes e não fumantes. A FEnVE, entretanto, foi menor nos camundongos CIF comparados a NCF, uma diferença não observada entre animais CI e NCF. Uma tendência não significativa de redução de S' foi observada em camundongos CIF, mas não em CI, comparados a NC ($p=0.083$). Interessantemente, o tabagismo piorou vários parâmetros estruturais em animais císticos. Camundongos CIF apresentaram DIVEs/PC e DIVEd/PC aumentados em relação a animais CI e NCF, VVEs/PC aumentado em relação a NCF e AE/PC aumentado em relação a CI. Esses dados sugerem que o tabagismo exerça efeitos deletérios estruturais, e provavelmente sistólicos, sobre o coração de camundogons císticos, efeitos associados à deficiência de *Pkd1*. Vale notar que MVE/PC não diferiu entre os grupos experimentais, em conformidade com os resultados da razão peso do coração/peso corporal, que também revelaram ausência de diferenças significantes entre animais CIF, CI, NCF e NC.

Para avaliar o desempenho miocárdico com maior sensibilidade, também analisamos *strain* e *strain rate*^{121, 156}. A deformação miocárdica foi impactada de forma negativa pelo tabagismo. Este efeito prejudicial foi caracterizado por valores menores de *strain* circunferencial e taxa de *strain* circunferencial em camundongos CIF que em CI, NCF e NC. Confirmamos, ainda, valores mais baixos em animais CI comparados a NC⁶⁸. Tendências não significantes observadas para *strain* radial e taxa de *strain* radial apontam para a mesma direção. Tais achados indicam que o efeito deletério do tabagismo sobre a deformação miocárdica é provavelmente associado ao estado de deficiência de *Pkd1*.

A taxa de apoptose cardíaca também foi analisada por meio de marcação para caspase-3 ativa. Nossos resultados corroboram achados anteriores, revelando uma maior taxa de apoptose em tecido cardíaco de camundongos císticos que não císticos⁶⁸. Os animais expostos ao tabagismo, contudo, císticos e não císticos, não apresentaram elevação na taxa de apoptose cardíaca comparados a seus respectivos controles. Tal achado sugere que apoptose não esteja envolvida no efeito do tabagismo sobre o coração de animais císticos.

Nossos resultados confirmaram dados prévios de aumento de fibrose cardíaca em camundongos císticos⁶⁸ e revelaram áreas fibróticas maiores em corações de animais císticos, fumantes e não fumantes, que em corações de camundongos não císticos, fumantes e não fumantes. A ausência de diferenças significantes entre animais CIF e CI e entre camundongos NCF e NC, por sua vez, sugere que tabagismo não aumente fibrose cardíaca em camundongos císticos e não císticos.

Nossos dados revelaram maior PAM em animais CI que em CIF, NC e NCF.

Interessantemente, vários estudos relataram níveis mais baixos de pressão arterial em indivíduos fumantes em comparação com não fumantes ¹⁵⁷⁻¹⁶⁶. Esta observação pode ser explicada em certa medida por um efeito redutor do tabagismo sobre a massa corporal ¹⁶⁷. O potencial efeito redutor do tabagismo sobre a PAM observado em camundongos císticos, portanto, pode se basear em seu efeito redutor sobre o peso corporal.

Nossas análises envolvendo um terceiro órgão alvo da DRPAD, o fígado, restringiram-se à razão peso do fígado/peso corporal. Não detectamos diferenças significantes em tal razão entre os grupos.

Também investigamos efeitos sistêmicos da longa exposição ao tabagismo sobre nossos camundongos. Não identificamos diferença significativa de sobrevida na idade de 18 semanas entre os vários grupos. Uma tendência não significativa de menor sobrevida para animais CIF em comparação a NC, no entanto, sugere a possibilidade de que a composição deficiência em *Pkd1* e tabagismo determine uma diminuição de sobrevida. A análise de tal possibilidade, contudo, requer um estudo envolvendo um número maior de animais. Interessantemente, a exposição ao tabagismo determinou redução do peso corporal em animais císticos, um efeito não observado em camundongos não císticos. Vale notar que um estudo prévio em ratos mostrou que o tabagismo reduziu o peso corporal ¹¹⁶. No nosso estudo, contudo, este efeito sistêmico do tabagismo foi específico para o estado de deficiência gênica do animal. Tal observação expande o conceito da DRPAD como doença sistêmica, demonstrando, em camundongos *Pkd1^{flox/flox}:Nestin^{cre}*, que um estímulo externo pode aflorar um fenótipo de natureza global não presente no estado basal de deficiência gênica. Estudos futuros dirigidos a esta questão, contudo, deverão incluir a mensuração da ingestão calórica dos animais, bem como sua taxa metabólica, de modo a distinguir efeitos primários de secundários do estado de deficiência de *Pkd1*.

Nossos achados indicam, portanto, que a exposição crônica ao tabagismo desde a concepção amplia dois processos decisivos à progressão da DRPAD em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*: crescimento cístico e fibrose renal. Tais processos se acompanharam de redução da função renal. Nossos resultados sugerem que proliferação celular aumentada contribua para o crescimento cístico e mostram que o tabagismo reduziu os níveis renais de glutathione. Efeitos adversos do tabagismo também foram observados em rins de animais não císticos, embora em menor grau. Nossos dados revelaram, também, consequências negativas do tabagismo sobre o fenótipo cardíaco de camundongos císticos. Dadas as similaridades entre a DRPAD humana e o modelo animal ortólogo estudado, os efeitos deletérios do tabagismo observados em animais císticos devem provavelmente se aplicar a pacientes com DRPAD.

Conclusões

CONCLUSÕES

Exposição ao tabagismo desde a concepção aumentou a taxa de crescimento cístico em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*.

Nossos achados sugerem que um efeito pró-proliferação celular do tabagismo contribua para o maior crescimento cístico renal.

Exposição crônica ao tabagismo acelerou a fibrose renal em camundongos císticos, um efeito presente em muito menor intensidade em animais não císticos.

O tabagismo promoveu redução da função renal nos camundongos císticos, um efeito também detectado em animais não císticos.

Exposição crônica ao tabagismo determinou redução dos níveis renais de glutathione em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*, efeito também observado em animais não císticos.

Nossos resultados sugerem que o tabagismo determine efeitos deletérios estruturais, e provavelmente sistólicos, sobre o coração de camundongos císticos deficientes em *Pkd1*.

O tabagismo crônico exerceu um efeito deletério sobre a deformação miocárdica em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*.

Exposição ao tabagismo desde a concepção reduziu o peso corporal apenas em camundongos císticos, indicando que este efeito sistêmico se associou ao estado de deficiência em *Pkd1*.

Nossos achados sugerem que o tabagismo induza efeitos deletérios específicos e não específicos sobre a progressão da doença renal associada à DRPAD.

A natureza de nosso modelo animal sugere que os efeitos deletérios do tabagismo observados em animais císticos devam provavelmente se aplicar a pacientes com DRPAD.

Anexos

ANEXOS

ARTIGO EM REVISÃO NO PERIÓDICO JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF
NEPHROLOGY

Smoking accelerates renal cystic disease and worsens cardiac phenotype in *Pkd1*-deficient mice

Marciana V. Sousa¹, Andressa G. Amaral¹, Bruno E. Balbo¹, Elieser H. Watanabe¹, Marcelo D. Tavares², Renato A. Hortegal², Camila Rocon², Leandro E. Souza², Isac Castro¹, Maria C. Irigoyen², Vera M. Salemi², and Luiz F. Onuchic^{1,*}.

¹Divisions of Nephrology and Molecular Medicine, Department of Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil; ²Heart Institute, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Running title: Smoking in *Pkd1*-deficient mice

*Correspondence should be addressed to:

Luiz F. Onuchic, MD, PhD

University of São Paulo School of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine

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

Fax: 55-11-3061-8361

Email: lonuchic@usp.br

Keywords: Autosomal dominant polycystic kidney disease, *Pkd1* deficiency, Smoking, Cyst growth, Renal dysfunction, Cardiac phenotype

SIGNIFICANCE STATEMENT

Smoking has been independently associated with renal disease progression in ADPKD, although a later study has not confirmed this. Recent studies, in addition, support a fundamental role of *PKD1* or *PKD2* deficiency in ADPKD-associated cardiomyopathy. To investigate the renal and cardiac effects of chronic smoking on ADPKD, we analyzed such effects on a cystic mouse orthologous to ADPKD1. Smoking accelerated cystic growth and renal fibrosis in these cystic mice, and reduced renal function and kidney levels of glutathione. Our findings also suggest that increased cell proliferation contributed to cyst growth and revealed detrimental consequences on the cardiac phenotype. Given the similarities between human ADPKD and the studied animal, these deleterious effects of smoking are likely to apply to ADPKD patients.

ABSTRACT

Background: Smoking has been independently associated with renal disease progression in ADPKD, although a later study has not confirmed this. It is unknown whether smoking specifically worsens ADPKD-associated cardiomyopathy.

Methods: To investigate these potential associations, cystic *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} and noncystic *Pkd1*^{flox/flox} mice were not exposed (CY and NC, respectively) or exposed to smoking (CYS and NCS, respectively) from conception to 18 weeks. Their phenotypes were analyzed at 13-18 weeks.

Results: SUN was higher in CYS than CY and in NCS than NC. Renal cystic index and cyst-lining cell proliferation, but not apoptosis, were increased in CYS compared to CY. Tubular cell proliferation and apoptosis were higher in CY than NC and in CYS than NCS kidneys. Renal fibrosis was increased in CYS compared to CY and, at much lower levels, in NCS compared to NC. Renal glutathione concentration was lower in CYS than CY and in NCS than NC. Left ventricular ejection fraction was decreased in CYS and CY compared to NC. Cardiac structural parameters were also altered in CYS in comparison to CY and NCS. Circumferential strain and strain rate were lower in CYS than CY and NCS. Cardiac apoptosis and fibrosis did not differ between CYS and CY and between NC and NCS. Survival at 18 weeks did not differ among the groups but body weight was lower in CYS than CY.

Conclusion: Our findings showed that smoking aggravated the renal and cardiac phenotypes of *Pkd1*-deficient cystic mice, suggesting that similar effects are likely to occur in human ADPKD.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common life-threatening monogenic human disease, with prevalences of 1:543 to 1:4000 in different populations¹. This disease is responsible for 5-10% of patients who reach end-stage kidney disease (ESKD), its main medical burden¹. Mutations in *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) account for 64-85% of cases whereas almost all remaining ones are caused by mutations in *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*)²⁻⁴. Mutations in *GANAB* (*glucosidase II α subunit*) were identified in an absolute minority of cases⁵. Although the kidney phenotype is predominant, ADPKD is a systemic disorder, comprising a number of extrarenal manifestations such as liver cysts, intracranial aneurysm and cardiac valve and myocardial abnormalities^{6, 7}.

Clinical studies have reported accelerating effects of environmental agents on kidney disease in ADPKD, including high salt intake⁸ and smoking^{9, 10}. A recent report, however, found that smoking status did not influence renal survival in this disease¹¹. Similarly, *in vitro* experimental data suggested a detrimental effect for caffeine¹² but was not confirmed by a recent clinical study¹³. While conclusions about the effects of smoking on ADPKD became controversial, the possible mechanisms involved in such effects remain also unclear.

Smoking was found to be a risk factor of progression to ESKD, at least in men, in patients with chronic kidney disease (CKD)¹⁴. Its potential detrimental actions on the kidneys include endothelial lesion¹⁴; inflammatory and pro-proliferative effects; redox imbalance¹⁵; albuminuria¹⁶; decrease in renal plasma flow and glomerular filtration rate^{17, 18}; and increase in sympathetic activity and renal vascular resistance^{17, 18}. The specific effects of smoking on the ADPKD kidney, however, are unclear. Given the nature of tobacco adverse consequences and the properties of polycystins 1 and 2, the *PKD1* and *PKD2* products, it is unknown whether significant effects of smoking on ADPKD are disease-specific. Specific effects could potentially include acceleration of cyst growth,

cystogenesis, renal fibrosis and/or hemodynamic dysfunction.

Smoking is also associated with increased risk of cardiovascular disease in CKD and arterial calcification in ESKD patients¹⁹. Several studies have revealed distinct aspects of cardiac structural alterations and/or dysfunction in *Pkd1* and *Pkd2*-deficient mouse models²⁰⁻²⁵. The relevance of such data is supported by the association observed between ADPKD and idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM)⁷. It is unknown, however, whether smoking has specific detrimental effects on the ADPKD heart, in addition to its known deleterious cardiac consequences.

