Andressa Godoy Amaral

Camundongos deficientes em *Pkd1* apresentam disfunção cardíaca associada a reprogramação metabólica e aumento de inflamação e apoptose

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

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Amaral, Andressa Godoy

Camundongos deficientes em Pkd1 apresentam
disfunção cardíaca associada a reprogramação metabólica
e aumento de inflamação e apoptose / Andressa Godoy
Amaral. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Nefrologia.

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico
dominante 2.Cardiomiopatias 3.Metabolismo
energético 4.Mitocôndrias cardíacas 5.Apoptose
6.Inflamação 7.Camundongos

USP/FM/DBD-428/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, Marcos e Cida, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

*Ao meu marido, Edwin, por ter aceitado e vivido esse sonho comigo,
mesmo que lhe fugindo a razão.*

Agradecimentos

À minha irmã Thais e meu cunhado Carlo por terem me acolhido em sua casa quando vim para São Paulo e minha vida era cheia de incertezas. Por terem me transformado na tia Dessa, a melhor versão de mim mesma!

Aos meus sobrinhos, que mesmo sem saberem, me consolaram em momentos de dificuldades, deixando minha vida muito mais colorida e alegre!

Ao Professor Luiz Fernando Onuchic pelas oportunidades, ensinamentos, conselhos e pelo entusiasmo científico que muito me motivaram nessa jornada.

À Prof^a Alicia Kowaltovski pela colaboração, por ter feito renascer em mim a paixão pela pesquisa e principalmente pelo exemplo de pesquisadora, minha enorme gratidão e admiração.

Ao Prof. Kinulpe Sampaio pelo auxílio na microscopia eletrônica e pelos bons momentos proporcionados em Belo Horizonte.

Ao Dr. Maurício Sforça, Dra Silvana Rocco e Dr. Antônio Bloise pelo auxílio nos experimentos e análises de metabolômica.

À Dra Ana Maria Gonçalves da Silva pelos ensinamentos em imunohistoquímica, pelo exemplo de excelência e pela amizade.

Ao Dr. Amaro Duarte Neto, médico patologista, pela dedicação e pelo auxílio nas análises histológicas.

À Prof^a Silvana Bordin e Dr. Gilson Murata pela gentileza em ceder diversos anticorpos utilizados neste trabalho.

À Dr^a Vera Maria Cury Salemi e Dr Marcelo Dantas Tavares de Melo pelas sugestões que enriqueceram meu trabalho.

À especialista de laboratório Camille Caldeira pelos ensinamentos e treinamento nas técnicas de respirômetria de alta resolução, pela simpatia e amizade que tornaram meus experimentos no instituto de química tão prazerosos e produtivos.

À Prof^a Alessandra Boletta e Dra Laura Cassina pelos esclarecimentos e pelas discussões de resultados.

Aos colegas de laboratório Marciana, Jéssica, Lívia, Elieser, Bruno, Precil, Fernanda, Stefanie e Vitória pela convivência e motivação.

À Jacqueline Souza, bioterista competente, que cuidou dos animais utilizados neste trabalho.

Às funcionárias Eliene, Mirtes e Cleonice pela ajuda diária, cumplicidade e amizade. Minha jornada no LIM 29 não seria a mesma sem vocês!

À Ivone e Wagner pelas viagens inesquecíveis, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Um agradecimento especial à Dra Andréia Watanabe pelo exemplo de profissional e de amor ao próximo e à família Navajas pelo apoio financeiro nessa difícil crise de nosso país.

À Capes, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Doença renal policística autossômica dominante: epidemiologia e manifestações clínicas .	1
1.2	Bases Genéticas e Produtos Proteicos dos Genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i>	1
1.3	Patogênese Molecular e Celular: Mecanismos e Vias de Sinalização.....	5
1.4	Alterações Metabólicas Associadas à Patogênese da DRPAD: Um Cenário Recente.....	8
1.5	Patogênese da Disfunção Cardíaca Associada à DRPAD: Um Entendimento em Evolução	15
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo central	20
2.2	Objetivos específicos	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	Modelo animal.....	22
3.2	Curva de sobrevida e tratamento com metformina.....	23
3.3	Análise histológica	23
3.4	Imunoistoquímica para caspase-3 clivada	24
3.5	Microscopia eletrônica	24
3.6	RT-PCR em Tempo Real.....	25
3.7	<i>Western blotting</i>	27
3.8	Cultura primária de cardiomiócitos	29

3.9 Medidas de consumo de oxigênio	29
3.10 Análise metabólica	31
3.11 Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Avaliação de parâmetros biométricos, morfométricos e de hipertrofia cardíaca	33
4.2 Avaliação de apoptose no tecido cardíaco	33
4.3 Avaliação de inflamação no tecido cardíaco	36
4.4 Avaliação de sensores de metabolismo energético e de oxigênio em tecido cardíaco	36
4.5 Avaliação de reguladores do metabolismo de lipídeos em tecido cardíaco	40
4.6 Avaliação do perfil transcricional em tecido cardíaco	42
4.7 Avaliação da densidade e morfologia das mitocôndrias em tecido cardíaco	43
4.8 Avaliação do consumo de oxigênio em tecido cardíaco e em cultura de cardiomiócitos ...	45
4.9 Avaliação do perfil de metabólitos em tecido cardíaco	48
4.10 Avaliação do potencial terapêutico da metformina sobre o fenótipo cardíaco.....	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	63
7. BIBLIOGRAFIA	65
8. ANEXO	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e representação dos domínios fundamentais da policistina-1 (PC1) e da policistina-2 (PC2), os produtos de PKD1 e PKD2, respectivamente. NTF: porção N-terminal da policistina-1; CTF: porção C-terminal da policistina-1.....4

Figura 2. Alterações metabólicas na DRPAD. ACC β : acetil CoA carboxilase β ; Akt: proteína quinase B; AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; B-Raf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*; CAC: ciclo do ácido cítrico, CAMKK: *calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase*, cAMP: adenosina monofosfato cíclico; ERK: *extracellular signal-regulated protein kinase*; FOX: fosforilação oxidativa; Glut: Glutamina, IP3R: receptor de inositol trifosfato; LKB1: *liver kinase B1*, MTORC1: *mechanistic target of rapamycin complex 1*; OAG: β -oxidação de ácidos graxos, PC1: policistina-1; PC2: policistina-2; Rheb: *ras homolog enriched in brain*; RyR2: receptor de rianodina 2, SERCA: *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*, TSC2: tuberina; TSC1: hamartina. Proteínas ou mensageiros celulares na cor azul estão ativados ou aumentados na DRPAD, em amarelo estão inibidos ou reduzidos na DRPAD.....14

