Ana Paula Almeida Bastos

A haploinsuficiência de *Pkd1* aumenta a lesão renal e induz formação de microcistos após isquemia/reperfusão em camundongos

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

Programa de: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

São Paulo

2010

Ana Paula Almeida Bastos

A haploinsuficiência de *Pkd1* aumenta a lesão renal e induz formação de microcistos após isquemia/reperfusão em camundongos

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

Programa de: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Ana Paula Almeida

A haploinsuficiência de *Pkd1* aumenta a lesão renal e induz formação de microcistos após isquemia/reperfusão em camundongos / Ana Paula Almeida Bastos. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante 2.Doenças renais císticas
3.Mutação 4.Traumatismo por reperfusão 5.Isquemia 6.Proliferação de células
7.Inibidor de quinase dependente de ciclina p21

USP/FM/DBD-250/10

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 29 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílios 06/52038-8 (bolsa de doutorado) e 06/52037-1 (auxílio regular).

*À minha mãe, **Dóris Silva Almeida**, pelo amor, amizade, apoio incondicional em minhas conquistas e pela abnegação de sua vida pessoal em favor de seus filhos.*

*Ao meu companheiro, **José Luiz Miranda**, que sempre me apoiou e me incentivou em todos os meus desejos e conquistas. Te amo!*

*À minha filha, **Tarsila Miranda**, que com sua ternura está permanentemente ao meu lado incentivando e para o qual desejo sempre ser exemplo e amiga.*

*À minha irmã, **Lilian Regina Bastos**, pelo apoio nos momentos difíceis e pela vibração nas conquistas. Minha grande amiga e companheira em todos os momentos.*

*Ao meu pai, **Joanes Bastos**, que com sua determinação e coragem, ensinou-me a lutar pelos meus ideais com afinco.*

*À inestimável **Maria**, que deseja ver seus sonhos realizados nos meus! Grande amiga.*

*Ao meu irmão, **Marcus Vinícius Bastos** (in memoriam), que continua presente através das lembranças e do amor.*

Ao Professor Luiz Fernando Onuchic, meu orientador e amigo, pilar da minha formação científica. Professor dedicado, zeloso, crítico, indagador e grande entusiasta do conhecimento! Disponível e sempre disposto a assistir-me atenciosamente, incentivando nos momentos de fracasso e guiando minha conduta profissional e ética. Profissional íntegro, ético e apaixonado pela ciência! Um grande amigo nos momentos de inquietação e insegurança que passei, insuflou com seu apoio. Compartilhamos momentos de vida nos últimos cinco anos que só fizeram aumentar a minha profunda admiração. Obrigada por ter compartilhado e confiado o treinamento de vários alunos; essa atividade foi essencial para meu progresso científico. A você minha eterna gratidão e admiração.

Aos meus grandes amigos, Rodrigo Nassar, Ana Guiomar, Jonathan e Andressa, pela força, conselhos, parceria, motivação e carinho incondicional nos momentos difíceis, e principalmente por compartilhar e proporcionar momentos de alegria e descontração.

“Depois de algum tempo você aprende... que bons amigos são a família que nos permitiram escolher...” William Shakespeare

Aos Profs. Antônio Seguro, Antônio Magaldi, Cláudia Helou, Lúcia Andrade, Luís Yu, obrigada pelo apoio, compreensão e disponibilização de vosso preciso tempo com meus experimentos.

Ao Prof. Gregory Germíno pelas discussões de resultados, revisões, esclarecimentos e pela atitude solícita em diversas ocasiões.

Ao Prof. Thales Brito e Ana Maria Silva pelo entusiasmo, dedicação e presteza durante todo o desenvolvimento desta pesquisa sem os quais não seria possível realizá-la.

À Profa. Élia Caldini, Íris e a Nílsa, pelo auxílio constante e disponibilidade de vosso preciso tempo com as análises morfológicas.

Ao Dr. Dino Martini e Denise Malheiros, médicos patologistas, pelo auxílio fundamental nos resultados das análises morfológicas.

À Profa. Mirian Boim e aos alunos Edgar, Carine, Priscila e Olínda, da Escola Paulista de Medicina, pela indispensável e generosa ajuda.

À minha tia, Maria Ermecília, pela oportunidade, confiança, respeito, incentivo e valiosos ensinamentos que me encaminharam para a pesquisa.

Aos amigos Luís Menezes e Ivone, pelas sugestões, discussões, conselhos, motivação e auxílio no início desta jornada, e principalmente pela amizade.

Ao Dr. Isac de Castro pelos sábios comentários críticos a respeito desse trabalho e por ter sido completamente solícito em diferentes ocasiões.

Aos amigos, Ane Cláudia, Bruno, Fernanda, Diego, Frederico, Mauri, Michele, Zenaide, Rildo, Carol, Talita, Helô, Fabíola, Nivaldo, Eloá, Cecília, Anne e Dani Canale pelo apoio, motivação, paciência, e principalmente pela amizade, pelas experiências compartilhadas, e pelos momentos de desabafos, risos, choros e confortos.

À Dra. Ane Nunes, pelo apoio com os experimentos da Na-K-ATPase, pela amizade e compreensão durante os momentos que estive ausente com os experimentos no Rio de Janeiro.

Ao Prof. Rui Toledo pelo auxílio, pela competência e eficiência nos assuntos relacionados a pós-graduação.

*Ao Prof. **Roberto Zatz**, um grande pesquisador e professor.
Agradeço todos seus ensinamentos.*

*Aos colegas do LIM-29, **Dra. Irene, Cléo, Rodrigo, Humberto, Dimitrí, Adriana, Willian, Filipe, Alexandre, Rosana, Pamela, Carina, Hugo e Rita**, pelo agradável convívio, pelo carinho, amizade e risadas. Desejo um grande sucesso à todos!*

*A todos os funcionários do Centro de Bioterismo da FMUSP, especialmente **Flávio e Milena**, pela colaboração, pelo fornecimento dos animais e pelo espaço concedido.*

*Aos **ANIMAIS** que foram eutanasiados para a realização desse estudo. À eles demonstro o meu respeito e seriedade com que esse trabalho foi conduzido.*

*A **Deus**, por se mostrar em cada momento de dificuldade e de conquista, por me fazer mais forte a cada obstáculo e por me fazer perceber tão frágil frente a Sua grandeza.*

E a todos do Departamento de Nefrologia, que de alguma forma contribuíam para a realização deste trabalho.

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pela concessão da bolsa e do auxílio à pesquisa.*

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª.Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Siglas.....	x
Lista de Símbolos.....	xv
Resumo.....	xviii
Summary.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Doença Renal Policística Autossômica Dominante.....	02
1.1.1 <i>Epidemiologia</i>	02
1.1.2 <i>Manifestações clínicas</i>	03
1.2 Patogênese e Genética Molecular da DRPAD.....	06
1.2.1 <i>Os Genes PKD1 e PKD2</i>	06
1.2.2 <i>Policistina- 1 e policistina-2, os produtos de PKD1 e PKD2....</i>	07
1.2.3 <i>Implicações do loco mutado sobre a severidade da</i> <i>DRPAD</i>	11
1.2.4 <i>Bases genéticas moleculares da cistogênese associada à</i> <i>DRPAD: o modelo de dois eventos e a hipótese de um</i> <i>terceiro golpe</i>	12
1.2.5 <i>Correlações genótipo-fenótipo</i>	16

1.3 Sinalização e Patogênese Celular na DRPAD.....	17
1.3.1 Alterações celulares fundamentais associadas à DRPAD.....	17
1.3.2 Vias de sinalização alteradas na DRPAD e implicações fenotípicas.....	19
1.3.3 A participação da secreção de fluido.....	25
1.3.4 A DRPAD é uma doença ciliar.....	27
1.3.5 Alterações do ciclo celular.....	29
1.4 Isquemia/Reperusão e Coordenação Celular.....	32
1.5 Hipóteses.....	36
 2 OBJETIVOS.....	 38
 3 MÉTODOS.....	 41
3.1 Modelo Animal.....	42
3.2 Modelo Experimental de Isquemia/Reperusão.....	44
3.2.1 Grupos experimentais incluídos no estudo.....	45
3.3 Determinações Bioquímicas.....	46
3.4 Análises Morfológicas.....	48
3.4.1 Quantificação histológica da lesão renal.....	48
3.4.2 Análise de expansão intersticial renal.....	49
3.4.3 Análise dos índices cístico e de dilatação tubular.....	50
3.4.4 Análise por microscopia eletrônica.....	50
3.5 Análise Imunoistoquímica.....	51

3.6 Obtenção de Amostras de Tecidos, Preparação de cDNA e RT-PCR em Tempo Real.....	53
3.7 Análise Estatística.....	55
4 RESULTADOS.....	57
4.1 Análises Indiretas da TFG.....	58
4.2 Análises de Função Tubular.....	59
4.3 Análises Histológicas da Lesão Renal.....	66
4.3.1 Análises por microscopia eletrônica.....	69
4.4 Análises de Proliferação Celular.....	71
4.5 Análises de Apoptose.....	71
4.6 Análises de Expressão de p21.....	76
4.7 Análises de Infiltração de Macrófagos.....	79
4.8 Análises de Distribuição da Na-K-ATPase	82
4.9 Análises de Expansão e Fibrose Intersticial.....	84
4.10 Análises de Dilatação Tubular e Formação de Microcistos/Cistos.....	87
5 DISCUSSÃO.....	91

6 CONCLUSÕES.....	108
7 ANEXOS.....	111
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

Índice de Figuras

Figura 1.	Esquema das estruturas da policistina-1 e da policistina-2, os produtos dos genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i>	08
Figura 2.	Mecanismo molecular proposto para a formação de cistos na doença renal policística autossômica dominante. O primeiro golpe consiste na mutação de linhagem germinativa, enquanto o segundo constitui-se em uma mutação somática que inativa o alelo previamente normal em uma célula epitelial renal.....	14
Figura 3.	Alterações fenotípicas celulares associadas à DRPAD.....	18
Figura 4.	Vias alteradas na doença renal policística associadas ao fenótipo proliferativo celular.....	21
Figura 5.	Modelo da participação de p21 no ciclo celular após lesão induzida por isquemia/reperfusão.....	31
Figura 6.	Genotipagem de camundongos gerados na colônia constituída.....	43
Figura 7.	Modelo experimental da indução da lesão renal aguda bilateral por meio de insulto isquemia/reperfusão.....	46
Figura 8.	Organograma do estudo.....	47
Figura 9A.	Análises comparativas da S_{Cr} em camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> antes do insulto isquêmico e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto IR renal de 32 min.....	61
Figura 9B.	Análises comparativas da S_U em camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> antes do insulto isquêmico e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto IR renal de 32 min.....	61
Figura 10A.	Análises comparativas da S_{Cr} em camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> antes do insulto isquêmico e 48 h após o insulto IR renal de 35 min.....	63
Figura 10B.	Análises comparativas da S_U em camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> antes do insulto isquêmico e 48 h após o	

insulto IR renal de 35 min.....	63
Figura 10C. Curva de sobrevivência cumulativa e análise comparativa entre os camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> após 35 min de IR.....	63
Figura 11A. Análises comparativas da FE_{Na} em camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> antes do insulto isquêmico e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto IR renal de 32 min.....	65
Figura 11B. Análises comparativas da FE_K em camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> antes do insulto isquêmico e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto IR renal de 32 min.....	65
Figura 12. Análise histológica comparativa do dano residual cortical renal avaliado pelo índice de Jablonski em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d e 14 d após IR renal.....	67
Figura 13. Representação histológica da lesão renal nos camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal.....	68
Figura 14A. Imagens representativas de túbulo proximal em camundongos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i>	70
Figura 14B. Imagens representativas de capilares peritubulares em camundongos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i>	70
Figura 15. Análise comparativa de marcação para PCNA entre rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal.....	72
Figura 16. Imagens representativas da marcação para PCNA em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal.....	73
Figura 17. Análise comparativa de marcação para TUNEL entre rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal.....	74
Figura 18. Imagens representativas de marcação para TUNEL em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal.....	75

Figura 19.	Análise comparativa de marcação para p21 entre rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d pós-IR renal.....	77
Figura 20.	Imagens representativas da marcação para p21 em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d pós-IR renal.....	78
Figura 21.	Análise comparativa dos níveis de RNAm de p21 em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h após IR renal, realizada através de RT-PCR em tempo real.....	79
Figura 22.	Análise comparativa da marcação de Mac-2 entre rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal.....	80
Figura 23.	Imagens representativas da marcação para Mac-2 em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 48 h, 7 d, e 14 d pós-IR renal.....	81
Figura 24.	Imagens representativas da expressão da Na-K-ATPase em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> . Sham, 48 h e 7 d pós-IR renal.....	83
Figura 25.	Análise comparativa da área intersticial relativa entre camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 6 sem após IR renal.....	85
Figura 26.	Imagens representativas da área intersticial relativa nos camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> . Sham e 6 sem após IR renal.....	86
Figura 27.	Análise comparativa dos níveis de RNAm de <i>Col1a1</i> e <i>Col1a2</i> em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 6 sem após IR renal, realizada por meio de RT-PCR em tempo real.....	87
Figura 28.	Análise comparativa dos índices de dilatação tubular, formação de microscistos e formação de cistos entre rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i> 6 sem após IR renal.....	89

Figura 29. Representação histológica das alterações potenciais de dilatação tubular e microcistos em rins de camundongos machos <i>Pkd1^{+/+}</i> e <i>Pkd1^{+/-}</i>	90
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Curso temporal de S_{Cr} , S_U e PC em camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ submetidos a isquemia/reperfusão renal.....	62
Tabela 2 - Curso temporal de FE_{Na} , FE_K , U_{osm} , S_{Na} e S_K em camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ submetidos a isquemia/reperfusão renal.....	64

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SIGLAS

aa	aminoácido
Akt	<i>protein kinase B</i>
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
AP-1	<i>activator protein 1</i>
B-raf	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
C	cisto
DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
CIPI	<i>cdk-interactin protein 1</i>
cols	colaboradores
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cdk	quinase dependente de ciclina
<i>Col1a1</i>	cadeia alfa-1 do colágeno tipo I
<i>Col1a2</i>	cadeia alfa-2 do colágeno tipo I
<i>cpk</i>	<i>polycystic model</i>
DRCt	doença renal crônica terminal
DRP	doença renal policística
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante tipo 1
DRPAD2	doença renal policística autossômica dominante tipo 2
DRPAR	doença renal policística autossômica recessiva
DT	dilatação tubular

EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ErbB1	membro da família ErbB de receptores
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FE _K	fração de excreção de K ⁺
FE _{Na}	fração de excreção de Na ⁺
GPS	<i>G-protein-coupled receptor proteolytic site</i>
H&E	hematoxilina e eosina
Ht	heterozigoto
IP	intraperitoneal
IR	isquemia/reperfusão
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
jck	<i>juvenile cystic kidneys</i>
JNK	<i>jun n-terminal kinase</i>
Kif3a	<i>kinesin family member 3A</i>
Kim-1	<i>kidney injury molecule-1</i>
Kip	<i>cdk inhibitory protein</i>
LDL-A	<i>low density lipoprotein apheresis</i>
LRA	lesão renal aguda
LSD	<i>lower standard difference</i>
MC	microcisto
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NF-κB	fator de transcrição nuclear kappa B
NO	óxido nítrico

NTA	necrose tubular aguda
PACS-1	<i>phosphofurin acidic cluster sorting protein 1</i>
PACS-2	<i>phosphofurin acidic cluster sorting protein 2</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC	peso corpóreo
PC1	policistina-1
PC2	policistina-2
PCK	<i>polycystic kidney</i>
pcy	<i>polycystic</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinase
<i>PKD1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>PKD2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
pRB	proteína do retinoblastoma
primer	oligonucleotídeo iniciador
REJ	<i>receptor for egg jelly</i>
Rheb	<i>ras homolog enriched in brain</i>
RNA	ácido ribonucléico
RV2VP	receptor V2 da vasopressina
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RT	transcriptase reversa
S _{Cr}	concentração sérica de creatinina
S _K	concentração sérica de K ⁺

S _{Na}	concentração sérica de Na ⁺
S _U	concentração sérica de uréia
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
Sv	selvagem
TD	túbulo dilatado
TFG	taxa de filtração glomerular
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
Tg737	<i>intraflagellar transport 88</i>
TM	transmembrânico
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
mTOR	<i>mammalian target for rapamycin</i>
TRP	receptor de potencial transiente
TUNEL	<i>terminal deoxinucleotidil transferase uracil nick end labeling</i>
UA	unidade arbitrária
U _{Cr}	concentração urinária de creatinina
U _K	concentração urinária de K ⁺
U _{Na}	concentração urinária de Na ⁺
U _{osm}	osmolalidade urinária
WAF1	<i>wild type p53 associated fragment 1</i>
Wnt	<i>wingless-int</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
ANOVA	análise de variância
°C	grau Celsius
Ca ²⁺	cálcio
Na ⁺	sódio
K ⁺	potássio
Cl ⁻	cloreto
d	dia
dL	decilitro
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
h	hora
kb	kilobase
L	litro
<i>LacZ</i> ⁺	gene que codifica a beta-galactosidase
min	minuto
mg	miligrama
mEq	miliequivalente
mm Hg	milímetro de mercúrio

P	coeficiente de significância estatística
pb	par de base
pH	potencial hidrogeniônico
sem	semana
X	vezes
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado

RESUMO

RESUMO

Bastos A. P. **A haploinsuficiência de *Pkd1* aumenta a lesão renal e induz formação de microscistos após isquemia/reperfusão em camundongos** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 138p.

A maior parte dos casos de doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é causada por mutações no gene *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*). O insulto por isquemia/reperfusão (IR) constitui-se em uma causa freqüente de lesão renal aguda, incluindo a população de pacientes com DRPAD, mas a relação entre policistina-1 e IR é essencialmente desconhecida. Uma vez que a policistina-1 modula proliferação, diferenciação celular e apoptose em sistemas de cultura de células, sua menor atividade biológica na DRPAD poderia favorecer um maior grau de lesão renal. Utilizamos uma linhagem endogâmica de camundongos 129Sv com uma mutação nula em *Pkd1* para testar esta hipótese. Camundongos *Pkd1*^{+/-} não apresentam cistos renais até 12 semanas de vida, constituindo-se em um modelo puro de haploinsuficiência para este gene. Um insulto IR bilateral de 32 min foi induzido em camundongos machos de 10-12 semanas de idade, heterozigotos e selvagens, por meio do clampeamento reversível de ambos os pedículos renais. Os animais foram analisados 48 h, 7 dias (d) e 14 d após o insulto. Camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentaram FE_{Na}, FE_K e S_{Cr} mais elevadas que animais *Pkd1*^{+/+} 48 h após IR. O dano cortical residual foi mais severo em heterozigotos que em selvagens em todos os tempos avaliados. A marcação para PCNA também foi mais alta em camundongos *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} 48 h e 7 d pós-IR, enquanto a taxa de apoptose e a infiltração inflamatória intersticial foram maiores em heterozigotos que em selvagens nos seguimentos de 48 h, 7 d e 14 d pós-IR. A expressão renal de p21 foi menor nos camundongos *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} no tempo de 48 h pós-insulto, tanto no nível transcricional como traducional. Análises adicionais realizadas 6 semanas após o insulto IR revelaram dilatação tubular e formação de microcistos nos camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*, assim como fibrose renal aumentada nesses animais, comparados aos camundongos selvagens. Por fim, um insulto de 35 min de isquemia/reperfusão acompanhou-se de uma mortalidade precoce substancialmente maior nos animais *Pkd1*^{+/-}. Esses achados sugerem que isquemia/reperfusão induza uma lesão mais severa em rins de camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*, um processo aparentemente dependente de uma deficiência relativa da atividade de p21, assim como dilatação tubular e formação de microcistos. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a heterozigose para mutação nula em *Pkd1* em camundongo (e

talvez em humanos) esteja associada a um risco aumentado para lesão renal por isquemia/reperfusão e a um pior impacto desse insulto sobre a progressão da doença renal.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante 2.Doenças renais císticas 3.Mutação 4.Traumatismo por reperfusão 5.Isquemia 6.Proliferação de células 7. Inibidor de quinase dependente de ciclina p21

SUMMARY

SUMMARY

Bastos A. P. ***Pkd1* haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion in mice** [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 138p.

The majority of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) cases are caused by mutations in the *PKD1* gene. Ischemia/reperfusion is a frequent cause of acute kidney injury, including the ADPKD patient population, but the relationship between polycystin-1 and ischemia/reperfusion is essentially unknown. Since polycystin-1 modulates cell proliferation, cell differentiation and apoptosis in cell culture systems, its lower biological activity in ADPKD might amplify the degree of renal injury. Using an inbred 129Sv mouse line with a *Pkd1*-null mutation, 32-min renal ischemia/reperfusion was induced in 10-12 week-old male non-cystic mice, heterozygotes and wild types. The animals were analyzed at 48h, 7 days (d) and 14d after the insult. *Pkd1*^{+/-} mice showed higher FE_{Na}, FE_K and S_{Cr} than *Pkd1*^{+/+} animals at 48h of follow-up. The residual cortical damage was more severe in heterozygotes than wild types at all evaluated time points. The PCNA staining was also higher in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} mice at 48h and 7d, while cell apoptotic rates and the interstitial inflammatory infiltration were higher in heterozygotes than wild types at 48h, 7d and 14d post-ischemia/reperfusion. The expression of p21 was lower in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} kidneys at 48h, both at the transcriptional and translational levels. Additional analyses performed 6 weeks after the insult showed tubular dilatation and microcyst formation in the haploinsufficient mice, and increased renal fibrosis in these animals compared to wild types. Thirty-five-min ischemia/reperfusion, at last, was accompanied by a substantially higher early mortality of *Pkd1*^{+/-} animals. These findings suggest that ischemia/reperfusion induces a more severe injury in kidneys of *Pkd1*-haploinsufficient mice, a process that is apparently dependent on a relative deficiency of p21 activity, as well as tubular dilatation and microcyst formation. Altogether, our results suggest that mouse *Pkd1*-null heterozygosity (and maybe human) is associated with a higher risk for renal ischemia/reperfusion injury and with a worse impact of this insult upon renal disease progression.

Descriptors: 1. Autosomal dominant polycystic kidney disease 2. Cystic kidney diseases 3. Mutation 4. Reperfusion injury 5. Ischemia 6. Cell proliferation 7. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Policística Autossômica Dominante

1.1.1 *Epidemiologia*

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma das doenças humanas hereditárias mais comuns, constituindo-se na principal desordem renal monogênica. Esta doença acomete todas as raças, com uma prevalência estimada de 1:500 a 1:1000 ¹. A DRPAD é tipicamente diagnosticada em adultos, embora possa manifestar-se antes dos 18 anos em 1 a 2% dos casos.

Com penetrância de virtualmente 100%, a DRPAD se responsabiliza por aproximadamente 5% dos casos de doença renal crônica terminal (DRct) nos EUA, enquanto um estudo nacional sugere que acometa cerca de 7,5% dos pacientes em DRct no sul do Brasil ². Esta enfermidade associa-se, portanto, a um grande impacto médico e socioeconômico. De fato, apenas a metade dos pacientes atingem os 58 anos de idade sem evoluir para DRct ³⁻⁴. Interessantemente, as taxas anuais de incidência de DRct sugerem uma progressão mais rápida da doença em homens que em mulheres ⁵.

1.1.2 *Manifestações clínicas*

A DRPAD manifesta-se tipicamente nas terceira e quarta décadas de vida, embora possa acometer indivíduos em qualquer idade. Em sua forma mais avançada, os rins estão classicamente aumentados, com cistos de diferentes tamanhos, variando de poucos milímetros a vários centímetros, distribuídos pelo córtex e pela medula renais. Nesta enfermidade, os cistos renais podem se originar do epitélio de diferentes segmentos do néfron, embora o néfron distal se responsabilize pela maior parte dos mesmos. Esses cistos são revestidos por uma camada única de células epiteliais, menos diferenciadas e associadas a taxas elevadas de proliferação e apoptose ¹.

A maioria dos sintomas observados nos pacientes é consequência do aumento do tamanho do rim, como dor em flanco, lombar ou abdominal e plenitude pós-prandial, enquanto hematúria, infecção urinária, nefrolitíase e distúrbio de concentração urinária são complicações classicamente associadas aos cistos renais. O desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica é mais freqüente e precoce em pacientes com DRPAD, sendo encontrada em mais de 50% dos pacientes antes de redução significativa da taxa de filtração glomerular (TFG). Diversas evidências sugerem que a ativação do sistema renina-angiotensina intra-renal desempenhe um papel central na gênese e manutenção da hipertensão arterial associada à DRPAD, enquanto o papel do sistema circulante ainda é controverso ⁶. Admite-se que a ativação do sistema renina-angiotensina decorra de

isquemias renais setoriais, conseqüentes à progressiva expansão cística. Outros fatores também parecem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial nesta desordem, incluindo aumento da atividade simpática, resistência à insulina, elevação dos níveis de endotelina-1 e redução da atividade da óxido nítrico (NO) sintase constitutiva.

Embora a DRPAD apresente um fenótipo renal predominante, ela se constitui numa doença sistêmica, associando-se também a manifestações extra-renais ⁴. Entre essas manifestações, destacam-se o desenvolvimento de cistos hepáticos, aneurismas intra-cranianos e valvopatias cardíacas. Fenótipos menos freqüentes incluem ainda cistos pancreáticos, seminais e aracnóides, hérnias abdominais e inguinais, divertículos colônicos e outros achados vasculares como aneurismas e dilatação de raiz aórtica ^{3, 7}.

Os cistos hepáticos constituem a manifestação extra-renal mais comum na DRPAD, sendo geralmente detectados 10 anos após o aparecimento dos primeiros cistos renais. Com o intuito de aumentar a sensibilidade metodológica, um estudo recente utilizando ressonância magnética demonstrou a presença de cistos hepáticos em 58, 85 e 94% dos pacientes nas faixas de idade de 15 - 24, 25 - 34 e 35 - 46 anos de idade ⁸. Disfunção hepática e hipertensão portal, contudo, são raras na DRPAD, mesmo na presença de múltiplos cistos hepáticos. Os exames bioquímicos geralmente se apresentam normais, exceto por um pequeno aumento da fosfatase alcalina sérica. O fenótipo hepático policístico pode ocorrer, contudo, como uma enfermidade geneticamente distinta não associada a cistos renais, a doença hepática policística autossômica dominante. Mutações nos genes

PRKCSH e *SEC63* responsabilizam-se por cerca da terça parte desses casos ⁹.

Aneurismas intracranianos assintomáticos são encontrados em 8% dos pacientes com DRPAD, o que equivale a uma frequência três a quatro vezes maior que a população geral ¹⁰⁻¹¹. É importante notar que o risco relativo de apresentação de um aneurisma intracraniano nesta população de pacientes aumenta mais de duas vezes em indivíduos com história familiar de aneurisma intracraniano ou hemorragia subaracnóide, comparados àqueles sem este antecedente ¹¹. A maior parte dos aneurismas intracranianos associados à DRPAD apresentam diâmetro inferior a 6 mm e, assim como na população geral, a vasta maioria dos mesmos acomete a circulação cerebral anterior.

A quarta parte dos pacientes com DRPAD apresenta prolapso de valva mitral ¹²⁻¹³. Insuficiência aórtica e dilatação da raiz da aorta também podem ocorrer. Embora essas valvopatias possam progredir com o tempo, raramente exigem a substituição valvar. Indivíduos com esta moléstia também apresentam um risco elevado de derrame pericárdico, provavelmente em virtude de uma maior complacência do pericárdio parietal. Tais efusões, entretanto, são geralmente bem toleradas e não associadas a manifestações clínicas significativas ¹³.

1.2 Patogênese e Genética Molecular da DRPAD

1.2.1 Os Genes *PKD1* e *PKD2*

A DRPAD é geneticamente heterogênea, podendo decorrer de mutações em um de dois genes: *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) e *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*). Mutações no gene *PKD1*, localizado na região cromossômica 16p13.3, responsabilizam-se por cerca de 85% dos casos da doença, enquanto em cerca de 15% dos pacientes a enfermidade deve-se a mutações em *PKD2*, mapeado a 4q21. A depender do loco envolvido, a doença é denominada DRPAD tipo um (DRPAD1) ou tipo dois (DRPAD2) ³. Famílias com DRPAD não ligadas a *PKD1* e *PKD2* foram anteriormente descritas, porém uma análise mais recente e profunda de uma delas mostrou heterozigose composta para *PKD1* e *PKD2*, e confirmações adicionais ainda não encontram-se disponíveis para as demais. Nesse contexto, a existência de locos adicionais associados à DRPAD é seriamente questionada ¹⁴.