To appropriately address the potential association between smoking and ADPKD, as well as the aforementioned related questions, we analyzed the effects of chronic exposure to tobacco on renal and cardiac phenotypes of a cystic mouse orthologous to ADPKD1, phenotypically similar to human ADPKD. Smoking aggravated the renal and cardiac phenotypes, suggesting that similar effects are also likely to occur in human ADPKD.

METHODS

Mouse model

Cystic mice were generated based on a *Pkd1* floxed allele (*Pkd1*^{flox}) with loxP sites positioned in introns 1 and 4 and a neomycin cassette flanked by FRT sites located in intron 1²⁶. Excision of exons 2-4 was induced by expression of Cre recombinase under the control of the Nestin promoter. *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} animals (CY) were generated and maintained on a C57BL/6 background, with a mosaic pattern of allele inactivation defined by Nestin expression. These mice display a mild to moderate renal cystic phenotype that resembles human ADPKD. Genotyping for *Pkd1*^{flox} and *Nestin*^{cre} was carried out using specific PCR reactions. *Pkd1*^{flox/flox} noncystic animals (NC) were employed as controls.

All experiments were performed in male mice and in accordance with international standards of animal care and experimentation.

Exposure to cigarette smoke

Female *Pkd1*^{flox/flox} noncystic mice of reproductive age were exposed to smoking and mated with *Pkd1*^{flox/flox};*Nestin*^{cre} cystic males not exposed to it. The mating system was temporary and polygamous. Once copulation was confirmed, pregnant females were isolated in individual cages. Tobacco exposure was extended throughout the gestational period and the postnatal trial. Cystic and noncystic mice were exposed to cigarette smoke (CYS and NCS, respectively) from conception to 18 weeks of age. Control groups included CY and NC animals not exposed to smoking.

The smoking protocol was carried out using a previously described system²⁷ and comprised two 30-min periods/day, with a minimum interval of 4 h, five times/week. Seven to nine cigarettes (Derby red pack, Souza Cruz, Rio de Janeiro, Brazil) were burned per period, following a priorly established protocol^{28, 29}. Carbon monoxide (CO) concentration was monitored inside the smoking box with a CO sensor (Toxi-Oxy, Biosystems, Connecticut) and maintained at 250-350 ppm, a range associated with non-toxic carboxyhemoglobin levels³⁰.

Biochemical determination of serum urea nitrogen

Blood samples were collected by retro-ocular access. Serum urea nitrogen (SUN) was determined using an enzymatic-colorimetric method (Urea CE kit, Labtest, MG, Brazil).

Renal ultrasonographic evaluation

Renal ultrasonographic analysis was performed in CYS and CY mice using the Vevo 2100

equipment (VisualSonics Inc., Toronto, Canada) with a 40-mHz transducer. The animals were anesthetized with isoflurane and two-dimensional images were acquired for each kidney. The three renal axes were measured and an axial-cut film of 3 s and 200 images was generated. Renal volume was calculated using the ellipsoid volume modified equation ³¹ while cyst volume was obtained based on its diameter and the assumption of a spherical structure. The renal cystic index was the ratio between the sum of the cyst volumes of both kidneys and the total volume of both organs.

Echocardiographic analyses and strain assessment

Echocardiographic assessment was performed with the same device and basic procedures used for renal ultrasonography. Image acquisition in one-dimensional mode (M-mode) was used for analysis of left ventricular internal diameter at diastole (LVIDD) and at systole (LVIDS), for the calculations of the left ventricular shortening fraction (LVSF) and left ventricle mass (LVM), and to obtain the left atrium diameter (LA). Two-dimensional mode (B-mode) was used for the analysis of LV volume in diastole (LVDV) and systole (LVSV), measures used in the calculation of LV ejection fraction (LVEF) using the Simpson method³². Analyses of mitral valve deceleration time (DT) and mean pulmonary artery pressure (PAP) were performed with pulsatile Doppler (PD)³³. Tissue Doppler (TD) imaging, in turn, allowed the acquisition of systolic velocity (S'), LV isovolumetric relaxation time (IVRT) and LV myocardial performance index (MPI). Velocity-time integral of right ventricular outflow tract length (VTI_{RVOT}) and right ventricular myocardial performance index (RVMPI) were also acquired with TD.

Using speckle-tracking strain analysis of two-dimensional gray-scale echocardiographic images acquired from the parasternal short and long axes, strain and strain rate were quantified on the circumferential, radial and longitudinal axes. Images were acquired using the speckle-tracking algorithm at 200 frames/s rate and 11-mm depth³⁴.

Direct measurement of mean arterial blood pressure

Given the invasive nature of direct assessment of mean arterial blood pressure (MAP), independent CY, CYS, NC and NCS groups were used only for this purpose. The animals were anesthetized with isoflurane, followed by insertion of a 4.0-cm-long, 0.40-mm external-diameter and 0.25-mm internal-diameter catheter (Micro-Renathane, Braintree Science Inc) in the right carotid artery³⁵. This catheter was externalized at the animal nape with the aid of a trocar and coupled to a pressure transducer connected to a data acquisition system (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA) for MAP measurement (mmHg). The data recording protocol was conducted 24 h after recovery from surgery, allowing adaptation to the system.

Organ harvesting

Eighteen-week-old mice were anesthetized with intraperitoneal thiopental 0.4 mg/g of body weight (BW) and submitted to thoracotomy, insertion of a catheter into the LV and a cut in the right atrium for blood drainage. Saline solution was infused until complete exsanguination, followed by immediate harvesting and weighing of kidney, heart and liver.

Immunohistochemical evaluation of cell proliferation and apoptosis

Cell proliferation was analyzed using an anti-Ki-67 monoclonal antibody (ab16667, ABCAM, Cambridge, UK). Each kidney section had eight cortical and two medullary fields analyzed at 400x magnification. Cell proliferation rate was calculated as the ratio cells with positive nuclei/total cells.

Apoptosis was evaluated with an anti-active caspase-3 antibody (CP229B, BioCare Medical,

Concord, CA). Selection of kidney fields followed the same protocol used for Ki-67. Each heart section had 10 random fields analyzed. Quantification was performed as the ratio positive cells/total cells.

Tissue fibrosis quantification

Kidney and heart sections were stained with 0.2% picrosyrius (Sirius Red, Direct Red 80, Milwaukee, WI). Positive staining was analyzed and quantified using an optical polarizer (BX-51, Olympus, Hatagaya, Japan) with a light polarizer. Each kidney section had 12 cortical and three medullary fields scanned whereas 10 random fields were analyzed for each cardiac tissue slide, at 400x magnification. Image ProPlus 6.0 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD) was used for image processing, allowing selection of reddish, orange or greenish birefringent shades for collagen quantification. Data were expressed as the ratio collagen content area/total area.

Quantification of *Il1b* and *Tgfb1* expression by real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from renal tissue using Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA samples were treated with DNase (RQ1 RNase free DNase, Promega, Fitchburg, WI) and reverse transcription was performed with the ImProm-II kit (Promega, Fitchburg, WI). Real-time PCR reactions were carried out using the StepOne Plus equipment (Thermo-Fisher) and the *TaqMan* assay (Applied Biosystems, Warrington, UK) for the specific assays *Il1b* (Mm00434228_m1) and *Tgfb1* (Mm01178820_m1), as well as for the endogenous control *Gapdh* (Mm99999915_g1). Products of qPCR reactions were quantified using the relative $\Delta\Delta C_t$ method.

Analysis of redox metabolism

Glutathione (GSH) concentration was quantified in renal tissue using the Glutathione Fluorescent Detection kit (Arbor Assays, Michigan, USA) and standardized for protein content according to the manufacturer's instructions. Concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was also determined in kidney tissue, utilizing the OxiSelect TBARS assay kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), and normalized to protein content.

Statistical analyses

The data were classified in parametric and nonparametric based on the Shapiro-Wilks test. When parametric, comparisons of four independent groups with similar variances according to the Bartlett Test were performed using one-way analysis of variance with Tukey, least significant difference or Benjamini, Krieger and Yekutieli posttest; when variances differed, we utilized one-way analysis of variance for nonrepeated and nonhomoscedastic measurements with the Dunnett C posttest. Nonparametric data involving four experimental groups were analyzed using the Kruskal-Wallis test with Müller-Dunn, Simes-Hochber, Dwass-Steel-Christchlow-Fligner or Benjamini, Krieger and Yekutieli posttest. Comparisons of nonparametric data including two groups were performed employing the Mann–Whitney test. We accepted α risk $\leq 5\%$ and β risk $\leq 20\%$. Statistical programs included SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY), Systat 13.0 (Systat Software, San Jose, CA) and GraphPad 7.0 (Prism Software, GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

Smoking does not affect fertility and survival in cystic and noncystic mice

NC and CY mice were exposed to smoking from conception to 18 weeks of age. Pregnant females averaged seven pups per litter, the average litter size expected for C57BL/6 isogenic mice³⁶, indicating no significant embryonic lethality. The observed genotype frequencies also followed the Mendelian pattern of inheritance, with 51% Cre recombinase-positive offsprings, and no impact on the sex ratio was detected. Weaning was performed at 5 weeks due to reduced growth in smoking animals.

No significant difference in survival, assessed at 18 weeks, was detected among the groups. A nonsignificant trend of decreased survival, however, was observed in CYS compared to NC mice ($P=0.083$) (Figure 1A).

Exposure to smoking reduces body weight in cystic animals

CYS mice showed lower BW at 16 weeks than CY [23.0 (22.1-23.7) vs 27.2 g (26.1-28.0); $P<0.001$] and a trend of decrease compared to NC ($P=0.056$) (Figure 1B). CY animals, in turn, presented higher BW than NC and NCS ($P<0.05$ and $P<0.001$).

A higher kidney weight (KW)/BW at 18 weeks ratio was observed in CYS mice compared to NCS [18.7 (15.4-30.9) vs 13.2 mg/g (12.1-13.7); $P<0.001$] and NC [vs 13.6 mg/g (12.3-14.8); $P<0.01$] (Figure 1C). CY animals also showed a higher KW/BW than NCS ($P<0.01$) and NC ($P<0.05$). Heart weight (HW)/BW and liver weight (LW)/BW did not differ among the four groups (Figures 1D and 1E).

Smoking worsens renal function in cystic and noncystic mice

SUN was higher at 17 weeks in CYS than CY [48.7 (40.1-54.1) vs 35.3 mg/dL (31.7-38.4); $P<0.05$] and NC mice [vs 31.0 mg/dL (29.2-34.9); $P<0.001$] (Figure 2A). NCS animals also presented increased SUN compared to NC controls ($P<0.01$). Our data showed no difference between the CY and NC groups.

Smoking aggravates renal cystic disease

Renal ultrasonography was performed at 16 weeks of age. CYS mice displayed a higher cystic index than CY [17.4% (6.0-31.7) vs 4.6% (2.7-8.4); $P<0.05$] (Figures 2B and 2C).

Exposure to smoking affects the cardiac phenotype in cystic animals

Echocardiographic assessment was performed at 16 weeks. Our results revealed reduced LVEF measured with the Simpson method in CYS and CY mice compared to NC but no significant difference between CYS and CY and between NCS and NC (Figure 3A, Table 1). LVSF was also diminished in CYS compared to NC and NCS mice, while a trend of reduced LVSF was observed in CY compared to NC animals ($P=0.065$). A trend of decreased S' was verified in CYS compared to NC ($P=0.083$).

Structural analyses revealed increased LVIDS/BW and LVIDD/BW in CYS animals compared to CY and NCS, and a trend of LVIDS/BW reduction in CYS comparing to NC ($P=0.055$) (Figures 3B and 3C, Table 1). Along this line, LVSV/BW was higher in CYS mice than NCF and a trend of increase was observed in CYS compared to CY and NC ($P=0.078$ and $P=0.078$). CYS mice displayed, moreover, increased LA/BW compared to CY. Significant differences were not detected

for LVM/BW.

Analysis of diastolic parameters did not reveal significant differences among the animal groups, despite a numerically higher IVRT in CYS animals (Figure 3D, Table 1). Deceleration time of mitral E wave (DT) did not differ among the groups.

MPI did not differ among the groups. PAP was reduced in CYS compared to CY and NC mice but no differences in VTI_{RVOT} and RVMPI were observed among the groups (Table 1).