Figura 3. A) Análise da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE%) de camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT) e *Pkd1*^{V/V} com 18 dias de vida; B) Imagens representativas da FEVE em modo M. Retirado e adaptado de Balbo e cols, 2016.....17

Figura 4. Genotipagem em gel de agarose 2% corado com *Sybr Safe DNA*. PM: marcador de peso molecular de 100bp. A e B: camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT); C: camundongo *Pkd1*^{V/V} (VV); D, E e F: camundongos *Pkd1*^{+/V} (HT).....23

Figura 5. Esquema de avaliação da respiração mitocondrial utilizando modulares da cadeia transportadora de elétrons (reproduzido do manual do usuário do kit 103015-100 da *Agilent Technologies*).....30

Figura 6. Parâmetros estruturais e hipertróficos cardíacos. Análise comparativa de A) Peso cardíaco em camundongos *Pkd1*^{+/+} (n = 18) e *Pkd1*^{V/V} (n = 18); B) Diâmetro do cardiomiócito em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 5) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5) e C) Expressão de ERK2 fosforilada em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8); D) Peso cardíaco normalizado por peso corporal em camundongos *Pkd1*^{+/+} (n = 18) e *Pkd1*^{V/V} (n = 18); E) Perda de peso corporal entre P12 e P15-16 dias de vida (n = 13). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. * P <0,05 e *** P <0,001.....34

Figura 7. Apoptose no tecido cardíaco. A) Análise comparativa de marcação para caspase-3 clivada entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 10) e *Pkd1*^{V/V} (n = 10); B) Imagem representativa para *Pkd1*^{+/+} e C) Imagem representativa para *Pkd1*^{V/V}. Aumento original, 400x; barra de escala 10 μ m; setas indicam marcação positiva para caspase-3 clivada. Análise comparativa da expressão do gene *Bcl2* (D), *Bcl2-XL* (E) e *Bax* (F) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8);. Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. Os dados não

paramétricos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. * P <0,05 e ** P <0,01.....35

Figura 8. Inflamação no tecido cardíaco. Análise comparativa da expressão gênica de *Il6* (A); *Il1 β* (B) e expressão da proteína galectina-3 (C) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8); D) Imagens representativas de células inflamatórias no miocárdio de camundongos *Pkd1*^{V/V} - painel superior: neutrófilos no interstício cardíaco em contato próximo com cardiomiócitos; e painel inferior: monócitos no interior de um pequeno vaso cardíaco. Ampliação original, 9300x, barra de escala de 5 μ m. Os dados foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. * P <0,05, ** P <0,01 e *** P <0,001.....37

Figura 9. Marcadores de fibrose em tecido cardíaco. Análise comparativa da expressão de *Colla1* (A) e *Col3a1* (B) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. * P <0,05.....38

Figura 10. Análises comparativas da expressão de AMPK total (A); AMPK fosforilada (B) e AMPK fosforilada /AMPK total (C) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. * P <0,05, ** P <0,01 e *** P <0,001.....38

Figura 11. Análises comparativas da expressão de A) RPS6 total e fosforilada entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8) e B) ACC β fosforilada entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 7). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP, enquanto os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, tendo os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. * P <0,05 e ** P <0,01.....39

Figura 12. Análise comparativa da expressão de A) *Pgc1a* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8); B) *Ppara* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 10) e *Pkd1*^{V/V} (n = 11); *Cpt1* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 10) e *Pkd1*^{V/V} (n = 11); *Sirt1* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8) e *Hif1a* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). B) Expressão comparativa da proteína PGC1 α nos corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. * P <0,05 e ** P <0,01.....41

Figura 13. Análise comparativa da A) Densidade volumétrica citoplasmática de gotículas lipídicas em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 5) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5) e B) Expressão de *Fasn* nos corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP, enquanto os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, tendo os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil.....41

Figura 14. Análise comparativa da expressão de *Anp*, (A) *Acta1* (B), *Myh7* (C) e *Myh6* (D) em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. * P <0,05 e ** P <0,01.....42

Figura 15. Densidade e morfologia mitocondrial em tecido cardíaco. A) Análise comparativa de densidade volumétrica citoplasmática mitocondrial em corações *Pkd1^{+/+}* (n = 5) e *Pkd1^{V/V}* (n = 5); B) Imagem representativa de coração *Pkd1^{+/+}* e C) imagem representativa de coração *Pkd1^{V/V}*; ampliação original, x9300, barra de escala de 2 µm. Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. *** P <0,001. LD: gotículas lipídicas, MF: miofibrila, Mit: mitocôndrias, e N: núcleos.....43

Figura 16. Análise comparativa da expressão de DRP1(A) e MFN2 (B) em corações *Pkd1^{+/+}* (n = 8) e *Pkd1^{V/V}* (n=8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP.....44

Figura 17. Análise comparativa do consumo de oxigênio nos A) corações *Pkd1^{+/+}* (n = 8) e *Pkd1^{V/V}* (n = 8) e B) cardiomiócitos *Pkd1^{+/+}* (n = 6) e *Pkd1^{V/V}* (n = 5) em condição basal e após adição sequencial de oligomicina, CCCP e antimicina/rotenona. Dados comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P <0,05 e ** P <0,01.....46

Figura 18. A) Acidificação do meio extracelular de cardiomiócitos *Pkd1^{+/+}* (n = 6) e *Pkd1^{V/V}* (n = 5) em condição basal e após adição sequencial de oligomicina, CCCP e antimicina/rotenona; B) Análise comparativa da produção de lactato em meio de cultura de cardiomiócitos *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{V/V}* (n = 4). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, tendo os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. *P <0,05.....46

Figura 19. Quantificação do consumo de oxigênio em cardiomiócitos *Pkd1^{+/+}* (n = 6) e *Pkd1^{V/V}* (n = 5). A) Basal; B) Relacionado à produção de ATP (consumo na presença de oligomicina menos o basal); C) Relacionado ao vazamento de prótons (insensível à oligomicina); D) Máximo (induzido pelo desacoplador CCCP); E) Capacidade de reserva (consumo máximo menos o basal) e F) Não mitocondrial (insensível à antimicina mais rotenona). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P <0,05 e ** P <0,01. *Pkd1^{+/+}* (n = 6) e *Pkd1^{V/V}* (n = 5)47