PKD1 estende-se por um segmento genômico de aproximadamente 52 kb, compreende quarenta e seis éxons e dá origem a um transcrito de 14,2 kb, associado a um quadro de leitura aberta de aproximadamente 12,9 kb. O gene *PKD2*, por sua vez, distribui-se por 68 kb, compreende 15 éxons e expressa um RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) de 5,4 kb, relacionado a um quadro de leitura aberta de 2,9 kb ³.

1.2.2 *Policistina- 1 e policistina-2, os produtos de PKD1 e PKD2*

O gene *PKD1* codifica policistina-1 (PC1), uma glicoproteína integral de membrana de 4.303 aminoácidos (aa) e massa molecular de ~460 kDa (Figura 1). Esta proteína apresenta uma porção extracelular amino-terminal de 3.074 aa ^{1, 3}, onze domínios transmembrânicos (TM) e uma cauda carboxi-terminal intracelular curta. Domínios contidos na região extracelular estão aparentemente envolvidos em interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato, mediando potencialmente interações célula-célula e/ou célula-matriz. Tais regiões parecem estar envolvidas na regulação de proliferação, polaridade e diferenciação celular, propriedades da PC1. Este conjunto de domínios inclui dezesseis repetições de 80 aa semelhantes a regiões da imunoglobulina, denominadas domínios PKD, uma sequência sinal, repetições ricas em leucina, domínios WSC, lectina tipo-C e LDL-A (*low density lipoprotein apheresis*), um módulo REJ (*receptor for egg jelly*) e um domínio GPS (*G-protein-coupled receptor proteolytic site*) ¹⁵⁻¹⁶.

O grande módulo REJ associa-se a um papel regulatório aparentemente importante, tendo sido originalmente descrito em uma proteína envolvida na reação acrossômica do ouriço do mar ¹⁵. PC1 pode ser clivada em um sítio localizado imediatamente antes do primeiro domínio TM, o domínio GPS, resultando em dois fragmentos, amino-terminal ¹⁷ e carboxi-terminal ¹⁸. Tais fragmentos permanecem acoplados após a clivagem, porém podem se separar dependendo do estímulo vigente. A capacidade de clivagem e conseqüente geração de um fragmento amino-

terminal traduz-se em repercussões estruturais e funcionais renais significativas e específicas¹⁶⁻¹⁷. Enquanto camundongos nulos para *Pkd1* morrem *in utero* e apresentam cistos renais e pancreáticos, malformações cardíacas, vasculares e esqueléticas, camundongos homozigotos para uma mutação associada à expressão de PC1 não clivável, mas não da forma clivável, sobrevivem até o dia P28, com rins aumentados e císticos. Tais achados sugerem que a forma não clivada de PC1 seja crítica na embriogênese, ao passo que a forma clivada da molécula seja essencial para a manutenção da integridade tubular do néfron distal¹⁶.

Figura 1. Esquema das estruturas da policistina-1 e da policistina-2, os produtos dos genes *PKD1* e *PKD2*.

PC1 apresenta a estrutura de um receptor de membrana, mas também parece atuar como uma molécula da adesão ¹⁹⁻²⁰. Sua pequena cauda intracitoplasmática, de 197 aa, contém diversos sítios de fosforilação e um domínio espiral enrolado denominado *coiled-coil*. Este domínio, tipicamente envolvido em interações proteína-proteína e capaz de mediar transdução de sinais para o meio intracelular, é responsável pela interação física da PC1 com a cauda carboxi-terminal intracitoplasmática da policistina-2 (PC2), o produto do gene *PKD2* ³.

A PC2, com 968 aa e ~110kDa, também se constitui numa glicoproteína integral de membrana. Com seis domínios transmembrânicos e extremidades carboxi e amino-terminais intracelulares, a PC2 apresenta homologia com os seis últimos domínios TM da PC1. Juntas, PC1 e PC2 formam uma subfamília de canais TRP (receptor de potencial transiente), denominada TRPP. Em sua extremidade carboxi-terminal, a PC2 contém um domínio *EF hand*, capaz de ligar Ca^{2+} ³. PC2, também denominada TRPP2, funciona como um canal de cátions não-seletivo com permeabilidade a Ca^{2+} , cuja atividade é regulada pela PC1. A interação física entre as PC1 e PC2 desempenha, portanto, um papel fundamental na homeostase do Ca^{2+} intracelular ²¹.

As policistinas são proteínas multifuncionais. PC1 se expressa predominantemente na membrana plasmática e possivelmente no retículo endoplasmático, enquanto seu fragmento carboxi-terminal pode também migrar para o núcleo ¹⁸. PC2, por outro lado, é encontrada predominantemente no retículo endoplasmático e em menor intensidade na

membrana plasmática. PC1 e PC2 se co-localizam nos cílios apicais primários de células epiteliais tubulares renais, mas também apresentam efeitos extra-ciliares associados à mediação de adesão celular e interação com o citoesqueleto ^{20, 22-23}. Em túbulos maduros, PC1 se expressa na membrana basolateral, em sítios de interação célula-célula e célula-matriz extracelular, estruturas identificadas como desmossomos e junções de adesão ¹⁴. Vale notar que enquanto PC1 apresenta seus níveis mais altos de expressão no rim em desenvolvimento, associando-se a níveis baixos no rim adulto, PC2 também se acompanha de expressão significativa durante o desenvolvimento, mas mantém níveis elevados no rim maduro. À semelhança da PC1, PC2 se expressa aparentemente em todos os segmentos tubulares do néfron, à exceção provável das alças finas de Henle, sendo ausente no glomérulo ²⁴.

A PC2 localiza-se principalmente no retículo endoplasmático, mas também é encontrada na membrana plasmática, no centróssomo, nos eixos mitóticos das células em divisão e se colocaliza com PC1 nos cílios apicais primários de células epiteliais tubulares renais ²³⁻²⁵. Seu transporte e sua localização subcelular são reguladas pela fosforilação e interações com proteínas adaptadoras ²⁶⁻²⁷. Sua fosforilação por caseína quinase 2 media sua interação com PACS-2 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*)/COPI ou com PACS-1/AP-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 1/activator protein 1*), determinando seu trânsito para o retículo endoplasmático e Golgi/Transgolgi. A desfosforilação da PC2 por PP2A (proteína fosfatase 2A) promove seu desacoplamento de PACS-1 ou PASC-

2, resultando em sua translocação para a membrana plasmática ²⁸. A translocação para a membrana plasmática também parece ocorrer em resposta a sua interação com PC1 ²⁷. PC1 e PC2 foram também localizadas, por fim, em exossomos ²⁹. Estes, por sua vez, parecem interagir preferencialmente com o cílio apical primário de células renais e das células epiteliais biliares, de uma maneira altamente específica ²⁹. Interessantemente, a urina contém uma subpopulação de exossomos com grandes quantidades de PC1 e PC2.

1.2.3 Implicações do loco mutado sobre a severidade da DRPAD

Embora mutações em *PKD1* e *PKD2* determinem as mesmas manifestações renais e extra-renais, pacientes com DRPAD1 apresentam uma forma mais severa da doença quando comparados a pacientes com DRPAD2 ^{3, 30}. A DRPAD1 se associa a menores sobrevidas renal e do paciente, apresentando medianas de idade de diagnóstico e de evolução para DRCt mais baixas, bem como maior propensão a hipertensão arterial sistêmica, infecções do trato urinário e hematúria ³⁰. As manifestações renais mais intensas da DRPAD1, por sua vez, parecem decorrer do desenvolvimento de mais cistos na fase precoce de vida do que na DRPAD2, e não de um crescimento cístico mais rápido ³¹⁻³².

1.2.4 Bases genéticas moleculares da cistogênese associada à DRPAD: o modelo de dois eventos e a hipótese de um terceiro golpe

A cistogênese constitui-se em um processo focal na DRPAD, acometendo segmentos de < 1% dos néfrons. Análises de amostras de ácido desoxirribonucléico (DNA) do epitélio cístico renal trouxeram importantes contribuições à elucidação das bases moleculares desse processo³³. Tais estudos demonstraram que os cistos são monoclonais na DRPAD e sugeriram fortemente que, embora a transmissão genética desta condição clínica obedeça a um padrão dominante, ao nível celular/molecular o mecanismo de formação dos cistos seja recessivo. Tal modelo estabelece, portanto, um padrão *knudsoniano* para a cistogênese na DRPAD, incluindo dois eventos para que ocorra a formação de cistos. Este processo tem como primeiro golpe a mutação germinativa, presente em todas as células tubulares renais do paciente, enquanto o segundo evento é representado por uma mutação somática no alelo previamente normal do gene (Figura 2). Este modelo se aplica a ambas as formas genéticas da doença, DRPAD1 e DRPAD2, e a cistos renais e hepáticos³³⁻³⁴.

Modelos animais geneticamente modificados, gerados ao longo dos últimos 14 anos, apoiaram o modelo de dois golpes. De fato, camundongos homozigotos nulos para *Pkd1* e *Pkd2*, ortólogos dos genes *PKD1* e *PKD2* em camundongos, apresentaram letalidade pré-natal, assim como intensa formação de cistos renais³⁵. É importante notar, contudo, que animais heterozigotos para tais mutações inativadoras desenvolveram apenas

poucos cistos tardios, principalmente no fígado. Vale mencionar que a cistogênese renal pode ser observada mesmo na ausência de inativação completa de *Pkd1* (ortólogo ao gene *PKD1* em camundongo), uma vez que dois modelos animais homozigotos para alelos *Pkd1* hipomórficos apresentaram diminuição dos níveis de PC1 e desenvolveram cistos renais ³⁶. Em outro modelo, camundongos com expressão reduzida de PC1 apresentaram viabilidade peri-natal ³⁷. Finalmente, em um estudo para analisar aspectos moleculares e celulares da DRPAD, células tronco embrionárias *Pkd1*^{-/-} foram agregadas a mórulas de camundongos *Pkd1*^{+/+} LacZ⁺ Rosa26, gerando um animal quimérico que sobreviveu além de um mês de idade ³⁸. Neste modelo, os cistos mostraram-se inicialmente compostos por uma população mista de células *Pkd1*^{-/-} e *Pkd1*^{+/+}, sendo progressivamente substituída por células predominantemente *Pkd1*^{-/-}. Esses resultados, portanto, também apóiam o modelo de dois golpes.

Estudos recentes ampliaram conceitualmente este modelo patogénético. Em um artigo chave pautado na geração de camundongos *knockout* condicionais para *Pkd1*, Piontek e cols demonstraram que quando a inativação do gene *Pkd1* ocorreu antes do 13º dia de vida, os camundongos cursaram com formação cística intensa e progressiva, ao passo que a inativação estabelecida após esta fase acompanhou-se de uma doença cística muito mais branda e bem mais tardia ³⁹. Tais achados demonstram que a resposta renal à inativação de *Pkd1* é essencialmente dependente do momento em que ocorre, acompanhando-se de uma janela de transição temporalmente muito bem definida. Em outros estudos, os

genes ciliogênicos *Tg737* (*intraflagellar transport 88*) e *Kif3a* (*kinesin family member 3A*) foram inativados em diferentes momentos, por meio da geração de seus respectivos camundongos *knockout* condicionais. Tais estudos revelaram que a taxa de desenvolvimento cístico dependeu do momento da perda ou inativação ciliar⁴⁰⁻⁴¹. De fato, quando a inativação rim-específica de *Kif3a* foi induzida ao nascimento, os animais apresentaram perda do cílio apical primário e uma importante formação cística renal primariamente nas alças de Henle, enquanto a inativação induzida em camundongos adultos não determinou desenvolvimento rápido de cistos, apesar da perda do cílio primário. Tais achados seguem conceitualmente, portanto, os resultados encontrados para *Pkd1*⁴²⁻⁴³.

Figura 2. Mecanismo molecular proposto para a formação de cistos na doença renal policística autossômica dominante. O primeiro golpe consiste na mutação de linhagem germinativa, enquanto o segundo constitui-se em uma mutação somática que inativa o alelo previamente normal em uma célula epitelial renal.

Tais achados também se alinham com observações fundamentais de autores ^{37, 42}, obtidas a partir de um modelo de deleção indutível de *Pkd1* específica para rim ⁴³. Quando a inativação ocorreu em camundongos recém-nascidos, a formação cística renal mostrou-se rápida e massiva, enquanto a inativação de *Pkd1* induzida em animais adultos seguiu-se de um fenótipo cístico leve. Esses resultados sugerem que a deficiência de *Pkd1* não inicie proliferação celular autônoma suficiente para a formação de cistos, explicando porque num ambiente de menor proliferação celular como o rim adulto a inativação deste gene não se segue de rápido desenvolvimento cístico. Interessantemente, nesse cenário onde a cistogênese parece depender de uma taxa de proliferação celular aumentada, chamam atenção as observações de Piontek e cols em seu modelo de inativação de *Pkd1*, onde não referem proliferação celular significativamente aumentada no processo de cistogênese ³⁹.

Em um estudo mais recente, Takakura e cols demonstraram que a inativação de *Pkd1* na quinta semana de vida resultou na formação de cistos focais seis a nove semanas após a indução, enquanto a inativação induzida precocemente, na primeira semana de vida, acompanhou-se de um desenvolvimento massivo de cistos seis semanas após a inativação do gene. Tais achados corroboram as observações anteriores, fortalecendo a hipótese de que a inativação de *Pkd1* não seria suficiente para iniciar a proliferação celular necessária à formação cística no rim adulto ⁴². Nesse cenário, esses pesquisadores propuseram que o rápido desenvolvimento de

cistos requereria um terceiro golpe no rim maduro, de natureza genética ou não genética.

1.2.5 Correlações genótipo-fenótipo

Uma ampla variedade de mutações pode causar a DRPAD. Mais de trezentas mutações em *PKD1* e mais de 90 em *PKD2* associadas a truncamento já foram reportadas; a quarta parte do total de mutações, por sua vez, são do tipo *missense* ³. Essa grande heterogeneidade alélica, associada ao enorme tamanho e à complexidade do gene *PKD1*, dificultam a análise molecular direta. A constatação de que a maior parte das mutações são particulares e que grande parte delas são *missense*, por sua vez, torna difícil a comprovação de patogenicidade de algumas variantes e impede o diagnóstico molecular de certeza em vários pacientes.

A DRPAD apresenta grande variabilidade fenotípica inter e intrafamiliar, neste caso entre portadores da mesma mutação de linhagem germinativa. Esta variabilidade pode ser observada, ainda, mesmo dentro de um rim acometido pela doença, uma vez que a formação cística na DRPAD constitui-se num processo focal. Nesse contexto, além dos efeitos associados ao loco envolvido na doença, evidências atuais apontam para a participação da frequência e do momento da vida em que ocorrem mutações somáticas em *PKD1/PKD2*, a influência de locos modificadores e a participação de fatores ambientais sobre o estabelecimento do fenótipo renal ³⁰. De fato, observações comparativas entre irmãos monozigóticos e

irmãos fraternos confirmam a influência de genes modificadores sobre o curso da doença renal.

A natureza e a posição da mutação de linhagem germinativa, contudo, também poderiam influenciar significativamente o curso da doença. Alguns estudos procuraram abordar especificamente este ponto ³. O tipo de mutação, associada a truncamento ou *missense*, não parece se correlacionar fortemente com o fenótipo. A localização das mesmas, entretanto, mostrou-se relevante: mutações localizadas na parte 5' do gene *PKD1* associaram-se a uma evolução mais precoce para DRCh e maior prevalência de aneurismas intracranianos que mutações posicionadas na porção 3' do gene ³¹.

1.3 Sinalização e Patogênese Celular na DRPAD

1.3.1 Alterações celulares fundamentais associadas à DRPAD

Cistos renais de pacientes com DRPAD apresentam uma monocamada de células epiteliais caracterizadas por índices aumentados de proliferação e apoptose, bem como por desdiferenciação celular (Figura 3). É importante notar, ainda, que PC1 e PC2 constituem-se em moléculas envolvidas na mediação de adesão celular, estruturação do citoesqueleto, polaridade celular e modulação da matriz extracelular ¹⁹.

Figura 3. Alterações fenotípicas celulares associadas à DRPAD.

Múltiplas evidências demonstram que as policistinas são essenciais para o controle da proliferação celular e para a manutenção do fenótipo diferenciado do epitélio tubular renal ^{34, 44}. De fato, a redução de PC1 ou PC2 abaixo de um nível crítico acompanha-se de um fenótipo celular anômalo, caracterizado por taxas aumentadas de proliferação celular e de apoptose, incapacidade de manter a polaridade planar, expressão de um fenótipo secretório, e remodelação da matriz extracelular ⁴⁴. Os mecanismos moleculares responsáveis por este fenótipo alterado ainda não são bem compreendidos, porém a descrição recente de vias alteradas na doença sugere algumas hipóteses bem fundamentadas. É importante reconhecer

que as policistinas atuam em diversas vias de sinalização celular, o que torna esta tarefa complexa. De todo modo, algumas intervenções sobre tais vias com intuito terapêutico têm se mostrado bem sucedidas em modelos animais de doença renal policística, ortólogos e não ortólogos à doença humana ⁴⁵⁻⁴⁸. Tais resultados indicam, portanto, relevância de tais vias na patogênese da DRPAD.

1.3.2 Vias de sinalização alteradas na DRPAD e implicações fenotípicas

Dadas a natureza e as propriedades do complexo PC1-PC2, a doença renal policística caracteriza-se por uma homeostase defeituosa do Ca^{2+} intracelular, com uma conseqüente redução nos níveis intracelulares deste cátion. Células DRP (doença renal policística) apresentam uma resposta proliferativa anormal à adenosina monofosfato cíclico (AMPc), efeito não verificado para células tubulares renais normais ⁴⁵. Além disso, a redução da atividade do complexo PC1-PC2 e a conseqüente diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} poderiam estimular a adenil ciclase seis e inibir a fosfodiesterase um dependente de cálcio/calmodulina, favorecendo o acúmulo intracelular de AMPc ⁴⁹. Em conjunto, esses efeitos ativam a via MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase*), promovendo proliferação celular e secreção transepitelial de fluido, características fundamentais da DRPAD ⁵⁰. Esta resposta hiperproliferativa anormal de células DRP a AMPc sugere fortemente, portanto, ligação entre o fenótipo cístico e a redução da concentração

intracelular de Ca^{2+} , resultante da perturbação da via policistínica ^{27, 50}. De fato, a transfecção de células principais do ducto coletor com um construto dominante negativo da cauda carboxi-terminal da PC1 determinou a ativação de B-Raf (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) e ERK, através de um processo dependente de AMPc e inibível por um ionóforo de Ca^{2+} ⁵¹ (Figura 4). Além disso, medidas que promoveram a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} resgataram o fenótipo de proliferação normal em células DRPAD e doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR) humanas ⁵².

Na DRPAD, na DRPAR e na nefronoftise os cistos renais se originam predominantemente de ductos coletores, ao menos nos estágios precoces. Nas células principais dos ductos coletores, por sua vez, o principal sistema agonista de geração de AMPc é o sistema vasopressina-receptor V2 (RV2VP). Nesse contexto, merecem destaque os achados de que a utilização de um antagonista do RV2VP determinou inibição do desenvolvimento e da progressão da doença renal cística em ratos PCK (*polycystic kidney*), um modelo animal ortólogo à DRPAR humana, e em camundongos *pcy* (*polycystic*), um modelo ortólogo à nefronoftise do adolescente ⁴⁵. O tratamento com este antagonista também se acompanhou de inibição tanto da cystogênese como do aumento renal em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD2 humana ^{45, 47, 53}. Vale mencionar que um estudo clínico com tolvaptan, um antagonista do RV2VP, encontra-se em andamento em populações de pacientes com DRPAD ⁵⁴. A supressão da liberação de arginina vasopressina obtida por uma elevada ingesta de água,

por sua vez, também se acompanhou de um efeito protetor sobre a doença renal policística no rato PCK ⁴⁶.

Figura 4. Vias alteradas na doença renal policística associadas ao fenótipo proliferativo celular.

A ação da somatostatina sobre receptores subtipo 2, localizados nos rins e no fígado, também é capaz de modular negativamente os níveis celulares de AMPc. Um estudo inicial em pacientes com DRPAD com um análogo estável da somatostatina, a octreotida, mostrou que esta droga

lentificou a expansão do volume renal ⁴⁷. Esta droga também limitou a progressão da doença cística renal e hepática no rato PCK, apoiando o conceito de que iniba o crescimento cístico ⁵⁵.

As propriedades biológicas da PC1 mostraram-se, também, essenciais ao processo de tubulogênese renal. Um importante estudo demonstrou que células MDCK (*Madin-Derby canine kidney*) transfectadas de forma estável com *PKD1*, cultivadas em meio gel de três dimensões, apresentaram redução da taxa de crescimento celular, resistência a apoptose e evoluíram para diferenciação celular terminal ⁴⁴. A orquestração dessas respostas celulares traduziu-se em tubulogênese espontânea, associada a estruturas tubulares bem desenvolvidas, enquanto células transfectadas controle, sem expressão de PC1, permaneceram formando estruturas multicelulares císticas. Estudos posteriores atribuíram a indução de resistência a apoptose pela PC1 à ativação de fosfatidilinositol - 3 quinase (PI3K) e Akt (*protein kinases B*) via GiCPR. De fato, modelos animais com DRP apresentaram aumento da taxa de apoptose celular e ativação de PI3K e de Akt ⁵⁶. O papel da PI3K e de Akt na DRPAD, entretanto, permanece incerto ⁵⁷. Interessantemente, em linhagens celulares de câncer a superexpressão de *PKD1* foi capaz de induzir parada do ciclo celular em G0/G1 e aumento da taxa de apoptose ⁵⁸. Embora células MDCK submetidos à *knockdown* de PC1 tenham apresentado maiores taxas de proliferação e apoptose, elas também se acompanharam de aumento de adesão a colágeno tipo I e resistência a anoikis (apoptose deflagrada por perda de ancoramento celular), provavelmente devido ao aumento de expressão de integrina- $\alpha 2\beta 1$ ⁵⁹.

Vários trabalhos sugerem que PC1 possa também funcionar como um receptor acoplado à proteína G, ativando $G\alpha$ e liberando $G\beta\gamma$ ⁶⁰. A ativação de sinalização via proteína G regula proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e secreção de fluido^{21, 61}. Além disso, a redução da taxa de proliferação celular determinada pela PC1 pode depender de regulação positiva de p21. A ativação de PC1, através de um processo dependente de PC2, ativa a via JAK2 - STAT1 (*janus kinase 2 - signal transducer and activator of transcription 1*), gerando homodímeros STAT1⁶². Esses dímeros se translocam ao núcleo, onde se ligam ao promotor de *p21*, promovendo aumento de sua transcrição, inibição da atividade de Cdk2 (quinases dependentes de ciclinas 2) e inibição do ciclo celular, com parada celular em G0/G1⁶². Essa via parece contribuir para o efeito de redução da taxa de proliferação celular determinada pela PC1.

A importância das poliestrinas na adesão célula-célula é evidenciada pela expressão de PC1 na membrana plasmática em desmossomos, adesões focais e junções *adherens*¹⁴. PC1 forma um complexo na junção de aderência com a caderina-E e com as cateninas- α , β , e γ . Sob circunstâncias de privação de Ca^{2+} , PC1 e caderina - E são seqüestradas nas vesículas citoplasmáticas. A restauração do Ca^{2+} , por sua vez, deflagra o recrutamento de ambas as proteínas para restabelecer sítios de contato célula-célula^{19, 63}. Um outro estudo propôs que a PC1 regule também a força mecânica de adesão entre as células, através do controle da formação de junções de adesão estabilizadas e associadas à actina⁵⁷. Na DRPAD, os

complexos PC1/caderina-E são quebrados e a caderina-E é seqüestrada internamente e substituída na superfície pela caderina-N.

Várias alterações podem determinar perda da polaridade celular planar, podendo levar à conversão de estruturas tubulares em císticas. Entre elas destacam-se disfunções centrossomais, amplificação ou ativação da via de sinalização Wnt (*wingless-int*) canônica dependente da catenina- β , e a inibição da via de sinalização Wnt não-canônica independente da catenina- β ⁶⁴. Neste caso, o efeito seria decorrente da ativação da quinase amino-terminal c-jun, da JNK (*jun N-terminal kinase*), e de alterações transientes na concentração de Ca^{2+} citosólico (Figura 4).

TSC2 (*Tuberous sclerosis 2*), um dos genes mutados na esclerose tuberosa, é adjacente ao gene *PKD1* em 16p13.3. Deleções contíguas desses genes seguiram-se de uma doença cística renal muito severa em vários pacientes analisados ⁶⁵. Interessantemente, evidências recentes apóiam a existência de interação entre PC1 e tuberina, o produto do gene *TSC2* e inibidor de Rheb (*ras homolog enriched in brain*) e mostram que a via mTOR (*mammalian target for rapamycin*) encontra-se ativada na DRPAD. Esses achados sugerem um modelo adicional para a cystogênese, onde na ausência de PC1 não haveria inibição de Rheb, levando à ativação de mTOR e ao fenótipo cístico ⁶⁶. Para testar esta hipótese, esses autores utilizaram rapamicina, um inibidor da via mTOR, em modelos animais de DRP, incluindo um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1 humana. Em conjunto, esses resultados mostraram melhora do fenótipo cístico e proteção da função renal ⁶⁶. Embora interessantes, esses dados devem ser

interpretados com cautela, pois não está excluída a possibilidade de que tais efeitos se devam a uma inibição inespecífica de outras vias e/ou a um efeito anti-proliferativo não necessariamente relacionado à patogênese da doença. Outro estudo, clínico e retrospectivo, foi conduzido em pacientes com DRPAD transplantados renais portadores de fígado policístico, submetidos a um esquema imunossupressor incluindo sirolimo ou tacrolimo. Enquanto os pacientes submetidos à imunossupressão com tacrolimo cursaram com aumento hepático, os tratados com sirolimo evoluíram com diminuição do volume do fígado policístico ⁴⁸. Também foi observada, no grupo tratado com sirolimo, uma tendência a maior redução do volume renal nativo.

Células epiteliais renais císticas também apresentam expressão aumentada e localização apical anormal dos receptores ErbB1 (membro da família ErbB de receptores) e ErbB2. Inibidores da atividade tirosina quinase de EGFR reduziram a formação de cistos e melhoram a função renal em um modelo recessivo de DRP, o camundongo BPK ⁶⁷. A utilização de um inibidor de Src, por sua vez, melhorou a formação renal cística e as anormalidades ductais biliares no rato PCK.

1.3.3 A participação da secreção de fluido

Acredita-se que secreção de fluido para a luz do cisto deva participar ativamente do processo de expansão cística. Os estudos mais controlados sugerem que esta secreção baseie-se num transporte ativo secundário de cloreto. As células epiteliais renais possuem a capacidade de secretar e de

reabsorver soluto e fluido. Em células normais, o fluxo de absorção é maior que o fluxo secretório. A reabsorção de NaCl pelas células principais dos ductos coletores, aparentemente o principal segmento de onde se originam os cistos, é dirigida pela baixa concentração intracelular de Na^+ gerada pela Na-K-ATPase basolateral. O NaCl entra na membrana luminal através dos canais epiteliais de Na^+ e Cl^- , enquanto o K^+ é recirculado na membrana apical por meio de canais de K^+ ROMK medulares externos. A água, por sua vez, entra pela membrana luminal celular através de canais aquaporina-2 sensíveis à vasopressina.

As células epiteliais císticas, contudo, se comportam de maneira muito diferente das células principais do ducto coletor cortical normal. Segundo o modelo proposto para este processo patológico, o cloreto entra através da membrana basolateral por co-transportadores Na-K-2Cl, seguindo o gradiente de Na^+ estabelecido pela Na-K-ATPase basolateral, e sai da célula pela membrana luminal através do canal de cloreto CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Este canal é ativado por AMPc, sendo responsivo à proteína quinase A apical ²⁵. Este acúmulo ativo de cloreto dentro do lúmen cístico, por sua vez, determina a secreção de Na^+ e água, seguindo o potencial transepitelial e os gradientes osmóticos.