Some myocardial strain parameters were also affected by smoking. Circumferential strain and circumferential strain rate were decreased in CYS compared to CY, NCS and NC mice (Figures 3E and 3F, Table 1). These parameters were also lower in CY than NC animals. CYS mice presented a decrease in radial strain in relation to NC and a trend of reduction compared to NCS ($P=0.087$) (Figure 3G, Table 1). A similar trend was observed in CY animals compared to NC ($P=0.058$). The radial strain rate, in turn, was lower in the CYS than NC mice while a trend towards reduction was detected in CYS compared to CY ($P=0.086$) and NCS ($P=0.062$) (Figure 3H, Table 1). We did not observe significant differences in strain parameters on the long axis.

Impact of smoking on blood pressure

Invasive mean arterial blood pressure (MAP) was obtained in 13-week-old mice, revealing higher values in CY compared to CYS (159.6 ± 23.4 vs 132.4 ± 16.2 mmHg; $P<0.01$), NC (vs 136.9 ± 6.3 mmHg; $P<0.05$) and NCS (vs 124.3 ± 12.9 mm Hg; $P<0.01$) (Figure 4).

Smoking increases proliferation of cyst-lining cells

Ki-67-based assays showed higher proliferation of tubular epithelial cells in CY than NC kidneys [0.76% (0.53 - 1.60) vs 0.23% (0.19 - 0.27); $P<0.001$], an effect also observed in CYS compared to

NCS [2.36% (1.08-3.61) *vs* 0.92% (0.79-1.08); $P<0.05$] and NC organs [*vs* 0.23% (0.19-0.27); $P<0.001$] (Figures 5A and 5C). Smoking also increased tubular cell proliferation in noncystic animals, as revealed by increased values in NCS compared to NC mice [0.92% (0.79-1.08) *vs* 0.23% (0.19-0.27); $P<0.001$]. Although not significant, CYS kidneys showed a trend towards higher proliferation compared to CY ($P=0.060$). Interestingly, the proliferation rate of cyst lining cells was significantly higher in CYS than CY mice [2.40% (1.54-3.16) *vs* 1.31% (0.79-1.50); $P<0.05$] (Figures 5B and D).

Analyses of active caspase-3 staining profiles revealed a higher apoptotic rate of tubular epithelial cells in CY than NC kidneys [0.09% (0.08-0.17) *vs* 0.02% (0.00-0.02); $P<0.001$] (Figures 5E and 5G). This rate was also increased in CYS mice compared to NCS [0.27% (0.20-0.47) *vs* 0.04% (0.03-0.07); $P<0.05$] and NC animals (*vs* 0.02% (0.00-0.02); $P<0.001$). Likewise, smoking had a proapoptotic effect in noncystic kidneys, with a higher apoptotic rate in NCS than NC kidneys ($P<0.001$). No significant difference was observed between CYS and CY animals (Figures 5E and 5G). The degree of apoptosis in cyst-lining cells was not found to differ between CY and CYS mice (Figures 5F and H).

Apoptosis was increased in CY compared to NC hearts [0.73% (0.44-1.03) *vs* 0.40% (0.23-0.60); $P<0.05$] (Figures 5I and J). A trend towards higher apoptotic rates was also observed in CYS compared to NC mice ($P=0.053$).

Renal fibrosis increases with smoking exposure

Tissue fibrosis was quantified based on picrosirius staining, revealing a higher relative area of fibrosis in CYS than CY [1.20% (0.87-2.02) *vs* 0.34% (0.23-0.86); $P<0.05$], NCS [*vs* 0.13% (0.10-0.21); $P<0.001$] and NC kidneys [*vs* 0.06% (0.04-0.09); $P<0.001$] (Figures 6A and 6B). Renal fibrosis was also increased in CY compared to NCS ($P<0.001$) and NC mice ($P<0.001$), as well as in NCS compared to NC animals ($P<0.05$).

Cardiac fibrosis was increased in CY compared to NC [0.81% (0.70-1.49) *vs* 0.21% (0.09-0.38); $P<0.01$] and NCS mice [*vs* 0.26% (0.16-0.43); $P<0.05$] (Figures 6C and 6D). Our findings also revealed higher fibrosis indices in CYS than in NCS [1.10% (0.80-2.66) *vs* NCS; $P<0.01$] and NC hearts ($P<0.001$).

Renal levels of glutathione are reduced in cystic and noncystic mice submitted to smoking

Renal levels of GSH were lower in CYS than CY [107.9 $\mu\text{mol/mg}$ protein (98.7-118.1) *vs* 148.0 $\mu\text{mol/mg}$ protein (139.8-183.8); $P<0.01$], NCS [*vs* 139.8 $\mu\text{mol/mg}$ protein (124.1-159.0); $P<0.01$] and NC mice [*vs* 186.1 $\mu\text{mol/mg}$ protein (172.2-195.5); $P<0.01$] (Figure 7A). We also detected reduced GSH levels in NCS compared to NC kidneys ($P<0.05$). Quantitative analyses of lipid peroxidation (TBARS) in renal tissue did not reveal significant differences among the four groups (Figure 7B).

Smoking did not significantly affect *Il1b* and *Tgfb1* renal expression

The inflammatory status in renal tissue was analyzed in renal tissue by real-time RT-PCR. Expression levels of *Il1b* and *Tgfb1* did not significantly differ among the groups, despite higher numerical values in CYS (Figures 7C and D).

DISCUSSION

The identification of environmental risk factors for faster progression of ADPKD carries great medical interest, as the avoidance or cessation of such stimuli is expected to prevent acceleration or slow disease progression. Smoking has been investigated as one of these potential risk factors.

Preclinical studies have shown that nicotine increases vasopressin levels³⁷, which increases renal cyclic AMP and favors cyst growth³⁸. In addition, smoking has been independently associated with renal disease progression in this disorder¹⁰. Another clinical study revealed that male smokers with ADPKD display increased risk of reaching ESKD⁹. Interestingly, while the risk of progressing to ESKD was substantially higher in smokers with no history of ACE inhibitor (ACEi) use, the odds ratio for smokers submitted to this treatment history was not significant. The reasons for this finding remained unclear. Recent reports, however, found that smoking status did not affect renal survival in ADPKD¹¹ or that smoking history did not differ between progressor and nonprogressor patients³⁹. In addition to this unresolved scenario, it is unknown whether the reported tobacco-related effects follow mechanisms common to all forms of CKD or are mainly based on deleterious actions specific to ADPKD.

Our *Pkd1*-deficient mouse model reproduces the ADPKD renal cystic phenotype and the smoking protocol employed was early and long enough to detect potential deleterious effects at all several pathogenic steps, including cystogenesis, cystic growth, fibrosis, hemodynamics and other basic cellular alterations. To ensure this detection capacity, we worked with high exposure to cigarette smoke at doses equivalent to those used in previous studies^{28, 29}.

Smoking has been shown to affect the kidney in different ways. It can cause albuminuria and/or proteinuria, increase the renal arteriolar wall, and lead to hemodynamic changes associated with hypoperfusion^{16, 40}. Our results revealed higher SUN in CYS than CY animals as well as in NCS than NC mice, indicating that the deleterious effect of smoking on renal function was not specific to the underlying disease. It is possible that a significant component of this effect resulted from hemodynamic alterations induced by sympathetic exacerbation and increase in renal vascular resistance¹⁸.

Chronic exposure to smoking significantly increased the renal cystic index, revealing a marked deleterious effect on the most seminal phenotype of ADPKD. Data and image analyses indicate that

most of this effect occurred due to acceleration of cystic growth. Limitations of the employed methodology did not allow appropriate investigation into whether the smoking-related increase in cystic burden also involves acceleration of cystogenesis. It is possible that somatic mutations induced by tobacco contribute to the formation of new renal cysts, by affecting the previously normal *Pkd1* allele of tubular cells in which the Cre-lox system inactivated only one of the two copies. This phenomenon, previously described for other targeted genes^{41, 42}, would have occurred during renal development, behaving as the second hit for cystogenesis. Smoking could have also induced second hits in post-kidney development cells, allowing them to evolve to cystogenesis in the presence of a third hit⁴³. Two-hit cells localized in ischemic areas provoked by the hemodynamic effects of smoking could potentially acquire this third hit.

Our data showed higher cell proliferation rates in cyst epithelium of CYS than CY kidneys. Smoking also increased cell proliferation in tubular cells of noncystic kidneys. The lack of significant difference in tubular cell proliferation rates between CYS and CY mice, in turn, may have occurred due to an already increased baseline tubular cell proliferation in cystic mice. The increase in cystic index in response to smoking suggests that the tobacco propoliferative effect, although not specific to *Pkd1* deficiency, is particularly important at the cyst-lining-cell level, playing an essential role in smoking-induced cyst growth. A study carried out in aortic smooth muscle cells suggests that this propoliferative effect may be exerted by nicotine⁴⁴.

Smoking increased renal fibrosis in cystic and noncystic mice; this effect, however, was much higher in cystic kidneys. Our results confirm that cystic kidneys present increased levels of renal fibrosis²³ and suggest that smoking may stimulate renal fibrosis in ADPKD, a process critically associated with disease progression⁴⁵. We did not find, however, increase in *Il1b* and *Tgfb1* expression levels in cystic kidneys following exposure to smoking. It is possible that these results occurred due to high variability among animals, since *Il1b* and *Tgfb1* levels were numerically higher in CYS than CY mice. Interestingly, smoking led to cystic index increase in CYS animals without significant increase in KW/BW, suggesting parenchymal reduction in CYS kidneys.

Increased renal fibrosis may have been a significant contributor to this likely decrease in renal parenchyma.

Redox imbalance is another important component of ADPKD pathogenesis⁴⁶. ADPKD patients present decreased levels of glutathione peroxidase and superoxide dismutase⁴⁷. Additionally, chronic smoking induces oxidative stress and damages endothelial cells⁴⁸, and cigarette substances reduce glutathione levels in mouse lung epithelial cells¹⁵. Our results showed that smoking reduced glutathione levels in cystic kidneys, an effect also present in noncystic animals. These data suggest that oxidative stress may participate in the detrimental effect of smoking on *Pkd1*-deficient renal disease, although its induction is not specific to cystic kidneys.

Apoptosis is another pathogenic component in ADPKD⁴⁹. Nicotine, in turn, has been reported to induce or inhibit apoptosis in different cell types^{44, 50}. Tubular cell apoptosis was increased in CY compared to NC kidneys and in CYS comparing to NCS organs. Interestingly, a proapoptotic effect of smoking was detected in noncystic tubules but not in cystic kidneys, both at the tubular and cyst-lining cell levels. This suggests that increased apoptosis does not contribute to the deleterious effect of smoking on cystic kidneys.

Recent experimental studies support a fundamental role of gene deficiency, *PKD1* or *PKD2*, in the development of ADPKD-associated cardiomyopathy^{7, 23, 24, 51}. Other factors, including hypertension, may also contribute to cardiac deterioration in this disorder⁵². Smoking, in turn, is associated with harmful cardiovascular effects⁵³. Our data confirmed lower LVEF in CY than NC mice²³. They also showed decreased LVEF in CYS compared to NC, while it did not differ between CYS and CY animals. LVSF, however, was decreased in CYS compared to NCS mice, a difference not seen between CY and NCS, and a trend towards reduced S' was observed in CYS, but not CY, compared to NC (P=0.083). Notably, smoking worsened several structural parameters in cystic mice. CYS presented increased LVIDS/BW and LVIDD/BW compared to CY and NCS animals, increased LVSV/BW compared to NCS and increased LA/BW compared to CY. These data suggest that smoking exerts structural, and likely systolic, deleterious effects on the hearts of

cystic mice, which are associated with *Pkd1* deficiency.

In order to evaluate myocardial performance with higher sensitivity, we also analyzed strain and strain rate^{34, 54}. Myocardial deformation was negatively impacted by smoking. This detrimental effect was supported by lower circumferential strain and circumferential strain rate in CYS than in CY, NCS and NC mice. Nonsignificant trends observed for radial strain and radial strain rate pointed in the same direction. Such findings indicate that the effect of smoking on impairing myocardial deformation is likely associated with the *Pkd1*-deficient status.

Our data confirmed increased cardiac fibrosis in cystic mice²³. Larger fibrotic areas were detected in CYS and CY than NCS and NC hearts. The lack of significant differences between CYS and CY and between NCS and NC, in turn, suggests that smoking does not increase cardiac fibrosis in cystic and non-cystic mice. Our findings suggest, in addition, that apoptosis is not involved in the smoking effect upon the heart of cystic animals.