Figura 20. Perfil metabólico no coração. A e B) Análise de *Partial Least Square-Discriminant* (PLS-DA); C) *Heatmap* aplicado aos metabólitos identificados, mostrando separação entre os corações *Pkd1^{+/+}* (n = 9) e *Pkd1^{V/V}* (n = 8). Os metabólitos mais discriminatórios foram identificados pelas pontuações do *variable importance on the projection* (pontuação VIP≥1) e (D) gráfico *volcano*, usando como critério de seleção o limiar de mudança (x) de 1,5 vezes e teste t (y) de 0,1 (E).....49

Figura 21: A) Análise de sobrevida de camundongos *Pkd1^{V/V}* tratados com metformina 62,5 mg/kg de PC (n = 13) ou salina na mesma proporção (n = 12). Os dados de sobrevida foram representados através da curva de Kaplan-Meier e os dados analisados utilizando o teste de Log-rank.....50

Figura 22. Representação esquemática da reprogramação metabólica em células e tecidos cardíacos *Pkd1^{V/V}*. A atividade da AMPK é regulada negativamente nos corações VV, resultando em diminuição da ACCβ fosforilada, uma enzima chave da oxidação de ácidos graxos (FAO). Os

genes fetais cardíacos *Nppa* e *Acta1* estão aumentados, enquanto a expressão dos genes *Cpt1*, *Ppara* e *Pgcl α* está reduzida, contribuindo para a diminuição da FAO nos cardiomiócitos. A diminuição da FAO pode induzir o uso de glicose e aminoácidos para alimentar o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Os aminoácidos também podem ser utilizados para sustentar a biossíntese de metabólitos potencialmente envolvidos no metabolismo lipídico e no estresse oxidativo. Nesse cenário, um conjunto definido de aminoácidos encontra-se diminuído nos corações VV, diminuindo a atividade da mTORC1. Apoptose e inflamação podem ocorrer devido à permeabilização da membrana externa mitocondrial. O aumento no consumo de oxigênio nos cardiomiócitos VV induz a expressão de *Hif1 α* . ACoA = acetil-CoA, CAC = ciclo do ácido cítrico, CG = complexo Golgi, MCoA = malonil-CoA, FA = ácido graxo, ER = retículo endoplasmático, MIT = mitocôndria, NU = núcleo e PC2 = policistina-2.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaios *TaqMan* e sequências dos primers.....26

Tabela 2. Anticorpos e diluições.....28

Tabela 3. Parâmetros morfométricos mitocondriais.....44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2DG	2-deoxi-glicose
ACC β	acetil-CoA carboxilase β
aa	aminoácidos
Acta1	<i>actin alpha 1</i>
Akt	<i>protein kinase B</i>
AMPc	adenosina monofasfato cíclico
AMPK	proteína quinase ativada por AMPc
ATP	adenosina trifosfato
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma</i> protein 2
Bcl2-XL	<i>B-cell lymphoma-extra-large</i>
BSA	albumina sérica bovina
CAC	ciclo do ácido cítrico
CAMKK	<i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
CAP	cílio apical primário
CaSR	<i>calcium-sensing receptor</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
Cdk2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CGB	cromogranina B
CMDI	cardiomiopatia dilatada idiopática
Cpt1	<i>carnitine palmitoyltransferase 1A</i>

CT	carboxi-terminal
CTT	fragmento C-terminal de PC1
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRC	doença renal crônica
DREF	doença renal em estágio final
DRP	doença renal policística
DRP1	<i>dynamic-related protein-1</i>
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante do tipo 1
DRPAD2	doença renal policística autossômica dominante do tipo 2
DRPAR	doença renal policística autossômica recessiva
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGLN3	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 3</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EROS	espécies reativas de oxigênio
Fasn	<i>Fatty acid synthase</i>
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
Flp	<i>flippase</i>
Floxed	<i>flanked by loxP</i>
FRT	<i>flippase recognition target</i>
GANAB	<i>glucosidase II α subunit</i>
Gal-3	galectina-3
Gapdh	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

GPS	<i>G protein-coupled receptor proteolytic site</i>
GSH	glutathione
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HIE	hipertrofia induzida por estiramento/sobrecarga de pressão
Hif1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
Ift20	<i>Intraflagellar transport protein 20</i>
Il1 β	interleucina-1 beta
Il6	interleucina-6
IP3R	receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
JAK-STAT	<i>janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
KD	<i>knockdown</i>
Kif3a	kinesin family member 3A
Kv	<i>potassium voltage-gated channel</i>
LC3II	<i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3- phosphatidylethanolamine conjugate</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LTCC	<i>L-type calcium channel</i>
MCoA	Malonil-CoA
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MFN2	mitofusina-2
MP	membrana plasmática
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin kinase</i>
mTORC1	<i>mechanistic target of rapamycin kinase complex 1</i>

Myh6	<i>myosin heavy chain 6</i>
Myh7	<i>myosin heavy chain 7</i>
NCCE	<i>Non-capacitative calcium entry</i>
NO	óxido nítrico
Nppa	<i>natriuretic peptide A</i>
NT	amino-terminal
OAG	β -oxidação de ácidos graxos
PA	pressão arterial
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	peso corporal
PC1	policistina-1
PC2	policistina-2
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGC-1 α	<i>proliferator-activated receptor γ coactivator-1α</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKD1	<i>polycystic kidney disease 1</i>
PKD2	<i>polycystic kidney disease 2</i>
PKHD1	<i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
PLB	<i>Phospholamban</i>
PLS-DA	<i>partial least square- discriminant analysis</i>
PNB	peptídeo natriurético tipo B
PPAR α	<i>peroxisome proliferation-activated receptor-α</i>
PR	peso renal