Nesse contexto, a inibição de CFTR poderia reduzir a taxa de crescimento cístico. Um estudo relativamente recente mostrou, de fato, que inibidores de CFTR lentificaram o crescimento cístico e protegeram a função renal em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1 de rápida evolução ⁶⁸.

1.3.4 A DRPAD é uma doença ciliar

Várias evidências experimentais apóiam o envolvimento do cílio apical primário na patogênese das doenças renais policísticas ⁶⁹. O cílio apical primário é um marcador da diferenciação celular. Defeitos na sua formação, estrutura ou função podem potencialmente resultar em desbalanço em favor de proliferação e alterações de polaridade celular e secreção transepitelial de cloreto ¹⁴. Resultados adicionais demonstraram, de fato, a conexão entre cílio primário e doença renal policística através de modelos animais onde a inativação de um componente motor anterógrado, KIF3A, compromete o transporte intraflagelar, fundamental para o tráfego ciliar de proteínas e para a formação do cílio ⁷⁰. Interessantemente, tais camundongos desenvolveram cistos renais a partir do 5º dia de vida e apresentaram insuficiência renal por volta dos 21 dias de idade. Além da ausência do cílio apical primário nas células císticas, foram observadas alterações tanto no nível celular como molecular, incluindo aumento nas taxas de proliferação e apoptose, alteração do perfil de expressão de EGFR e aumento da expressão de catenina- β e c-Myc. Tais resultados sugerem que a ausência do cílio apical primário gere fenótipos clínicos e celulares consistentes com DRP ¹².

O cílio primário é aparentemente sensível a estímulos químicos ou físicos, em particular ao fluxo de fluido tubular, transduzindo sinais do meio extra para o meio intracelular através de transientes intracelulares de Ca^{2+} . PC1 e PC2 desempenham um papel fundamental nesse processo ⁷¹. O complexo PC1-PC2 parece funcionar como um mecanossensor de superfície

ciliar que, uma vez ativado, promoveria influxo de Ca^{2+} através de PC2 ²¹⁻²². Este influxo, por sua vez, induziria liberação de Ca^{2+} a partir de estoques intracelulares, determinando ações biológicas de modulação de proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e expressão gênica ²¹. De fato, mutações tanto em *PKD1* como em *PKD2* resultam em anormalidades da sinalização envolvendo Ca^{2+} intracelular, porém os mecanismos precisos pelos quais as policistinas regulam esta sinalização e a liberação citosólica de Ca^{2+} ainda são incertos. Estudos conduzidos em diferentes modelos biológicos sugerem que a sinalização via Ca^{2+} possa envolver a ativação de receptores de rianodina ²², a interação entre PC2 e o receptor de inositol 1, 4, 5 tri-fosfato do tipo I e outros mecanismos ⁷².

Dois estudos sugerem que a porção carboxi-terminal de PC1 possa ser clivada e migrar para o núcleo da célula. Em um deles, mostrou-se que PC1 pode seqüestrar o fator de transcrição STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) no cílio, impedindo sua ativação. A interrupção do fluxo de fluido luminal (por exemplo, obstrução ureteral ou isquemia renal) deflagra a clivagem dos 112 aa finais. Este fragmento p112 interage com STAT6 e com o co-ativador P100, estimulando a atividade transcricional ⁷³. No outro estudo, o estímulo mecânico do cílio apical primário deflagraria a clivagem e a liberação de toda a cauda carboxi-terminal (p200). Este fragmento, contendo um motivo de localização nuclear, se ligaria à catenina- β no núcleo e inibiria sua capacidade de ativar a transcrição gênica dependente de um fator de células T, um efetor importante da via de sinalização Wnt canônica ⁶⁴.

1.3.5 Alterações do ciclo celular

Após lesão renal, as células epiteliais tubulares quiescentes entram no ciclo celular com o propósito de se multiplicarem e diferenciarem para reconstituir o tecido renal lesado. Após abandonar o estado quiescente (G0), a célula inicia um período de crescimento e produção protéica necessária para a síntese de DNA (G1), para então passar à fase de replicação de DNA (S). A transição entre essas duas fases apresenta o primeiro ponto de controle do ciclo, pois é onde se verifica o preparo celular para a síntese de DNA, afastando a possibilidade de dano ao DNA antes da duplicação. Após a síntese do DNA e antes da mitose, ocorre uma fase de transição chamada de G2, segundo ponto de regulação do ciclo, onde a célula novamente cresce e sintetiza proteínas, habilitando-se ao processo de divisão ⁷⁴⁻⁷⁵.

Durante todo o ciclo celular ocorre a expressão de diversas moléculas estimuladoras e inibidoras. Tais moléculas reguladoras são proteínas expressas de forma cíclica ao longo do ciclo e, por isso, são chamadas ciclinas. Essas proteínas regulam positivamente o ciclo e se encontram sob a forma de dímeros com suas parceiras catalíticas, as Cdk ⁷⁴⁻⁷⁵. Outra classe importante são os inibidores do complexo ciclina/ Cdk, como o grupo Kip (*Cdk inhibitory protein*), do qual fazem parte as proteínas p21, p27 e p57 e um grupo que inibe especificamente a ciclina D/Cdk4,6, denominado InK4 (*inhibitor for Cdk4*) ⁷⁶. Recentemente, a proteína p21 tem sido descrita como um fator inibidor importante na via p53-específica do controle de crescimento, uma vez que constitui-se em um inibidor do complexo Cdk. A

proteína p21 pode ser produzida quando um dano no DNA provoca atividade de p53. A proteína p21 é codificada pelo gene WAF1/CIP1 (*wild type p53 associated fragment 1/Cdk-interactin protein1*), um gene supressor tumoral, que está localizado no cromossomo 6p21.2. Um segundo ponto de controle do ciclo é na transição de G2 para M, quando a célula inicia a divisão celular, após concluir a replicação do DNA ⁷⁶. A replicação incompleta e/ou qualquer dano ao DNA inibe esse processo, estimulando a síntese de quinases que causam a fosforilação e a compartimentalização citoplasmática de cdc2 e de outras proteínas, cuja localização nuclear é crucial para a transição da fase G2 para a fase M. Essa compartimentalização é feita através da ligação e do transporte das proteínas 14-3-3 α . Interessantemente, p21 pode inativar diretamente a quinase cdc2, causando parada em G2 ⁷⁴. Na ausência da indução de p21, o aumento da expressão do gene 14-3-3 α células em crescimento causa uma incoordenação do ciclo celular e impedindo sua divisão. Este aumento de DNA celular conduz essas células descoordenadas à morte ⁷⁴⁻⁷⁶. Esta proteína pode ainda influenciar o destino celular após a lesão ⁷⁷⁻⁷⁸.

A presença de p21 e 14-3-3 α são necessárias para a coordenação do ciclo celular (Figura 5). A ausência de um deles traduz-se no aumento da taxa de morte celular e no aumento da mortalidade por lesão renal aguda (LRA) ⁷⁴.

Figura 5. Modelo da participação de p21 no ciclo celular após lesão induzida por isquemia/reperfusão (Adaptado de Price e cols; 2004).

É importante lembrar, ainda, que a apoptose constitui-se em um dos mecanismos responsáveis pela morte/perda celular. Este processo também se apresenta como um mecanismo de proteção, ao viabilizar a remoção de células senescentes, com dano no DNA, ou de células doentes que podem interferir na função normal ⁷⁵.

Como vimos, várias evidências sugerem fortemente que a DRPAD deva se associar a uma desregulação do ciclo celular. Um estudo recente, conduzido em dois modelos animais de DRP não ortólogos à DRPAD humana, mostrou que a roscovitina, uma droga inibidora do ciclo celular, inibiu e/ou retardou a progressão da doença renal cística em ambos os casos ⁷⁹. Tais observações indicam, de fato, a perturbação do ciclo celular nesses modelos animais de DRP. É importante destacar que um dos modelos, o camundongo *jck* (*juvenile cystic kidneys*), apresenta uma evolução cística renal mais lenta, enquanto o outro modelo, o camundongo

cpk (polycystic model), representa um fenótipo de evolução cística rápida e agressiva.

Diversas vias compreendendo receptores de superfície celular (como GPCRs, TKRs e integrinas) e proliferação celular epitelial encontram-se ativadas na doença renal policística. Entre elas destacam-se MAPK/ERK, mTOR e a ativação por PC1 da sinalização JAK2/STAT-1, com conseqüente aumento da expressão de p21 e redução da atividade de Cdk2. PC2 se liga a Id2, uma proteína hélice-alça-hélice, de uma maneira dependente de PC1, impedindo sua translocação para o núcleo e a supressão de p21^{waf1}, o que bloqueia a ativação de Cdk2 e a progressão do ciclo celular. Em consistência com esses dados, os níveis de p21^{waf1} encontram-se reduzidos em tecidos humanos com DRPAD e em tecidos de modelos animais de DRP⁸⁰.

1.4 Isquemia/Reperfusão e Coordenação Celular

Insultos renais por isquemia/reperfusão (IR) constituem causas freqüentes de LRA. Sua patogenia envolve alterações de natureza hemodinâmica, celular e molecular⁸¹⁻⁸². Essa agressão caracteriza-se inicialmente por vasoconstrição renal, um processo dependente da produção de agentes vasoconstritores como endotelina, e da redução da síntese de substâncias vasodilatadoras, como o NO. Obstrução tubular secundária à descamação de células tubulares e debris celulares, assim como vazamento retrógrado, também contribuem para a manutenção da baixa TFG. A lesão

celular secundária à isquemia, por sua vez, decorre de uma série de anormalidades bioquímicas e biológicas, incluindo redução dos níveis de ATP, alteração da função da Na-K-ATPase, lesão nuclear e mitocondrial, aumento do Ca^{2+} intracelular, ativação de enzimas proteolíticas e alterações do citoesqueleto ⁸³. A depleção de ATP compromete preferencialmente porções do néfron associadas a alta taxa de reabsorção tubular e consequente gasto de energia, o segmento S3 do túbulo proximal e a porção ascendente espessa da alça de Henle. Com a reperfusão, a elevação dos níveis de xantina oxidase e hipoxantina levam à formação de radicais livres de oxigênio, determinando peroxidação lipídica de membranas e intensa injúria celular ⁸⁴.

Outra consequência maior do insulto por IR renal prolongado é o surgimento de uma resposta inflamatória cuja intensidade varia em função do tempo e do grau da isquemia. Esta é iniciada pela ativação do sistema complemento, amplificando o recrutamento de células inflamatórias para o local da isquemia, principalmente através de citocinas pró-inflamatórias. Alguns fatores de transcrição, como NF- κ B (fator de transcrição nuclear kappa B), são ativados nesse processo, induzindo a expressão de citocinas chave, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, de quimiocinas e de moléculas de adesão celular. A necrose tubular aguda envolve, portanto, disfunção endotelial, inflamação e morte de células tubulares, acompanhadas do desprendimento de células epiteliais para a luz tubular ⁸⁴. Nesse processo, as células epiteliais do segmento S3 e da porção ascendente espessa da alça de Henle tendem a ser mais seriamente

afetadas. A recuperação da necrose tubular aguda (NTA), por sua vez, depende do repovoamento celular das áreas lesadas. A lesão celular induzida por IR, por sua vez, pode se traduzir em morte ou alterações subletais⁸⁴. O padrão de morte celular, quando presente, não é homogêneo, podendo ocorrer por necrose ou apoptose.

A relação entre policistina-1 e isquemia/reperfusão era essencialmente desconhecida. Algumas contribuições potenciais advinham de estudos sobre a relação isquemia/policistina-2. Zhao e cols mostraram que a expressão de PC2 está aumentada após insulto isquêmico renal em ratos, mas notaram que este aumento não se ateve exclusivamente às células em proliferação⁸⁵. Dessa forma, tais autores sugeriram que é possível que a elevação da expressão da PC2 seja apenas uma consequência do processo de reparo ou diferenciação renal. Paralelamente, Obermüller e cols também demonstraram regulação positiva de PC2 seguindo-se à isquemia em ratos Sprague Dawley⁸⁶. Neste caso, o aumento de expressão da policistina-2 ocorreu principalmente nas células do segmento S3, inicialmente seguindo um padrão basal/basolateral, evoluindo posteriormente para uma distribuição citoplasmática mais homogênea e puntiforme. Baseados na expressão preferencial no segmento S3 do túbulo proximal, esses autores sugeriram que a expressão aumentada de PC2 pudesse estar associada a uma função de auto-defesa celular. Os achados de um terceiro estudo, por fim, levantaram a possibilidade de que a redução da expressão de PC2 pudesse favorecer uma maior intensidade de lesão renal seguindo-se a um insulto. Neste estudo, camundongos *Pkd2*^{WS25/-}, um modelo ortólogo à DRPAD2

humana, apresentaram um aumento da expressão de Kim-1 (*kidney injury molecule-1*) em um grupo de cistos e em túbulos proximais adjacentes aos mesmos ⁸⁷. A expressão tubular de Kim-1 associou-se a desdiferenciação parcial de células epiteliais, sugerindo que pudesse participar da indução de lesão intersticial.

O papel protetor de p21 sobre a agressão IR é bem documentado ^{76, 88}. De fato, observações prévias de outros autores demonstram que animais *knockout* para *p21* apresentam maior susceptibilidade à agressão isquêmica, evoluindo com maior lesão histológica renal e maiores taxas de proliferação celular e apoptose após a lesão por isquemia/reperfusão ⁸⁸. Estudos subseqüentes ampliaram o conceito de que a desregulação do ciclo celular compromete a resposta celular após lesão por IR ⁷⁴, e mostraram que a adequada regulação do ciclo celular dependia de uma atividade apropriada de p21 independente de p53 ⁷⁸.

A IR renal deflagra um encurtamento do cílio apical nas células epiteliais tubulares e um aumento na expressão de *Pkd1* e *Pkd2*. O cílio apical primário apresenta uma aparente participação no processo de reparação celular após a lesão isquêmica renal, encontrando-se presente nas células desdiferenciadas que proliferam e adotam um fenótipo epitelial que favorece o reparo do túbulo lesado ⁸⁹. Devido ao envolvimento do cílio renal no processo celular que ocorre após a isquemia, defeitos ciliares poderiam comprometer a habilidade do rim em responder e reparar a lesão tubular. De forma interessante, essas análises realizadas em túbulos pré-císticos mostraram que a perda ciliar resulta em uma polaridade planar

celular alterada, manifestada por anomalias na orientação e/ou coordenação da divisão celular, mas não estimulou um aumento de proliferação celular ⁴¹. O entendimento de que a orientação da divisão celular é determinada pela polaridade planar fez com que Fischer e cols estudassem se um defeito na orientação da divisão celular é responsável, ao menos em parte, pela patogênese da DRP. Este grupo observou perda da orientação da divisão celular nos dias P3-P4 em rins de camundongos que evoluem a um fenótipo renal cístico severo até P8 ⁹⁰.

1.5 Hipóteses

Neste trabalho procuramos elucidar a relação entre policistina-1 e isquemia/reperfusão. Por se tratar de uma molécula envolvida na regulação da taxa de proliferação celular, de diferenciação celular e de apoptose, formulamos a hipótese inicial de que sua menor atividade biológica pudesse favorecer um maior grau de lesão determinada por insulto isquemia/reperfusão ^{44, 62}. De fato, estudos de expressão estável de PC1 em células MDCK sugeriam que esta molécula pudesse reduzir o crescimento de células epiteliais renais em desenvolvimento, permitindo que se diferenciasssem terminalmente e formassem túbulos renais maduros ⁴⁴. Outros estudos mostravam, paralelamente, um papel protetor de p21 sobre a agressão isquêmica ^{74-75, 88}. A reconhecida elevação da atividade de p21 induzida pela PC1 ⁶², portanto, poderia se associar a uma maior suscetibilidade à IR em pacientes com DRPAD tipo 1 e em modelos animais

ortólogos. Além disso, uma possível incapacidade de diferenciação apropriada e/ou inibição da apoptose durante o processo de regeneração também poderiam dificultar a recuperação renal. Reduções dos níveis de atividade da PC1, portanto, poderiam comprometer a capacidade de resposta celular à isquemia/reperfusão, prejudicar o curso morfológico e funcional renal pós-isquemia nesses animais e contribuir para a aceleração da doença cística. O efeito e o grau com que a haploinsuficiência de *Pkd1* pode modificar tais respostas celulares, contudo, não eram conhecidos. Para que esses mecanismos potenciais de patogênese pudessem ser apropriadamente analisados, utilizamos neste trabalho um modelo de camundongo heterozigoto para um alelo nulo *Pkd1*, não-cístico e, portanto, representativo de um modelo puro de haploinsuficiência gênica, submetido a insulto isquemia/reperfusão renal. Avaliações pós-IR em diferentes tempos, por sua vez, permitiram não apenas analisar sua suscetibilidade aguda à agressão isquêmica, como o impacto potencial deste insulto sobre a evolução do rim haploinsuficiente para *Pkd1*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos fundamentais deste projeto foram: 1) analisar os efeitos da haploinsuficiência de *Pkd1* sobre a lesão renal por isquemia/reperfusão; e 2) analisar os efeitos potenciais de insultos renais por isquemia/reperfusão sobre a indução de dilatação tubular, formação de microcistos/cistos e fibrose renal no estado de haploinsuficiência para o gene *Pkd1*. Para tanto, os objetivos específicos deste estudo compreenderam:

- 1) Analisar os efeitos da haploinsuficiência de *Pkd1* sobre a lesão renal por isquemia/reperfusão.
 - Avaliação renal funcional pré-isquemia e 48 horas, 7 dias e 14 dias após indução de isquemia renal de 32 min/reperfusão;
 - Avaliação renal funcional pré-isquemia e 48 horas após indução de isquemia renal de 35 min/reperfusão;
 - Avaliação de sobrevida após indução de isquemia renal de 35 min/reperfusão;
 - Avaliação renal morfológica pré-isquemia e 48 horas, 7 dias e 14 dias após indução de isquemia renal de 32 min/reperfusão;
 - Analisar proliferação celular, apoptose e inflamação pré-isquemia e 48 horas, 7 dias e 14 dias após indução de isquemia renal de 32 min/reperfusão;

- Analisar o padrão de expressão renal da Na-K-ATPase pré-isquemia e 48 horas após indução de isquemia renal de 32 min/reperfusão;
- Analisar a expressão de p21 pré-isquemia e 48 horas e 7 dias após indução de isquemia renal de 32 min/reperfusão.

2) Analisar os efeitos potenciais tardios da indução de isquemia/reperfusão sobre a morfologia renal no estado de haploinsuficiência de *Pkd1*.

- Avaliar o impacto da haploinsuficiência de *Pkd1* sobre a evolução da fibrose renal 6 semanas após indução de isquemia de 32 min/reperfusão;
- Avaliar o impacto da haploinsuficiência de *Pkd1* sobre a dilatação tubular e formação de microcistos/cistos 6 semanas após indução de isquemia de 32 min/reperfusão.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Modelo Animal

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos em concordância com o guia institucional de cuidados e uso de laboratório, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (HC/FMUSP – CAPPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (#314/06).

O modelo animal utilizado em nosso projeto consiste em uma linhagem de camundongo 129Sv com um alelo *Pkd1* nulo⁹¹. Este alelo se baseou numa construção que apresentava parte do éxon dois e todo o éxon três de *Pkd1* substituídos por um gene repórter (*lacZ*) acoplado em fase à porção restante do éxon dois, e seguido por um marcador positivo, o gene de resistência à neomicina (*neor*). O segmento 5' *lacZ-neor* inclui seqüências de terminação transcricional que impedem a expressão de éxons 3' de *Pkd1*, ao mesmo tempo em que um promotor PGK promove expressão do marcador selecionável *neor* de forma independente. A integração bem sucedida da construção resultou na inativação de *Pkd1*.

A genotipagem dos animais foi realizada utilizando uma estratégia baseada na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) associada a três oligonucleotídeos iniciadores (*primers*): um *primer forward* comum a ambos os alelos (KF1, 5'-AATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3') e dois

primers reversos específicos para os alelos selvagem e *knockout*⁹¹. O *primer* reverso específico ao alelo selvagem posiciona-se na região do DNA substituído pela construção recombinante (KR1, 5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'), enquanto o *primer* específico ao alelo *knockout* localiza-se no segmento inserido (M3-2B, 5'-TACTCACACCTCCACCAGTGC-3'). Amostras de DNA genômico foram extraídas de fragmentos de orelhas dos camundongos. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados com brometo de etídeo 1 µg/ml. Animais com banda única de 180 pb foram diagnosticados como selvagens (Svs), enquanto animais com duas bandas (180 e 220 pb) foram classificados como heterozigotos (Hts) (Figura 6).

Figura 6. Genotipagem de camundongos gerados na colônia constituída. Ht1 a Ht9: animais heterozigotos para a mutação nula em *Pkd1*; Sv1 a Sv6: animais selvagens; CN: controle negativo; M: marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb).

Este estudo foi dirigido a camundongos heterozigotos para o alelo nulo de *Pkd1* com idade entre 10 e 12 semanas, uma vez que nesta idade eles virtualmente não apresentam cistos renais, representando um modelo puro de haploinsuficiência de *Pkd1*. Seus companheiros de prole Svs foram usados como seus controles experimentais. Por fim, todo o estudo foi conduzido em camundongos machos, para evitar heterogeneidade experimental relacionada a gênero.

3.2 Modelo Experimental de Isquemia/Reperusão

Os animais foram inicialmente pesados e então submetidos ao protocolo de insulto por isquemia/reperusão. Após anestesia com pentobarbital 65 µg/g de peso corpóreo (PC), administrado por via intraperitoneal (IP), foi feita uma incisão na parte central do abdômen, os dois pedículos renais foram expostos por dissecação e se induziu isquemia renal bilateral por meio do clampeamento de ambos os pedículos renais (Figura 7). A cavidade abdominal foi coberta com gaze estéril umidificada com PBS (*phosphate-buffered saline*) e o camundongo permaneceu sobre uma mesa térmica de 37 °C durante o procedimento cirúrgico. Depois de 32 min, os pedículos foram liberados para restabelecimento da perfusão renal. Quando a reperusão não foi completa, os animais foram sacrificados e descartados. Os animais foram hidratados com 400 µl (IP) de solução salina imediatamente após a reperusão renal. A incisão abdominal foi então suturada e a recuperação cirúrgica realizada em gaiola metabólica, com livre acesso a água e dieta. Grupos adicionais sham-operados de

camundongos heterozigotos ($n = 8$) e selvagens ($n = 8$) também foram incluídos como controles negativos para as análises imunoistoquímicas. Dois grupos adicionais de animais Hts ($n = 8$) e Svs ($n = 11$) foram submetidos ao mesmo protocolo, exceto pela duração do insulto isquêmico, que neste caso foi de 35 min.

3.2.1 Grupos experimentais incluídos no estudo:

1. Sham – estudados após 48 horas (h) da laparotomia

$Pkd1^{+/+}$ (SvSham): $n = 7$

$Pkd1^{+/-}$ (HtSham): $n = 7$

2. 48H – estudados após 48 h da indução de insulto por IR

$Pkd1^{+/+}$ (Sv48H): $n = 10$

$Pkd1^{+/-}$ (Ht48H): $n = 10$

3. 7D – estudados após 7 dias (d) da indução de insulto por IR

$Pkd1^{+/+}$ (Sv7D): $n = 8$

$Pkd1^{+/-}$ (Ht7D): $n = 8$

4. 14D – estudados após 14 d da indução de insulto por IR

$Pkd1^{+/+}$ (Sv14D): $n = 8$

$Pkd1^{+/-}$ (Ht14D): $n = 8$

5. 6S – estudados após 6 semanas (sem) da indução de insulto por IR

$Pkd1^{+/+}$ (Sv6S): $n = 8$

$Pkd1^{+/-}$ (Ht6S): $n = 8$

Figura 7. Modelo experimental da indução da lesão renal aguda bilateral por meio de insulto isquemia/reperfusão.

3.3 Determinações Bioquímicas

Um dia antes de cada análise bioquímica, os camundongos permaneceram em jejum hídrico e alimentar em gaiolas metabólicas. A coleta de sangue foi realizada por acesso ocular pré-isquemia e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto isquêmico (Figura 8). As amostras de sangue foram centrifugadas após coagulação, de modo a obter soro. A dosagem da concentração sérica de uréia (S_U) foi realizada pelo método de Crocker modificado (Celm, Brasil) e da concentração de creatinina sérica (S_{Cr}) e urinária (U_{Cr}) pelo método quantitativo colorimétrico (Labtest, Brasil). Animais com concentrações séricas basais de creatinina e/ou uréia anormalmente elevadas foram excluídos do estudo.

A dosagem das concentrações séricas de Na^+ (S_{Na}) e K^+ (S_{K}) foram realizadas em espectrofotômetro de chama, modelo FC280 (Celm, Brasil). As dosagens 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 de K^+ (FE_{K}) foram obtidas a partir das seguintes equações: $\text{FE}_{\text{Na}} = (U_{\text{Na}} \times S_{\text{Cr}}) / (S_{\text{Na}} \times U_{\text{Cr}}) \times 100$ e $\text{FE}_{\text{K}} = (U_{\text{K}} \times S_{\text{Cr}}) / (S_{\text{K}} \times U_{\text{Cr}}) \times 100$. As medidas de osmolalidade urinária (U_{osm}) foram realizadas, por fim, usando um osmômetro por pressão de vapor *Vapro 5500* (Wescor, Logan, UT).

Figura 8. Organograma do estudo.

3.4 Análises Morfológicas

3.4.1 *Quantificação histológica da lesão renal*

Após a última coleta de sangue e urina de cada animal, os rins foram removidos e preparados para as diferentes análises envolvidas na avaliação da lesão do tecido renal (Figura 8). Para tanto, os animais foram anestesiados com pentobarbital (0,1 mg/g PC, administrado IP) e submetidos a toracotomia, seguida da inserção de um catéter no ventrículo esquerdo e de um corte no átrio direito para drenar o sangue. Os mesmos foram perfundidos com solução salina a uma pressão de 100 mm Hg até a sangria completa, e imediatamente após perfundidos com formalina de Millonig, modificada por Carlson. Os rins foram então extraídos.

As amostras de tecido renal para histologia foram fixadas em formaldeído 4%, desidratadas em uma série graduada de etanol, incluídas em parafina e cortadas em secções de 3-4 µm de espessura. Esse material foi corado imediatamente após com hematoxilina-eosina (H&E). A análise histológica renal foi realizada por um patologista renal experiente, que desconhecia o genótipo dos animais relacionados às lâminas analisadas. A quantificação da lesão foi feita através da aplicação do índice de Jablonski⁹². Este índice compreende os seguintes parâmetros: perda da borda em escova, formação de cilindros tubulares, dilatação tubular, espessamento da membrana basal, inflamação, número de células apoptóticas, número de células mitóticas, sinais de regeneração tubular, lesão tubular proximal e

lesão de néfron distal. Esta análise permite graduar a extensão da necrose cortical de 0 a 4, onde 0 reflete ausência de necrose; 1 inclui mitose e necrose de células individuais; 2 significa necrose de todas as células em túbulos convolutos proximais adjacentes, com sobrevida de túbulos ao redor; 3 compreende necrose confinada ao terço distal do túbulo proximal com uma banda de necrose que se estende através do córtex interno; e 4 reflete necrose afetando os três segmentos do túbulo convoluto proximal. Estas análises foram realizadas em córtex renal, incluindo duas secções/animal e 10 campos/secção, totalizando 20 campos/animal.

3.4.2 Análise de expansão intersticial renal

Secções de 3 µm de espessura de tecido renal emblocado em parafina, de órgãos coletados 6 sem após o insulto IR, foram montadas em lâminas e submetidas às colorações de tricrômio de Masson e H&E. Este procedimento visou a análise do comprometimento túbulo-intersticial e a avaliação quantitativa da área intersticial relativa do córtex renal desses animais. Para o estudo de morfometria, as imagens obtidas pela microscopia ótica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um analisador de imagens (Qwin, Leica, Wetzlar, Alemanha). Dez campos foram analisados no córtex de cada rim, medindo 37.000 µm² cada, de maneira cega. A área intersticial foi primeiramente circundada manualmente, seguindo-se sua mensuração percentual com relação ao campo óptico, excluindo os glomérulos ⁹³.