Our results revealed lower MAP in CYS mice than in hypertensive CY, reaching normotensive levels that did not differ from NC and NCS. Interestingly, several studies have reported lower blood pressure levels in smokers compared to nonsmokers⁵⁵⁻⁵⁷. This observation may be explained to a certain extent by an effect of smoking on decreasing body mass⁵⁸. The potential lowering effect of smoking on MAP observed in cystic mice, therefore, may be a consequence of its effect on reducing BW.

Survival was not significantly different at 18 weeks among the groups. A trend towards lower survival in the CYS group compared to NC, however, suggests the possibility that the coexistence of *Pkd1* deficiency and smoking exposure may have a detrimental effect on survival. Interestingly, smoking induced reduction in BW in cystic animals, an effect not observed in noncystic mice. This observation expands the concept that ADPKD is a systemic disease. Future studies addressing this issue should measure caloric intake and metabolic rate to distinguish between primary and secondary effects of *Pkd1* deficiency on BW.

Our findings showed that chronic exposure to smoking had a deleterious effect on the renal phenotype of *Pkd1*-deficient cystic mice, accelerating cystic growth and renal fibrosis as well as reducing renal function. Our results suggest that increased cell proliferation contributed to cyst growth and show that smoking reduced the renal levels of glutathione. Our data also revealed detrimental consequences of smoking on the cardiac phenotype of cystic mice. Given the similarities between human ADPKD and the studied orthologous animal model, the observed deleterious effects of smoking are likely to apply to ADPKD patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V.S. carried out experiments and drafted the paper; B.E.B carried out ultrasound analysis; L.E.S. and M.C.I. carried out the measurement of mean arterial blood pressure; V.M.S., M.D.M., R.A.H. and C.R. carried out echocardiographic procedures and analyses; E.H.W. and I.C. analyzed the data; A.G.A. drafted and revised the paper; L.F.O. designed and mentored the study, drafted and revised the paper; all authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Milton A. Martins and Fernanda Lopes for providing the smoking system and infrastructure and Victor Debbas for technical suggestions applied to redox analysis. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2015/17152-3 to LFO), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (fellowship to MVS) and Laboratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. This study utilized resources provided by the NIDDK-sponsored Baltimore Polycystic Kidney Disease Research and Clinical Core Center (grant P30DK090868).

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Chebib, FT, Torres, VE: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *Am J Kidney Dis*, 67: 792-810, 2016.
2. Peters, DJ, Sandkuijl, LA: Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. *Contrib Nephrol*, 97: 128-139, 1992.
3. Barua, M, Cil, O, Paterson, AD, Wang, K, He, N, Dicks, E, Parfrey, P, Pei, Y: Family history of renal disease severity predicts the mutated gene in ADPKD. *J Am Soc Nephrol*, 20: 1833-1838, 2009.
4. Pei, Y, Watnick, T: Diagnosis and screening of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 140-152, 2010.
5. Porath, B, Gainullin, VG, Cornec-Le Gall, E, Dillinger, EK, Heyer, CM, Hopp, K, Edwards, ME, Madsen, CD, Mauritz, SR, Banks, CJ, Baheti, S, Reddy, B, Herrero, JI, Bañales, JM, Hogan, MC, Tasic, V, Watnick, TJ, Chapman, AB, Vigneau, C, Lavainne, F, Audrézet, MP, Ferec, C, Le Meur, Y, Torres, VE, Harris, PC, Genkyst Study Group, HALTPoPKDG, Disease, CfRISoPK: Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am J Hum Genet*, 98: 1193-1207, 2016.
6. Pirson, Y: Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 173-180, 2010.
7. Paavola, J, Schliffke, S, Rossetti, S, Kuo, IY, Yuan, S, Sun, Z, Harris, PC, Torres, VE, Ehrlich, BE: Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 58: 199-208, 2013.
8. Torres, VE, Abebe, KZ, Schrier, RW, Perrone, RD, Chapman, AB, Yu, AS, Braun, WE, Steinman, TI, Brosnahan, G, Hogan, MC, Rahbari, FF, Grantham, JJ, Bae, KT, Moore, CG, Flessner, MF: Dietary salt restriction is beneficial to the management of autosomal dominant

polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 91: 493-500, 2017.

9. Orth, SR, Stöckmann, A, Conradt, C, Ritz, E, Ferro, M, Kreusser, W, Piccoli, G, Rambauser, M, Roccattello, D, Schäfer, K, Sieberth, HG, Wanner, C, Watschinger, B, Zucchelli, P: Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int*, 54: 926-931, 1998.

10. Ozkok, A, Akpinar, TS, Tufan, F, Kanitez, NA, Uysal, M, Guzel, M, Caliskan, Y, Alisir, S, Yazici, H, Ecder, T: Clinical characteristics and predictors of progression of chronic kidney disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center experience. *Clin Exp Nephrol*, 17: 345-351, 2013.

11. Cornec-Le Gall, E, Audrézet, MP, Rousseau, A, Hourmant, M, Renaudineau, E, Charasse, C, Morin, MP, Moal, MC, Dantal, J, Wehbe, B, Perrichot, R, Frouget, T, Vigneau, C, Potier, J, Jousset, P, Guillodo, MP, Siohan, P, Terki, N, Sawadogo, T, Legrand, D, Menoyo-Calonge, V, Benarbia, S, Besnier, D, Longuet, H, Férec, C, Le Meur, Y: The PROPKD Score: A New Algorithm to Predict Renal Survival in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 27: 942-951, 2016.

12. Belibi, FA, Wallace, DP, Yamaguchi, T, Christensen, M, Reif, G, Grantham, JJ: The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 13: 2723-2729, 2002.

13. Girardat-Rotar, L, Puhan, MA, Braun, J, Serra, AL: Long-term effect of coffee consumption on autosomal dominant polycystic kidneys disease progression: results from the Suisse ADPKD, a Prospective Longitudinal Cohort Study. *J Nephrol*, 31: 87-94, 2018.

14. Orth, SR: Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamics: influence on renal function. *J Am Soc Nephrol*, 15 Suppl 1: S58-63, 2004.

15. Lerner, CA, Sundar, IK, Yao, H, Gerloff, J, Ossip, DJ, McIntosh, S, Robinson, R, Rahman, I: Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS One*, 10:

e0116732, 2015.

16. Orth, SR: Cigarette smoking: an important renal risk factor - far beyond carcinogenesis. *Tob Induc Dis*, 1: 137-155, 2002.
17. Ritz, E, Benck, U, Franek, E, Keller, C, Seyfarth, M, Clorius, J: Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 9: 1798-1804, 1998.
18. Ritz, E, Benck, U, Orth, SR: Acute effects of cigarette smoking on renal hemodynamics. *Contrib Nephrol*, 130: 31-38, 2000.
19. London, GM, Marchais, SJ, Guérin, AP, Métivier, F: Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14: 525-531, 2005.
20. Boulter, C, Mulroy, S, Webb, S, Fleming, S, Brindle, K, Sandford, R: Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 12174-12179, 2001.
21. Wu, G, Markowitz, GS, Li, L, D'Agati, VD, Factor, SM, Geng, L, Tibara, S, Tuchman, J, Cai, Y, Park, JH, van Adelsberg, J, Hou, H, Kucherlapati, R, Edelmann, W, Somlo, S: Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet*, 24: 75-78, 2000.
22. Muto, S, Aiba, A, Saito, Y, Nakao, K, Nakamura, K, Tomita, K, Kitamura, T, Kurabayashi, M, Nagai, R, Higashihara, E, Harris, PC, Katsuki, M, Horie, S: Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet*, 11: 1731-1742, 2002.
23. Balbo, BE, Amaral, AG, Fonseca, JM, de Castro, I, Salemi, VM, Souza, LE, Dos Santos, F, Irigoyen, MC, Qian, F, Chammas, R, Onuchic, LF: Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice with phenotype rescue by galectin-3 knockout. *Kidney Int*, 90: 580-597, 2016.
24. Pedrozo, Z, Criollo, A, Battiprolu, PK, Morales, CR, Contreras-Ferrat, A, Fernández, C, Jiang, N, Luo, X, Caplan, MJ, Somlo, S, Rothermel, BA, Gillette, TG, Lavandero, S, Hill, JA: Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation*, 131: 2131-2142, 2015.

25. Kuo, IY, Kwaczala, AT, Nguyen, L, Russell, KS, Campbell, SG, Ehrlich, BE: Decreased polycystin 2 expression alters calcium-contraction coupling and changes β -adrenergic signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 16604-16609, 2014.
26. Piontek, KB, Huso, DL, Grinberg, A, Liu, L, Bedja, D, Zhao, H, Gabrielson, K, Qian, F, Mei, C, Westphal, H, Germino, GG: A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*, 15: 3035-3043, 2004.
27. Biselli, PJ, Lopes, FD, Moriya, HT, Rivero, DH, Toledo, AC, Saldiva, PH, Mauad, T, Martins, MA: Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res*, 44: 460-468, 2011.
28. Bracke, KR, D'hulst, AI, Maes, T, Moerloose, KB, Demedts, IK, Lebecque, S, Joos, GF, Brusselle, GG: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol*, 177: 4350-4359, 2006.
29. Huvenne, W, Pérez-Novo, CA, Derycke, L, De Ruyck, N, Krysko, O, Maes, T, Pauwels, N, Robays, L, Bracke, KR, Joos, G, Brusselle, G, Bachert, C: Different regulation of cigarette smoke induced inflammation in upper versus lower airways. *Respir Res*, 11: 100, 2010.
30. Toledo, AC, Magalhaes, RM, Hizume, DC, Vieira, RP, Biselli, PJ, Moriya, HT, Mauad, T, Lopes, FD, Martins, MA: Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*, 39: 254-264, 2012.
31. Nishiura, JL, Neves, RF, Eloi, SR, Cintra, SM, Ajzen, SA, Heilberg, IP: Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4: 838-844, 2009.
32. Esporcatte, BLB, Rocha, NN, Mello, DB, Dutra, K, Asensi, Lachtermacher, S, Goldenberg, RCdS, Carvalho, ACCd: High Resolution Echocardiography and the Myocardial Infarction Model in Mice. *Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc*, 23(3): 18-24, 2010.
33. Dabestani, A, Mahan, G, Gardin, JM, Takenaka, K, Burn, C, Allfie, A, Henry, WL: Evaluation of pulmonary artery pressure and resistance by pulsed Doppler echocardiography. *Am J Cardiol*,

59: 662-668, 1987.

34. Bauer, M, Cheng, S, Jain, M, Ngoy, S, Theodoropoulos, C, Trujillo, A, Lin, FC, Liao, R: Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res*, 108: 908-916, 2011.

35. Ceroni, A, Moreira, ED, Mostarda, CT, Silva, GJ, Krieger, EM, Irigoyen, MC: Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37: 490-495, 2010.

36. The Jackson Laboratory. [Available from: <https://www.jax.org/>]. 2018.

37. Cadnapaphornchai, P, Boykin, JL, Berl, T, McDonald, KM, Schrier, RW: Mechanism of effect of nicotine on renal water excretion. *Am J Physiol*, 227: 1216-1220, 1974.

38. Belibi, FA, Reif, G, Wallace, DP, Yamaguchi, T, Olsen, L, Li, H, Helmkamp, GM, Grantham, JJ: Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int*, 66: 964-973, 2004.

39. Brosnahan, GM, Abebe, KZ, Moore, CG, Rahbari-Oskoui, FF, Bae, KT, Grantham, JJ, Schrier, RW, Braun, WE, Chapman, AB, Flessner, MF, Harris, PC, Hogan, MC, Perrone, RD, Miskulin, DC, Steinman, TI, Torres, VE, Investigators, H-PT: Patterns of Kidney Function Decline in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Post Hoc Analysis From the HALT-PKD Trials. *Am J Kidney Dis*, 71: 666-676, 2018.

40. Arany, I, Grifoni, S, Clark, JS, Csongradi, E, Maric, C, Juncos, LA: Chronic nicotine exposure exacerbates acute renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F125-133, 2011.

41. Liu, J, Willet, SG, Bankaitis, ED, Xu, Y, Wright, CV, Gu, G: Non-parallel recombination limits Cre-LoxP-based reporters as precise indicators of conditional genetic manipulation. *Genesis*, 51: 436-442, 2013.