RA	restrição alimentar
RE	retículo endoplasmático
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RMN	ressonância nuclear magnética
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RPS6	<i>ribosomal protein S6</i>
RT-PCR	transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
RyR2	receptor de rianodina 2
SDS	dodecil sulfato de sódio
SERCA	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SIRT1	Sirtuina-1
SRA	sistema renina angiotensina
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
TA	temperature ambiente
TBST	<i>tris-buffered saline acrescida de tween 0,1%</i>
TCF	<i>T-cell-factor</i>
TFG	taxa de filtração glomerular
Tgfb1	<i>transforming growth factor beta-1</i>
TMSP	<i>3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionic acid</i>
T-PER	<i>Tissue Protein Extraction Reagent</i>
TropI	troponina I
TRPC1	<i>transient receptor potential canonical 1</i>
TRS	terapia renal substitutiva

TRPV4	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
TSC2	tuberous sclerosis 2
VE	ventrículo esquerdo
VIP	<i>variable importance on the projection</i>
WNT	<i>Wingless</i> -type MMTV integration site family

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
Ca^{2+}	cálcio
cm	centímetros
P	coeficiente de significância estatística
g	força g
g	gramas
°C	graus Celsius
h	hora
=	igual
L	litro
> e <	maior e menor
$\geq$ e $\leq$	maior ou igual e menor ou igual
$\pm$	mais ou menos
mHz	megahertz
μg	micrograma
$\mu\text{g/g}$	micrograma/grama
μL	microlitros
$\mu\text{L/mL}$	microlitro/mililitro
μm	micrometro
mg	miligrama
mg/g	miligrama/grama

mg/ μ L	miligrama/microlitro
mL	mililitros
mg/mL	miligrama/mililitro
mL/min	mililitros/minutos
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minutos
M	molar
CO	monóxido de carbono
nm	nanômetro
N	número de uma amostra
NO	óxido nítrico
O ₂	oxigênio
pb	pares de base
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	segundo
x	vezes

RESUMO

Amaral AG. *Camundongos deficientes em Pkd1 apresentam disfunção cardíaca associada a reprogramação metabólica e aumento de inflamação e apoptose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Manifestações cardiovasculares são responsáveis por morbidade e mortalidade significativas na doença renal policística autossômica dominante (DRPAD). Associação entre cardiomiopatia dilatada idiopática e DRPAD, assim como um papel primário da deficiência de *Pkd1* e *Pkd2* nessa disfunção, foram recentemente descritos. Os mecanismos envolvidos na patogênese desse fenótipo, contudo, permanecem amplamente desconhecidos. Nesse cenário, o objetivo deste estudo foi investigar as bases metabólicas e celulares do fenótipo cardíaco associado à DRPAD. Para tanto, utilizamos como modelo experimental camundongos homozigotos para um alelo hipomórfico de *Pkd1* (*Pkd1*^{V/V}, VV), animais que apresentam disfunção cardíaca precocemente. Os corações de camundongos VV não desenvolveram hipertrofia, mas apresentaram apoptose e inflamação aumentadas em comparação a seus respectivos controles selvagens (WT). A expressão dos genes fetais *Nppa* e *Acta1* mostrou-se aumentada em tecido cardíaco VV, revelando uma transição inadequada do perfil transcricional fetal para o perfil pós-natal. Corações VV apresentaram diminuição da expressão de *Ppara*, *Pgc1α*/PGC1, AMPK total e fosforilada e ACCβ fosforilada, resultados associados a diminuição da fosforilação oxidativa de ácidos graxos e aumento da oxidação de glicose. Diferentemente de resultados prévios obtidos em rins deficientes em *Pkd1*, corações VV apresentaram diminuição da atividade de mTORC1, a glicose não foi preferencialmente direcionada para glicólise aeróbica e a concentração de glutamina mostrou-se aumentada quando comparada à dos controles WT. Tais achados acompanharam-se de alterações mitocondriais, incluindo aumento da densidade volumétrica citoplasmática, aumento de fragmentação e aumento do consumo de oxigênio em resposta à glicose. Experimentos de ressonância nuclear identificaram um perfil metabólico distinto em corações VV, caracterizado principalmente por diminuição dos níveis de glicose e aminoácidos (serina, alanina, tirosina, valina, prolina, metionina, glutamato, glicina, aspartato, isoleucina e histidina). Esses dados sugerem que glicose e aminoácidos possam estar sendo utilizados como substrato energético e, possivelmente, para sustentar a biossíntese de compostos envolvidos no metabolismo lipídico e no estresse oxidativo. Nossos achados consistem na primeira descrição de reprogramação metabólica cardíaca associada a deficiência de *Pkd1*, revelando aspectos comuns e diferentes dos descritos para rins com DRPAD. Nossos resultados constituem, portanto, um marco conceitual na elucidação da patogênese da disfunção cardíaca associada à deficiência de *Pkd1*, achados provavelmente aplicáveis ao fenótipo cardíaco na DRPAD humana.

Descritores: Rim policístico autossômico dominante; Cardiomiopatias; Metabolismo energético; Mitocôndrias cardíacas; Apoptose; Inflamação; Camundongos.

ABSTRACT

Amaral AG. *Cardiac dysfunction in Pkd1 deficient mice is associated with metabolic rewiring, inflammation and apoptosis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Cardiovascular manifestations account for significant morbidity and mortality in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Association between idiopathic dilated cardiomyopathy and ADPKD as well as a primary role for *Pkd1* and *Pkd2* deficiency in this dysfunction have been recently described, however the pathogenic mechanisms remain largely unknown. In this scenario, the aim of this study was to investigate the metabolic and cellular basis of ADPKD-associated cardiac phenotype. We used a mouse homozygous for a *Pkd1* hypomorphic allele (*Pkd1*^{V/V}, VV) with early cardiac dysfunction as our experimental model. Dysfunctional VV hearts were not hypertrophic but displayed increased apoptosis and inflammation compared to wild-type controls. Expression of *Nppa* and *Acta1* was increased in VV cardiac tissue, revealing inappropriate transcriptional transition to the mature state. Downregulation of *Ppara*, *Pgc1α*/PGC1, total and phosphorylated AMPK and phosphorylated ACCβ, in turn, was associated with abnormal lipid metabolism and increased glucose oxidation. Unlike *Pkd1*-deficient kidneys, mTORC1 is downregulated, glucose is not targeted for aerobic glycolysis and glutamine is increased in VV hearts. Such findings were accompanied by increased mitochondrial density with decreased size and increased oxygen consumption in response to glucose. NMR experiments identified a distinct metabolite profile in VV hearts, associated with decreased levels of glucose and amino acids (serine, alanine, tyrosine, valine, proline, methionine, glutamate, glycine, aspartate, isoleucine and histidine). These data suggest that glucose and amino acids may be used as energetic substrate and to sustain biosynthesis of metabolites likely involved in lipid metabolism and oxidative stress. Our findings are the first description of cardiac metabolic rewiring associated with *Pkd1* deficiency, revealing a pattern just partially similar to the metabolic profile previously observed in the cystic kidney phenotype. Our results constitute, therefore, a conceptual marker in the elucidation of the heart dysfunction pathogenesis associated with *Pkd1* deficiency, findings likely applicable to the cardiac phenotype in human ADPKD.