3.4.3 Análise dos índices cístico e de dilatação tubular

Os rins dos camundongos sacrificados 6 sem após o insulto IR foram retirados, pesados, cortados longitudinalmente e colocados em formalina tamponada. Depois de incubação por ao menos 48 h em formalina, os rins foram incluídos em parafina e a seguir submetidos a cortes de 3 µm de espessura, corados com HE. Os cortes foram analisados na busca de cistos (C), microcistos (MC) e dilatação tubular (DT). Para quantificação dessas alterações, utilizamos uma tela com pontos equidistantes entre si por 13,625 µm. A categorização da alteração foi determinada pelo número de pontos dentro da luz tubular⁹⁴. Classificamos como dilatações tubulares grau I aquelas que comportaram apenas um ponto e apresentaram dilatação superior a 13,625 µm; dilatações tubulares grau II aquelas que comportaram dois pontos; microcistos aquelas que comportaram de 3 a 9 pontos; e cistos aqueles que apresentaram 10 ou mais pontos.

3.4.4 Análise por microscopia eletrônica

Amostras de tecido renal foram fixadas em paraformaldeído 4%, transferidas para glutaraldeído 2% por 2 h, incubadas em tetróxido de ósmio aquoso 2%, desidratadas em uma série graduada de etanol e emblocadas em resina L.R. White (London Resin Company, Ltd., Berkshire, England). Secções ultrafinas foram cortadas, montadas em telas de níquel e contracoradas com acetato de uranil 4% aquoso e citrato de chumbo de

Reynolds. Esses cortes foram examinados em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010.

3.5 Análise Imunoistoquímica

Os rins utilizados para reações de imunoistoquímica foram fixados em formalina de Millonig e emblocados em parafina. Secções de 3 µm de tecido renal de camundongo foram montadas em lâminas pré-tratadas com silane. A exposição antigênica foi obtida por tratamento por 20 min em panela a vapor com “target retrieval system” (DAKO, Carpenteria, CA). O bloqueio de peroxidase endógena, por sua vez, foi realizado utilizando incubação em metanol 50% / H₂O₂ 3%. Para redução de sinais inespecíficos na reação, foi realizada incubação com leite em pó desnatado 6% em PBS (pH 7,4) por 30 min. A incubação com anticorpo primário foi realizada a 4 °C por 18 h, em secções seriadas de tecido. A incubação com anticorpo secundário foi feita com *EnVision-HRP* (DAKO, Carpenteria, CA), seguindo as especificações do fabricante. O kit *EnVision* inclui anticorpos secundários ligados a uma molécula de dextran, ao invés de anticorpos biotinilados, o que reduz o fundo nas reações realizadas em rim. A revelação com substrato cromogênico foi feita utilizando diaminobenzidina (0,6% em PBS com H₂O₂ 1%, filtrado) para anticorpos conjugados a peroxidase, controlando o tempo de exposição de acordo com o anticorpo utilizado. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Carazzi para anticorpos com peroxidase. Após as reações, as lâminas foram lavadas, desidratadas em

bateria de etanol (50%, 80%, 95% e absoluto) e montadas com *Entellan* (EMS, Hatfield, PA, EUA). A exposição ao cromógeno foi monitorada em todos os experimentos, sendo interrompida simultaneamente no fragmento incubado com o anticorpo específico e em seu respectivo controle.

Os anticorpos primários utilizados incluíram: 1) anticorpo IgG2b anti-p21 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), utilizado na diluição de 1:100; 2) anticorpo monoclonal IgG2a anti-Mac-2 (Cedarlane Laboratories, Canada), utilizado na diluição de 1:25.000; 3) anticorpo monoclonal IgG2 anti-PCNA - *proliferating cell nuclear antigen*- (Dako, EUA), utilizado na diluição de 1:1300; 4) anticorpo monoclonal IgG1 anti-subunidade α 1 da Na-K-ATPase (Affinity BioReagentes Golden, EUA), utilizado na diluição de 1:1000; e 5) TUNEL- *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling*- com o kit *In Situ Cell Death Detection* (Roche, Alemanha), utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

As lâminas usadas para controle negativo das análises de p21, PCNA e Mac-2 foram incubadas com PBS ao invés do anticorpo primário. Para controle positivo utilizamos uma secção com tumor mamário na análise de p21, uma secção com tecido de baço na análise de PCNA e na análise de TUNEL uma secção renal foi incubada com 1 U/mL de DNase.

Nas análises de p21, TUNEL e PCNA, as avaliações de cada animal foram realizadas com microscopia óptica sob o aumento de 400X. Tais análises consistiram na quantificação de células positivas e células totais em dez campos distintos, sendo oito corticais e dois medulares, expressas como células positivas/total de células (CP/TC). A quantificação envolvendo Mac-

2, por sua vez, consistiu na quantificação de células positivas no interstício renal em dez campos distintos, sendo oito corticais e dois medulares. Esta análise foi realizada com microscopia óptica sob o aumento de 400X e expressa como células positivas/campo (CP/C).

3.6 Obtenção de Amostras de Tecidos, Preparação de cDNA e RT-PCR em Tempo Real

O sacrifício dos animais e a remoção dos rins direitos foram precedidos de anestesia geral com pentobarbital 0,1 mg/g PC por via IP. As amostras foram congeladas imediatamente com nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C, até o procedimento de extração de RNA (ácido ribonucléico mensageiro).

Um fragmento de aproximadamente 100 mg do tecido renal foi dissolvido em 750 µl de TrizolTM (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 250 µl de água livre de RNase, obtida pelo tratamento com dietil pirocarbonato, DEPC. Esse material foi incubado à temperatura ambiente por 5 min. O material foi centrifugado a 12000 g por 15 min a 4 °C. Adicionamos, então, clorofórmio na proporção de 200 µl/mL de TrizolTM. Seguiu-se nova centrifugação a 12000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo limpo com 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. Após 2 h a -80 °C, nova centrifugação foi realizada a 12000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi então removido e descartado, enquanto o precipitado foi lavado com etanol 75% em uma centrifugação a 7500 g por 10 min a 4 °C. Após secagem, o RNA foi ressuspendido em 60 µl de água livre de RNase.

A quantificação deste RNA total foi realizada em espectrofotômetro modelo Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech).

A síntese do cDNA (ácido desoxirribonucleico codificante) foi feita a partir de 3 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do kit *SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis* (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA). A reação quantitativa de transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real (qRT-PCR) foi realizada usando o kit mistura *SYBER green* (Applied Biosystems, Warrington, UK), enquanto o cDNA foi amplificado utilizando dois *primers* específicos para $p21^{Waf1/Cip1}$ para as amostras correspondentes a 48 h de seguimento pós-IR (*forward* 5'-GTGATTGCGATGCGCTCATG-3' e reverso 5'-TCTCTTGCAGAAGACCAATC-3') e *primers* para o gene codificador da β -actina, este empregado como controle quantitativo das reações. O mesmo procedimento foi aplicado a amostras correspondentes a 6 semanas pós-IR, usando *primers* específicos para os genes cadeia alfa-1 do colágeno tipo I (*Col1a1*) (*forward* 5'-CAGACGTGCTTCTTTTCCTTGG-3' e reverso 5'-TGA CTGGAAGAGCGGAGAGTACT-3') e cadeia alfa-2 do colágeno tipo I (*Col1a2*) (*forward* 5'-CACCCCAGGAAGACTCATA-3' e reverso 5'-GCCACCATTGATAGTCTCTCCTAAC-3'). Os controles negativos consistiram em omitir a transcriptase reversa e substituí-la por água destilada livre de nuclease. A solução foi inicialmente incubada a 50 °C por 2 min, seguida de incubação a 95 °C por 10 min para ativar a polimerase. O programa utilizado para as amplificações relacionadas a $p21$ incluiu 40 ciclos

de 95 °C por 30 s e 60 °C por 1 min; e uma extensão final de 72 °C por 10 min, enquanto as amplificações relacionadas a *Col1a1* e *Col1a2* compreenderam 35 ciclos usando *hot start* e 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min. Padrões de cDNA foram usados para determinar quantidades relativas e comparar temperaturas de dissociação, para garantir parcialmente a formação de produtos corretos.

Os produtos das reações de qRT-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% para a identificação de bandas que confirmasse a amplificação adequada. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA), baseadas na normalização em relação ao sinal para β -actina.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram inicialmente analisados pelo teste de distância K-S. Quando paramétricos, foram comparados usando análise de variância dois fatores (two-way ANOVA), com o pós-teste Lower Standard Difference (LSD). Quando não-paramétricos, o teste de Friedmann foi usado para análises longitudinais, com o pós-teste de Student-Newman-Keuls, enquanto análises transversais foram feitas usando o teste de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de Student-Newman-Keuls. Uma vez que as tabelas foram construídas com base em análises transversais, os dados foram apresentados de acordo com o teste usado na análise correspondente. A análise de dano cortical residual (índice de Jablonski) e a análise de Mac-2

foram conduzidas utilizando o teste *t* de Student não pareado. As avaliações por RT-PCR em tempo renal da expressão de *p21*, *Col1a1* e *Col1a2* e as análises de S_{Cr} e S_U associadas a 35 min de isquemia, por sua vez, foram realizadas com o teste *t* de Student não pareado com correção de Welch se necessário. A comparação entre as sobrevidas de camundongos selvagens e heterozigotos submetidos a IR de 35 min, durante o período de seguimento dos animais, foi realizada usando a curva de sobrevida de Kaplan-Meier. As análises imunoistoquímicas para PCNA, TUNEL e p21 foram feitas usando o teste de proporção do Qui-quadrado. As análises do índice de expansão intersticial e do índice cístico/dilatação tubular foram realizadas com o teste de Mann-Whitney não-pareado. Os testes empregados foram aplicados usando Prism 4.00 (GraphPad Software, CA, USA) e Sigma-Stat (SPSS Corporation, USA). Aceitamos um erro alfa menor ou igual a 5% para rejeitar a hipótese de nulidade.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análises Indiretas da TFG

Uma vez que este estudo incluiu análises histológicas e imunoistoquímicas realizadas em três grupos Hts e três grupos Svs, sacrificados nos tempos de 48 h (Ht48H e Sv48H), 7 d (Ht7D e Sv7D) e 14 d depois do insulto IR de 32 min (Ht14D e Sv14D), as análises funcionais foram conduzidas antes da indução de isquemia e 48 h pós-IR em todos os grupos de animais, aos 7 d pós-IR nos grupos Sv7D, Sv14D, Ht7D e Ht14D, e aos 14 d pós-IR nos grupos Sv14D e Ht14D. Dois grupos adicionais *Pkd1^{+/+}* (n = 11) e *Pkd1^{+/-}* (n = 8) foram submetidos a um insulto IR de 35 min. Todos os animais analisados apresentaram S_U e S_{Cr} pré-isquêmicas normais.

Na Tabela 1 observamos o curso temporal dos valores absolutos de S_{Cr} e S_U . O insulto IR bilateral de 32 min determinou um aumento significativo na S_{Cr} em camundongos *Pkd1^{+/-}* nos seguimentos de 48 h e 7 d, enquanto apenas uma tendência de elevação não significativa foi observada nos animais *Pkd1^{+/+}* no tempo de 48 h pós-IR (Figura 9A, Tabela 1). Os camundongos *Pkd1^{+/-}* apresentaram um aumento da S_{Cr} de $0,33 \pm 0,13$ para $0,80 \pm 0,40$ mg/dL ($P < 0,001$), um valor significativamente mais elevado que o observado em camundongos *Pkd1^{+/+}* ($0,60 \pm 0,20$ mg/dL; $P < 0,005$). Os

níveis de S_{Cr} , por sua vez, retornaram a valores pré-isquêmicos até 14 dias após o insulto.

A S_U elevou-se 48 h pós-IR em camundongos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$, mas não diferiu entre eles (Figura 9B). Não foi detectada diferença significativa de S_U entre Hts e Svs nos três tempos de seguimento pós-IR. Detectou-se uma redução de peso corpóreo em ambos os grupos Sv e Ht após IR, mas apenas os camundongos $Pkd1^{+/+}$ retornaram aos níveis basais 14 dias pós-insulto. Os camundongos Hts pertencentes ao grupo adicional submetido a 35 min de isquemia, por sua vez, apresentaram níveis mais elevados de S_U que os animais Svs 48 h após IR ($87,9 \pm 10,9$ versus $53,2 \pm 2,9$ mg/dL; $P < 0,05$), assim como maior S_{Cr} ($1,13 \pm 0,07$ versus $0,70 \pm 0,03$ mg/dL; $P < 0,0003$) (Figuras 10, A e B). Os camundongos submetidos a 35 min de isquemia não sobreviveram por todo o período de seguimento de 14 dias pós-IR, porém os animais Svs apresentaram sobrevida substancialmente mais longa que os Hts (10 dias versus 3 dias; $P < 0,0001$) (Figura 10C).

4.2 Análises de Função Tubular

Os camundongos $Pkd1^{+/-}$ apresentaram elevação significativa da FE_{Na} 48 h após o insulto IR [(0,56% (0,39 - 0,81%) para 2,10% (1,31 - 3,18%; $P < 0,05$), uma observação não detectada nos animais $Pkd1^{+/+}$ (Tabela 2, Figura 11A). O valor correspondente a 48 h pós-IR, por sua vez, foi mais alto nos camundongos Hts que nos animais Svs [0,80% (0,66 - 1,00%); $P < 0,05$]. A FE_{Na} permaneceu elevada nos animais Hts no 7º dia pós-IR, porém no dia 14 pós-IR ela não mais diferiu dos níveis pré-isquêmicos.

Um aumento da FE_K também foi detectado nos camundongos $Pkd1^{+/-}$ 48 h após IR renal [35,0% (19,4 - 61,7%) para 70,0% (45,3 - 95,4%); $P < 0,05$], enquanto não foi observado nos camundongos $Pkd1^{+/+}$ (Tabela 2, Figura 11B). Os valores de FE_K , por sua vez, mostraram-se mais elevados nos animais Hts que nos Svs 48 h pós-IR [36,8% (29,1 - 47,0%); $P < 0,05$] e no 7º dia após o insulto [59,0% (37,3 - 95,9%) *versus* 41,0% (26,3 - 48,4%); respectivamente $P < 0,005$].

A S_K elevou-se 48 h pós-IR tanto nos animais $Pkd1^{+/-}$ ($4,8 \pm 1,0$ a $5,4 \pm 1,2$ mEq/L, $P < 0,05$) como nos camundongos $Pkd1^{+/+}$ ($4,9 \pm 0,8$ a $5,6 \pm 1,0$ mEq/L, $P < 0,05$) (Tabela 2). Não se detectou diferença significativa para S_K entre Hts e Svs, entretanto, em todos os tempos de seguimentos do estudo (Tabela 2). Uma pequena elevação da S_{Na} foi detectada em camundongos $Pkd1^{+/-}$ [138 mEq/L (136 - 140 mEq/L) para 143 mEq/L (139 - 151 mEq/L); $P < 0,05$], porém não foram observadas diferenças entre os grupos para os tempos pós-IR avaliados. Observamos, ainda, redução da U_{osm} em ambos os grupos 7 d pós-IR (Tabela 2).

Figura 9. (A e B) Análises comparativas da S_{Cr} (A) e S_U (B) em camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{-/-}$ antes do insulto isquêmico e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto IR renal de 32 min. $^{\pi}P < 0,001$ versus pré-isquemia (PI); $^{\theta}P < 0,05$ versus PI; $^{\dagger}P < 0,05$ versus PI; $^{\ddagger}P < 0,05$ versus 48 h; $^{\S}P < 0,05$ versus $Pkd1^{+/+}$. S_{Cr} foi comparada usando ANOVA two-way, com os dados apresentados como média $\pm$ DP; e S_U usando o teste de Friedmann, com os dados expressos como mediana (intervalo interquartil).

Tabela 1 - Curso temporal de S_{Cr} , S_U e PC em camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ submetidos a isquemia/reperfusão renal

Parâmetros	S_{Cr} (mg/dL; Média $\pm$ DP)	Uréia [mg/dL; Mediana (intervalo interquartil)]	PC (g; Média $\pm$ DP)
Pré-Isquemia			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 26)	0,46 $\pm$ 0,17	48,6 (42,8 - 49,6)	21,15 $\pm$ 1,89
$Pkd1^{+/-}$ (n = 26)	0,33 $\pm$ 0,13	46,8 (41,7 - 49,6)	20,52 $\pm$ 2,74
48 horas			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 26)	0,60 $\pm$ 0,20	88,8 (77,0 - 113,8) ^a	18,87 $\pm$ 1,41 ^a
$Pkd1^{+/-}$ (n = 26)	0,80 $\pm$ 0,40 ^{b, c}	97,1 (86,4 - 163,7) ^d	17,80 $\pm$ 2,10 ^b
7 dias			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 16)	0,46 $\pm$ 0,17	65,0 (55,4 - 95,0) ^a	19,34 $\pm$ 2,05 ^a
$Pkd1^{+/-}$ (n = 16)	0,50 $\pm$ 0,15 ^{d,e}	69,1 (62,7 - 98,2) ^d	18,81 $\pm$ 2,38 ^d
14 dias			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 8)	0,62 $\pm$ 0,25	77,2 (68,7 - 86,7) ^a	20,10 $\pm$ 1,30
$Pkd1^{+/-}$ (n = 8)	0,44 $\pm$ 0,17 ^e	82,8 (75,1 - 92,4) ^d	19,40 $\pm$ 2,10

S_{Cr} e PC foram comparados por ANOVA two-way; Uréia foi analisada através do teste de Friedmann. PI, pré-isquemia.

^aP < 0,05 versus $Pkd1^{+/+}$ PI.

^bP < 0,001 versus $Pkd1^{+/-}$ PI.

^cP < 0,005 versus $Pkd1^{+/+}$

^dP < 0,05 versus $Pkd1^{+/-}$ PI.

^eP < 0,05 versus $Pkd1^{+/-}$ 48 h.

Figura 10. (A e B) Análises comparativas da S_{Cr} (A) e S_U (B) em camundongos machos *Pkd1*^{+/+} ($n = 11$) e *Pkd1*^{+/-} ($n = 8$) antes do insulto isquêmico e 48 h após o insulto IR renal de 35 min. ^Δ $P < 0,0001$ versus PI; [£] $P < 0,0005$ versus PI; ^ω $P < 0,0003$ versus *Pkd1*^{+/+}; [#] $P < 0,05$ versus *Pkd1*^{+/+}. S_{Cr} e a S_U foram comparadas usando o teste t de Student não pareado com correção de Welch, com os dados apresentados como média $\pm$ DP. A alta mortalidade observada no grupo de camundongos *Pkd1*^{+/-} após 48 h não permitiu avaliações de tempos posteriores. (C) Curva de sobrevivência cumulativa e análise comparativa entre os camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} após 35 min de IR ($P < 0,0001$). Comparação realizada usando a curva de sobrevida de Kaplan-Meier.

Tabela 2 - Curso temporal de FE_{Na} , FE_K , U_{osm} , S_{Na} e S_K em camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ submetidos a isquemia/reperfusão renal

Parâmetros	FE_{Na} [%; Mediana (intervalo interquartil)]	FE_K [%; Mediana (intervalo interquartil)]	U_{osm} [mOsm/kg H_2O ; Mediana (intervalo interquartil)]	S_{Na} [mEq/L; Mediana (intervalo interquartil)]	S_K (mEq/L; Média $\pm$ DP)
Pré-Isquemia					
$Pkd1^{+/+}$ (n = 26)	0,90 (0,69-1,37)	36,2 (24,5-70,3)	2260 (1745-3350)	138 (136-140)	4,9 $\pm$ 0,8
$Pkd1^{+/-}$ (n = 26)	0,56 (0,39-0,81) ^l	35,0 (19,4-61,7)	2250 (1975-2760)	140 (137-144)	4,8 $\pm$ 1,0
48 horas					
$Pkd1^{+/+}$ (n = 26)	0,80 (0,66-1,00)	36,8 (29,1-47,0)	2250 (1320-2774)	143 (139-151) ^b	5,6 $\pm$ 1,0 ^b
$Pkd1^{+/-}$ (n = 26)	2,10 (1,31-3,18) ^{c, d}	70,0 (45,3-95,4) ^{c, d}	1985 (1275-3370)	140 (136-143)	5,4 $\pm$ 1,2 ^c
7 dias					
$Pkd1^{+/+}$ (n = 16)	0,99 (0,80-1,27)	41,0 (26,3-48,4)	1593 (1352-2032) ^b	140 (138-144)	4,6 $\pm$ 0,4 ^e
$Pkd1^{+/-}$ (n = 16)	1,50 (0,98-2,39) ^{a, c}	59,0 (37,3-95,9) ^a	1645 (1213-1877) ^c	141 (139-142)	4,9 $\pm$ 0,8
14 dias					
$Pkd1^{+/+}$ (n = 8)	1,40 (0,88-2,30)	58,8 (32,7-79,2)	1862 (1599-2036)	141 (138-145)	5,5 $\pm$ 0,7 ^f
$Pkd1^{+/-}$ (n = 8)	1,20 (0,89-1,54)	36,0 (29,8-43,3) ^g	1978 (1683-2285)	140 (136-142)	5,8 $\pm$ 0,9 ^{c, h}

S_K foi comparado por ANOVA two-way; FE_{Na} , FE_K , U_{osm} e S_{Na} foram analisados através do teste de Friedmann. PI, pré-isquemia.

^aP < 0,005 versus $Pkd1^{+/+}$.

^bP < 0,05 versus $Pkd1^{+/+}$ PI.

^cP < 0,05 versus $Pkd1^{+/-}$ PI.

^dP < 0,05 versus $Pkd1^{+/+}$.

^eP < 0,05 versus $Pkd1^{+/+}$ 48 h.

^fP < 0,05 versus $Pkd1^{+/+}$ 7 d.

^gP < 0,05 versus $Pkd1^{+/-}$ 48 h.

^hP < 0,05 versus $Pkd1^{+/-}$ 7 d.

Figura 11. (A e B) Análises comparativas da FE_{Na} (A) e FE_K (B) em camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} antes do insulto isquêmico e 48 h, 7 d e 14 d após o insulto IR renal de 32 min. **P < 0,05 versus PI; #P < 0,05 versus 48 h; £P < 0,05 versus *Pkd1*^{+/+}; €P < 0,005 versus *Pkd1*^{+/+}. Comparações realizadas usando o teste de Friedman, com os valores expressos como mediana (intervalo interquartil).

4.3 Análises Histológicas da Lesão Renal

As análises histológicas realizadas nos rins de camundongos *Pkd1^{+/-}* e *Pkd1^{+/+}* revelaram um dano cortical residual mais proeminente nos animais Hts que nos Svs, nos 3 momentos pós-IR analisados: 48 h, 7 d e 14 d (Figura 12). O índice de Jablonski foi de $3,60 \pm 0,22$ nos Hts *versus* $2,40 \pm 0,40$ nos Svs ($P < 0,05$) 48 h pós-IR; $3,12 \pm 0,22$ nos camundongos *Pkd1^{+/-}* *versus* $1,00 \pm 0,26$ nos *Pkd1^{+/+}* ($P < 0,0001$) no 7º dia pós-IR; e $2,29 \pm 0,56$ *versus* $0,57 \pm 0,29$ ($P < 0,05$), respectivamente, no 14º dia pós-insulto. Não foram observado sinais de lesão ou diferenças significantes entre os grupos sham Sv ($0,22 \pm 0,16$) e Ht ($0,13 \pm 0,14$).

Alterações leves a moderadas foram observadas 48 h pós-IR e mínimas a leves 7 e 14 d pós-insulto nos animais Svs, enquanto os camundongos Hts apresentaram dano moderado a severo no seguimento de 48 h, lesão moderada no 7º dia pós-IR e dano leve a moderado no 14º dia pós-insulto isquêmico (Figura 13). Na avaliação de 48 h, quando o dano cortical atingiu seu nível mais intenso em ambos os grupos, os rins de camundongos *Pkd1^{+/-}* apresentaram vacuolização, dilatação e cilindros hialinos predominantemente em túbulos proximais e, em menor extensão, em túbulos coletores. Os rins de camundongos *Pkd1^{+/+}*, por outro lado, apresentaram pequenas dilatações e microvacuolizações nos túbulos proximais, envolvimento tubular menos extenso e apenas poucos cilindros hialinos (Figura 12). O grau de dilatação tubular observada, por sua vez, foi

mais pronunciado nos animais Hts que nos Svs para os mesmos tempos pós-IR analisados.

Figura 12. Análise histológica comparativa do dano residual cortical renal avaliado pelo índice de Jablonski em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} 48 h, 7 d e 14 d após IR renal (48 h *n* = 10 por grupo; 7 d *n* = 8 por grupo; 14 d *n* = 8 por grupo). [#]*P* < 0,05 versus *Pkd1*^{+/+}; ^{*}*P* < 0,0001 versus *Pkd1*^{+/+}. Teste *t* de Student não pareado, com os dados expressos como média ± DP.

Figura 13. Representação histológica da lesão renal nos camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h) 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal (48 h *n* = 10 por grupo; 7 d *n* = 8 por grupo; 14 d *n* = 8 por grupo). (a, b) Sham. (c, d) 48 h pós-IR. (e, f) 7 d. (g, h) 14 d. Aumento original, X400.

4.3.1 Análises por microscopia eletrônica

Análises por microscopia eletrônica em tecido renal revelaram uma lesão mais severa nos rins de camundongos Hts que nos de animais Svs para 48 h pós-IR (Figura 14A). Os animais Svs apresentaram alterações discretas, enquanto os Hts mostraram lesão celular tubular significativa, com presença de cilindros hialinos intraluminais, e desgarramento de células de revestimento com quantidades aumentadas de proteína na luz de túbulos proximais. Algumas células tubulares heterozigotas apresentaram rarefação do citoplasma com vacúolos intracelulares, organelas inchadas, apoptose e perda da borda em escova, enquanto outras apresentaram condensação nuclear, inchaço citoplasmático e perda nuclear em até a terça parte do perfil tubular (Figura 14A).

Os camundongos Svs apresentaram discretas alterações endoteliais, representadas pela perda de parte da fenestração endotelial nos capilares peritubulares. Os Hts, entretanto, demonstraram uma lesão mais intensa, com perda significativa da fenestração endotelial e acúmulo de material floculado (Figura 14B).

Figura 14. Análise por microscopia eletrônica de rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} 48 h após IR renal. (A) Imagens representativas de túbulo proximal em camundongos *Pkd1*^{+/+} (a, b) e *Pkd1*^{+/-} (c, d). Nos camundongos selvagens, alterações leves foram observadas seguindo o insulto IR, incluindo microvacuolização de algumas células epiteliais de túbulo proximal e perda da borda em escova (setas). Os rins heterozigotos, por outro lado, apresentaram lesão celular tubular proximal significativa, com acúmulo intraluminal de fragmentos da membrana apical e cilindros hialinos (*). (B) Imagens representativas de capilares peritubulares em camundongos *Pkd1*^{+/+} (a, b) e *Pkd1*^{+/-} (c, d). Aumento original, X10.000 em A e B (b); X 20.000 em B (a, c, d).

4.4. Análises de Proliferação Celular

As análises imunoistoquímicas para PCNA revelaram uma maior taxa de proliferação celular nos animais *Pkd1^{+/-}* que *Pkd1^{+/+}* 48 h e 7 d depois do insulto IR, embora as taxas de 48 h tenham se mostrado sensivelmente maiores (Figuras 15 e 16). O número de células em proliferação mostrou-se significativamente reduzido e não houve diferença entre as taxas basais observadas para os animais sham *Pkd1^{+/-}* (0,15%) e *Pkd1^{+/+}* (0,12%). Nossas análises revelaram índices de células positivas para PCNA de 15,51% nos Hts *versus* 8,42% nos animais Svs ($P < 0,0001$) na análise de 48 h, e 3,05% *versus* 1,25%, respectivamente, 7 d após IR ($P < 0,0001$). Aos 14 d pós-IR, contudo, a marcação celular para PCNA foi substancialmente reduzida e não diferiu entre Hts e Svs.