42. Kühn, R, Schwenk, F, Aguet, M, Rajewsky, K: Inducible gene targeting in mice. *Science*, 269: 1427-1429, 1995.

43. Takakura, A, Contrino, L, Zhou, X, Bonventre, JV, Sun, Y, Humphreys, BD, Zhou, J: Renal

injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*, 18: 2523-2531, 2009.

44. Cucina, A, Fuso, A, Coluccia, P, Cavallaro, A: Nicotine inhibits apoptosis and stimulates proliferation in aortic smooth muscle cells through a functional nicotinic acetylcholine receptor. *J Surg Res*, 150: 227-235, 2008.

45. Grantham, JJ, Mulamalla, S, Swenson-Fields, KI: Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 7: 556-566, 2011.

46. Menon, V, Rudym, D, Chandra, P, Miskulin, D, Perrone, R, Sarnak, M: Inflammation, oxidative stress, and insulin resistance in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 7-13, 2011.

47. Zima, T, Crkovská, J, Merta, M, Stípek, S, Němec, K, Tesar, V: Activity of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, on autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Biochem Mol Biol Int*, 35: 699-704, 1995.

48. Orth, SR: Smoking and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1663-1672, 2002.

49. Boletta, A, Qian, F, Onuchic, LF, Bhunia, AK, Phakdeekitcharoen, B, Hanaoka, K, Guggino, W, Monaco, L, Germino, GG: Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell*, 6: 1267-1273, 2000.

50. Berger, F, Gage, FH, Vijayaraghavan, S: Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci*, 18: 6871-6881, 1998.

51. Kuo, IY, Duong, SL, Nguyen, L, Ehrlich, BE: Decreased Polycystin 2 Levels Result in Non-Renal Cardiac Dysfunction with Aging. *PLoS One*, 11: e0153632, 2016.

52. Chapman, AB, Stepniakowski, K, Rahbari-Oskoui, F: Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 153-163, 2010.

53. Bhatnagar, A: Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circ Res*, 121: 162-180, 2017.

54. Kramann, R, Erpenbeck, J, Schneider, RK, Röhl, AB, Hein, M, Brandenburg, VM, van Diepen,

- M, Dekker, F, Marx, N, Floege, J, Becker, M, Schlieper, G: Speckle tracking echocardiography detects uremic cardiomyopathy early and predicts cardiovascular mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 25: 2351-2365, 2014.
55. Green, MS, Jucha, E, Luz, Y: Blood pressure in smokers and nonsmokers: epidemiologic findings. *Am Heart J*, 111: 932-940, 1986.
56. Berglund, G, Wilhelmsen, L: Factors related to blood pressure in a general population sample of Swedish men. *Acta Med Scand*, 198: 291-298, 1975.
57. Seltzer, CC: Effect of smoking on blood pressure. *Am Heart J*, 87: 558-564, 1974.
58. Freathy, RM, Kazeem, GR, Morris, RW, Johnson, PC, Paternoster, L, Ebrahim, S, Hattersley, AT, Hill, A, Hingorani, AD, Holst, C, Jefferis, BJ, Kring, SI, Mooser, V, Padmanabhan, S, Preisig, M, Ring, SM, Sattar, N, Upton, MN, Vollenweider, P, Waeber, G, Sørensen, TI, Frayling, TM, Watt, G, Lawlor, DA, Whincup, PH, Tozzi, F, Davey Smith, G, Munafò, M: Genetic variation at CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 interacts with smoking status to influence body mass index. *Int J Epidemiol*, 40: 1617-1628, 2011.

Table 1. Echocardiographic parameters in CY, CYS, NC and NCS mice.

Parameters	CY	CYS	NC	NCS
Structure				
LVM/BW (mg/g)	3.29±0.86 n=13	3.62±0.88 n=8	3.69±1.03 n=8	2.93±0.61 n=11
LA/BW (mm/g)	0.07±0.02 ^b n=13	0.09±0.01 ^a n=8	0.09±0.02 n=8	0.08±0.01 n=11
LVIDS/BW (mm/g)	0.12±0.02 n=13	0.15±0.03 ^{ac} n=8	0.13±0.03 n=8	0.12±0.02 n=11
LVIDD/BW (mm/g)	0.16 (0.15-0.17) n=13	0.20 (0.17-0.19) ^{ac} n=8	0.18 (0.15-0.19) n=8	0.16 (0.15-0.18) n=11
LVSV/BW (μl/g)	1.70±0.54 n=13	2.32±0.94 ^c n=8	1.57±0.53 n=8	1.43±0.64 n=11
LVDV/BW (μl/g)	2.79±0.56 n=13	3.36±0.75 n=8	3.06±0.97 n=8	2.67±0.87 n=11
Systolic Function				
LVEF (%)	39.9±11.1 ^b n=11	34.4±10.5 ^{bb} n=7	50.5±8.4 n=8	43.1±9.6 n=8
LVSF (%)	20.8±6.8 n=13	17.3±8.4 ^{bbc} n=8	26.7±6.0 n=8	24.9±6.8 n=11
S' (mm/s)	15.3±3.5 n=13	12.8±6.2 n=8	16.3±2.9 n=8	15.8±2.0 n=9
Diastolic Function				
IVRT (ms)	25.6 (22.2-30.8) n=12	30.5 (24.9-39.2) n=8	26.7 (22.9-27.8) n=8	24.6 (21.4-28.4) n=10
DT (ms)	18.3±3.8 n=11	21.5±5.4 n=7	21.2±4.6 n=8	19.9±5.9 n=9
Other Parameters				
MPI	0.67±0.17 n=13	0.77±0.22 n=7	0.64±0.08 n=7	0.71±0.15 n=10
RV MPI	0.37 (0.33-0.51) n=11	0.36 (0.27-0.63) n=6	0.38 (0.32-0.51) n=8	0.46 (0.34-0.71) n=8
VTI_{RVOT}	19.7±5.4 n=12	19.3±6.7 n=7	20.8±4.6 n=8	22.8±3.8 n=11
PAP (mmHg)	71.9±2.4 n=12	68.8±2.9 ^{ab} n=6	72.2±3.1 n=8	70.5±2.6 n=10
Short Axis (%)				
Circumferential strain	-14.5±3.2 ^b n=10	-9.8±4.8 ^{abbbcc} n=8	-19.5±4.1 n=7	-17.4±3.3 n=7
Circumferential strain rate (×s ⁻¹)	-4.54 (-5.80--3.82) ^b n=10	-3.11 (-3.58--2.84) ^{abbbcc} n=8	-6.31 (-7.16--5.18) n=7	-5.39 (-5.70--4.86) n=7
Radial strain	18.4 (14.5-23.4) n=10	13.4 (11.4-18.0) ^{bb} n=8	26.5 (20.8-31.2) n=7	25.0 (16.9-26.1) n=7
Radial strain rate (×s ⁻¹)	5.84 (4.87-6.34) n=10	4.23 (3.80-4.60) ^{bb} n=8	6.33 (6.12-8.17) n=7	5.74 (5.37-6.40) n=7

LVM/BW: left ventricular mass normalized to body weight, **LA/BW:** ratio of left atrium mass normalized to body weight, **LVIDS/BW:** left ventricular internal diameter in systole normalized to body weight, **LVIDD/BW:** left ventricular internal diameter in diastole normalized to body weight, **LVSV/BW:** left ventricular volume in systole normalized to body weight, **LVDV/BW:** left ventricular volume in diastole normalized to body weight, **LVEF:** left ventricular ejection fraction. **LVSF:** left ventricular shortening fraction, **S':** peak velocity at the septal basal level, **IVRT:** isovolumetric relaxation time, **DT:** mitral valve deceleration time, **MPI:** myocardial performance index, **RV MPI:** right ventricular myocardial performance index, **VTI_{RVOT}:** velocity-time integral of the right ventricular outflow tract and **PAP:** mean pulmonary artery pressure. Parametric data were compared by means of one-way ANOVA, with results expressed as mean and standard deviation. The non-parametric data were compared with the Kruskal-Wallis test, with the results presented in median and interquartile intervals. ^aP<0.05 vs CY; ^bP<0.05 vs NC; ^{bb}P<0.01 vs NC; ^{bbb}P<0.001 vs NC; ^cP<0.05 vs NCS; ^{cc}P<0.01 vs NCS.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. **A)** Comparative analysis of survival among CY (n=14), CYS (n=21), NC (n=20) and NCS (n=20) mice. Data were compared using the Log-rank test. **B)** Comparative analysis of body weight at 16 weeks among CY (n=13), CYS (n=8), NC (n=8) and NCS (n=11) animals. **C)** Comparative analysis of the renal weight/body weight among CY mice (n=12), CYS (n=9), NC (n=15) and NCS (n=17) mice. **D)** Comparative analysis of heart weight/body weight ratio among the four experimental groups. **E)** Comparative analysis of liver weight/body weight among the four experimental groups. **B-E)** Comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test and Müller-Dunn posttest or with p values corrected for False Discovery Rate (FDR) using the method proposed by Benjamini, Krieger and Yekutieli. Results are expressed in median and interquartile intervals. *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001.

Figure 2. **A)** Comparative analysis of SUN among CY (n=10), CYS (n=12), NC (n=8) and NCS (n=9) mice. These comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test with Müller-Dunn posttest, with results expressed in median and interquartile intervals. **B)** Comparative analysis of the global renal cystic index between CY (n=11) and CYS (n=12) mice. This comparison was performed using the Mann-Whitney test, with results expressed in median and interquartile intervals. **C)** Representative images of the renal cystic phenotype in the absence and presence of smoking. *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001.

Figure 3. Comparative analysis of **A)** LVEF, **B)** LVIDS/BW, **C)** LVIDD/BW, **D)** IVRT, **E)** circumferential strain, **F)** circumferential strain rate, **G)** radial strain and **H)** radial strain rate among CY, CYS, NC and NCS mice. Parametric data were compared by means of one-way ANOVA and Tukey posttest. The results were expressed as mean and standard deviation. Non-parametric data were compared with Kruskal-Wallis test with p values corrected for False Discovery Rate (FDR) using the method proposed by Benjamini, Krieger and Yekutieli. The results

were presented in median and interquartile. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 4. Comparative analysis of MAP among CY (n=11), CYS (n=7), NC (n=8) and NCS (n=8).

The results were compared by one-way ANOVA and p values corrected for False Discovery Rate (FDR) using the method proposed by Benjamini, Krieger and Yekutieli. The results were expressed as mean and standard deviation. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Figure 5. **A)** Comparative analysis of cell proliferation rate in tubular renal epithelium among CY (n=9), CYS (n=10), NC (n=8) and NCS (n=8) mice and **B)** in renal cystic epithelium between CY and CYS animals. **(C and D)** Representative images of Ki-67 staining in tubular renal epithelium and cystic epithelium, respectively. **E)** Comparative analysis of apoptotic rate in tubular renal epithelium among CY (n=10), CYS (n=11), NC (n=9) and NCS (n=8) mice and **F)** in renal cystic epithelium between CY (n=9) and CYS (n=11). **(G and H)** Representative images of active caspase-3 staining in tubular renal epithelium and cystic epithelium, respectively. **I)** Comparative analysis of apoptotic rate in cardiac tissue among CY (n=12), CYS (n=11), NC (n=9) and NCS (n=8) mice. **J)** Representative images of active caspase-3 staining in cardiac tissue. **C, D, G, H and J:** Original magnification, x400. Non-parametric data were compared using the Kruskal-Wallis test with Simes-Hochber posttest (**A**) and Mann-Whitney test (**B** and **F**). The results were expressed as median and interquartile intervals. In figure **E** and **I** the parameters were transformed into Log10 and the data were compared using one-way ANOVA and Tukey posttest. The results were expressed as median and interquartile intervals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 6. Comparative analysis of renal (**A**) and cardiac (**C**) fibrosis index among CY (n=9), CYS (n=10), NC (n=8) and NCS (n=8) mice. **B)** Representative images of renal fibrosis and **D)** Representative images of cardiac fibrosis in the four groups. Original magnification x400. Data were compared using the Kruskal-Wallis test with Dwass-Steel-Christchlow-Fligner posttest (**A**) or Simes-Hochber posttest (**C**). The results were expressed as median and interquartile intervals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 7. Comparative analyses of **A)** GSH in renal tissue among CY (n=9), CYS (n=10), NC

(n=9) and NCS (n=10) mice; **B**) TBARS in renal tissue among CY (n=8), CYS (n=9), NC (n=10) and NCS (n=10) animals; **C**) *Il1b* expression in renal tissue among CY (n=7), CYS (n=7), NC (n=6) e NCS (n=6) mice and **D**) *tgfb1* expression in renal tissue among CY (n=7), CYS (n=7), NC (n=6) and NCS (n=7) animals. Data were compared using the Kruskal-Wallis test with Simes-Hochber posttest. The results were expressed as median and interquartile intervals. *P<0.05 and **P<0.01.