Descriptors: Polycystic kidney, autosomal dominant; Cardiomyopathies; Energy Metabolism; Mitochondria, Heart; Apoptosis; Inflammation; Mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal policística autossômica dominante: epidemiologia e manifestações clínicas

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) constitui a doença monogênica humana com risco de óbito mais comum, com uma prevalência populacional estimada entre 1:1000 e 1:2500 (1, 2). Seu fenótipo renal caracteriza-se pelo desenvolvimento bilateral e difuso de múltiplos cistos preenchidos por fluido, acompanhado de aumento progressivo do volume do órgão. O processo de expansão cística, por sua vez, leva à compressão de néfrons adjacentes e uma distorção gradual da arquitetura renal. Vale destacar que o crescimento do volume renal associa-se a uma função renal estável ou lentamente declinante por décadas, até atingir uma fase em que a taxa de filtração glomerular (TFG) passa a cair de forma relativamente rápida (3).

É importante notar que aproximadamente 70% dos pacientes afetados pela DRPAD requerem terapia renal substitutiva (TRS) até os 70 anos de idade (4). Nesse cenário, esta doença se responsabiliza por 5-10% de todos os casos que evoluem a doença renal em estágio final (DREF) (5). Embora o fenótipo renal predomine, a DRPAD é uma doença sistêmica, compreendendo também manifestações extrarrenais. Entre elas, destacam-se manifestações cardiovasculares, como aneurismas intracranianos, hipertrofia do ventrículo esquerdo e valvopatias; cistos hepáticos; cistos pancreáticos e outras anormalidades menos frequentes (6).

1.2 Bases Genéticas e Produtos Proteicos dos Genes *PKD1* e *PKD2*

A DRPAD é uma doença geneticamente heterogênea. A quase totalidade dos casos é causada por mutação em um de dois genes: *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*), que codifica a proteína policistina-1 (PC1), ou *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*), que codifica policistina-2 (PC2). Em pacientes com diagnóstico molecular definido, 78% dos casos decorrem de mutações em *PKD1*, enquanto em 15% dos pacientes a enfermidade

deve-se a mutações no gene *PKD2* (7). Mutações em *PKD1* e *PKD2*, entretanto, não são detectadas em cerca de 7% das famílias associadas a manifestações clínicas consistentes com a doença, sugerindo a existência de *loci* adicionais relacionados à DRPAD (8). De fato, um trabalho recente identificou mutações patogênicas no gene *GANAB* (*glucosidase II alpha subunit*) em sete dessas famílias, associadas a um fenótipo renal policístico leve (9).

PC1 é uma glicoproteína integral de membrana com mais de 4300 aminoácidos (aa), contendo uma porção extracelular amino-terminal de mais de 3000 aa (NT), 11 domínios transmembrânicos e uma porção carboxi-terminal intracelular (CT). A porção NT apresenta diversos domínios envolvidos em interações com proteínas ou carboidratos, além de um domínio GPS (*G-protein-coupled receptor proteolytic site*) que se constitui em um sítio de clivagem autocatalítico de PC1 (10, 11). A extremidade CT, por sua vez, apresenta um domínio helicoidal que interage fisicamente com PC2 (12). A clivagem de PC1 é essencial para sua atividade e gera dois fragmentos, um N-terminal (NTF) e outro C-terminal (CTF), que permanecem a princípio associados de forma não covalente (13). Além da clivagem, a atividade e endereçamento de PC1 dependem de um processamento pós-traducional complexo, que se inicia no retículo endoplasmático (RE) e termina no complexo de Golgi (CG). Interessantemente, a subunidade catalítica da enzima glucosidase II, codificada pelo gene *GANAB*, participa do processamento pós-traducional de PC1 no RE (9).

PC2 também se constitui em uma glicoproteína integral de membrana, formada por seis domínios transmembrânicos e extremidades CT e NT intracitosólicas (14). Essa proteína funciona como um canal de cátions não seletivo, permeável a Ca^{2+} , ao passo que se admite que PC1 funcione como um receptor de membrana e também como uma molécula de adesão. PC1 e PC2 também podem interagir física ou funcionalmente com várias outras proteínas em diferentes sítios subcelulares, incluindo cílio apical basal (CAP), membrana plasmática (MP) e membrana do RE (15-19). Embora as funções do complexo PC1/PC2 não estejam completamente esclarecidas, estudos sugerem que PC1 atue como um sensor responsivo ao fluxo de fluido intratubular no CAP, modulando a homeostase intracelular de Ca^{2+} em associação com PC2 (20). PC2 pode ainda interagir com outros canais de Ca^{2+} , como TRPC1 (*transient receptor potential canonical 1*) e TRPV4 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*) (21, 22), e

regular a liberação de Ca^{2+} do RE através de interação com o receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R) ou com o receptor de rianodina 2 (RyR2) (23-25). PC1, por sua vez, também pode modular as oscilações de Ca^{2+} intracelular por meio de sua interação com o canal NCCE (*Non-capacitative calcium entry*) (26)

Embora a DRPAD se constitua em uma doença de transmissão genética dominante, estudos fundamentais apoiam um mecanismo molecular recessivo para a cistogênese. De acordo com esse modelo, a formação cística segue um padrão *knudsoniano* de dois eventos, descrito originalmente para genes supressores de tumores. O primeiro evento consiste na mutação de linhagem germinativa em *PKD1* ou *PKD2*, enquanto o segundo é representado por uma mutação somática que inativa ou reduz significativamente a atividade da cópia previamente normal (27). Estudos subsequentes ampliaram e aprimoraram esse modelo. De acordo com o modelo atual, a cistogênese se inicia em uma dada célula quando a atividade de PC1 ou PC2 cai abaixo de um nível crítico. Admite-se, porém, que esse limiar possa variar em função de vários fatores, incluindo a fase de desenvolvimento renal, variantes genéticas de *loci* modificadores, fatores ambientais e demandas fisiológicas decorrentes de lesão renal (3, 28-30). Esse modelo corrobora a natureza focal da cistogênese e é consistente com a variabilidade fenotípica observada na DRPAD. Outros autores sugerem que a cistogênese pode ser determinada por um mecanismo baseado na dosagem de policistina-1 funcional, porém independente de mutação somática em *PKD1* (31). Sua importância relativa na DRPAD humana, contudo, permanece a ser determinada.