4.5. Análises de Apoptose

As análises realizadas a partir dos experimentos conduzidos pela técnica de TUNEL revelaram uma maior taxa de apoptose celular nos animais Hts que nos animais Svs nos três tempos de seguimento pós-IR determinados, embora as taxas tenham declinado consideravelmente com o tempo (Figura 17). Não foi detectada marcação positiva em rins de animais sham Hts e Svs. As taxas apoptóticas 48 h pós-IR foram de 62,02% nos camundongos *Pkd1^{+/-}* *versus* 42,31% nos animais *Pkd1^{+/+}* ($P < 0,0005$); aos 7 d após o insulto foram de 3,99% nos Hts *versus* 0,67% nos Svs ($P < 0,01$); e 14 d pós-IR de 1,37% nos camundongos Hts *versus* 0,48% nos Svs

($P < 0,005$) (Figura 18). A diferença observada nas células positivas para TUNEL refletiu predominantemente o compartimento epitelial, embora o processo de quantificação também tenha incluído o interstício renal.

Figura 15. Análise comparativa de marcação para PCNA entre rins de camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal (48 h $n=10$ por grupo; 7 d $n=8$ por grupo; 14 d $n=8$ por grupo); * $P < 0,0001$ versus $Pkd1^{+/+}$. Teste de proporção do Qui-quadrado, com os dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Figura 16. Imagens representativas da marcação para PCNA em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h) 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal (48 h *n* = 10 por grupo; 7 d *n* = 8 por grupo; 14 d *n* = 8 por grupo). (a, b) Sham. (c, d) 48 h pós-IR. (e, f) 7 d. (g, h) 14 d. Aumento original, X400.

Figura 17. Análise comparativa de marcação para TUNEL entre rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal (48 h $n=10$ por grupo; 7 d $n=8$ por grupo; 14 d $n=8$ por grupo); ^εP < 0,0005 versus *Pkd1*^{+/+}; ^{**}P < 0,01 versus *Pkd1*^{+/+}; [#]P < 0,005 versus *Pkd1*^{+/+}. Teste de proporção do Qui-quadrado, com os dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Figura 18. Imagens representativas de marcação para TUNEL em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g, i, k, m, o) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h, j, l, n, p) 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal (48 h *n* = 10 por grupo; 7 d *n* = 8 por grupo; 14 d *n* = 8 por grupo). (a, b, c, d) Sham. (e, f, g, h) 48 h pós-IR. (i, j, k, l) 7 d. (m, n, o, p) 14 d. Aumento original, X400 em a, b, e, f, i, j, m, n; X1000 em c, d, g, h, k, l, o, p.

4.6. Análises de Expressão de p21

Os experimentos de imunoistoquímica para p21 demonstraram uma taxa de marcação de células mais baixa nos rins de camundongos *Pkd1^{+/-}* que nos *Pkd1^{+/+}* 48 h após o insulto IR (Figuras 19 e 20). A taxa de células com marcação nuclear positiva para p21 foi de 0,58% nos rins Hts e 3,18% nos Svs ($P < 0,0005$). Uma expressão citoplasmática reduzida de p21 também foi detectada nos rins *Pkd1^{+/-}* comparados ao seus controles *Pkd1^{+/+}* (0,12% *versus* 0,62%; $P < 0,05$). Embora em níveis bem mais baixos, a marcação nuclear positiva para p21 no seguimento de 7 d ainda se manteve levemente acima nos camundongos Svs (1,16%) comparados aos Hts (0,86%; $P < 0,05$), enquanto a marcação citoplasmática não diferiu entre os mesmos (0,35% *versus* 0,39%, respectivamente). As análises da expressão nuclear e citoplasmática entre os grupos sham, por sua vez, não mostraram diferença entre camundongos *Pkd1^{+/-}* (0,04% e 0,09%) e *Pkd1^{+/+}* (0,05% e 0,09%, respectivamente).

A avaliação da expressão de RNAm de p21 por meio da técnica de qRT-PCR revelou um padrão similar ao observado pela análise imunoistoquímica. De fato, no seguimento de 48 h pós-IR a expressão de *p21* foi menor nos rins *Pkd1^{+/-}* que nos rins *Pkd1^{+/+}* [$0,73 \pm 0,29$ UA *versus* $2,30 \pm 1,55$ UA; $P < 0,03$] (Figura 21).

Figura 19. Análise comparativa de marcação para p21 entre rins de camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ 48 h, 7 d, e 14 d pós-IR renal (48 h $n=10$ por grupo; 7 d $n=8$ por grupo; 14 d $n=8$ por grupo); € $P < 0,0005$ versus $Pkd1^{+/+}$; # $P < 0,05$ versus $Pkd1^{+/+}$. Teste de proporção do Qui-quadrado, com os dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Figura 20. Imagens representativas da marcação para p21 em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g, i, k) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h, j, l) 48 h, 7 d, e 14 d pós-IR renal (48 h *n* = 10 por grupo; 7 d *n* = 8 por grupo; 14 d *n* = 8 por grupo). (a, b, c, d) Sham. (e, f, g, h) 48 h pós-IR. (i, j, k, l) 7 d. (m) Controle negativo em rim. (n) Controle positivo em câncer de mama. Aumento original, X400 em a, b, e, f, i, j, m, n; X1000 em c, d, g, h, k, l.

Figura 21. Análise comparativa dos níveis de RNAm de p21 em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} 48 h após IR renal ($n=8$ por grupo), realizada através de RT-PCR em tempo real. $\Phi P < 0,03$ versus *Pkd1*^{+/+}, Teste t de Student não pareado com correção de Welch, com os dados representados como média $\pm$ DP.

4.7. Análises de Infiltração de Macrófagos

Os controles negativos e positivos para o anticorpo anti-Mac-2 mostraram-se adequados, porém nossas análises imunoistoquímicas iniciais revelaram uma marcação cruzada com células epiteliais tubulares proximais em rins dos camundongos. Apesar desta observação, também relatada por outros investigadores ⁹⁵, seu padrão de marcação em interstício renal mostrou-se apropriadamente restrito a macrófagos. Esta observação permitiu que analisássemos a resposta inflamatória intersticial à agressão por IR em camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+}.

Nossos resultados revelaram uma infiltração mais intensa em camundongos Hts que Svs em todos os tempos de seguimento após o insulto IR (Figuras 22 e 23), enquanto não foi detectada diferença entre os camundongos sham $Pkd1^{+/-}$ ($0,33 \pm 0,06$ CP/C) e $Pkd1^{+/+}$ ($0,34 \pm 0,04$ CP/C). Camundongos $Pkd1^{+/-}$ apresentaram marcação mais intensa para Mac-2 que animais $Pkd1^{+/+}$ 48 h pós-IR ($4,43 \pm 0,81$ versus $2,06 \pm 0,32$ CP/C; $P < 0,01$), 7 d após o insulto ($5,07 \pm 0,43$ versus $2,61 \pm 0,54$ CP/C; $P < 0,05$), e aos 14 d pós-IR ($1,80 \pm 0,36$ versus $0,71 \pm 0,15$ CP/C; $P < 0,01$).

Figura 22. Análise comparativa da marcação de Mac-2 entre rins de camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ 48 h, 7 d, e 14 d após IR renal (48 h $n=10$ por grupo; 7 d $n=8$ por grupo; 14 d $n=8$ por grupo). ** $P < 0,01$ versus $Pkd1^{+/+}$; # $P < 0,05$ versus $Pkd1^{+/+}$. Teste t de Student não pareado, com os dados representados como média $\pm$ DP.

Figura 23. Imagens representativas da marcação para Mac-2 em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h) 48 h, 7 d, e 14 d pós-IR renal (48 h *n* = 10 por grupo; 7 d *n* = 8 por grupo; 14 d *n* = 8 por grupo). (a, b) Sham. (c, d) 48 h pós-IR. (e, f) 7 d. (g, h) 14 d. Aumento original, X400.

4.8. Análises de Distribuição da Na-K-ATPase

Análises imunoistoquímicas de detecção da Na-K-ATPase não mostraram diferença entre camundongos sham Svs e Hts, revelando uma marcação predominante basolateral e citoplasmática nos túbulos coletores e distais, acompanhada de uma marcação menos intensa em túbulos proximais. Este padrão mostrou-se preservado nos rins Svs 48 h após IR, porém com uma sensível redução da intensidade do sinal (Figura 24). Os rins dos camundongos Hts, por outro lado, mantiveram o mesmo perfil de sinal em citoplasma e membrana basolateral, com um discreto aumento do sinal nos ductos coletores medulares, e alguns poucos túbulos mostrando marcação específica na membrana luminal. No 7º dia pós-IR, o padrão de distribuição em membrana permaneceu o mesmo nos animais *Pkd1^{+/+}*, com a intensidade do sinal aumentando a um nível próximo do observado nos camundongos sham, enquanto os animais Hts retornaram ao perfil basal.

Figura 24. Imagens representativas da expressão da Na-K-ATPase em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, b, c, d, e, f, g, h, i) e *Pkd1*^{+/-} (j, k, l, m, n, o, p, q, r) Sham, 48 h e 7 d pós-IR renal. (a, b, c, j, k, l) Sham. (d, e, f, m, n, o) 48 h pós-IR. (g, h, i, p, q, r) 7 d. Aumento original, X200.

4.9. Análises de Expansão e Fibrose Intersticial

Grupos adicionais de sete camundongos *Pkd1*^{+/-} e sete *Pkd1*^{+/+} foram submetidos ao mesmo insulto de 32 min de isquemia/reperfusão renal, porém foram sacrificados e submetidos à remoção dos rins 6 sem após a indução de IR. Este desenho experimental teve o intuito de permitir analisar o impacto dessa agressão sobre o tecido renal haploinsuficiente para *Pkd1*. A análise das secções dos rins direitos revelaram um aumento da área intersticial nos dois grupos 6 sem após IR, porém esse efeito foi mais intenso nos camundongos Hts que nos Svs (Figuras 25 e 26). A área intersticial relativa não diferiu entre os camundongos sham *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} [7,26 (6,52 - 8,46) *versus* 6,80% (5,91 - 8,57), respectivamente], enquanto os camundongos Hts mostraram uma área intersticial relativa substancialmente maior que os controles Svs 6 sem após o insulto por IR [22,69 (20,28 - 26,16) *versus* 17,99% (13,60 - 19,90) *P* < 0,01].

As análises da expressão de RNAm de *Col1a1* e de *Col1a2* realizadas através da técnica de RT-PCR em tempo real revelaram perfis que seguem os padrões observados pela avaliação da expansão intersticial. No tempo de seguimento de 6 sem após IR, as expressões de *Col1a1* e *Col1a2* foram, respectivamente, $2,75 \pm 0,86$ e $4,11 \pm 2,21$ UA nos rins dos camundongos *Pkd1*^{+/-} e de $0,92 \pm 0,27$ e $0,94 \pm 0,27$ UA nos rins dos animais *Pkd1*^{+/+} (*P* < 0,02 e *P* < 0,0002, respectivamente) (Figura 27).

Figura 25. Análise comparativa da área intersticial relativa entre camundongos machos *Pkd1*^{+/+} ($n = 7$) e *Pkd1*^{+/-} ($n = 7$) 6 sem após IR renal; ΩP < 0,005 versus SO; **P < 0,01 versus *Pkd1*^{+/+}. Teste de Mann-Whitney não pareado, com os dados expressos como mediana (intervalo interquartil).

Figura 26. Imagens representativas da área intersticial relativa nos camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f) Sham e 6 sem após IR renal (Sham *n* = 7 por grupo; 6 sem *n* = 7 por grupo). (a, b) Sham. (c, d, e, f) 6 sem pós-IR. Aumento original, X400.

Figura 27. Análise comparativa dos níveis de RNAm de *Col1a1* e *Col1a2* em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} 6 sem após IR renal ($n=7$ por grupo), realizada por meio de RT-PCR em tempo real. □ $P < 0,02$ versus *Pkd1*^{+/+}; * $P < 0,0002$ versus *Pkd1*^{+/+}, Teste t de Student não pareado com correção de Welch, com os dados representados como média $\pm$ DP.

4.10. Análises de Dilatação Tubular e Formação de Microcistos/Cistos

Secções seriadas dos rins esquerdos dos dois grupos de 7 animais *Pkd1*^{+/+} e 7 animais *Pkd1*^{+/-} descritos acima, removidos 6 sem após o insulto por IR, foram analisadas para ampliações potenciais da luz tubular. Tal avaliação revelou DT e formação de MC significativas nos camundongos Hts do córtex à medula interna, enquanto este efeito não foi observado nos animais Svs (Figura 28). Não observamos diferença na dilatação tubular e na formação de MC/C entre os grupos sham *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}. Esta análise mostrou DT grau I de 6,0 (3,0 - 7,0) túbulos dilatados (TD) nos camundongos *Pkd1*^{+/-} e 1,0 (0,0 - 1,0) TD em *Pkd1*^{+/+}, NS; DT grau II de 3,0

(0,0 - 4,0) e 0,0 (0,0 - 0,0) TD, respectivamente, NS; MC de 0,0 (0,0 - 0,0) em *Pkd1^{+/-}* e *Pkd1^{+/+}*; e C de 0,0 (0,0 - 0,0) em ambos os grupos. Os camundongos Hts apresentaram dilatação tubular grau II e formação de microcistos aumentadas 6 sem pós-IR. Estas análises mostraram DT grau I de 4,5 (1,0 - 7,0) TD NS *versus* sham (Figura 29); DT grau II de 6,5 (5,0 - 8,0) TD, $P < 0,05$ *versus* sham; MC de 3,5 (2,0 - 5,0), $P < 0,02$ *versus* sham; e C de 0,0 (0,0 - 0,0), NS *versus* sham. Vale mencionar que dois rins de camundongos *Pkd1^{+/-}* apresentaram dois cistos cada, o que não foi verificado em rins Svs. Os rins dos animais *Pkd1^{+/+}*, por outro lado, não apresentaram aumento nesses parâmetros 6 sem pós-IR: DT grau I de 1,5 (1,0 - 2,0) TD; DT grau II de 1,5 (0,0 - 2,0) TD; MC de 0,0 (0,0 - 0,0); e C de 0,0 (0,0 - 0,0). As taxas de DT grau II e de formação de MC, por sua vez, foram significativamente mais altas nos camundongos *Pkd1^{+/-}* que nos animais *Pkd1^{+/+}* ($P < 0,02$ e $P < 0,02$, respectivamente).

Figura 28. Análise comparativa dos índices de dilatação tubular, formação de microscistos e formação de cistos entre rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} ($n = 7$) e *Pkd1*^{+/-} ($n = 7$) 6 sem após IR renal; * $P < 0,02$ versus SO; † $P < 0,05$ versus SO; ‡ $P < 0,02$ versus *Pkd1*^{+/+}. Teste de Mann-Whitney não pareado, com os dados expressos como mediana (intervalo interquartil).

Figura 29. Representação histológica das alterações potenciais de dilatação tubular e microcistos em rins de camundongos machos *Pkd1*^{+/+} (a, c, e) e *Pkd1*^{+/-} (b, d, f). (a, b) Sham. (c, d, e, f) 6 sem pós-IR. Aumento original, X400 em a, b, c, d; X200 em e, f.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A identificação dos genes *PKD1* e *PKD2* e a caracterização progressiva de seus respectivos produtos permitiram contribuições sucessivas à compreensão da patogênese da DRPAD e das funções das policistinas 1 e 2. Achados robustos indicam que a maior parte dos cistos renais e hepáticos, se não todos, em ambas as formas genéticas DRPAD1 e DRPAD2, se formam com base em um processo de dois golpes³³⁻³⁴. A compreensão e os efeitos da haploinsuficiência desses genes, contudo, são ainda muito limitados. É importante notar que a tubulogênese tardia e a maturação tubular requerem aparentemente níveis baixos de PC1⁴⁴ e que um modelo de camundongo geneticamente modificado com nível diminuído de expressão de PC1 mostrou-se viável ao nascimento^{35, 37}. Outros processos de organização e diferenciação, contudo, podem estar associados a níveis mais altos de atividade de PC1.

De fato, anormalidades funcionais renais e vasculares têm sido descritas em modelos animais de haploinsuficiência para *Pkd1* e *Pkd2*. Ahrabi e cols relataram que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* cursaram com uma síndrome de antidiurese inapropriada com elevação da osmolalidade urinária e redução da osmolalidade plasmática, apesar de apresentarem função renal e ingestão hídrica semelhantes a seus controles selvagens. Tal achado se associou a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} , diminuição da atividade de RhoA, recrutamento de aquaporina-2

nos ductos coletores e expressão inapropriada de vasopressina no tecido cerebral ⁹⁶. Qian e cols, por sua vez, mostraram que a vasculatura arterial de camundongos haploinsuficientes para *Pkd2* apresentaram uma resposta contrátil exacerbada, assim como uma sensibilidade aumentada a fenilefrina ⁹⁷.

No contexto fenotípico apresentado e amparados na natureza da lesão por isquemia/reperfusão, consideramos fundamental atentar para as propriedades biológicas da PC1, incluindo regulação da proliferação, da diferenciação e da apoptose celular. Com base na análise integrada dessas observações, tecemos a hipótese de que a PC1 pudesse desempenhar um papel protetor contra o insulto renal por IR e que, portanto, a haploinsuficiência de *PKD1* pudesse levar a uma maior suscetibilidade a essa agressão. Esta associação potencial, por sua vez, poderia ser importante não apenas para definir um risco mais elevado para LRA na DRPAD, como também para analisar a possibilidade de que a lesão renal por IR pudesse ser um fator contributório para a piora da progressão da doença renal nesses pacientes. Embora alguns estudos tenham relacionado o perfil de expressão da policistina-2 à lesão isquêmica ⁸⁵⁻⁸⁷, nenhuma análise significativa havia abordado essa questão para a policistina-1.

O insulto por isquemia/reperfusão constitui-se na causa principal da LRA ⁸¹. A LRA pós-isquêmica é secundária a uma cadeia de anormalidades bioquímicas e biológicas envolvendo morte de células tubulares, disfunção endotelial e inflamação ⁸⁴. Interessantemente, células renais quiescentes entram no ciclo celular após LRA, o que se segue da indução de inibidores

do ciclo celular, particularmente p21⁷⁶. A expressão aumentada desta proteína está aparentemente envolvida na coordenação adequada do ciclo celular, necessária à maximização da recuperação de células epiteliais renais pós-lesão e à redução da extensão do dano orgânico⁷⁴.

Baseados nas evidências apresentadas, analisamos a possível relação entre haploinsuficiência de *Pkd1* e risco aumento para lesão renal por IR utilizando uma linhagem endogâmica de camundongos 129Sv com uma mutação nula no gene *Pkd1*, um modelo descrito anteriormente⁹¹. Uma vez que os camundongos heterozigotos para esta mutação virtualmente não desenvolvem cistos renais até 12 semanas de idade, pudemos assumir que este animal se constituía em um modelo apropriado para avaliar o impacto biológico da haploinsuficiência de *Pkd1*. Nossos dados mostraram um maior aumento da S_{Cr} nos animais *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} 48 h após a indução de isquemia/reperfusão, indicando que os Hts apresentaram uma maior redução da TFG que os Svs neste momento de avaliação. Esses resultados sugerem que o estado de haploinsuficiência de *Pkd1* aumenta o grau da lesão por IR. A S_U não diferiu entre os dois grupos de animais em todos os tempos de análise para o insulto isquêmico de 32 min, porém quando esse tempo foi elevado para 35 min ambos S_{Cr} e S_U mostraram-se significativamente mais altos em Hts que em Svs. A razão pela qual a diferença de S_U entre os grupos não foi significativa para o insulto IR de 32 min ainda não é clara. Acreditamos que alterações hemodinâmicas ou metabólicas, presentes nos camundongos *Pkd1*^{+/-}, possam contribuir para esse achado. Deve-se atentar, ainda, para o fato de que embora a lesão

renal associada ao insulto de 35 min tenha se acompanhado da morte de todos os animais, os Svs sobreviveram por um período substancialmente mais longo que os Hts. Esta observação apóia fortemente a maior suscetibilidade à lesão por IR em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*.

Aumentos da FE_{Na} e da FE_K foram observados nos animais heterozigotos 48 h e 7 d pós-IR, porém o mesmo não foi verificado para os camundongos selvagens. Esses achados indicam um nível mais pronunciado de lesão tubular nos animais haploinsuficientes para *Pkd1* quando comparados a seus controles. A redução na expressão da Na-K-ATPase encontrada nos animais controle na primeira avaliação pós-IR consiste em um dado esperado ⁹⁸, porém permanece desconhecido o porquê desse resultado não ter sido encontrado em Hts. A observação de que rins *Pkd1*^{+/-} apresentam expressão da Na-K-ATPase em membrana luminal em alguns túbulos sugere, contudo, que sua distribuição anormal de polaridade possa desempenhar um papel relevante nesses achados funcionais. O grau atingido de lesão tubular, por sua vez, foi suficiente para aumentar precocemente a S_K após o insulto IR e reduzir a osmolalidade urinária 7 dias pós-IR em ambos, os grupos heterozigoto e selvagem.

As análises histológicas realizadas nos rins de camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} revelaram que o dano residual cortical foi mais intenso nos animais heterozigotos que nos selvagens 48 h, 7 d e 14 d após a indução de isquemia renal. As lesões específicas observadas 48 h pós-IR em túbulos proximais e coletores em rins *Pkd1*^{+/-}, associadas às alterações de baixa

magnitude encontradas nos túbulos proximais dos animais *Pkd1*^{+/+}, são consistentes com esses resultados. É importante mencionar que a histologia renal basal é indistinguível entre os camundongos heterozigotos e selvagens até 12 semanas de idade. O envolvimento de túbulos coletores na lesão IR encontrada em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* não deve ser considerado um achado surpreendente, uma vez que a policistina-1 é particularmente expressa no néfron distal e em túbulos coletores^{24, 99-100}.

A haploinsuficiência de *Pkd1*, portanto, magnifica a lesão morfológica determinada pela isquemia/reperfusão até 14 dias após o insulto. Esta conclusão também é apoiada pela análise de microscopia eletrônica, que revela uma lesão tubular proximal significativamente mais severa nos Hts, incluindo importante dano celular tubular, acúmulo intraluminal de fragmentos de membrana apical, cilindros hialinos e desgarramento de células de revestimento com quantidades aumentadas de proteína para a luz tubular. Também detectamos uma lesão endotelial pós-IR mais intensa em rins *Pkd1*^{+/-} que em rins *Pkd1*^{+/+}, representada por uma perda considerável de fenestração endotelial e acúmulo de material floculado. Estas observações indicam que a haploinsuficiência de *Pkd1* amplia a lesão morfológica determinada pela isquemia/reperfusão, um efeito detectável até 14 dias após o insulto. Vale dizer que observações recentes de Takakura e cols também foram consistentes com um grau de lesão ao insulto IR renal maior em camundongos haploinsuficientes e *knockout* induzidos para *Pkd1* que em seus respectivos controles selvagens¹⁰¹.

As análises imunoistoquímicas para PCNA mostraram uma taxa de proliferação celular mais elevada 48 h pós-IR renal em camundongos *Pkd1*^{+/-} que em animais *Pkd1*^{+/+}. Esse padrão foi também observado no 7º dia pós-insulto isquêmico. A ausência de diferença significativa observada entre os grupos 14 dias pós-IR, por sua vez, era um achado previsto, uma vez que uma importante redução na proliferação celular foi descrita para esse tempo de seguimento em rins submetidos a IR ⁸⁸. A haploinsuficiência de *Pkd1* parece, portanto, prejudicar a coordenação apropriada do ciclo celular necessária após IR. Assim, o achado de uma maior taxa de proliferação celular em rins *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} é consistente com uma relação proliferação/diferenciação celular prejudicada para uma resposta de reparo e regeneração celular adequada determinada pelo estado de haploinsuficiência de *Pkd1*. Os estudos de TUNEL conduzidos nos rins removidos 48 h depois do insulto IR, por sua vez, revelaram uma maior taxa de apoptose nos animais *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+}. Embora com taxas bem mais baixas, padrões similares também foram observados nos tempos de 7 e 14 d pós-IR. O declínio significativo da taxa de apoptose observado até 7 dias é, de fato, consistente com sua sensível queda observada após os primeiros dias pós-insulto IR ¹⁰². O estado de haploinsuficiência de *Pkd1*, conseqüentemente, está associado a uma taxa de apoptose aumentada, uma anormalidade que aparentemente contribui para a lesão tubular ⁸¹. Vale notar que esses resultados são consistentes com os efeitos funcionais da PC1 elucidados *in vitro*, que sugerem uma ação de redução da taxa de

proliferação de células epiteliais renais, permitindo sua evolução à diferenciação terminal sem sucumbir à apoptose ⁴⁴.

Paralelamente ao nosso trabalho, Prasad e cols caracterizaram e analisaram alguns efeitos do insulto IR renal sobre camundongos haploinsuficientes para *Pkd2*, igualmente não-císticos. Embora seu modelo tenha utilizado isquemia renal unilateral e um período de isquemia inferior ao empregado em nosso estudo (25 min), seus achados também demonstraram maiores grau de necrose tubular, taxa de proliferação celular, taxa de apoptose e resposta inflamatória nos animais *Pkd2*^{+/-}, comparados a seus controles selvagens ¹⁰³.

Os rins de camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentaram expressão nuclear de p21 mais baixa que os rins *Pkd1*^{+/+} 48 h após IR e, em um grau mais baixo, 7 dias após o insulto. Interessantemente, uma expressão citoplasmática mais baixa de p21 também foi observada em rins de camundongos *Pkd1*^{+/-} no tempo de seguimento de 48 h. Vários investigadores descreveram, de fato, uma expressão citoplasmática consistente de p21 ¹⁰⁴. Sua menor expressão em Hts no tempo de 48 h foi confirmada também no nível transcricional. Merece menção, ainda, o fato dessa redução relativa de expressão de p21 estar conceitualmente em acordo com os resultados de Bhunia e cols, que reportaram que a cascata dependente de PC1 leva a aumento da expressão de p21 e conseqüente inibição da atividade de Cdk2 ⁶². A proteína p21 é classicamente expressa no núcleo das células e, como vimos, é envolvida na regulação da atividade do ciclo celular. Sua função basal é estabilizar a interação entre as ciclinas e as Cdks, enquanto

em níveis mais altos determina parada do ciclo celular. A transcrição de p21 pode ser controlada por mecanismos p53-dependentes e/ou p53-independentes ⁷⁸. O efeito imediato da indução de p21 é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma (pRB); p21 inibe o complexo de Cdk, levando ao acúmulo de pRB hipofosforilada e à parada do ciclo celular em G1.

A elevação inicial da expressão de p21 48 h pós-IR e seu declínio significativo aos 7 d após o insulto nos animais selvagens são consistentes com observações relatadas para um outro modelo de lesão por IR renal em camundongo ⁷⁸, que revelou um aumento da expressão de p21 logo após o insulto, seguido de um retorno a níveis pré-lesão nos dias seguintes. O curso dos resultados obtidos para os rins selvagens, associado a uma expressão não aumentada de p21 nos rins heterozigotos no tempo de 48 h, indica que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* são incapazes de elevar a expressão de p21, conforme se faz necessário logo após um insulto IR. Além disso, esta incapacidade de aumentar a expressão de p21 está associada a evidências de coordenação desregulada do ciclo celular, conforme revelado por taxas de proliferação celular e de apoptose inapropriadamente elevadas em rins heterozigotos pós-IR. Merece destaque o fato de que uma regulação apropriada do ciclo celular após LRA constitui-se em um determinante chave para uma resposta de recuperação tecidual adequada ⁷⁵⁻⁷⁶. Nesse contexto, admite-se que o aumento de expressão de p21 exerça um efeito renoprotetor contra a IR, por meio da regulação adequada do ciclo celular após o insulto. A resposta tubular defeituosa e a

suscetibilidade aumentada à isquemia presentes nos camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*, portanto, parecem ser determinados pela ausência desta *upregulation*.

Nossos resultados são consistentes e apoiados por achados prévios, que mostram níveis transcricionais aumentados de *p21* em rins murinos após IR, assim como maiores comprometimento da função renal, mortalidade e atividade do ciclo celular pós-IR renal em camundongos *p21^{-/-}*, comparados a seus controles *p21^{+/+}* ⁸⁸. Dados adicionais sugerem que a *upregulation* de *p21* pós-IR seja independente de *p53* ⁷⁸. A maior suscetibilidade à lesão por IR observada em animais *p21^{-/-}*, portanto, resulta aparentemente de uma atividade do ciclo celular regulada inapropriadamente em células renais. Interessantemente, este grupo de investigadores também mostrou que inibidores do ciclo celular protegem células renais da apoptose induzida por cisplatina e que a citotoxicidade da cisplatina é dependente da atividade de *Cdk2* ⁷⁷. Além disso, em apoio a nossos achados, outros estudos recentes mostraram que células epiteliais renais de camundongo *Pkd1^{-/-}* expressam *p21* em níveis mais baixos que células *Pkd1^{+/+}* ³⁸ e demonstraram uma diminuição da expressão de *p21* em rins humanos císticos com DRPAD, quando comparados a rins normais ⁸⁰. Propomos, portanto, que a falta de *upregulation* de *p21* que se segue à IR em camundongos *Pkd1^{+/+}* seja, ao menos parcialmente, responsável pela intensificação da lesão inicial e pelas alterações tardias na recuperação observadas nesses animais.