Figure 1

A

B

C

D

E

Figure 2

A

B

C

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

A

B

C

D

Figure 7

Referências

REFERÊNCIAS

1. Chebib, FT, Torres, VE: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *Am J Kidney Dis*, 67: 792-810, 2016.
2. Rossetti, S, Consugar, MB, Chapman, AB, Torres, VE, Guay-Woodford, LM, Grantham, JJ, Bennett, WM, Meyers, CM, Walker, DL, Bae, K, Zhang, QJ, Thompson, PA, Miller, JP, Harris, PC, Consortium, C: Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 18: 2143-2160, 2007.
3. Martinez-Maldonado, M, Yium, JJ, Eknayan, G, Suki, WN: Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int*, 2: 107-113, 1972.
4. Gabow, PA, Johnson, AM, Kaehny, WD, Kimberling, WJ, Lezotte, DC, Duley, IT, Jones, RH: Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 41: 1311-1319, 1992.
5. Nunes, AC, Milani, V, Porsch, DB, Rossato, LB, Mattos, CB, Roisenberg, I, Barros, EJ: Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. *Ren Fail*, 30: 169-173, 2008.
6. Balbo, BEP, Cavalcante, RM, Romão Júnior, JE, Barros, RTd, Zatz, R, Abensur, H: Profile of patients with end-stage renal disease before starting renalreplacement therapy, derived from a tertiary nephrology center. *J Bras Nefrol*, 29(4): 203-208, 2007.
7. Torres, VE, Harris, PC, Pirson, Y: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*, 369: 1287-1301, 2007.
8. Bastos, AP, Piontek, K, Silva, AM, Martini, D, Menezes, LF, Fonseca, JM, Fonseca, II, Germino, GG, Onuchic, LF: Pkd1 haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*, 20: 2389-2402, 2009.
9. Bastos, AP, Onuchic, LF: Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res*, 44: 606-617, 2011.
10. Pirson, Y: Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 173-180, 2010.
11. Ecdar, T, Schrier, RW: Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 5: 221-228, 2009.
12. Kelleher, CL, McFann, KK, Johnson, AM, Schrier, RW: Characteristics of hypertension in young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease compared with the general U.S. population. *Am J Hypertens*, 17: 1029-1034, 2004.
13. Oflaz, H, Alisir, S, Buyukaydin, B, Kocaman, O, Turgut, F, Namli, S, Pamukcu, B, Oncul, A,

- Ecdar, T: Biventricular diastolic dysfunction in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 68: 2244-2249, 2005.
14. Peters, DJ, Sandkuijl, LA: Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. *Contrib Nephrol*, 97: 128-139, 1992.
15. Barua, M, Cil, O, Paterson, AD, Wang, K, He, N, Dicks, E, Parfrey, P, Pei, Y: Family history of renal disease severity predicts the mutated gene in ADPKD. *J Am Soc Nephrol*, 20: 1833-1838, 2009.
16. Pei, Y, Watnick, T: Diagnosis and screening of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 140-152, 2010.
17. Porath, B, Gainullin, VG, Cornec-Le Gall, E, Dillinger, EK, Heyer, CM, Hopp, K, Edwards, ME, Madsen, CD, Mauritz, SR, Banks, CJ, Baheti, S, Reddy, B, Herrero, JI, Bañales, JM, Hogan, MC, Tasic, V, Watnick, TJ, Chapman, AB, Vigneau, C, Lavainne, F, Audrézet, MP, Ferec, C, Le Meur, Y, Torres, VE, Harris, PC, Genkyst Study Group, HALTPoPKDG, Disease, CfRISoPK: Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am J Hum Genet*, 98: 1193-1207, 2016.
18. Cornec-Le Gall, E, Audrézet, MP, Chen, JM, Hourmant, M, Morin, MP, Perrichot, R, Charasse, C, Whebe, B, Renaudineau, E, Jousset, P, Guillodo, MP, Grall-Jezequel, A, Saliou, P, Férec, C, Le Meur, Y: Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol*, 24: 1006-1013, 2013.
19. 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*, 78: 725, 1994.
20. Hughes, J, Ward, CJ, Peral, B, Aspinwall, R, Clark, K, San Millán, JL, Gamble, V, Harris, PC: The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*, 10: 151-160, 1995.
21. Yu, S, Hackmann, K, Gao, J, He, X, Piontek, K, García-González, MA, García González, MA, Menezes, LF, Xu, H, Germino, GG, Zuo, J, Qian, F: Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 18688-18693, 2007.
22. Mochizuki, T, Wu, G, Hayashi, T, Xenophontos, SL, Veldhuisen, B, Saris, JJ, Reynolds, DM, Cai, Y, Gabow, PA, Pierides, A, Kimberling, WJ, Breuning, MH, Deltas, CC, Peters, DJ, Somlo, S: PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 272: 1339-1342, 1996.
23. Qian, F, Germino, FJ, Cai, Y, Zhang, X, Somlo, S, Germino, GG: PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet*, 16: 179-183, 1997.

24. González-Perrett, S, Kim, K, Ibarra, C, Damiano, AE, Zotta, E, Batelli, M, Harris, PC, Reisin, IL, Arnaout, MA, Cantiello, HF: Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 1182-1187, 2001.
25. Vassilev, PM, Guo, L, Chen, XZ, Segal, Y, Peng, JB, Basora, N, Babakhanlou, H, Cruger, G, Kanazirska, M, Ye Cp, Brown, EM, Hediger, MA, Zhou, J: Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca^{2+} homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 341-350, 2001.
26. Li, Y, Santoso, NG, Yu, S, Woodward, OM, Qian, F, Guggino, WB: Polycystin-1 interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca^{2+} signaling with implications for polycystic kidney disease. *J Biol Chem*, 284: 36431-36441, 2009.
27. Santoso, NG, Cebotaru, L, Guggino, WB: Polycystin-1, 2, and STIM1 interact with IP(3)R to modulate ER Ca release through the PI3K/Akt pathway. *Cell Physiol Biochem*, 27: 715-726, 2011.
28. Li, Y, Wright, JM, Qian, F, Germino, GG, Guggino, WB: Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca^{2+} signaling. *J Biol Chem*, 280: 41298-41306, 2005.
29. Köttgen, M, Buchholz, B, Garcia-Gonzalez, MA, Kotsis, F, Fu, X, Doerken, M, Boehlke, C, Steffl, D, Tauber, R, Wegierski, T, Nitschke, R, Suzuki, M, Kramer-Zucker, A, Germino, GG, Watnick, T, Prenen, J, Nilius, B, Kuehn, EW, Walz, G: TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J Cell Biol*, 182: 437-447, 2008.
30. Mekahli, D, Sammels, E, Luyten, T, Welkenhuyzen, K, van den Heuvel, LP, Levtchenko, EN, Gijssbers, R, Bultynck, G, Parys, JB, De Smedt, H, Missiaen, L: Polycystin-1 and polycystin-2 are both required to amplify inositol-trisphosphate-induced Ca^{2+} release. *Cell Calcium*, 51: 452-458, 2012.
31. Torres, VE, Harris, PC: Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 25: 18-32, 2014.
32. Gattone, VH, Wang, X, Harris, PC, Torres, VE: Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med*, 9: 1323-1326, 2003.
33. Wang, X, Ward, CJ, Harris, PC, Torres, VE: Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 77: 129-140, 2010.
34. Bhunia, AK, Piontek, K, Boletta, A, Liu, L, Qian, F, Xu, PN, Germino, FJ, Germino, GG: PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell*, 109: 157-168, 2002.
35. Shillingford, JM, Murcia, NS, Larson, CH, Low, SH, Hedgepeth, R, Brown, N, Flask, CA, Novick, AC, Goldfarb, DA, Kramer-Zucker, A, Walz, G, Piontek, KB, Germino, GG, Weimbs, T:

The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5466-5471, 2006.

36. Dere, R, Wilson, PD, Sandford, RN, Walker, CL: Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PLoS One*, 5: e9239, 2010.

37. Chauvet, V, Tian, X, Husson, H, Grimm, DH, Wang, T, Hiesberger, T, Hiesberger, T, Igarashi, P, Bennett, AM, Ibraghimov-Beskrovnaya, O, Somlo, S, Caplan, MJ: Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest*, 114: 1433-1443, 2004.

38. Nickel, C, Benzing, T, Sellin, L, Gerke, P, Karihaloo, A, Liu, ZX, Cantley, LG, Walz, G: The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest*, 109: 481-489, 2002.

39. Qian, F, Watnick, TJ, Onuchic, LF, Germino, GG: The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell*, 87: 979-987, 1996.

40. Piontek, K, Menezes, LF, Garcia-Gonzalez, MA, Huso, DL, Germino, GG: A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med*, 13: 1490-1495, 2007.

41. Lantinga-van Leeuwen, IS, Leonhard, WN, van der Wal, A, Breuning, MH, de Heer, E, Peters, DJ: Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet*, 16: 3188-3196, 2007.

42. Takakura, A, Contrino, L, Beck, AW, Zhou, J: Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol*, 19: 2351-2363, 2008.

43. Takakura, A, Contrino, L, Zhou, X, Bonventre, JV, Sun, Y, Humphreys, BD, Zhou, J: Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*, 18: 2523-2531, 2009.

44. Merta, M, Tesar, V, Zima, T, Jirsa, M, Rysavá, R, Zabka, J: Cytokine profile in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochem Mol Biol Int*, 41: 619-624, 1997.

45. Zheng, D, Wolfe, M, Cowley, BD, Wallace, DP, Yamaguchi, T, Grantham, JJ: Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 14: 2588-2595, 2003.

46. Okada, H, Ban, S, Nagao, S, Takahashi, H, Suzuki, H, Neilson, EG: Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int*, 58: 587-597, 2000.

47. Grantham, JJ, Mulamalla, S, Swenson-Fields, KI: Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 7: 556-566, 2011.

48. Song, X, Di Giovanni, V, He, N, Wang, K, Ingram, A, Rosenblum, ND, Pei, Y: Systems

- biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks. *Hum Mol Genet*, 18: 2328-2343, 2009.
49. Menon, V, Rudym, D, Chandra, P, Miskulin, D, Perrone, R, Sarnak, M: Inflammation, oxidative stress, and insulin resistance in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 7-13, 2011.
50. Circu, ML, Aw, TY: Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48: 749-762, 2010.
51. Gupta, SC, Hevia, D, Patchva, S, Park, B, Koh, W, Aggarwal, BB: Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal*, 16: 1295-1322, 2012.
52. Barzilai, A, Yamamoto, K: DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 3: 1109-1115, 2004.
53. Pahl, HL, Baeuerle, PA: Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays*, 16: 497-502, 1994.
54. Arrigo, AP: Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*, 27: 936-944, 1999.
55. Merta, M, Zima, T, Stípek, S, Crkovská, J, Pláteník, J: Lipid peroxidation and activity of superoxide dismutase in ADPKD. *Contrib Nephrol*, 115: 109-112, 1995.
56. Zima, T, Crkovská, J, Merta, M, Stípek, S, Němecek, K, Tesar, V: Activity of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, on autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Biochem Mol Biol Int*, 35: 699-704, 1995.
57. Maser, RL, Vassmer, D, Magenheimer, BS, Calvet, JP: Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 13: 991-999, 2002.
58. Geng, L, Segal, Y, Pavlova, A, Barros, EJ, Löhning, C, Lu, W, Nigam, SK, Frischau, AM, Reeders, ST, Zhou, J: Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol*, 272: F451-459, 1997.
59. Markowitz, GS, Cai, Y, Li, L, Wu, G, Ward, LC, Somlo, S, D'Agati, VD: Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol*, 277: F17-25, 1999.
60. Boulter, C, Mulroy, S, Webb, S, Fleming, S, Brindle, K, Sandford, R: Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 12174-12179, 2001.
61. Wu, G, Markowitz, GS, Li, L, D'Agati, VD, Factor, SM, Geng, L, Tibara, S, Tuchman, J, Cai, Y, Park, JH, van Adelsberg, J, Hou, H, Kucherlapati, R, Edelmann, W, Somlo, S: Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet*, 24: 75-78, 2000.