Figura 1. Estrutura e representação dos domínios fundamentais da policistina-1 (PC1) e da policistina-2 (PC2), os produtos de *PKD1* e *PKD2*, respectivamente. NTF: porção N-terminal da policistina-1; CTF: porção C-terminal da policistina-1.

1.3 Patogênese Molecular e Celular: Mecanismos e Vias de Sinalização

Os mecanismos moleculares que traduzem os defeitos de PC1/PC2 no desenvolvimento da DRPAD vêm sendo gradativamente elucidados, embora ainda permaneçam amplamente desconhecidos. Avanços obtidos nas últimas duas décadas mostraram que as policistinas são capazes de modular diversas vias de sinalização envolvidas em proliferação, apoptose, desdiferenciação, polaridade celular planar e polaridade celular. A desregulação dessas vias, essenciais à homeostase celular, contribuem para a patogênese da DRPAD.

Alterações na homeostase intracelular de Ca^{2+} constituem um elemento central na patogênese da DRPAD. Embora alguns pontos sejam ainda controversos, a maior parte dos estudos encontrou níveis reduzidos de Ca^{2+} intracelular basal em células e tecidos DRPAD. Mostrou-se, ainda, que a homeostase defeituosa de Ca^{2+} intracelular se associa a uma resposta hiperproliferativa anormal em resposta ao AMP cíclico (AMPc) em células DRPAD, enquanto este induz uma resposta inibitória em células tubulares renais normais (32, 33). Um trabalho clássico mostrou que a transfecção de células imortalizadas de ducto coletor de camundongo (M1) com um construto dominante negativo da cauda C-terminal da PC1 determinou a ativação de ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) via AMPc, efeito que foi inibido por ionóforo de Ca^{2+} (33). De forma complementar, medidas que promoveram a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em células DRPAD humanas resgataram o fenótipo de proliferação normal, bloqueando a ativação de ERK via AMPc (32).

Vale destacar que a redução do Ca^{2+} intracelular favorece o acúmulo intracelular de AMPc por meio de mecanismos que podem incluir a estimulação da adenil ciclase-5 e 6 e a inibição das fosfodiesterase 1 e 3 (34, 35). Além disso, AMPc é capaz de estimular CFTR, canal de cloreto presente na membrana apical de células DRPAD, promovendo secreção transepitelial de fluido dirigida por cloreto. Tal mecanismo contribui para o processo de crescimento cístico (36).

A expressão de PC1 em desmossomos, adesões focais e junções aderentes da membrana basolateral sustentam seu papel como molécula de adesão. Em células renais normais, PC1 forma um complexo com E-caderina e β -catenina nas junções aderentes da

MP. Em células DRPAD este complexo é desarranjado e a PC1 é fosforilada. Nesse cenário, PC1 e E-caderina são depletadas da MP (37). Em apoio a esta hipótese, outro trabalho mostrou que células DRPAD apresentam polaridade anormal das proteínas de desmossomos nos domínios apical e basolateral (38). Tais anormalidades contribuem para o enfraquecimento da adesão celular e tornam o epitélio mais susceptível à dissociação em resposta ao estresse de cisalhamento.

Outra função das policistinas consiste na regulação do ciclo celular, ao menos parcialmente mediada pela via JAK-STAT (*janus kinase-signal transducer and activator of transcription*). PC1 é capaz de interagir com JAK2, que ativa o fator de transcrição STAT1, através de um processo dependente de PC2. Dímeros ativos de STAT1 migram para o núcleo, promovendo a transcrição de genes envolvidos na parada do ciclo celular em G₀/G₁ (39). A desregulação desse mecanismo pode contribuir para o aumento de proliferação celular observada na DRPAD.

Vários estudos mostraram que a via mTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*) encontra-se ativada no epitélio cístico renal em pacientes com DRPAD e em modelos animais ortólogos à doença. O complexo proteico hamartina/tuberina (produtos respectivos de *TSC1* e *TSC2*, genes mutados no complexo esclerose tuberosa) inibe constitutivamente Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). Rheb é membro da família Ras GTPase e tem como função ativar o complexo 1 de mTOR (mTORC1). O complexo mTORC1, por sua vez, pode ser ativado via PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*), uma vez que a proteína Akt (*protein kinase B*), principal efetora dessa via, fosforila tuberina levando ao desarranjo do complexo hamartina/tuberina (40). Além disso, Shillingford e cols mostraram interação entre a porção C-terminal de PC1 e tuberina em células epiteliais renais, sugerindo a formação do complexo proteico PC1/tuberina/mTOR (41). Um estudo posterior mostrou que a interação entre a porção C-terminal de PC1 e tuberina impede a fosforilação desta por Akt, mantendo o complexo ancorado à MP e mTORC1 inibido (42). Em condição normal, admite-se que a formação desse complexo e seu ancoramento na MP iniba a atividade de mTORC1. Alterações em PC1, portanto, podem levar ao desarranjo desse complexo e consequente desinibição de mTORC1 (41-43). PC1 pode também regular a via mTORC1 por meio da inibição da fosforilação da tuberina pela proteína ERK, promovendo o efeito inibitório do complexo hamartina/tuberina (44).

mTOR regula também autofagia, um processo catabólico fundamental para a manutenção da homeostase celular. Vale destacar que defeitos no fluxo autofágico foram observados em células renais na DRPAD humana, de ratos Han:SPRD e de camundongos *cpk* (45, 46). Além disso, Zhu e cols mostraram que o percentual de alevinos de *zebrafish* *Pkd1*^{-/-} (*Pkd1a*^{-/-}) com cistos aumentou de 10% para 48% após o *knockdown* de *Atg5*, uma proteína do core autofágico (46). Seguindo a mesma linha conceitual, a ativação do fluxo autofágico com beclina-1 diminuiu a cystogênese nesses alevinos. Por fim, *Pkd1a*^{-/-} tratados com rapamicina, inibidor de mTOR, apresentaram aumento do fluxo autofágico, redução significativa da formação de cistos e melhora da função renal.