Outros mecanismos não mutuamente exclusivos, entretanto, também poderiam potencialmente contribuir para a maior intensidade de lesão por IR e para as alterações associadas observadas em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*. Como consideração inicial, os camundongos heterozigotos poderiam se associar a um estado hemodinâmico renal distinto dos selvagens, alteração que poderia potencialmente conduzir a uma disfunção hemodinâmica renal mais pronunciada pós-IR e contribuir para um maior declínio da TFG e amplificação da lesão renal. Uma resposta vascular potencialmente alterada ao insulto renal poderia igualmente conduzir a um maior dano renal em camundongos heterozigotos. Tal anormalidade poderia envolver o sistema NO, uma vez que foi demonstrada geração defeituosa de NO e vasodilatação dependente do endotélio alterada na DRPAD ¹⁰⁵. Vale mencionar que um modelo prévio de camundongo *Pkd1*^{+/-} apresentou níveis mais baixos de excreção urinária de metabólitos do NO que animais *Pkd1*^{+/+} ¹⁰⁶.

Fisher e cols mostraram que o alongamento tubular renal está associado à orientação mitótica longitudinal ⁹⁰. Esta polarização celular planar, por sua vez, encontra-se comprometida em modelos animais de doença renal policística. Este grupo de pesquisadores relatou recentemente, além disso, que a lesão renal por IR pode induzir uma fase significativa de proliferação celular regenerativa depois do intenso período proliferativo que se segue ao alongamento tubular por ocasião do desenvolvimento pós-natal ¹⁰⁷. Tais observações, associadas a nossos achados, sugerem uma provável ligação entre vias relacionadas a DRP e IR renal. É importante

notar que inibidores do ciclo celular foram capazes de resgatar anormalidades do tubo neural em *zebrafish* sem expressão de Vangl2, uma molécula envolvida na sinalização de PCP¹⁰⁸. Esta observação, associada a nossos resultados, sugere que uma ligação potencial entre haploinsuficiência de *Pkd1* e defeitos da PCP relacionados a IR poderia resultar da deficiência relativa de p21. É importante mencionar, contudo, que Nishio e cols concluíram recentemente um estudo onde testaram a hipótese de que a perda da orientação da divisão celular causa a doença cística em modelos de camundongo ortólogos à DRPAD e à DRPAR (*Pkhd1*^{del4/del4}) humanas. Interessantemente, após a inativação rim-específica de *Pkd1* ou *Pkd2* túbulos pré-císticos não perderam o padrão de divisão orientada antes do processo de dilatação cística, mas o perderam após o início da dilatação tubular. Os camundongos mutantes para o gene *Pkhd1*, ao contrário, perderam a capacidade de divisão celular orientada, porém não desenvolveram cistos renais. Tais investigadores concluem, portanto, que a perda do padrão de divisão celular orientada constitui-se de fato em uma característica da formação cística e em uma alteração biológica induzida por mutações no gene *Pkhd1*, porém não é suficiente para levar à formação de cistos renais nem necessária para iniciar a cystogênese após mutações em *Pkd1* ou *Pkd2*¹⁰⁹.

Uma resposta tubular defeituosa à lesão por IR nos Hts também poderia decorrer da perturbação dos prováveis papéis de PC1 em interações célula-célula e/ou célula-matriz, assim como de ajustes impróprios ao estresse celular, uma vez que a PC1 constitui-se em um regulador da

liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Outro aspecto importante da lesão por IR potencialmente associado à DRPAD foi abordado por um estudo recente de Verghese e cols⁸⁹. Estes investigadores mostraram que IR renal em camundongos resulta no encurtamento dos cílios primários 24 e 48 h pós-insulto, enquanto em fases mais tardias de lesão e reparo tecidual seu comprimento aumenta. Esses achados sugerem que o cílio apical primário renal possa responder a estímulos ambientais deflagrados por lesão e atuar no processo de reparo.

A inflamação consiste num participante maior da lesão renal deflagrada por IR. A resposta inflamatória à IR renal inclui componentes celulares, como células endoteliais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células tubulares, assim como citocinas⁸⁴. Nossos dados suportam que a haploinsuficiência de *Pkd1* também impacte o componente inflamatório renal pós-IR, amplificando tal resposta. Nossos resultados também sugerem que esta resposta se constitua em um evento ligeiramente mais tardio que as outras respostas a IR associadas à haploinsuficiência de *Pkd1*. Os níveis reduzidos de p21, por sua vez, poderiam ser também responsáveis por tal amplificação, uma vez que a transferência do gene *p21* reduziu a expressão de vários mediadores inflamatórios e proteinases degradadoras de tecido¹¹⁰. Com base nessas observações e no fato de que a progressão da doença renal é aparentemente afetada pela fibrose na DRPAD¹¹¹, analisamos um tempo de seguimento de 6 sem pós-IR. Neste ponto, mostramos uma expansão intersticial mais extensa e uma maior expressão de *Col1a1* e *Col1a2* em camundongos *Pkd1*^{+/-} que em *Pkd1*^{+/+}, resultados consistentes com nível

mais elevado de fibrose renal nos animais heterozigotos. Tais achados sugerem que insultos por IR possam favorecer a aceleração da doença em rins haploinsuficientes para *Pkd1* por meio da indução de fibrose renal.

É fundamental enfatizar que os rins dos camundongos heterozigotos mostraram dilatação tubular e desenvolvimento de microcistos 6 sem após a lesão por IR, um achado não encontrado em seus controles selvagens. Cistos maiores foram observados apenas ocasionalmente nos heterozigotos após IR, mas nunca nos animais selvagens. Estas observações exigem a lembrança de alguns resultados chave. Piontek e cols mostraram recentemente em camundongos submetidos à inativação condicional de *Pkd1* que: 1) a inativação deste gene em células renais adultas é capaz de levar à formação de cistos; e 2) a susceptibilidade à inativação de *Pkd1* depende criticamente do momento da inativação, mesmo após o término da nefrogênese. Enquanto a inativação no dia pós natal 12 (P12) resulta em extenso aparecimento de cistos renais em 3 semanas, a inativação de *Pkd1* no P14 leva a uma formação bem mais tênue de cistos e apenas após cinco meses ³⁹. A presença de uma mudança brusca no padrão geral de expressão gênica entre os dias P12 e P14 em camundongos normais sugere, por sua vez, que a susceptibilidade à inativação de *Pkd1* esteja relacionada ao estágio de desenvolvimento do órgão, e que a inativação dos dois alelos *Pkd1* é necessária, porém não suficiente para o aparecimento rápido de cistos no rim adulto.

Resultados adicionais mostraram que a inativação específica de *Pkd1* no rim resultou em uma doença cística lentamente progressiva em

camundongos adultos, sugerindo que a deficiência de *Pkd1* não inicie proliferação celular suficiente para formação cística e que estímulos adicionais sejam necessários para a cystogênese ⁴²⁻⁴³. Nesse cenário, o rápido desenvolvimento de cistos requereria um terceiro golpe no rim maduro, de natureza genética ou não genética ⁴². Seguindo esta linha conceitual, o mesmo grupo mostrou, em um estudo subsequente, que o insulto por isquemia/reperfusão determinou formação rápida e difusa de cistos renais em camundongos *knockout* induzidos com ambos os alelos *Pkd1* condicionais, quando a inativação gênica foi estabelecida na idade de 5 semanas ¹⁰¹. Tal achado confirmou que IR pode funcionar como um terceiro golpe para a formação de cistos no rim maduro deste modelo animal, contendo células tubulares com ambos os alelos *Pkd1* inativados tardiamente. Nossos resultados apóiam e são apoiados por esses dados prévios e estendem este princípio, colocando isquemia/reperfusão como um provável golpe adicional em um modelo *Pkd1*^{+/-}. Deve-se notar, entretanto, que embora se possa esperar que os microcistos formados em nosso modelo seguindo-se à IR tenham se originado de células com mutações germinativa e somática nos alelos *Pkd1*, esta hipótese ainda precisa ser demonstrada.

Patel e cols demonstraram que a lesão renal isquêmica induziu a formação de cistos em camundongos adultos mutantes para *Kif3a*, um processo aparentemente dependente de defeitos na polaridade celular planar ⁴¹. Enquanto estes investigadores advogam que anormalidades ciliares desempenham um papel chave nesse processo, é interessante notar

que nosso modelo de haploinsuficiência de *Pkd1* não está associado aparentemente com defeitos ciliares. Um ponto crítico, no entanto, deve ser levantado. Em nosso trabalho, animais heterozigotos e selvagens desenvolveram níveis distintos de lesão renal, enquanto no estudo de Patel e cols o grau da lesão não foi documentado ⁴¹. Com base em nossos achados, poder-se-ia considerar que os mutantes desses autores também pudessem ser mais suscetíveis ao insulto renal por IR. Se esse fosse o caso, em ambas as situações, nossa e deles, seria esperado que os fenótipos císticos resultassem de disfunções na regulação da luz tubular relacionadas a PC1, mas não se poderia excluir completamente a possibilidade de que os fenótipos estejam associados a um maior grau de lesão tubular pós-IR.

Nossos dados sugerem que camundongos heterozigotos para mutação nula no gene *Pkd1*, e possivelmente doentes com DRPAD, estejam associados a um maior risco para lesão renal por IR, um processo aparentemente dependente de uma deficiência relativa da atividade de p21. Nossos resultados sugerem, ainda, que este modelo animal, e possivelmente seus equivalentes humanos, também se associem a dilatação tubular e formação de microcistos induzidas por isquemia/reperfusão renal. Estes achados colocam policistina-1 como uma molécula aparentemente associada à proteção renal. Nesse cenário, nossos dados podem conduzir a medidas preventivas contra possíveis lesões renais em pacientes com DRPAD e ao desenvolvimento de agentes protetores a serem usados em tais pacientes em situações de risco. Nossos resultados mostram, por fim,

que o insulto por isquemia/reperfusão leva a uma fibrose renal aumentada na presença de haploinsuficiência para *Pkd1* e apóia o conceito de que IR renal pode funcionar como um golpe adicional para a cistogênese. Nesse contexto, tais resultados sugerem que insultos renais por isquemia/reperfusão possam contribuir para a aceleração da doença renal na DRPAD, ampliando o entendimento da patogênese desta enfermidade.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

✓ Específicas

1. Camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentam maior grau de lesão funcional renal que animais *Pkd1*^{+/+} após insulto isquemia/reperfusão.
2. Camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentam uma maior lesão cortical residual que animais *Pkd1*^{+/+} após insulto isquemia/reperfusão renal.
3. Camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentam maior mortalidade precoce que animais *Pkd1*^{+/+} após insulto isquemia/reperfusão renal severo.
4. A haploinsuficiência de *Pkd1* associou-se a maiores taxas de proliferação celular, apoptose e resposta inflamatória renais após insulto isquemia/reperfusão.
5. A maior suscetibilidade à lesão renal por isquemia/reperfusão associada a haploinsuficiência de *Pkd1* parece ser secundária a uma desregulação da atividade do ciclo celular, aparentemente dependente de uma deficiência relativa de p21.
6. Camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentam maior fibrose intersticial renal que animais *Pkd1*^{+/+} 6 semanas após insulto isquemia/reperfusão.
7. A haploinsuficiência de *Pkd1* associou-se a dilatação tubular e formação de microcistos 6 semanas após insulto isquemia/reperfusão renal.

✓ **Gerais**

1. Camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* apresentam um risco aumentado de lesão por isquemia/reperfusão renal, abrindo a mesma possibilidade para humanos.
2. Nossos achados abrem novas perspectivas para o papel biológico da policistina-1, sugerindo um efeito protetor renal contra a lesão por isquemia/reperfusão.
3. O insulto por isquemia/reperfusão constitui-se em um golpe adicional para a formação de microcistos renais em camundongo haploinsuficiente para *Pkd1*, podendo apresentar efeitos similares em pacientes com DRPAD.
4. A haploinsuficiência de *Pkd1* está associada a impacto negativo do insulto isquemia/reperfusão sobre a evolução renal em camundongos, sugerindo que esta agressão possa contribuir para a aceleração da doença renal em pacientes com DRPAD.

ANEXOS

***Pkd1* Haploinsufficiency Increases Renal Damage and Induces Microcyst Formation following Ischemia/Reperfusion**

Ana P. Bastos,* Klaus Piontek,[†] Ana M. Silva,[‡] Dino Martini,[§] Luis F. Menezes,[†] Jonathan M. Fonseca,* Ivone I. Fonseca,* Gregory G. Germino,[†] and Luiz F. Onuchic*

*Department of Medicine, Division of Nephrology, and [†]Department of Pathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil; [‡]Department of Medicine, Division of Nephrology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland; and [§]Division of Pathology, Beneficência Portuguesa Hospital, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Mutations in *PKD1* cause the majority of cases of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Because polycystin 1 modulates cell proliferation, cell differentiation, and apoptosis, its lower biologic activity observed in ADPKD might influence the degree of injury after renal ischemia/reperfusion. We induced renal ischemia/reperfusion in 10- to 12-wk-old male noncystic *Pkd1*^{+/-} and wild-type mice. Compared with wild-type mice, heterozygous mice had higher fractional excretions of sodium and potassium and higher serum creatinine after 48 h. In addition, in heterozygous mice, also cortical damage, rates of apoptosis, and inflammatory infiltration into the interstitium at time points out to 14 d after injury all increased, as well as cell proliferation at 48 h and 7 d. The mRNA and protein expression of p21 was lower in heterozygous mice than wild-type mice at 48 h. After 6 wk, we observed dilated tubules, microcysts, and increased renal fibrosis in heterozygotes. The early mortality of heterozygotes was significantly higher than that of wild-type mice when we extended the duration of ischemia from 32 to 35 min. In conclusion, ischemia/reperfusion induces a more severe injury in kidneys of *Pkd1*-haploinsufficient mice, a process that apparently depends on a relative deficiency of p21 activity, tubular dilation, and microcyst formation. These data suggest the possibility that humans with ADPKD from *PKD1* mutations may be at greater risk for damage from renal ischemia/reperfusion injury.

J Am Soc Nephrol 20: 2389–2402, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008040435

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common monogenic renal disease, with a prevalence of 1:400 to 1:1000. Mutations of the *PKD1* gene are responsible for approximately 85% of the disease cases, whereas approximately 15% are caused by mutations in *PKD2*.¹ Only half of patients reach the age of 58 yr without ESRD.² ADPKD is a systemic disorder, however, including extrarenal manifestations typically represented by liver cysts, intracranial aneurysms, and heart valve alterations.

The *PKD1* gene encodes polycystin 1, a large glycoprotein with an approximately 3000–amino acid extracellular portion that comprises domains that seem to be involved in protein–protein and protein–carbohydrate interactions. A number of stud-

ies support the involvement of the primary apical cilium in the pathogenesis of PKD by modulating signal transduction *via* intracellular Ca²⁺ transients.³ Polycystins 1 and 2 (PC1 and PC2) are thought to participate actively in this process.^{3–6} Ciliary mechanosensation has also been associated with STAT6-dependent changes in gene expression.⁷ In addition, the cellular effects of polycystins

Received April 29, 2008. Accepted August 6, 2009.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Luiz F. Onuchic, Avenida Dr. Arnaldo, 455, Sala 4304, São Paulo, SP 01246-903, Brazil. Phone: 55-11-3061-8399; Fax: 55-11-3061-8361; E-mail: lonuchic@lim12.fm.usp.br

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

seem to rely on interaction with the cytoskeleton and mediation of cell–cell adhesion.^{8,9}

PC1 and PC2 activate a number of other pathways. PC1 may function as a G protein–coupled receptor.¹⁰ Its activation, following a process dependent on PC2, may also activate JAK2, leading to phosphorylation and activation of STAT1 and generation of STAT1 homodimers.¹¹ These dimers bind to the *p21* promoter in the nucleus, promoting its upregulation, reduction of Cdk2 activity, and cell arrest in G0/G1. It has also been shown that PC1 induces phosphatidylinositol 3 kinase–dependent Akt activation,¹² whereas its C-terminus may interact with tuberlin, regulating mammalian target of rapamycin activity.¹³ Moreover, PC1 is subjected to an autoproteolytic process in the G protein-coupled receptor proteolytic site domain, generating an extracellular N-terminal fragment,¹⁴ whereas its C-terminus seems to be cleaved, to be translocated to the nucleus, and to activate AP-1.¹⁵

Ischemia/reperfusion (IR) injury is a common cause of acute kidney injury (AKI), including patients with ADPKD. The cellular damage is secondary to a chain of biochemical and biologic abnormalities.^{16,17} An abnormal proliferative response of ADPKD cells to cAMP has been reported, apparently associated with defective intracellular Ca^{2+} homeostasis,¹⁸ and animal models of PKD have been associated with dysregulated cell-cycle activity.¹⁹ Piontek *et al.*,²⁰ however, have shown that the effects of *Pkd1* inactivation in mice are determined by a developmental switch on postnatal day 13. Interestingly, in this model, cellular proliferation was not significantly increased.

In this scenario, we hypothesized that a lower PC1 biologic activity might amplify the IR injury degree. Although the focal cyst formation in ADPKD is likely dependent on a two-hit mechanism,²¹ the functional effects of PC1 seem to rely on activity thresholds.²² *PKD1*-haploinsufficient kidney cells, therefore, might be unable to achieve the required PC1 activity level when exposed to IR. Although studies on the ischemia/PC2 relation have brought some potential contributions to this question,^{23,24} the relationship between PC1 and IR is basically unknown. By coordinating cell planar polarity in renal tubules, PC1 might exert a protective effect after an ischemic insult. In this study, this potential mechanism was investigated in *Pkd1*^{+/-} mice obtained from an inbred mouse line with a *Pkd1* null mutation. Our findings of a more severe renal lesion in *Pkd1*-null heterozygotes suggest an increased risk for renal IR injury in *Pkd1*-haploinsufficient mice. Development of tubular dilation (TD) and microcysts (MCs) and increased renal fibrosis, in turn, suggest that the IR aggression has a higher long-term negative impact on *Pkd1*^{+/-} kidneys.

RESULTS

Indirect Analyses of GFR

Because the histologic and immunohistochemical analyses were performed on three heterozygous (HT) and three wild-

type (WT) groups, killed at 48 h (HT48h *n* = 10; WT48h *n* = 10), 7 d (HT7d *n* = 8; and WT7d *n* = 8), and 14 d after the 32-min IR insult (HT14d *n* = 8; and WT14d *n* = 8), the functional analyses were carried out preischemically and at 48 h in all animal groups; at 7 d in groups WT7d, WT14d, HT7d, and HT14d; and at 14 d only in the WT14d and HT14d groups. Two additional groups, *Pkd1*^{+/+} (*n* = 11) and *Pkd1*^{+/-} (*n* = 8), were subjected to a 35-min IR insult.

The bilateral IR insult resulted in a significant increase in serum creatinine (S_{Cr}) in *Pkd1*^{+/-} mice at 48 h and 7 d of follow-up, whereas only a NS trend of rise was observed in *Pkd1*^{+/+} mice at 48 h (Figure 1A; Table 1). *Pkd1*^{+/-} mice showed a S_{Cr} rise at 48 h from 0.33 ± 0.13 to 0.80 ± 0.40 mg/dl ($P < 0.001$), a value significantly higher than that observed in *Pkd1*^{+/+} mice (0.60 ± 0.20 mg/dl; $P < 0.005$). The S_{Cr} level, in turn, returned to preischemic values by 14 d after the insult.

Blood urea nitrogen (BUN) rose at 48 h in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice but did not differ between them at all three follow-up times (Figure 1B). A reduction in body weight was detected in both WTs and HTs after IR, but it returned to baseline values in both groups by 14 d after injury induction (Table 1). Thirty-five minutes of IR, in turn, led to significantly higher BUN levels in HTs than in WTs 48 h after the insult

Figure 1. (A and B) Comparative analyses of S_{Cr} (A) and BUN (B) in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice before insult and 48 h, 7 d, and 14 d after a 32 min of renal IR insult. $^{\pi}P < 0.001$ versus preischemic (PI); $^{\dagger}P < 0.05$ versus PI; $^{\ddagger}P < 0.05$ versus 48 h; $^{\S}P < 0.005$ versus *Pkd1*^{+/+}. S_{Cr} was compared using two-way ANOVA, with the data presented as means $\pm$ SD, and BUN using the Friedmann test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile).

Table 1. Time course of S_{Cr} , BUN, and body weight in $Pkd1^{+/+}$ and $Pkd1^{+/-}$ male mice subjected to renal IR^a

Parameter	S_{Cr} (mg/dl; Mean $\pm$ SD)	BUN (mg/dl; Median [Lower Quartile to Upper Quartile])	Body Weight (g; Mean $\pm$ SD)
PI			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 26)	0.46 ± 0.17	22.7 (20.0 to 23.9)	21.15 ± 1.89
$Pkd1^{+/-}$ (n = 26)	0.33 ± 0.13	21.9 (19.5 to 23.2)	20.52 ± 2.74
48 h			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 26)	0.60 ± 0.20	41.5 (36.0 to 53.2) ^a	18.87 ± 1.41^a
$Pkd1^{+/-}$ (n = 26)	$0.80 \pm 0.40^{b,c}$	45.4 (40.4 to 76.5) ^d	17.80 ± 2.10^b
7 d			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 16)	0.46 ± 0.17	30.4 (25.9 to 44.4) ^a	19.34 ± 2.05^a
$Pkd1^{+/-}$ (n = 16)	$0.50 \pm 0.15^{d,e}$	32.3 (29.3 to 45.9) ^d	18.81 ± 2.38^d
14 d			
$Pkd1^{+/+}$ (n = 8)	0.62 ± 0.25	36.1 (32.1 to 40.5) ^a	20.10 ± 1.30
$Pkd1^{+/-}$ (n = 8)	0.44 ± 0.17^e	38.7 (35.1 to 43.2) ^d	19.40 ± 2.10

S_{Cr} and body weight were compared using two-way ANOVA; BUN analysis was performed with the Friedmann test. PI, preischemic insult.

^a $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$ PI.

^b $P < 0.001$ versus $Pkd1^{+/-}$ PI.

^c $P < 0.005$ versus $Pkd1^{+/+}$.

^d $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/-}$ PI.

^e $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/-}$ 48 h.

(87.9 ± 10.9 versus 53.2 ± 2.9 mg/dl; $P < 0.05$), as well as to higher S_{Cr} (1.13 ± 0.07 versus 0.70 ± 0.03 mg/dl; $P < 0.0003$; Figure 2, A and B). The mice that were subjected to this time insult did not stay alive for the entire 14-d follow-up, but WT mice survived remarkably longer than HTs (10 versus 3 d; $P < 0.0001$; Figure 2C).

Tubular Function Analyses

HT mice presented a significant rise in fractional excretion of Na^+ (FE_{Na}) 48 h after the IR insult (0.56% [0.39 to 0.81%] to 2.10% [1.31 to 3.18%]; $P < 0.05$), an observation not detected in WT mice (Table 2; Supplemental Figure S1A). The 48-h value, in turn, was higher in $Pkd1^{+/-}$ than in $Pkd1^{+/+}$ mice (0.80% [0.66 to 1.00%]; $P < 0.05$). FE_{Na} remained above baseline levels in HTs at 7 d, whereas at 14 d it no longer differed from the preischemic value. An increase in fractional excretion of K^+ (FE_K) was also verified in $Pkd1^{+/-}$ mice 48 h after IR (35.0% [19.4 to 61.7%] to 70.0% [45.3 to 95.4%]; $P < 0.05$) but was not observed in $Pkd1^{+/+}$ mice (Table 2; Supplemental Figure S1B). The values detected in HTs, in turn, were higher than in WT mice both at 48 h (36.8% [29.1 to 47.0%] for WT; $P < 0.05$) and at 7 d (59.0% [37.3 to 95.9%] versus 41.0% [26.3 to 48.4%]; $P < 0.005$).

Histologic Analyses of Renal Injury

Histologic analyses performed in $Pkd1^{+/-}$ and $Pkd1^{+/+}$ kidneys revealed a more prominent residual cortical damage in HTs than in WT mice at 48 h, 7 d, and 14 d after IR. The Jablonski index was 3.60 ± 0.22 in $Pkd1^{+/-}$ versus 2.40 ± 0.40 in $Pkd1^{+/+}$ mice ($P < 0.05$) 48 h after IR; 3.12 ± 0.22 in HTs versus 1.00 ± 0.26 in WT mice ($P < 0.0001$) at 7 d; and 2.29 ± 0.56 versus 0.57 ± 0.29 ($P < 0.05$) at 14 d after the IR insult (Figure 3A). No significant injury signs or differences were detected between sham-operated (SO) WT mice (0.22 ± 0.16) and HTs (0.13 ± 0.14). Whereas in WT mice mild to moderate alterations

were observed 48 h after IR and minimal to mild changes were seen at 7 and 14 d, HTs presented with moderate to severe damage 48 h after IR, moderate injury at 7 d, and mild to moderate damage 14 d after the insult. At 48 h, when cortical damage was the most severe in both groups, HT kidneys showed vacuolization, dilation, and hyaline casts predominantly in proximal tubules (PTs) and, to a lesser extent, in collecting tubules, whereas WT mice had their kidneys with PT dilations and microvacuolization, less extensive tubular involvement, and only a few hyaline casts (Figure 3B). The degree of tubule dilation, in turn, was more pronounced in HTs than WT mice for similar time follow-ups.

PT and Endothelial Injury Analyses by Electron Microscopy

The immunoelectron microscopy analysis revealed more severe damage in HT than in WT mice at 48 h (Figure 4A). In WT mice, mild alterations were observed after IR, including microvacuolization of some PT epithelial cells. HT kidneys, conversely, showed significant PT cell damage with intraluminal accumulation of apical membrane fragments and hyaline casts. Additional HT injury features are reported in Figure 4A. The WT mice showed subtle changes in endothelium, represented by peritubular capillary loss of part of the endothelial fenestration. HTs, however, showed more prominent damage, with significant loss of endothelial fenestration and accumulation of flocculent material (Figure 4B).

Cell Proliferation Analyses

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) studies showed a higher cellular proliferation rate in $Pkd1^{+/-}$ than in $Pkd1^{+/+}$ mice 48 h and 7 d after IR, although the rates were markedly higher at 48 h (Figure 5). Cell proliferation was significantly reduced and no difference in baseline rates was detected between SO $Pkd1^{+/-}$ (0.15%) and $Pkd1^{+/+}$ mice (0.12%). Our

Figure 2. (A and B) Comparative analyses of S_{Cr} (A) and BUN (B) in $Pkd1^{+/+}$ ($n = 11$) and $Pkd1^{+/-}$ ($n = 8$) male mice before insult and 48 h after a 35 min of renal IR insult. $\Delta P < 0.0001$ versus PI; $\epsilon P < 0.0005$ versus PI; $\omega P < 0.0003$ versus $Pkd1^{+/+}$; $\#P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$. S_{Cr} and BUN were compared using the nonpaired t test with Welch correction, with the data presented as means $\pm$ SD. The high mortality observed in the $Pkd1^{+/-}$ mice group beyond 48 h did not allow longer time evaluations. (C) Cumulative survival curves and comparative analysis between $Pkd1^{+/+}$ and $Pkd1^{+/-}$ male mice after 35 min of IR ($P < 0.0001$). Comparison performed using the Kaplan-Meier survival curve.

analyses revealed indexes of PCNA-positive cells of 15.51% in HTs and 8.42% in WT mice ($P < 0.0001$) at 48 h of follow-up and 3.05 versus 1.25%, respectively, 7 d after IR ($P < 0.0001$). At 14 d, however, the PCNA staining was substantially reduced and not different between HTs and WT mice.