62. Muto, S, Aiba, A, Saito, Y, Nakao, K, Nakamura, K, Tomita, K, Kitamura, T, Kurabayashi, M, Nagai, R, Higashihara, E, Harris, PC, Katsuki, M, Horie, S: Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet*, 11: 1731-1742, 2002.
63. Perrone, RD, Ruthazer, R, Terrin, NC: Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis*, 38: 777-784, 2001.
64. Zeier, M, Geberth, S, Schmidt, KG, Mandelbaum, A, Ritz, E: Elevated blood pressure profile and left ventricular mass in children and young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 3: 1451-1457, 1993.
65. Chapman, AB, Johnson, AM, Rainguet, S, Hossack, K, Gabow, P, Schrier, RW: Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 8: 1292-1297, 1997.
66. Bardají, A, Martinez-Vea, A, Valero, A, Gutierrez, C, Garcia, C, Ridao, C, Oliver, JA, Richart, C: Cardiac involvement in autosomal-dominant polycystic kidney disease: a hypertensive heart disease. *Clin Nephrol*, 56: 211-220, 2001.
67. Paavola, J, Schliffke, S, Rossetti, S, Kuo, IY, Yuan, S, Sun, Z, Harris, PC, Torres, VE, Ehrlich, BE: Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 58: 199-208, 2013.
68. Balbo, BE, Amaral, AG, Fonseca, JM, de Castro, I, Salemi, VM, Souza, LE, Dos Santos, F, Irigoyen, MC, Qian, F, Chammass, R, Onuchic, LF: Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice with phenotype rescue by galectin-3 knockout. *Kidney Int*, 90: 580-597, 2016.
69. Ibraghimov-Beskrovnaya, O, Dackowski, WR, Foggensteiner, L, Coleman, N, Thiru, S, Petry, LR, Burn, TC, Connors, TD, Van Raay, T, Bradley, J, Qian, F, Onuchic, LF, Watnick, TJ, Piontek, K, Hakim, RM, Landes, GM, Germino, GG, Sandford, R, Klinger, KW: Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 6397-6402, 1997.
70. Pedrozo, Z, Criollo, A, Battiprolu, PK, Morales, CR, Contreras-Ferrat, A, Fernández, C, Jiang, N, Luo, X, Caplan, MJ, Somlo, S, Rothermel, BA, Gillette, TG, Lavandero, S, Hill, JA: Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation*, 131: 2131-2142, 2015.
71. Kuo, IY, Kwaczala, AT, Nguyen, L, Russell, KS, Campbell, SG, Ehrlich, BE: Decreased polycystin 2 expression alters calcium-contraction coupling and changes β -adrenergic signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 16604-16609, 2014.
72. Kuo, IY, Duong, SL, Nguyen, L, Ehrlich, BE: Decreased Polycystin 2 Levels Result in Non-Renal Cardiac Dysfunction with Aging. *PLoS One*, 11: e0153632, 2016.

73. Governo de São Paulo [Available from: www.leiantifumo.sp.org.br]. 2009.
74. Orth, SR: Smoking and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1663-1672, 2002.
75. Maccioni, RB, Muñoz, JP, Barbeito, L: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*, 32: 367-381, 2001.
76. Bartecchi, CE, MacKenzie, TD, Schrier, RW: The human costs of tobacco use (1). *N Engl J Med*, 330: 907-912, 1994.
77. Orth, SR, Ritz, E, Schrier, RW: The renal risks of smoking. *Kidney Int*, 51: 1669-1677, 1997.
78. Orth, SR: Cigarette smoking: an important renal risk factor - far beyond carcinogenesis. *Tob Induc Dis*, 1: 137-155, 2002.
79. Orth, SR: Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamics: influence on renal function. *J Am Soc Nephrol*, 15 Suppl 1: S58-63, 2004.
80. Orth, SR, Hallan, SI: Smoking: a risk factor for progression of chronic kidney disease and for cardiovascular morbidity and mortality in renal patients--absence of evidence or evidence of absence? *Clin J Am Soc Nephrol*, 3: 226-236, 2008.
81. Zitt, N, Kollerits, B, Neyer, U, Mark, W, Heininger, D, Mayer, G, Kronenberg, F, Lhotta, K: Cigarette smoking and chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 22: 3034-3039, 2007.
82. Ritz, E, Benck, U, Orth, SR: Acute effects of cigarette smoking on renal hemodynamics. *Contrib Nephrol*, 130: 31-38, 2000.
83. Ritz, E, Benck, U, Franek, E, Keller, C, Seyfarth, M, Clorius, J: Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 9: 1798-1804, 1998.
84. Sung, RS, Althoen, M, Howell, TA, Ojo, AO, Merion, RM: Excess risk of renal allograft loss associated with cigarette smoking. *Transplantation*, 71: 1752-1757, 2001.
85. Galazyn-Sidorczuk, M, Brzóska, MM, Moniuszko-Jakoniuk, J: Estimation of Polish cigarettes contamination with cadmium and lead, and exposure to these metals via smoking. *Environ Monit Assess*, 137: 481-493, 2008.
86. Barbier, O, Jacquillet, G, Tauc, M, Cougnon, M, Poujeol, P: Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol*, 99: p105-110, 2005.
87. Trap-Jensen, J: Effects of smoking on the heart and peripheral circulation. *Am Heart J*, 115: 263-267, 1988.
88. London, GM, Marchais, SJ, Guérin, AP, Métivier, F: Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14: 525-531, 2005.
89. Jee, SH, Suh, I, Kim, IS, Appel, LJ: Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease in men with low levels of serum cholesterol: the Korea Medical Insurance Corporation Study. *JAMA*, 282:

2149-2155, 1999.

90. Njølstad, I, Arnesen, E, Lund-Larsen, PG: Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction. A 12-year follow-up of the Finnmark Study. *Circulation*, 93: 450-456, 1996.

91. Suskin, N, Sheth, T, Negassa, A, Yusuf, S: Relationship of current and past smoking to mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 37: 1677-1682, 2001.

92. de Paiva, SA, Zornoff, LA, Okoshi, MP, Okoshi, K, Cicogna, AC, Campana, AO: Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol*, 81: 221-228, 2003.

93. Orth, SR, Stöckmann, A, Conradt, C, Ritz, E, Ferro, M, Kreusser, W, Piccoli, G, Rambausek, M, Roccatello, D, Schäfer, K, Sieberth, HG, Wanner, C, Watschinger, B, Zucchelli, P: Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int*, 54: 926-931, 1998.

94. Ozkok, A, Akpinar, TS, Tufan, F, Kanitez, NA, Uysal, M, Guzel, M, Caliskan, Y, Alisir, S, Yazici, H, Ecdar, T: Clinical characteristics and predictors of progression of chronic kidney disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center experience. *Clin Exp Nephrol*, 17: 345-351, 2013.

95. Cornec-Le Gall, E, Audrézet, MP, Rousseau, A, Hourmant, M, Renaudineau, E, Charasse, C, Morin, MP, Moal, MC, Dantal, J, Wehbe, B, Perrichot, R, Frouget, T, Vigneau, C, Potier, J, Jousset, P, Guillodo, MP, Siohan, P, Terki, N, Sawadogo, T, Legrand, D, Menoyo-Calonge, V, Benarbia, S, Besnier, D, Longuet, H, Férec, C, Le Meur, Y: The PROPKD Score: A New Algorithm to Predict Renal Survival in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 27: 942-951, 2016.

96. Boletta, A, Qian, F, Onuchic, LF, Bhunia, AK, Phakdeekitcharoen, B, Hanaoka, K, Guggino, W, Monaco, L, Germino, GG: Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell*, 6: 1267-1273, 2000.

97. Delmas, P: Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*, 118: 145-148, 2004.

98. Parnell, SC, Magenheimer, BS, Maser, RL, Rankin, CA, Smine, A, Okamoto, T, Calvet, JP: The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 251: 625-631, 1998.

99. Montalbetti, N, Cantero, MR, Dalghi, MG, Cantiello, HF: Reactive oxygen species inhibit polycystin-2 (TRPP2) cation channel activity in term human syncytiotrophoblast. *Placenta*, 29: 510-518, 2008.

100. Lerner, CA, Sundar, IK, Yao, H, Gerloff, J, Ossip, DJ, McIntosh, S, Robinson, R, Rahman, I: Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative

- stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS One*, 10: e0116732, 2015.
101. Cucina, A, Fuso, A, Coluccia, P, Cavallaro, A: Nicotine inhibits apoptosis and stimulates proliferation in aortic smooth muscle cells through a functional nicotinic acetylcholine receptor. *J Surg Res*, 150: 227-235, 2008.
102. Berger, F, Gage, FH, Vijayaraghavan, S: Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci*, 18: 6871-6881, 1998.
103. Eugenín, J, Otárola, M, Bravo, E, Coddou, C, Cerpa, V, Reyes-Parada, M, Llona, I, von Bernhardt, R: Prenatal to early postnatal nicotine exposure impairs central chemoreception and modifies breathing pattern in mouse neonates: a probable link to sudden infant death syndrome. *J Neurosci*, 28: 13907-13917, 2008.
104. Storm, H, Nylander, G, Saugstad, OD: The amount of brainstem gliosis in sudden infant death syndrome (SIDS) victims correlates with maternal cigarette smoking during pregnancy. *Acta Paediatr*, 88: 13-18, 1999.
105. Lam, DC, Girard, L, Ramirez, R, Chau, WS, Suen, WS, Sheridan, S, Tin, VP, Chung, LP, Wong, MP, Shay, JW, Gazdar, AF, Lam, WK, Minna, JD: Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers. *Cancer Res*, 67: 4638-4647, 2007.
106. West, KA, Brognard, J, Clark, AS, Linnoila, IR, Yang, X, Swain, SM, Harris, C, Belinsky, S, Dennis, PA: Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, 111: 81-90, 2003.
107. Balansky, R, Ganchev, G, Ilcheva, M, Steele, VE, D'Agostini, F, De Flora, S: Potent carcinogenicity of cigarette smoke in mice exposed early in life. *Carcinogenesis*, 28: 2236-2243, 2007.
108. Arany, I, Grifoni, S, Clark, JS, Csongradi, E, Maric, C, Juncos, LA: Chronic nicotine exposure exacerbates acute renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F125-133, 2011.
109. Liu, J, Willet, SG, Bankaitis, ED, Xu, Y, Wright, CV, Gu, G: Non-parallel recombination limits Cre-LoxP-based reporters as precise indicators of conditional genetic manipulation. *Genesis*, 51: 436-442, 2013.
110. Kühn, R, Schwenk, F, Aguet, M, Rajewsky, K: Inducible gene targeting in mice. *Science*, 269: 1427-1429, 1995.
111. Piontek, KB, Huso, DL, Grinberg, A, Liu, L, Bedja, D, Zhao, H, Gabrielson, K, Qian, F, Mei, C, Westphal, H, Germino, GG: A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*, 15: 3035-3043, 2004.
112. Bracke, KR, D'hulst, AI, Maes, T, Moerloose, KB, Demedts, IK, Lebecque, S, Joos, GF,

- Brusselle, GG: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol*, 177: 4350-4359, 2006.
113. Huvenne, W, Pérez-Novo, CA, Derycke, L, De Ruyck, N, Krysko, O, Maes, T, Pauwels, N, Robays, L, Bracke, KR, Joos, G, Brusselle, G, Bachert, C: Different regulation of cigarette smoke induced inflammation in upper versus lower airways. *Respir Res*, 11: 100, 2010.
114. D'hulst, AI, Vermaelen, KY, Brusselle, GG, Joos, GF, Pauwels, RA: Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J*, 26: 204-213, 2005.
115. Toledo, AC, Magalhaes, RM, Hizume, DC, Vieira, RP, Biselli, PJ, Moriya, HT, Mauad, T, Lopes, FD, Martins, MA: Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*, 39: 254-264, 2012.
116. Jagadapillai, R, Chen, J, Canales, L, Birtles, T, Pisano, MM, Neal, RE: Developmental cigarette smoke exposure: kidney proteome profile alterations in low birth weight pups. *Toxicology*, 299: 80-89, 2012.
117. Nishiura, JL, Neves, RF, Eloi, SR, Cintra, SM, Ajzen, SA, Heilberg, IP: Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4: 838-844, 2009.
118. Esporcatte, BLB, Rocha, NN, Mello, DB, Dutra, K, Asensi, Lachtermacher, S, Goldenberg, RCdS, Carvalho, ACCd: High Resolution Echocardiography and the Myocardial Infarction Model in Mice. *Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc*, 23(3): 18-24, 2010.
119. Tei, C, Ling, LH, Hodge, DO, Bailey, KR, Oh, JK, Rodeheffer, RJ, Tajik, AJ, Seward, JB: New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function--a study in normals and dilated cardiomyopathy. *J Cardiol*, 26: 357-366, 1995.
120. Dabestani, A, Mahan, G, Gardin, JM, Takenaka, K, Burn, C, Allfie, A, Henry, WL: Evaluation of pulmonary artery pressure and resistance by pulsed Doppler echocardiography. *Am J Cardiol*, 59: 662-668, 1987.
121. Bauer, M, Cheng, S, Jain, M, Ngoy, S, Theodoropoulos, C, Trujillo, A, Lin, FC, Liao, R: Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res*, 108: 908-916, 2011.
122. Ceroni, A, Moreira, ED, Mostarda, CT, Silva, GJ, Krieger, EM, Irigoyen, MC: Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37: 490-495, 2010.
123. Whittaker, P, Kloner, RA, Boughner, DR, Pickering, JG: Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*, 89: 397-410, 1994.