Assim como PC1 e PC2, vários produtos de genes mutados em outras doenças císticas renais humanas e em modelos animais de DRP se expressam no CAP. As relações entre defeitos no CAP e cystogênese, contudo, são ainda pouco compreendidas. Um trabalho notório confirmou dados anteriores que revelaram o desenvolvimento de cystogênese renal em modelos murinos mutantes para os genes ciliares *Kif3a* e *Ift20* (47-49). De forma surpreendente, animais com inativação concomitante desses genes ciliares e de *Pkd1* ou *Pkd2* cursaram com inibição da cystogênese e do crescimento cístico. A perda do cílio intacto, portanto, suprimiu o crescimento cístico seguindo a inativação das policistinas. Esses achados sugerem a existência de uma nova via definida por inibição dependente das policistinas e ativação dependente do cílio primário (49).

Uma via de sinalização ciliar que parece estar desregulada da DRPAD é a via WNT (*Wingless-type MMTV integration site family*). Essa via é evolutivamente conservada e ramifica-se em WNT canônica e não canônica, a depender da participação ou não da proteína β -catenina. Em condições normais, β -catenina é constitutivamente fosforilada por um complexo multiproteico de destruição e endereçada para degradação via proteossomo. Na presença de glicoproteínas da família WNT, entretanto, o complexo de destruição é inibido e β -catenina se transloca para o núcleo celular, onde se liga a TCF (*T-cell-factor*). Este complexo, por sua vez, ativa a transcrição de genes responsivos a WNT (50). Ativação aberrante dessa via foi descrita em modelos de camundongos deficientes em *Pkd1* e *Pkd2*, assim como em células DRPAD humanas (51-55). Lal e cols mostraram que a porção C-terminal de PC1 interage com β -catenina no núcleo das células, diminuindo sua afinidade de ligação a TCF e, conseqüentemente, inibindo tal via (55). Em sintonia com tais resultados, inibidores da via WNT/ β -catenina foram capazes

de diminuir o crescimento cístico, melhorar a função renal e estender a sobrevivência de camundongos mutantes para *Pkd2* (52).

Outros estudos demonstraram que a via WNT não canônica também pode estar desregulada na DRPAD. Essa via controla a polaridade celular planar, processo essencial à migração celular e, portanto, à tubulogênese renal. WNT atua via GTPases (RhoA e Rac), ativando a família de fatores de transcrição JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) (53). Luyten e cols mostraram que PC1 pode controlar a expressão de proteínas-chaves da via WNT não canônica e a taxa de migração celular *in vitro* (56). Mais recentemente, Kim e cols relataram que a porção extracelular de PC1 pode se ligar a WNT, induzindo influxo de Ca^{2+} via PC2. De fato, fibroblastos *Pkd2*^{-/-} não apresentaram correntes de Ca^{2+} em resposta a WNT e apresentaram defeitos de migração celular (57). No entanto, embora um forte conjunto de evidências conecte defeitos nas vias WNTs a doenças renais policísticas, tais resultados são ainda controversos (58, 59).

1.4 Alterações Metabólicas Associadas à Patogênese da DRPAD: Um Cenário Recente

Estudos concluídos nos últimos anos mostraram que alterações celulares metabólicas são centrais na patogênese da DRPAD. Uma vez que processos essenciais à cystogênese, como proliferação celular e secreção transepitelial de fluido, requerem um elevado consumo energético, a princípio não seria surpreendente que células DRPAD respondessem a tais anormalidades com reprogramação metabólica. Os resultados atualmente disponíveis, entretanto, levantam a possibilidade de que alterações metabólicas desempenhem um papel primário na patogênese desta enfermidade.

As primeiras evidências de alterações metabólicas na DRPAD vieram de estudos *in vitro*. Análises metabolômicas de células MEF (*mouse embryonic fibroblast*) *Pkd1*^{-/-} mostraram que as mesmas consomem quantidades elevadas de glicose usando preferencialmente glicólise aeróbica para gerar energia (efeito *Warburg*), mesmo em condições de normóxia (60). Submetidas a deprivação de glicose, essas células reduzem sua taxa de proliferação e aumentam a de apoptose. A mesma alteração metabólica foi encontrada *in vivo* em camundongos severamente císticos *Pkd1*^{flox/-} Ksp^{Cre} (60). De fato, os rins dos camundongos císticos captaram mais glicose após receberem injeção de

glicose C¹³ e geraram mais lactato, produto final da glicólise aeróbica. Vale notar que MEFs *Pkd1*^{-/-} expostos à deprivação de glicose não são capazes de modular a expressão de LC3II (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-phosphatidylethanolamine conjugate*), marcador da formação do autofagossomo durante o processo de autofagia.

Em linha com tais achados, modelos de camundongo ortólogos à DRPAD apresentaram retardo significativo da progressão da doença renal cística quando tratados com 2-deoxi-glicose (2DG), um análogo não metabolizável da glicose (60, 61). Tal procedimento associou-se a menor razão peso renal/peso corpóreo (PR/PC) e menor índice cístico. Nesse esteio conceitual, restrição alimentar (RA) em níveis que não causam desnutrição lentificou a progressão da doença renal cística em camundongos *Pkd1*^{RC/RC} (62). Quando submetidos a RA precoce de 40% (da 6ª semana até 7,5 meses de vida), tais animais apresentaram redução significativa do tamanho renal, índice cístico, infiltrado inflamatório e fibrose, comparados a animais de mesmo genótipo que receberam ração *ad libitum*. Surpreendentemente, redução de apenas 10% do consumo de ração por dois meses, iniciada em fase mais avançada de doença renal (5º mês), também se acompanhou de um efeito benéfico. Esses trabalhos mostraram, ainda, que a atividade de AMPK (proteína quinase ativada por AMPc) está diminuída no rim dos animais císticos e que o tratamento com 2DG e RA foram capazes de restaurar a atividade dessa enzima.