Apoptosis Analyses

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) analyses revealed a higher cell apoptotic rate in HT than in WT mice after IR at the three follow-up times, although the rates markedly declined with time (Figure 6). No positive staining was de-

Table 2. Time course of FE_{Na} , FE_{K} , U_{osm} , S_{Na} , and S_K in $Pkd1^{+/+}$ and $Pkd1^{+/-}$ male mice subjected to renal IR

Parameter	FE_{Na} (%) Median [Lower Quartile to Upper Quartile]	FE_{K} (%) Median [Lower Quartile to Upper Quartile]	U_{osm} (mOsm/kg H ₂ O; Median [Lower Quartile to Upper Quartile])	S_{Na} (mEq/L; Median [Lower Quartile to Upper Quartile])	S_K (mEq/L; Mean $\pm$ SD)
PI					
$Pkd1^{+/+}$ ($n = 26$)	0.90 (0.69 to 1.37)	36.2 (24.5 to 70.3)	2260 (1745 to 3350)	138 (136 to 140)	4.9 $\pm$ 0.8
$Pkd1^{+/-}$ ($n = 26$)	0.56 (0.39 to 0.81) ^a	35.0 (19.4 to 61.7)	2250 (1975 to 2760)	140 (137 to 144)	4.8 $\pm$ 1.0
48 h					
$Pkd1^{+/+}$ ($n = 26$)	0.80 (0.66 to 1.00)	36.8 (29.1 to 47.0)	2250 (1320 to 2774)	143 (139 to 151) ^b	5.6 $\pm$ 1.0 ^b
$Pkd1^{+/-}$ ($n = 26$)	2.10 (1.31 to 3.18) ^{c,d}	70.0 (45.3 to 95.4) ^{c,d}	1985 (1275 to 3370)	140 (136 to 143)	5.4 $\pm$ 1.2 ^c
7 d					
$Pkd1^{+/+}$ ($n = 16$)	0.99 (0.80 to 1.27)	41.0 (26.3 to 48.4)	1593 (1352 to 2032) ^b	140 (138 to 144)	4.6 $\pm$ 0.4 ^e
$Pkd1^{+/-}$ ($n = 16$)	1.50 (0.98 to 2.39) ^{a,c}	59.0 (37.3 to 95.9) ^a	1645 (1213 to 1877) ^c	141 (139 to 142)	4.9 $\pm$ 0.8
14 d					
$Pkd1^{+/+}$ ($n = 8$)	1.40 (0.88 to 2.30)	58.8 (32.7 to 79.2)	1862 (1599 to 2036)	141 (138 to 145)	5.5 $\pm$ 0.7 ^f
$Pkd1^{+/-}$ ($n = 8$)	1.20 (0.89 to 1.54)	36.0 (29.8 to 43.3) ^g	1978 (1683 to 2285)	140 (136 to 142)	5.8 $\pm$ 0.9 ^{c,h}

S_K was compared using two-way ANOVA; FE_{Na} , FE_{K} , U_{osm} , and S_{Na} were analyzed using the Friedman test.

^a $P < 0.005$ versus $Pkd1^{+/+}$.
^b $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$ PI.
^c $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/-}$ PI.
^d $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$.
^e $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$ 48 h.
^f $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$ 7 d.
^g $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$ 48 h.
^h $P < 0.05$ versus $Pkd1^{+/+}$ 7 d.

Figure 3. (A) Comparative analysis of renal residual cortical damage evaluated by the Jablonski index in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice 48 h, 7 d, and 14 d after renal IR (48 h *n* = 10 per group; 7 d *n* = 8 per group; 14 d *n* = 8 per group). [#]*P* < 0.05 versus *Pkd1*^{+/+}; ^{*}*P* < 0.0001 versus *Pkd1*^{+/+}. Nonpaired *t* test, with the data expressed as means ± SD. (B) Histologic representation of renal injury in *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, and g) and *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, and h) mice. (a and b) SO. (c and d) Forty-eight hours after IR. (e and f) Seven days. (g and h) Fourteen days. Magnification, ×400.

Figure 4. Immunoelectron microscopy analysis in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice 48 h after renal IR. (A) Representative images of PTs in *Pkd1*^{+/+} (a and b) and *Pkd1*^{+/-} (c and d) mice. WT controls show mild alterations whereas HTs show significant tubular cell damage with intraluminal hyaline casts (*) and shedding of lining cells with increased amounts of protein in the lumen of PTs. Some HT tubular cells showed rarefaction of the cytoplasm with intracellular vacuoles, swollen organelles, apoptosis, and loss of brush border (arrows), whereas others presented nuclear condensation, cytoplasmic swelling, and loss of nuclei in up to one third of the tubular profile. (B) Representative images of peritubular capillaries in *Pkd1*^{+/+} (a and b) and *Pkd1*^{+/-} (c and d) mice. HTs show a significantly more severe loss of peritubular capillary endothelial fenestration, as well as accumulation of flocculent material. Magnifications: ×10,000 in A and B (b); ×20,000 in B (a, c, and d).

tected in SO HTs and WT. The apoptotic rates were 62.02% in *Pkd1*^{+/-} and 42.31% in *Pkd1*^{+/+} mice at 48 h (*P* < 0.0005), 3.99% in HTs versus 0.67% in WT at 7 d (*P* < 0.01), and 1.37% in HTs versus 0.48% in WT at 14 d of follow-up (*P* < 0.005).

Figure 5. (A) Comparative analysis of kidney PCNA staining in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice after 48 h, 7 d, and 14 d of renal IR (48 h *n* = 10 per group; 7 d *n* = 8 per group; 14 d *n* = 8 per group). **P* < 0.0001 versus *Pkd1*^{+/+}. χ^2 proportion test, with the data presented as median (lower quartile to upper quartile). (B) Representative images of PCNA staining in *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, and g) and *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, and h) mice. (a and b) SO. (c and d) Forty-eight hours after IR. (e and f) Seven days. (g and h) Fourteen days. Magnification, $\times 400$.

The verified differences in TUNEL-positive cells reflect predominantly the epithelial compartment, although the quantification process also included interstitium.

p21 Expression Analyses

The p21 immunohistochemical experiments demonstrated a lower staining rate in cells of *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} kidneys 48 h after IR (Figure 7, A and B). The rate of nuclear p21-positive cells was 0.58% in HT and 3.18% in WT mice (*P* < 0.0005). A decreased p21 cytoplasmic expression was also detected in *Pkd1*^{+/-} kidneys compared with the *Pkd1*^{+/+} controls (0.12 versus 0.62%; *P* < 0.05). Although at much lower levels, the nuclear p21 staining at 7 d was still slightly higher in WTs (1.16%) than in HTs (0.86%; *P* < 0.05), whereas the cytoplasmic staining did not differ between them (0.35 versus 0.39%, respectively). The nuclear and cytoplasmic expression did not differ between *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} SO mice (0.04 and 0.09 versus 0.05 and 0.09%, respectively).

Real-time reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) evaluation of p21 mRNA expression revealed a pattern similar to that yielded by immunostaining. At 48 h of follow-up, p21 expression was 0.73 ± 0.29 arbitrary units (AU) in *Pkd1*^{+/-} kidneys and 2.30 ± 1.55 AU in *Pkd1*^{+/+} controls (*P* < 0.03; Figure 7C).

Macrophage Infiltration Analyses

Although negative and positive controls for the anti-Mac-2 antibody were adequate, our initial immunohistochemical analyses revealed that it cross-reacts with tubular epithelial cells in mouse kidneys, in addition to its specific staining for macrophages. Despite this observation, also reported by other investigators,²⁵ its staining pattern in renal interstitium was appropriately restricted to macrophages. Our results showed a more prominent infiltration in HTs and WTs at all follow-up times after the insult (Figure 8), whereas no difference was detected between *Pkd1*^{+/-} (0.33 ± 0.06 positive cells/field [PC/F]) and *Pkd1*^{+/+} (0.34 ± 0.04 PC/F) SO mice. HTs showed a more intense Mac-2 staining than WTs at 48 h (4.43 ± 0.81 versus 2.06 ± 0.32 PC/F; *P* < 0.01), at 7 d (5.07 ± 0.43 versus 2.61 ± 0.54 PC/F; *P* < 0.05), and at 14 d (1.80 ± 0.36 versus 0.71 ± 0.15 PC/F; *P* < 0.01).

Na-K-ATPase Distribution Analyses

Immunohistochemical analysis for Na-K-ATPase revealed no difference between SO WTs and HTs, showing a predominant basolateral and cytoplasmic staining in collecting and distal tubules, with significantly lower signal in PTs. At 48 h after IR, this pattern was preserved in WTs but with markedly decreased signal intensity (Supplemental Figure S2). HTs, conversely, kept the same signal profile in cytoplasm and basolateral membrane, with slightly increased signal in medullary collecting ducts, and a few tubules showing specific staining in the luminal membrane. At day 7, the membrane distribution pattern remained the same in WTs, with the signal intensity increasing to a level close to the SO mice, whereas HTs returned to the baseline profile.

follow-up, *Col1a1* and *Col1a2* expressions were, respectively, 2.75 ± 0.86 and 4.11 ± 2.21 AU in *Pkd1*^{+/-} kidneys and 0.92 ± 0.27 and 0.94 ± 0.27 AU in *Pkd1*^{+/+} kidneys ($P < 0.02$ and $P < 0.0002$, respectively; Figure 9C).

TD and MC/Cyst Formation Analyses

Serial sections of the seven *Pkd1*^{+/-} and seven *Pkd1*^{+/+} left kidneys removed 6 wk after the IR insult revealed significant TD and MC formation in HTs from cortex to inner medulla but not in WT (Figure 10). No differences in TD and MC/cyst formation were observed between *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} SO mice (TDI 6.0 [3.0 to 7.0] dilated tubules [DT] in *Pkd1*^{+/-} and 1.0 [0.0 to 1.0] DT in *Pkd1*^{+/+} [NS]; TDII 3.0 [0.0 to 4.0] and 0.0 [0.0 to 0.0] DT, respectively [NS]; MC 0.0 [0.0 to 0.0] in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+}; and cysts 0.0 [0.0 to 0.0] in both groups). HTs showed increased TDII and MC formation 6 wk after IR (TDI 4.5 [1.0 to 7.0] DT [NS] versus SO; TDII 6.5 [5.0 to 8.0] DT [$P < 0.05$] versus SO; MC 3.5 [2.0 to 5.0; $P < 0.02$] versus SO; and cysts 0.0 [0.0 to 0.0; NS] versus SO). Two *Pkd1*^{+/-} mouse kidneys showed two cysts each. WT, conversely, showed no increase in these parameters at 6 wk (TDI 1.5 [1.0 to 2.0] DT; TDII 1.5 [0.0 to 2.0] DT; MC 0.0 [0.0 to 0.0]; and cysts 0.0 [0.0 to 0.0]). The TDII and MC formation indexes, in turn, were significantly higher in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} mice ($P < 0.02$ and $P < 0.02$, respectively).

DISCUSSION

Although abnormalities have been reported in *Pkd1*- and *Pkd2*-haploinsufficient models,^{26,27} the understanding and effects of this condition are still limited. On the basis of the biologic properties of PC1, we reasoned that this condition might lead to increased susceptibility to IR. IR injury is a major cause of AKI, involving tubular cell death, endothelial dysfunction, and inflammation.²⁸ It is interesting that quiescent kidney cells enter the cell cycle after postischemic AKI, being followed by the induction of cell-cycle inhibitors, particularly p21.²⁹ The increased expression of this protein seems to be involved in the adequate coordination of cell cycle, required for maximization of renal epithelial cell recovery from injury and reduction of the damage extension.³⁰

We analyzed the relationship between *Pkd1* haploinsufficiency and the risk for renal IR using an inbred 129Sv mouse line with a *Pkd1* null mutation.³¹ Because the HT mice virtually do not develop renal cysts by 12 wk of age, they constitute an appropriate model of *Pkd1* haploinsufficiency. The higher S_{Cr}

Figure 6. (A) Comparative analysis of TUNEL staining in kidneys of *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice at 48 h, 7 d, and 14 d of follow-up after renal IR (48 h $n = 10$ per group; 7 d $n = 8$ per group; 14 d $n = 8$ per group). € $P < 0.0005$ versus *Pkd1*^{+/+}; ** $P < 0.01$ versus *Pkd1*^{+/+}; $\theta P < 0.005$ versus *Pkd1*^{+/+}. χ^2 proportion test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile). (B) Representative images of TUNEL staining in *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g, i, k, m, and o) and *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h, j, l, n, and p) mice. (a, b, c, and d) SO. (e, f, g, and h) Forty-eight hours after IR. (i, j, k, and l) Seven days. (m, n, o, and p) Fourteen days. Magnifications: ×400 in a, b, e, f, i, j, m, and n; ×1000 in c, d, g, h, k, l, o, and p.

Interstitial Expansion/Fibrosis Analyses

Seven *Pkd1*^{+/-} and seven *Pkd1*^{+/+} male mice were subjected to 32 min of IR and had their kidneys removed 6 wk after the insult. The analysis of right kidney sections revealed increased interstitial expansion 6 wk after IR in both groups, but this effect was more intense in HTs than in WT (Figure 9, A and B). The relative interstitial area did not differ between *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} SO mice (7.26 [6.52 to 8.46] versus 6.80% [5.91 to 8.57], respectively), whereas at 6 wk after the insult, HTs showed a significantly higher relative interstitial area than WT (22.69 [20.28 to 26.16] versus 17.99% [13.60 to 19.90]; $P < 0.01$).

Analysis of $\alpha 1$ chain of type I collagen (*Col1a1*) and $\alpha 2$ chain of type I collagen (*Col1a2*) mRNA expression performed by real-time RT-PCR showed profiles that follow the pattern yielded by the interstitial expansion evaluation. At 6 wk of

Figure 7. (A) Comparative analysis of p21 staining in kidneys of *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice after 48 h and 7 d of renal IR (48 h *n* = 10 per group; 7 d *n* = 8 per group). $^{\circ}P < 0.0005$ versus *Pkd1*^{+/+}; $^{\#}P < 0.05$ versus *Pkd1*^{+/+}. χ^2 proportion test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile). (B) Representative images of p21 staining in *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, g, i, and k) and *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, h, j, and l) mice. (a, b, c, and d) SO. (e, f, g, and h) Forty-eight hours after IR. (i, j, k, and l) Seven days. (m) Negative control in kidney. (n) Positive control in breast cancer. (C) Comparative analysis of p21 mRNA levels in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} kidneys of male mice 48 h after renal IR (*n* = 8 per group), performed by real-time RT-PCR. $^{\circ}P < 0.03$ versus *Pkd1*^{+/+}, *t* test with Welch correction. Magnifications: $\times 400$ in B (a, b, e, f, i, j, m, and n); $\times 1000$ in B (c, d, g, h, k, and l).

increase in *Pkd1*^{+/-} than in *Pkd1*^{+/+} mice 48 h after the induction of IR indicates a more pronounced GFR reduction in HTs than in WT mice and suggest that the *Pkd1*-haploinsufficient state increases the degree of IR lesion. BUN did not differ between the two groups for the 32-min IR, but when this time was raised to 35 min, both BUN and *S*_{Cr} were significantly higher in HTs than in WT mice at 48 h. It must be noted, in addition, that although the 35-min-related injury was followed by death of all mice, WT mice survived significantly longer than HT mice, also supporting increased susceptibility to IR injury in *Pkd1*^{+/-} mice. The increase in *FE*_{Na} and *FE*_K in the HT mice 48 h and 7 d after IR, not verified in the WT mice, indicates a higher level of tubular injury in the *Pkd1*-haploinsufficient mice. The obser-

vation that *Pkd1*^{+/-} kidneys show Na-K-ATPase expression in the luminal membrane in some tubules, in turn, suggests that its mispolarization may play a role in these functional findings.

A more severe residual cortical damage in HTs than in WT mice was shown at the three evaluated time points after renal IR. Whereas significant lesions were detected at 48 h in proximal and collecting tubules in *Pkd1*^{+/-} kidneys, only low-degree abnormal findings were found in *Pkd1*^{+/+} PTs. The involvement of collecting tubules in the IR injury of *Pkd1*-haploinsufficient mice is not surprising, because PC1 has been shown to be particularly expressed in the distal nephron and collecting tubules.^{32,33} *Pkd1* haploinsufficiency, therefore, magnifies the morphologic injury determined by IR up to 14 d after the insult. This conclusion is also supported by the immunoelectron microscopy analysis, which revealed more severe proximal tubular and endothelial injuries in HTs.

A higher cellular proliferation rate was found 48 h and 7 d after renal IR in *Pkd1*^{+/-} than in *Pkd1*^{+/+} mouse kidneys. The lack of difference observed at 14 d was an expected finding, because at this point, a marked reduction in cell proliferation is described in kidneys submitted to IR.³⁴ *Pkd1* haploinsufficiency, therefore, seems to hamper the appropriate cell-cycle coordination required after IR. The higher rate of apoptosis revealed by TUNEL assays in *Pkd1*^{+/-} compared with *Pkd1*^{+/+} mice, in turn, suggests that the increased post-IR apoptosis associated with *Pkd1* haploinsufficiency may contribute to the higher degree of tubular injury.¹⁶ The significant decline in apoptotic rate observed by 7 d, conversely, is consistent with its marked fall observed after the first days after IR.³⁵

The initial increase of p21 expression at 48 h after IR and its significant decline at 7 d in WT mice are consistent with another mouse model of renal IR injury,³⁶ revealing a normal p21 up-regulation shortly after this insult, followed by a return to pre-injury levels within the next days. This course in WT kidneys, associated with nonincreased p21 expression at 48 h in HTs, indicates that *Pkd1*-haploinsufficient mice are unable to up-regulate p21 early after the IR insult. This failure to increase p21 expression, moreover, is associated with evidence of disturbed cell-cycle coordination, as outlined by inappropriately elevated cell proliferation and apoptosis. A proper cell-cycle

Figure 8. (A) Comparative analysis of kidney Mac-2 staining in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice after 48 h, 7 d, and 14 d of renal IR (48 h *n* = 10 per group; 7 d *n* = 8 per group; 14 d *n* = 8 per group). ***P* < 0.01 versus *Pkd1*^{+/+}; #*P* < 0.05 versus *Pkd1*^{+/+}. Nonpaired *t* test, with the data expressed as means ± SD. (B) Representative images of Mac-2 staining in *Pkd1*^{+/+} (a, c, e, and g) and *Pkd1*^{+/-} (b, d, f, and h) mice. (a and b) SO. (c and d) Forty-eight hours after IR. (e and f) Seven days. (g and h) Fourteen days. Magnification, ×400.

regulation after AKI has been shown, in fact, to be a key determinant of an adequate tissue recovery response.²⁹ In this setting, it is expected that p21 upregulation exerts a renal protective effect against IR by adequately regulating cell cycle after injury.²⁹ The defective tubular response and increased susceptibility to ischemia in *Pkd1*-haploinsufficient mice, therefore, seem to be determined by this lack of upregulation.

Our findings are consistent and supported by previous results that show increased p21 transcriptional levels in murine kidneys after IR, as well as increased renal function impairment, mortality, and cell-cycle activity after renal IR in *p21*^{-/-} mice compared with their *p21*^{+/+} counterparts.³⁴ Additional data suggest that the post-IR p21 upregulation is p53 independent.³⁶ The higher susceptibility to IR injury observed in the *p21*^{-/-} animals, therefore, seems to result from inappropriately regulated cell-cycle activity in kidney cells. Interestingly, this group has also shown that cell-cycle inhibitors protected renal cells from cisplatin-induced apoptosis.³⁷ In addition, in support of our findings, other recent studies showed that mouse renal epithelial *Pkd1*^{-/-} cells express p21 at lower levels than *Pkd1*^{+/+} cells³⁸ and demonstrated a diminishment of p21 expression in human ADPKD cystic kidneys as compared with normal ones.³⁹ We propose, therefore, that the lack of p21 upregulation after IR in *Pkd1*^{+/-} mice is responsible, at least partially, for the increased initial injury and the latter changes in recovery observed in these animals.

Altered renal hemodynamics, defective vascular response, or dysregulated planar cell polarity, however, may also contribute to the higher degree of IR injury and associated findings seen in *Pkd1*^{+/-} mice. Given that cell-cycle inhibitors can rescue neural tube abnormalities in zebrafish lacking Vangl2, a molecule involved in planar cell polarity signaling,⁴⁰ a potential link between *Pkd1* haploinsufficiency and IR-related defects in planar cell polarity might result from p21 relative deficiency. A defective tubular response to injury in HTs might also result from disruption of PC1 likely roles in cell–cell and/or cell–matrix interactions and inappropriate adjustment to cellular stress, because PC1 is a regulator of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release. Last, that IR results in early shortening and later lengthening of cilia after the insult in mice⁴¹ suggests that renal cilia may act in the repair process.

Our data support that *Pkd1* haploinsufficiency also affects the post-IR renal inflammatory component, amplifying such response. They also suggest that this is a slightly later event than the other IR responses associated with *Pkd1* haploinsufficiency. Reduced levels of p21 might be also responsible for such amplification, because *p21* gene transfer has been shown to downregulate the expression of several inflammatory mediators.⁴² On the basis of these observations and that renal disease progression seems to be affected by fibrosis in ADPKD,⁴³ we analyzed a follow-up time of 6 wk after IR. In this setting, we showed more extensive interstitial expansion and higher *Col1a1* and *Col1a2* expression in *Pkd1*^{+/-} than *Pkd1*^{+/+} mice, findings consistent with a higher level of kidney fibrosis in HTs. These results suggest that IR insults may favor disease

Figure 9. (A) Comparative analysis of relative area of interstitial expansion in $Pkd1^{+/+}$ ($n = 7$) and $Pkd1^{+/-}$ ($n = 7$) male mice 6 wk after renal IR. $^{\Omega}P < 0.005$ versus SO; $^{**}P < 0.01$ versus $Pkd1^{+/+}$. Nonpaired Mann-Whitney test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile). (B) Histologic representation in $Pkd1^{+/+}$ (a, c, and e) and $Pkd1^{+/-}$ (b, d, and f) mice. (a and b) SO. (c, d, e, and f) Six weeks after IR. (C) Comparative analysis of Col1a1 and Col1a2 mRNA levels in $Pkd1^{+/+}$ and $Pkd1^{+/-}$ kidneys of male mice 6 wk after renal IR ($n = 6$ per group),

Figure 10. (A) Comparative analysis of TD, MC formation index, and cyst formation index in $Pkd1^{+/+}$ ($n = 7$) and $Pkd1^{+/-}$ ($n = 7$) male mice 6 wk after renal IR. $^{\Omega}P < 0.02$ versus SO; $^{\Theta}P < 0.05$ versus SO; $^{\ddagger}P < 0.02$ versus $Pkd1^{+/+}$. Nonpaired Mann-Whitney test, with the values expressed as median (lower quartile to upper quartile). (B) Histologic representation in $Pkd1^{+/+}$ (a, c, and e) and $Pkd1^{+/-}$ (b, d, and f) mice. (a and b) SO. (c, d, e, and f) Six weeks after IR. Magnification, $\times 400$ in a, b, c, and d; $\times 200$ in e and f.

acceleration in $Pkd1$ -haploinsufficient kidneys by inducing renal fibrosis.

HT kidneys showed significant TD and development of MCs 6 wk after IR, a finding not detected in their WT counterparts. Bigger cysts were only occasionally observed in HTs after IR but never in WTs. One study showed that inactivation of $Pkd1$ in mice after postnatal day 13 determines remarkably milder cystic formation than earlier inactivation.²⁰ Additional data show that kidney-specific $Pkd1$ inactivation leads to

performed by real-time RT-PCR. $^{\ddagger}P < 0.02$ versus $Pkd1^{+/+}$; $^{\forall}P < 0.0002$ versus $Pkd1^{+/+}$, t test with Welch correction. Magnification, $\times 400$ in B.

slowly progressive cystic disease in adult mice, suggesting that *Pkd1* deficiency does not initiate enough cell proliferation for cyst formation and that additional stimuli are probably required for cystogenesis.⁴⁴ Takakura *et al.*⁴⁵ confirmed these findings and showed that renal injury constitutes a “third hit” in *Pkd1* IKO mice, leading to rapid cyst formation in adulthood.⁴⁶ Our findings support and are supported by those previous data and extend this principle, placing IR as a likely additional hit in a *Pkd1*^{+/-} model. It must be noted, however, that although one could expect that the MCs formed in our model after IR would arise from cells with germline and somatic mutations in the *Pkd1* alleles, this remains to be demonstrated. Patel *et al.*⁴⁷ recently showed that ischemic kidney injury induced cyst formation in adult *Kif3a* mutant mice. Although these investigators claimed that cilia abnormalities play a key role in this process, it is interesting to note that our *Pkd1*-haploinsufficiency model seems not to be associated with ciliary defects. A critical point must be raised, however. In this work, HTs and WT mice developed distinct levels of renal injury, whereas in the study by Patel *et al.*, the degree of injury was not documented. On the basis of our findings, one could consider that their mutants might be also more susceptible to renal IR. If this were the case, then in our and their situations, it would be expected that the cystic phenotypes result from PC1-related dysfunctions in tubular luminal regulation, but one could not completely exclude the possibility that the phenotypes are associated with a higher degree of post-IR tubular injury.

Our data suggest that *Pkd1*-null heterozygotes—mice and possibly humans—are associated with a higher risk for renal IR injury, a process that seems to depend on a relative deficiency of p21 activity, and with IR-induced TD and MC formation. These findings place PC1 as a likely renal protective molecule and may lead to preventive procedures against possible kidney injury in patients with ADPKD and to the development of protective agents to be used in such patients in at-risk situations. Our results also show that IR leads to increased renal fibrosis in *Pkd1* haploinsufficiency and support the concept that renal IR may function as an additional hit for cystogenesis, suggesting that it may contribute to acceleration of kidney disease in ADPKD.

CONCISE METHODS

Animal Model

The generation of our 129Sv mouse line with a *Pkd1* null allele was based on a construct that had part of exon 2 and the entire exon 3 replaced with a reporter gene (*lacZ*) cloned in frame to the remainder of exon 2 and followed by the neomycin resistance gene (*neor*).³¹ The *lacZ*-*neor* 5' segment includes transcriptional termination sequences that prevent expression of 3' *Pkd1* exons. The mice were genotyped using a three-primer PCR strategy.³¹ This study was directed to HT mice for the *Pkd1*-null mutation with 10 to 12 wk of life, because, at this age, they present virtually no renal cysts, representing a pure *Pkd1*-

haploinsufficiency model. WT littermates were used as controls. The research was conducted in accordance with international standards of animal care and experimentation.

IR Model

All experiments were carried out in male mice to avoid potential gender-related experimental heterogeneity. Mice were weighed and subjected thereafter to the IR protocol. After anesthesia with sodium pentobarbital (65 μ g/g body wt) injected intraperitoneally, an incision was made in the central abdomen, the two renal pedicles were exposed, and microvascular clamps were applied to them. After 32 min of renal ischemia, clamps were removed, blood flow returned to the kidneys, and the incision was closed. During the procedure, mice were appropriately hydrated, and their body temperature was kept at approximately 37°C using an adjustable heating pad. When reperfusion was incomplete after clamp release, the experiment was terminated and the mouse was killed. The mice received 400- μ l aliquots of saline solution after the procedure, infused intraperitoneally. The mice were returned to their cages after surgery and allowed free access to food and water. Additional groups of SO HT ($n = 8$) and WT ($n = 8$) mice were also included as negative controls for the immunohistochemical analyses. Two additional HT ($n = 8$) and WT ($n = 11$) mouse groups were subjected to the same protocol, except for an IR insult of 35 min.

Biochemical Determinations

One day before each biochemical determination, the mice were housed in metabolic cages without food or water. Blood samples were drawn by retro-orbital bleeding before IR and 48 h, 7 d, and 14 d after ischemic insult. Blood samples were allowed to clot and were centrifuged to obtain serum. BUN was measured according to Crocker's protocol (Celm, Barueri, Brazil), whereas S_{Cr} and urine creatinine (U_{Cr}) values were determined using a colorimetric assay (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). Mice with baseline $S_{Cr} > 0.6$ mg/dl and BUN > 25 mg/dl were excluded from the study. FE_{Na} was calculated using the equation $FE_{Na} = (U_{Na} \times S_{Cr}) / (S_{Na} \times U_{Cr}) \times 100$, where U_{Na} is urine Na^+ . FE_K was obtained using a similar approach. U_{osm} was measured using a Vapro 5500 vapor osmometer (Wescor, Logan, UT).