124. Farris, AB, Adams, CD, Brousaides, N, Della Pelle, PA, Collins, AB, Moradi, E, Smith, RN, Grimm, PC, Colvin, RB: Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol*, 22: 176-186, 2011.
125. The Jackson Laboratory. [Available from: <https://www.jax.org/>]. 2018.
126. Lanktree, MB, Chapman, AB: New treatment paradigms for ADPKD: moving towards precision medicine. *Nat Rev Nephrol*, 13: 750-768, 2017.
127. Ong, AC, Devuyst, O, Knebelmann, B, Walz, G, Diseases, E-EWGfIK: Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management. *Lancet*, 385: 1993-2002, 2015.
128. Hateboer, N, v Dijk, MA, Bogdanova, N, Coto, E, Saggar-Malik, AK, San Millan, JL, Torra, R, Breuning, M, Ravine, D: Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet*, 353: 103-107, 1999.
129. Dicks, E, Ravani, P, Langman, D, Davidson, WS, Pei, Y, Parfrey, PS: Incident renal events and risk factors in autosomal dominant polycystic kidney disease: a population and family-based cohort followed for 22 years. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1: 710-717, 2006.
130. Rossetti, S, Harris, PC: Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 18: 1374-1380, 2007.
131. Chapman, AB, Bost, JE, Torres, VE, Guay-Woodford, L, Bae, KT, Landsittel, D, Li, J, King, BF, Martin, D, Wetzel, LH, Lockhart, ME, Harris, PC, Moxey-Mims, M, Flessner, M, Bennett, WM, Grantham, JJ: Kidney volume and functional outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 7: 479-486, 2012.
132. Fick-Brosnahan, GM, Belz, MM, McFann, KK, Johnson, AM, Schrier, RW: Relationship between renal volume growth and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: a longitudinal study. *Am J Kidney Dis*, 39: 1127-1134, 2002.
133. Schrier, RW, McFann, KK, Johnson, AM: Epidemiological study of kidney survival in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 63: 678-685, 2003.
134. Gabow, PA, Chapman, AB, Johnson, AM, Tangel, DJ, Duley, IT, Kaehny, WD, Manco-Johnson, M, Schrier, RW: Renal structure and hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 38: 1177-1180, 1990.
135. Keenan, D, Maxwell, AP: Optimising the management of polycystic kidney disease. *Practitioner*, 260: 13-16, 12, 2016.
136. Chapman, AB, Johnson, AM, Gabow, PA, Schrier, RW: Overt proteinuria and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 5: 1349-1354, 1994.
137. Grantham, JJ, Chapman, AB, Torres, VE: Volume progression in autosomal dominant

- polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1: 148-157, 2006.
138. Orskov, B, Christensen, KB, Feldt-Rasmussen, B, Strandgaard, S: Low birth weight is associated with earlier onset of end-stage renal disease in Danish patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 81: 919-924, 2012.
139. King, BF, Torres, VE, Brummer, ME, Chapman, AB, Bae, KT, Glockner, JF, Arya, K, Felmlee, JP, Grantham, JJ, Guay-Woodford, LM, Bennett, WM, Klahr, S, Hirschman, GH, Kimmel, PL, Thompson, PA, Miller, JP, (CRISP), CfRISoPKD: Magnetic resonance measurements of renal blood flow as a marker of disease severity in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 64: 2214-2221, 2003.
140. Torres, VE, King, BF, Chapman, AB, Brummer, ME, Bae, KT, Glockner, JF, Arya, K, Risk, D, Felmlee, JP, Grantham, JJ, Guay-Woodford, LM, Bennett, WM, Klahr, S, Meyers, CM, Zhang, X, Thompson, PA, Miller, JP, (CRISP), CfRISoPKD: Magnetic resonance measurements of renal blood flow and disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2: 112-120, 2007.
141. Valero, FA, Martinez-Vea, A, Bardají, A, Gutierrez, C, Garcia, C, Richart, C, Oliver, JA: Ambulatory blood pressure and left ventricular mass in normotensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1020-1026, 1999.
142. Helal, I, McFann, K, Reed, B, Yan, XD, Schrier, RW, Fick-Brosnahan, GM: Serum uric acid, kidney volume and progression in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 28: 380-385, 2013.
143. Peters, DJ, Breuning, MH: Autosomal dominant polycystic kidney disease: modification of disease progression. *Lancet*, 358: 1439-1444, 2001.
144. Morgenthaler, NG, Struck, J, Alonso, C, Bergmann, A: Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem*, 52: 112-119, 2006.
145. Morgenthaler, NG, Struck, J, Jochberger, S, Dünser, MW: Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab*, 19: 43-49, 2008.
146. Meijer, E, Bakker, SJ, van der Jagt, EJ, Navis, G, de Jong, PE, Struck, J, Gansevoort, RT: Copeptin, a surrogate marker of vasopressin, is associated with disease severity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 361-368, 2011.
147. Torres, VE, Bankir, L, Grantham, JJ: A case for water in the treatment of polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4: 1140-1150, 2009.
148. Barash, I, Ponda, MP, Goldfarb, DS, Skolnik, EY: A pilot clinical study to evaluate changes in urine osmolality and urine cAMP in response to acute and chronic water loading in autosomal

- dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5: 693-697, 2010.
149. Torres, VE, Abebe, KZ, Schrier, RW, Perrone, RD, Chapman, AB, Yu, AS, Braun, WE, Steinman, TI, Brosnahan, G, Hogan, MC, Rahbari, FF, Grantham, JJ, Bae, KT, Moore, CG, Flessner, MF: Dietary salt restriction is beneficial to the management of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 91: 493-500, 2017.
150. Belibi, FA, Wallace, DP, Yamaguchi, T, Christensen, M, Reif, G, Grantham, JJ: The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 13: 2723-2729, 2002.
151. Girardat-Rotar, L, Puhon, MA, Braun, J, Serra, AL: Long-term effect of coffee consumption on autosomal dominant polycystic kidneys disease progression: results from the Suisse ADPKD, a Prospective Longitudinal Cohort Study. *J Nephrol*, 31: 87-94, 2018.
152. Gaspar, R: Efeitos da cafeína sobre o desenvolvimento e progressão da doença renal policística em modelos de camundongos Pkd1 cond/cond: Balcre. Unifesp, 2016.
153. Cadnapaphornchai, P, Boykin, JL, Berl, T, McDonald, KM, Schrier, RW: Mechanism of effect of nicotine on renal water excretion. *Am J Physiol*, 227: 1216-1220, 1974.
154. Karihaloo, A, Koraishy, F, Huen, SC, Lee, Y, Merrick, D, Caplan, MJ, Somlo, S, Cantley, LG: Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1809-1814, 2011.
155. Chapman, AB, Stepniakowski, K, Rahbari-Oskoui, F: Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 153-163, 2010.
156. Kramann, R, Erpenbeck, J, Schneider, RK, Röhl, AB, Hein, M, Brandenburg, VM, van Diepen, M, Dekker, F, Marx, N, Floege, J, Becker, M, Schlieper, G: Speckle tracking echocardiography detects uremic cardiomyopathy early and predicts cardiovascular mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 25: 2351-2365, 2014.
157. Goldbourt, U, Medalie, JH: Characteristics of smokers, non-smokers and ex-smokers among 10,000 adult males in Israel. II. Physiologic, biochemical and genetic characteristics. *Am J Epidemiol*, 105: 75-86, 1977.
158. Green, MS, Jucha, E, Luz, Y: Blood pressure in smokers and nonsmokers: epidemiologic findings. *Am Heart J*, 111: 932-940, 1986.
159. Savdie, E, Grosslight, GM, Adena, MA: Relation of alcohol and cigarette consumption to blood pressure and serum creatinine levels. *J Chronic Dis*, 37: 617-623, 1984.
160. Berglund, G, Wilhelmsen, L: Factors related to blood pressure in a general population sample of Swedish men. *Acta Med Scand*, 198: 291-298, 1975.
161. Reid, DD, Holland, WW, Rose, GA: An Anglo-American cardiovascular comparison. *Lancet*, 2: 1375-1378, 1967.

162. Higgins, MW, Kjelsberg, M: Characteristics of smokers and nonsmokers in Tecumseh, Michigan. II. The distribution of selected physical measurements and physiologic variables and the prevalence of certain diseases in smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol*, 86: 60-77, 1967.
163. Jenkins, CD, Rosenman, RH, Zyzanski, SJ: Cigarette smoking. Its relationship to coronary heart disease and related risk factors in the Western Collaborative Group Study. *Circulation*, 38: 1140-1155, 1968.
164. Mikkelsen, KL, Wiinberg, N, Høegholm, A, Christensen, HR, Bang, LE, Nielsen, PE, Svendsen, TL, Kampmann, JP, Madsen, NH, Bentzon, MW: Smoking related to 24-h ambulatory blood pressure and heart rate: a study in 352 normotensive Danish subjects. *Am J Hypertens*, 10: 483-491, 1997.
165. Cheng, S, Xanthakis, V, Sullivan, LM, Vasan, RS: Blood pressure tracking over the adult life course: patterns and correlates in the Framingham heart study. *Hypertension*, 60: 1393-1399, 2012.
166. Brummett, BH, Babyak, MA, Siegler, IC, Shanahan, M, Harris, KM, Elder, GH, Williams, RB: Systolic blood pressure, socioeconomic status, and biobehavioral risk factors in a nationally representative US young adult sample. *Hypertension*, 58: 161-166, 2011.
167. Freathy, RM, Kazeem, GR, Morris, RW, Johnson, PC, Paternoster, L, Ebrahim, S, Hattersley, AT, Hill, A, Hingorani, AD, Holst, C, Jefferis, BJ, Kring, SI, Mooser, V, Padmanabhan, S, Preisig, M, Ring, SM, Sattar, N, Upton, MN, Vollenweider, P, Waeber, G, Sørensen, TI, Frayling, TM, Watt, G, Lawlor, DA, Whincup, PH, Tozzi, F, Davey Smith, G, Munafò, M: Genetic variation at CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 interacts with smoking status to influence body mass index. *Int J Epidemiol*, 40: 1617-1628, 2011.
168. Biselli, PJ, Lopes, FD, Moriya, HT, Rivero, DH, Toledo, AC, Saldiva, PH, Mauad, T, Martins, MA: Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res*, 44: 460-468, 2011.
169. Belibi, FA, Reif, G, Wallace, DP, Yamaguchi, T, Olsen, L, Li, H, Helmkamp, GM, Grantham, JJ: Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int*, 66: 964-973, 2004.
170. Brosnahan, GM, Abebe, KZ, Moore, CG, Rahbari-Oskoui, FF, Bae, KT, Grantham, JJ, Schrier, RW, Braun, WE, Chapman, AB, Flessner, MF, Harris, PC, Hogan, MC, Perrone, RD, Miskulin, DC, Steinman, TI, Torres, VE, Investigators, H-PT: Patterns of Kidney Function Decline in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Post Hoc Analysis From the HALT-PKD Trials. *Am J Kidney Dis*, 71: 666-676, 2018.
171. Bhatnagar, A: Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circ Res*, 121: 162-180, 2017.
172. Seltzer, CC: Effect of smoking on blood pressure. *Am Heart J*, 87: 558-564, 1974.