Morphologic Assessment

Kidneys were harvested from SO mice and 48 h, 7 d, and 14 d after the insult. The mice were anesthetized with intraperitoneal sodium pentobarbital (80 μ g/g body wt) and subjected to thoracotomy, a catheter insertion in the left ventricle, and a right atrial cut to drain the blood. They were then perfused with saline solution at a 100-mmHg pressure until complete exsanguination. Immediate perfusion with Millonig formalin, modified by Carlson, followed this step. Kidneys were fixed *in situ* with 4% buffered paraformaldehyde, paraffin embedded, sectioned at 4 μ m, and stained using hematoxylin and eosin (H&E). All morphologic analyses were performed blindly by

an experienced renal pathologist. This analysis included the evaluation of the degree of renal tubular necrosis after IR using a grading scale proposed by Jablonski *et al.*⁴⁸

The Jablonski index comprises the potential presence of brush border loss, tubular cast formation, TD, thickened basement membrane, inflammation, number of apoptotic cells, number of mitotic cells, signs of tubular regeneration, PT damage, and distal nephron damage. This analysis allows grading of the extent of the cortical necrosis from 0 to 4, where 0 reflects no necrosis; 1 includes mitoses and necrosis of individual cells; 2 means necrosis of all cells in adjacent proximal convoluted tubules, with survival of surrounding tubules; 3 comprises necrosis confined to the distal third of the proximal convoluted tubule with a band of necrosis extending across the inner cortex; and 4 reflects necrosis affecting all three segments of the proximal convoluted tubule. These analyses were performed in renal cortex, including two sections per mouse and 10 fields per section, totaling 20 fields per mouse, in groups of at least eight mice.

Electron Microscopy

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde, transferred to 2% aqueous glutaraldehyde for 2 h, stained with 2% aqueous osmium tetroxide, dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in L.R. white resin (London Resin Company, Ltd., Berkshire, England). Ultrathin sections were cut, placed on nickel grids, and counterstained with aqueous 4% uranyl acetate and Reynolds lead citrate. The specimens were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope.

Immunohistochemistry

A monoclonal IgG2 antibody (Ab) to PCNA (Dako, Carpinteria, CA), a monoclonal IgG2b Ab to p21 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a monoclonal IgG2a Ab to Mac-2 (Cedarlane, Ontario, Canada), and a monoclonal IgG1 Ab to the α 1-subunit of Na-K-ATPase (Affinity BioReagents, Golden, CO) were used. Control sections for p21, PCNA, and Mac-2 analyses, incubated with PBS instead of primary Abs, showed negative or negligible staining in PTs. In the p21 and PCNA analyses, the evaluation of each mouse included eight fields representing renal cortex and two in renal medulla. In the Mac-2 study, the evaluation of each mouse included analysis of renal interstitium in 10 fields located in the cortex.

Staining for apoptosis was obtained using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Positive controls were pretreated with 1 U/ml DNase, whereas negative controls were incubated without terminal deoxynucleotidyl transferase. Nuclei were counterstained with 3,3-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The analysis of each section included 10 distinct fields. The quantifications of p21-, PCNA-, and TUNEL-positive nuclei, as well as Mac-2-positive cells, were performed under light microscopy at $\times 400$ magnification. The corresponding results for p21, PCNA, and TUNEL are expressed as PC/total cells ratios and for Mac-2 as PC/F given the significantly lower cell count.

Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from entire kidneys of eight WT and eight HT mice at 48 h and of six WT and six HT mice 6 wk after renal IR using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Quantitative real-time RT-PCR was performed using the SYBER green real-time PCR mixture (Applied Biosystems, Warrington, UK), and cDNA was amplified using *p21*^{Waf1/Cip1}-specific primers (forward 5'-GTGATTGCGATGCGCTCATG-3', reverse 5'-TCTCTTGCAGAAGACCAATC-3') for the 48-h samples and mouse β -actin primers as positive control. The same procedure was applied to the 6-wk samples, using *Colla1*- and *Colla2*-specific primers (forward 5'-CAGACGTGCTTCTTTTCCTTGG-3', reverse 5'-TGACTGGAAGAGCGGAGAGTACT-3'; and forward 5'-CACCCCAGGAAGACTCATA-3', reverse 5'-GCCACCATTGATAGTCTCTCTAAC-3', respectively). Negative controls consisted of omitting the reverse transcriptase and substituting it with nuclease-free distilled water. The solution was initially incubated at 50°C for 2 min, followed by 10 min of incubation at 95°C to activate the polymerase. For the *p21*-based amplifications, 40 cycles were performed with steps of 95°C for 30 s and 60°C for 60 s; the *Colla1*- and *Colla2*-related amplifications were run with 35 cycles using a hot start and 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 60 s. cDNA standards were used to determine relative quantities and compare dissociation temperatures partially to ensure correct product formation. Amplified signals were confirmed to be associated with single bands by gel electrophoresis. Results are expressed as AUs normalized to the corresponding β -actin signal.

Interstitial Expansion Index

Three-micrometer paraffin-embedded kidney sections from specimens collected 6 wk after IR were mounted on slides and submitted to Masson's trichrome and H&E staining. The fractional interstitial area of the renal cortex was determined by morphometry with a video camera connected to an image analyzer (QWin; Leica, Wetzlar, Germany). Ten cortical grid fields (each with 37,000 μm^2 in area) of each right kidney were evaluated in a blinded manner. The interstitial areas were manually encircled on a video screen, and the percentage value was determined by computerized morphometry.

TD/Cystic Index

Kidney sections from organs collected 6 wk after IR were mounted on slides and stained with H&E. Ten cortical and medullary grid fields (each with 37,000 μm^2 in area) of each left kidney were evaluated. The TD/cyst quantification was performed using a screen with dots distant one from another by 13.625 μm . The measures were obtained by counting the number of dots located in the tubular lumen. The degree of TD was defined by the number of dots in the lumen, following previously suggested criteria⁴⁹: (1) TDI, dilation $> 13.625 \mu\text{m}$ but including only one dot; (2) TDII, two dots; (3) MC, three to nine dots; and (4) cyst, ≥ 10 dots.

Statistical Analysis

The data were preanalyzed by the K-S test. When parametric, they were compared using two-way ANOVA, with the lower standard difference posttest. When nonparametric, the Friedman test was used for longitudinal analyses, with the Student-Newman-Keuls posttest, whereas transversal analyses were performed using the Kruskal-Wallis test, with the Student-Newman-Keuls posttest. Because the tables were built on the basis of transversal analyses, the data were presented according to the test used in the corresponding analysis. The residual cortex damage analysis (Jablonski index) and the Mac-2 analysis were carried out using the nonpaired *t* test. The *p21*, *Colla1*, and *Colla2* real-time RT-PCR evaluation and the 35-min-IR BUN and *S_{Cr}* analyses, in turn, were performed with nonpaired *t* test with Welch correction. The 35-min survival comparison was analyzed using the Kaplan-Meier survival curve. The PCNA, TUNEL, and p21 immunostaining analyses were carried out using the χ^2 proportion test. The interstitial expansion index and the TD/cystic index analyses were performed with the nonpaired Mann-Whitney test. The tests were applied using Prism 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) and Sigma-Stat (SPSS, Chicago, IL). We accepted an α error $\leq 5\%$ to reject the null hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grants 2006/52037-1 to L.F.O. and 2006/52038-2 to A.P.B. and L.F.O.) and by Laboratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. G.G.G. is the Irving Blum Scholar of the Johns Hopkins University School of Medicine.

We thank Thales de Brito, MD, PhD, for technical suggestions, Isac de Castro, PhD, for valuable help in the statistical analyses, Denise Malheiros, MD, for help in electron microscopy analyses, Rildo Volpini, PhD, for technical help, and Elia Caldini, PhD, for technical suggestions. We also thank Mirian Boim, PhD, and Carine Arnoni for helpful assistance with real-time RT-PCR.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Torres VE, Harris PC, Pirson Y: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 369: 1287–1301, 2007
- 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
- Yoder BK: Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 5: 1381–1388, 2007
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu

- W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J: Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33: 129–137, 2003
- Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG: Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408: 990–994, 2000
- Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S: Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 4: 191–197, 2002
- Low SH, Vasanth S, Larson CH, Mukherjee S, Sharma N, Kinter MT, Kane ME, Obara T, Weimbs T: Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell* 10: 57–69, 2006
- Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnya O, Ong AC: Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 14: 1804–1815, 2003
- Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R: The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4017–4022, 2000
- Delmas P, Nomura H, Li X, Lakkis M, Luo Y, Segal Y, Fernandez-Fernandez JM, Harris P, Frischauf AM, Brown DA, Zhou J: Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem* 277: 11276–11283, 2002
- Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino JF, 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
- Boca M, D'Amato L, Distefano G, Polishchuk RS, Germino GG, Boletta A: Polycystin-1 induces cell migration by regulating PI3kinase-dependent cytoskeletal rearrangements and GSK3(beta)-dependent cell-cell mechanical adhesion. *Mol Biol Cell* 18: 4050–4061, 2007
- 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
- Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG: Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16981–16986, 2002
- Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang T, Hiesberger T, Igarashi P, Bennett AM, Ibraghimov-Beskrovnya 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
- Bellomo R: The epidemiology of acute renal failure: 1975 versus 2005. *Curr Opin Crit Care* 12: 557–560, 2006
- Lien YH, Lai LW, Silva AL: Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: Lessons from knockout mice. *Life Sci* 74: 543–552, 2003
- Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, Calvet JP: Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J Biol Chem* 279: 40419–40430, 2004
- Bukanov NO, Smith LA, Klinger KW, Ledbetter SR, Ibraghimov-Beskrovnya O: Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* 444: 949–952, 2006
- 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
- 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
- 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
23. Zhao Y, Haylor JL, Ong AC: Polycystin-2 expression is increased following experimental ischaemic renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 17: 2138–2144, 2002
 24. Obermüller N, Cai Y, Kränzl B, Thomson RB, Gretz N, Kriz W, Somlo S, Witzgall R: Altered expression pattern of polycystin-2 in acute and chronic renal tubular diseases. *J Am Soc Nephrol* 13: 1855–1864, 2002
 25. Inoue T, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson E: Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. *Kidney Int* 67: 2488–2493, 2005
 26. Qian Q, Hunter LW, Du H, Ren Q, Han Y, Sieck GC: Pkd2+/- vascular smooth muscles develop exaggerated vasocontraction in response to phenylephrine stimulation. *J Am Soc Nephrol* 18: 485–493, 2007
 27. Ahrabi AK, Terry S, Valenti G, Caron N, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Nielsen S, Horie S, Verbavatz JM, Devuyst O: PKD1 haploinsufficiency causes a syndrome of inappropriate antidiuresis in mice. *J Am Soc Nephrol* 18: 1740–1753, 2007
 28. Bonventre JV, Weinberg JM: Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14: 2199–2210, 2003
 29. Megyesi J, Andrade L, Vieira JM Jr, Safirstein RL, Price PM: Coordination of the cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F810–F816, 2002
 30. Price PM, Megyesi J, Safirstein RL: Cell cycle regulation: Repair and regeneration in acute renal failure. *Kidney Int* 66: 509–514, 2004
 31. 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
 32. Xu GM, Sikaneta T, Sullivan BM, Zhang Q, Andreucci M, Stehle T, Drummond I, Annaout MA: Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J Biol Chem* 276: 46544–46552, 2001
 33. Ong AC, Harris PC, Davies DR, Pritchard L, Rossetti S, Biddolph S, Vaux DJ, Migone N, Ward CJ: Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int* 56: 1324–1333, 1999
 34. Megyesi J, Andrade L, Vieira JM Jr, Safirstein RL, Price PM: Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 60: 2164–2172, 2001
 35. Kishino M, Yukawa K, Hoshino K, Kimura A, Shirasawa N, Otani H, Tanaka T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Maeda M, Ichinose M, Takeda K, Akira S, Mune M: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 15: 1826–1834, 2004
 36. Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, Price PM: p53-Independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SD11 after acute renal failure. *Am J Physiol* 271: F1211–F1216, 1996
 37. Price PM, Yu F, Kaldis P, Aleem E, Nowak G, Safirstein RL, Megyesi J: Dependence of cisplatin-induced cell death *in vitro* and *in vivo* on cyclin-dependent kinase 2. *J Am Soc Nephrol* 17: 2434–2442, 2006
 38. Nishio S, Hatano M, Nagata M, Horie S, Koike T, Tokuhisa T, Mochizuki T: Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 115: 910–918, 2005
 39. Park JY, Schutzer WE, Lindsley JN, Bagby SP, Oyama TT, Anderson S, Weiss RH: p21 is decreased in polycystic kidney disease and leads to increased epithelial cell cycle progression: Roscovitine augments p21 levels. *BMC Nephrol* 8: 12, 2007
 40. Ciruna B, Jenny A, Lee D, Mlodzik M, Schier AF: Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. *Nature* 439: 220–224, 2006
 41. Verghese E, Weidenfeld R, Bertram JF, Ricardo SD, Deane JA: Renal cilia display length alterations following tubular injury and are present early in epithelial repair. *Nephrol Dial Transplant* 23: 834–841, 2008
 42. Nonomura Y, Kohsaka H, Nagasaka K, Miyasaka N: Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in the treatment of arthritis. *J Immunol* 171: 4913–4919, 2003
 43. Zheng D, Wolfe M, Cowley BD Jr., 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
 44. 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
 45. 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
 46. 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
 47. Patel V, Li L, Cobo-Stark P, Shao X, Somlo S, Lin F, Igarashi P: Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum Mol Genet* 17: 1578–1590, 2008
 48. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J: An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 35: 198–204, 1983
 49. Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, Harris PC, Perez-Atayde AR, Rennke HG, Zhou J: Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet* 21: 160–161, 1999

Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(9):2384-98.
2. Nunes AC, Milani V, Porsch DB, Rossato LB, Mattos CB, Roisenberg I, Barros EJ. Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. *Ren Fail* 2008;30(2):169-73.
3. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 2009;60:321-37.
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* 1992;41(5):1311-9.
5. Reed BY, McFann K, Bekheirnia MR, Nobakhthaghighi N, Masoumi A, Johnson AM, Shamshirsaz AA, Kelleher CL, Schrier RW. Variation in age at ESRD in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2008;51(2):173-83.
6. Ecdar T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2009;5(4):221-8.
7. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993;329(5):332-42.
8. Bae KT, Zhu F, Chapman AB, Torres VE, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, Baumgarten DA, King BF Jr, Wetzel LH, Kenney PJ, Brummer ME, Bennett WM, Klahr S, Meyers CM, Zhang X, Thompson PA, Miller JP. Magnetic resonance imaging evaluation of hepatic cysts in early autosomal-dominant polycystic kidney disease: the Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease cohort. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1(1):64-9.
9. Qian Q, Li A, King BF, Kamath PS, Lager DJ, Huston J 3rd, Shub C, Davila S, Somlo S, Torres VE. Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology* 2003;37(1):164-71.

10. Pirson Y, Chauveau D, Torres V. Management of cerebral aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(1):269-76.
11. Rinkel GJ. Natural history, epidemiology and screening of unruptured intracranial aneurysms. *Rev Neurol (Paris)* 2008;164(10):781-6.
12. Lumiaho A, Ikaheimo R, Miettinen R, Niemitukia L, Laitinen T, Rantala A, Lampainen E, Laakso M, Hartikainen J. Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1. *Am J Kidney Dis* 2001;38(6):1208-16.
13. Qian Q, Hartman RP, King BF, Torres VE. Increased occurrence of pericardial effusion in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2(6):1223-7.
14. Scheffers MS, van der Bent P, Prins F, Spruit L, Breuning MH, Litvinov SV, de Heer E, Peters DJ. Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum Mol Genet* 2000;9(18):2743-50.
15. Moy GW, Mendoza LM, Schulz JR, Swanson WJ, Glabe CG, Vacquier VD. The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J Cell Biol* 1996;133(4):809-17.
16. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García-González MA, Menezes LF, Xu H, Germino GG, Zuo J, Qian F. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(47):18688-93.
17. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):16981-6.
18. Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang 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* 2004;114(10):1433-43.
19. Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong AC. Functional analysis of PKD1 transgenic lines

reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1804-15.

20. Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R. The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4017-22.

21. Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell* 2004;118(2):145-8.

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

23. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(10):2508-16.

24. Grimm DH, Cai Y, Chauvet V, Rajendran V, Zeltner R, Geng L, Avner ED, Sweeney W, Somlo S, Caplan MJ. Polycystin-1 distribution is modulated by polycystin-2 expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 2003;278(38):36786-93.

25. Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(11):880-93.

26. Fu X, Wang Y, Schettle N, Gao H, Putz M, von Gersdorff G, Walz G, Kramer-Zucker AG. The subcellular localization of TRPP2 modulates its function. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(7):1342-51.

27. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 2000;408(6815):990-4.

28. Kottgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber TB, Schermer B, Kramer-Zucker A, Hopker K, Simmen KC, Tschucke CC, Sandford R, Kim E, Thomas G, Walz G. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 2005;24(4):705-16.

29. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ, Charlesworth MC, Torres VE, LaRusso NF, Harris PC, Ward CJ.

Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(2):278-88.

30. 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* 1999;353(9147):103-7.

31. Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millan JL, Zerres K, Barratt TM, Ozen S, Torres VE, Bergstralh EJ, Winearls CG, Harris PC. The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(5):1230-7.

32. Harris PC, Bae KT, Rossetti S, Torres VE, Grantham JJ, Chapman AB, Guay-Woodford LM, King BF, Wetzel LH, Baumgarten DA, Kenney PJ, Consugar M, Klahr S, Bennett WM, Meyers CM, Zhang QJ, Thompson PA, Zhu F, Miller JP. Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):3013-9.

33. 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* 1996;87(6):979-87.

34. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 1998;2:247-51.

35. Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, Zhou J. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted *Pkd1* mutation. *Nat Genet* 1997;17(2):179-81.

36. Jiang ST, Chiou YY, Wang E, Lin HK, Lin YT, Chi YC, Wang CK, Tang MJ, Li H. Defining a link with autosomal-dominant polycystic kidney disease in mice with congenitally low expression of *Pkd1*. *Am J Pathol* 2006;168(1):205-20.

37. Lantinga-van Leeuwen IS, Dauwerse JG, Baelde HJ, Leonhard WN, van de Wal A, Ward CJ, Verbeek S, Deruiter MC, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Lowering of *Pkd1* expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2004;13(24):3069-77.

38. Nishio S, Hatano M, Nagata M, Horie S, Koike T, Tokuhisa T, Mochizuki T. *Pkd1* regulates immortalized proliferation of renal tubular

epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 2005;115(4):910-8.

39. 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* 2007;13(12):1490-5.

40. Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, Croyle MJ, van Groen T, Wyss JM, Nagy TR, Kesterson RA, Yoder BK. Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* 2007;17(18):1586-94.

41. Patel V, Li L, Cobo-Stark P, Shao X, Somlo S, Lin F, Igarashi P. Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum Mol Genet* 2008;17(11):1578-90.

42. Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J. Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(12):2351-63.

43. 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* 2007;16(24):3188-96.

44. 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* 2000;6(5):1267-73.

45. Gattone VH, 2nd, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med* 2003;9(10):1323-6.

46. Nagao S, Nishii K, Katsuyama M, Kurahashi H, Marunouchi T, Takahashi H. Increased water intake decreases progression of polycystic kidney disease in the PCK rat. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(8):2220-7.

47. Masyuk TV, Masyuk AI, Torres VE, Harris PC, Larusso NF. Octreotide inhibits hepatic cystogenesis in a rodent model of polycystic liver disease by reducing cholangiocyte adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Gastroenterology* 2007;132(3):1104-16.

48. Qian Q, Du H, King BF, Kumar S, Dean PG, Cosio FG, Torres VE. Sirolimus reduces polycystic liver volume in ADPKD patients. *Am Soc Nephrol* 2008;19(3):631-8.
49. Chabardes D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM. Functional properties of Ca²⁺-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal* 1999;11(9):651-63.
50. Hanaoka K, Guggino WB. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(7):1179-87.
51. Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, Calvet JP. Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J Biol Chem* 2004;279(39):40419-30.
52. Yamaguchi T, Hempson SJ, Reif GA, Hedge AM, Wallace DP. Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(1):178-87.
53. Torres VE, Wang X, Qian Q, Somlo S, Harris PC, Gattone VH, 2nd. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 2004;10(4):363-4.
54. Yamamura Y, Nakamura S, Itoh S, et al. OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287(3):860-7.
55. Ruggenenti P, Remuzzi A, Ondei P, Fasolini G, Antiga L, Ene-lordache B, Remuzzi G, Epstein FH. Safety and efficacy of long-acting somatostatin treatment in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68(1):206-16.
56. Wahl PR, Le Hir M, Vogetseder A, Arcaro A, Starke A, Waeckerle-Men Y, Serra AL, Wuthrich RP. Mitotic activation of Akt signalling pathway in Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2007;12(4):357-63.
57. Boca M, D'Amato L, Distefano G, Polishchuk RS, Germino GG, Boletta A. Polycystin-1 induces cell migration by regulating phosphatidylinositol 3-kinase-dependent cytoskeletal rearrangements and

GSK3beta-dependent cell cell mechanical adhesion. *Mol Biol Cell* 2007;18(10):4050-61.

58. Zheng R, Zhang Z, Lv X, Fan J, Chen Y, Wang Y, Tan R, Liu Y, Zhou Q. Polycystin-1 induced apoptosis and cell cycle arrest in G0/G1 phase in cancer cells. *Cell Biol Int* 2008;32(4):427-35.

59. Battini L, Fedorova E, Macip S, Li X, Wilson PD, Gusella GL. Stable knockdown of polycystin-1 confers integrin-alpha2beta1-mediated anoikis resistance. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):3049-58.

60. Delmas P, Nomura H, Li X, Lakkis M, Luo Y, Segal Y, Fernandez-Fernandez JM, Harris P, Frischauf AM, Brown DA, Zhou J. Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem* 2002;277(13):11276-83.

61. Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, et al. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251(2):625-31.

62. 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* 2002;109(2):157-68.

63. Markoff A, Bogdanova N, Knop M, Ruffer C, Kenis H, Lux P, Reutelingsperger C, Todorov V, Dworniczak B, Horst J, Gerke V. Annexin A5 interacts with polycystin-1 and interferes with the polycystin-1 stimulated recruitment of E-cadherin into adherens junctions. *J Mol Biol* 2007;369(4):954-66.

64. Lal M, Song X, Pluznick JL, Di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND, Chauvet V, Gottardi CJ, Pei Y, Caplan MJ. Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2008;17(20):3105-17.

65. Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, Haan E, Bernstein J, Harris PC. Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 1997;61(4):843-51.

66. 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* 2006;103(14):5466-71.

67. Sweeney WE, Jr., Hamahira K, Sweeney J, Garcia-Gatrell M, Frost P, Avner ED. Combination treatment of PKD utilizing dual inhibition of EGF-receptor activity and ligand bioavailability. *Kidney Int* 2003;64(4):1310-9.

68. Yang B, Sonawane ND, Zhao D, Somlo S, Verkman AS. Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(7):1300-10.

69. Yoder BK. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(5):1381-8.

70. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, Igarashi P. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5286-91.

71. Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 2002;4(3):191-7.

72. 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 Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 2005;280(50):41298-306.

73. Low SH, Vasanth S, Larson CH, Mukherjee S, Sharma N, Kinter MT, Kane ME, Obara T, Weimbs T. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell* 2006;10(1):57-69.

74. Price PM, Megyesi J, Safirstein RL. Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66(2):509-14.

75. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int* 2009;76(6):604-13.

76. Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM. Coordination of the cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(4):F810-6.

77. Price PM, Yu F, Kaldis P, Aleem E, Nowak G, Safirstein RL, Megyesi J. Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(9):2434-42.

-
78. Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, Price PM. The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *Am J Physiol* 1996;271(6 Pt2):F1211-6.
79. Bukanov NO, Smith LA, Klinger KW, Ledbetter SR, Ibraghimov-Beskrovnaya O. Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* 2006;444(7121):949-52.
80. Park JY, Schutzer WE, Lindsley JN, Bagby SP, Oyama TT, Anderson S, Weiss RH. p21 is decreased in polycystic kidney disease and leads to increased epithelial cell cycle progression: roscovitine augments p21 levels. *BMC Nephrol* 2007;8:12.
81. Bellomo R. The epidemiology of acute renal failure: 1975 versus 2005. *Curr Opin Crit Care* 2006;12(6):557-60.
82. Lien YH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci* 2003;74(3):543-52.
83. Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998;18(5):490-7.
84. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2199-210.
85. Zhao Y, Haylor JL, Ong AC. Polycystin-2 expression is increased following experimental ischaemic renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(12):2138-44.
86. Obermuller N, Cai Y, Kranzlin B, Thomson RB, Gretz N, Kriz W, Somlo S, Witzgall R. Altered expression pattern of polycystin-2 in acute and chronic renal tubular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(7):1855-64.
87. Kuehn EW, Park KM, Somlo S, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(6):F1326-36.
88. Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM. Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2001;60(6):2164-72.
89. Verghese E, Weidenfeld R, Bertram JF, Ricardo SD, Deane JA. Renal cilia display length alterations following tubular injury and are present early in epithelial repair. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(3):834-41.

-
90. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, Torres V, Yaniv M, Pontoglio M. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2006;38(1):21-3.
91. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG. A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(12):3035-43.
92. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 1983;35(3):198-204.
93. Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Nephron Physiol* 2004;98(4):p97-106.
94. Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, Harris PC, Perez-Atayde AR, Rennke HG, Zhou J. Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet* 1999;21(2):160-1.
95. Inoue T, Plieth D, Venkov CD, Xu C, Neilson EG. Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. *Kidney Int* 2005;67(6):2488-93.
96. Ahrabi AK, Terryn S, Valenti G, Caron N, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Nielsen S, Horie S, Verbavatz JM, Devuyst O. PKD1 haploinsufficiency causes a syndrome of inappropriate antidiuresis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(6):1740-53.
97. Qian Q, Hunter LW, Du H, Ren Q, Han Y, Sieck GC. Pkd2^{+/-} vascular smooth muscles develop exaggerated vasocontraction in response to phenylephrine stimulation. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(2):485-93.
98. Bae EH, Lee KS, Lee J, Ma SK, Kim NH, Choi KC, Frokiaer J, Nielsen S, Kim SY, Kim SZ, Kim SH, Kim SW. Effects of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(1):F272-80.
99. Xu GM, Sikaneta T, Sullivan BM, Zhang Q, Andreucci M, Stehle T, Drummond I, Arnaout MA. Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J Biol Chem* 2001;276(49):46544-52.

-
100. Ong AC, Harris PC, Davies DR, Pritchard L, Rossetti S, Biddolph S, Vaux DJ, Migone N, Ward CJ. Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int* 1999;56(4):1324-33.
101. Takakura A, Contrino L, Zhou X, et al. Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2009;18(14):2523-31.
102. Kishino M, Yukawa K, Hoshino K, Kimura A, Shirasawa N, Otani H, Tanaka T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Maeda M, Ichinose M, Takeda K, Akira S, Mune M. Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(7):1826-34.
103. Prasad S, McDaid JP, Tam FW, Haylor JL, Ong AC. Pkd2 dosage influences cellular repair responses following ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2009;175(4):1493-503.
104. Winters ZE, Leek RD, Bradburn MJ, Norbury CJ, Harris AL. Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 expression is correlated with HER-2/ neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis. *Breast Cancer Res* 2003;5(6):R242-9.
105. Wang D, Iversen J, Wilcox CS, Strandgaard S. Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2003;64(4):1381-8.
106. Muto S, Aiba A, Saito Y, et al. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet* 2002;11(15):1731-42.
107. Verdeguer F, Le Corre S, Fischer E, Callens C, Garbay S, Doyen A, Igarashi P, Terzi F, Pontoglio M. A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* 2010;16(1):106-10.
108. Ciruna B, Jenny A, Lee D, Mlodzik M, Schier AF. Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. *Nature* 2006;439(7073):220-4.
109. Nishio S, Tian X, Gallagher AR, Yu Z, Patel V, Igarashi P, Somlo S. Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation. *J Am Soc Nephrol*;21(2):295-302.

110. Nonomura Y, Kohsaka H, Nagasaka K, Miyasaka N. Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in the treatment of arthritis. *J Immunol* 2003;171(9):4913-9.
111. Zheng D, Wolfe M, Cowley BD, Jr., Wallace DP, Yamaguchi T, Grantham JJ. Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(10):2588-95.