AMPK, a principal enzima reguladora do balanço energético celular, modula negativamente mTOR, fosforilando e liberando a proteína Raptor do complexo mTORC1 (63) e aumentando a estabilidade do complexo hamartina/tuberina através da fosforilação de sítios estimulatórios da tuberina (64). Interessantemente, estudos revelaram desregulação concomitante de AMPK e mTOR na DRPAD, atuando de forma sinérgica (60, 62, 65). A atividade da AMPK depende de sua fosforilação por enzimas regulatórias, como LKB1 (*liver kinase B1*) e CAMKK (*calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase*). LKB1 é regulada negativamente por ERK, uma via classicamente ativada na DRPAD (66-68). Vale notar que LKB1 foi identificada no CAP formando um complexo com outras proteínas ciliares envolvidas em ciliopatias, incluindo PC1 (69). Experimentos *in vitro* demonstraram que o curvamento do CAP em resposta ao fluxo tubular ativa LKB1, a qual ativa AMPK na base do cílio (70). Vale destacar também que um estudo recente revelou desregulação da via CAMKK-AMPK-MTOR dependente de

Ca^{2+} na DRPAD, traduzida na diminuição da autofagia (65). O tratamento de células DRPAD com um inibidor de SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase) ativou CAMKK, aumentando a atividade de AMPK e diminuindo a de mTOR (65). Esses efeitos se traduziram, por sua vez, na normalização dos níveis de autofagia e na redução de cistogênese *in vitro*. Interessantemente, AMPK também pode contribuir diretamente para o crescimento cístico através da regulação de CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Takiar e cols mostraram que AMPK inibe CFTR, e que a ativação farmacológica dessa enzima com metformina reduziu o índice cístico em animais *Pkd1*^{flox/-}:Ksp^{Cre} (71).

SIRT1 (*Sirtuin-1*), outra proteína que atua como sensor do estado energético celular, também está alterada na DRPAD. Os níveis desta enzima, uma deacetilase dependente de NAD^+ , encontram-se aumentados em rins de camundongos mutantes para *Pkd1* (62, 72). SIRT1 interage e modula a atividade de proteínas que regulam o ciclo celular, como *retinoblastoma protein* e p53, contribuindo para a desregulação da proliferação celular presente na DRPAD. Em sintonia com essas observações, a inativação farmacológica de SIRT1 retardou a formação e o crescimento cístico em diferentes modelos de camundongo ortólogos à DRPAD (72).

Alterações na β -oxidação de ácidos graxos (OAG) e fosforilação oxidativa (FOX) também parecem participar da patogênese da DRPAD. Utilizando técnicas de perfil transcricional e análises metabolômica e lipidômica, Menezes e cols mostraram que OAG está diminuída em células renais ductais com inativação de *Pkd1* e que o metabolismo de glicose não sofre alterações significativas nas condições estudadas (73). Os autores mostraram, ainda, que uma diminuição modesta (1,85%) da ingestão de lipídeos levou a uma redução significativa da razão peso renal/peso corpóreo em dois modelos de camundongo deficientes em *Pkd1*. Resultados nessa mesma linha também foram descritos para ratos Han:SPRD, um modelo não ortólogo à DRPAD humana: ratos císticos submetidos a dieta com alto teor lipídico desenvolveram uma doença cística renal mais severa que os que receberam dieta pobre em lipídeos (74). Nesse sentido, Chiaravalli e cols mostraram redução na expressão da enzima acetil-CoA carboxilase β (ACC β) fosforilada em rim de animais císticos (61). ACC β catalisa a produção de malonil-CoA (MCoA), um inibidor da carnitina-palmitoil-transferase 1 (CPT1). CPT1, por sua vez, regula a entrada dos ácidos graxos na mitocôndria e, conseqüentemente, sua oxidação

(75). Devemos notar que ACC β é regulada pela AMPK e quando está fosforilada, encontra-se inativa (76). Dessa forma, uma diminuição nos níveis de ACC β fosforilada resultam em diminuição na OAG.

Outro achado bastante relevante foi o reconhecimento de expressão reduzida de PPAR α (*peroxisome proliferation-activated receptor- α*) em rins de camundongos ortólogos à DRPAD e em células humanas de epitélio cístico (77, 78). PPAR α é um receptor de hormônio nuclear que regula a expressão de inúmeros genes envolvidos na OAG e FOX. A expressão do micro RNA de interferência miR17 encontra-se aumentada na DRPAD (77). Nesse estudo, os autores mostraram que a inativação de miR17 em dois modelos císticos de camundongo ortólogos à DRPAD, de progressão rápida e lenta, atenuou o crescimento cístico, aumentou a expressão de PPAR α e melhorou o metabolismo mitocondrial. A descoberta da relação entre miR17 e PPAR α impulsionou estudos *in vitro* e *in vivo*, que sugerem inibição de PPAR α por miR17 na DRPAD. De fato, animais homozigotos para um alelo hipomórfico de *Pkd1* e sem expressão de PPAR α (*Pkd1*^{RC/RC}; *Ppara*^{-/-}) apresentaram fenótipo cístico mais grave que animais *Pkd1*^{RC/RC} (77). No sentido oposto, o aumento da atividade de PPAR α revelou-se benéfico em animais císticos (77, 78). A caracterização desse mecanismo ampliou-se com um estudo ainda mais recente, que mostrou que camundongos *Pkd1*^{RC/RC} tratados com o agonista de PPAR α fenofibrato apresentaram aumento da expressão de genes envolvidos na OAG e FOX, diminuição da proliferação celular e redução de infiltrado inflamatório (78).

Um trabalho recente mostrou que glutamina é preferencialmente utilizada como substrato anaplerótico do ciclo do ácido cítrico (CAC) e para manter a síntese de ácidos graxos em células renais *knockout* para *Pkd1* e em rins de pacientes com DRPAD (79). O aumento da glicólise aeróbica é central nesse remodelamento metabólico e medidas de intervenção que diminuam a captação de glutamina ou a síntese de ácidos graxos retardam o crescimento e a sobrevida de células deficientes em *Pkd1* (79).

Mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas, com função muito relacionada com sua morfologia. Estudos revelaram alterações morfológicas em mitocôndrias de células de revestimento cístico em rins de pacientes com DRPAD, de camundongos *Pkd1*^{flox/flox}; *Ksp*^{cre} e de ratos Han:SPRD Cy/+, assim como em células epiteliais renais de camundongo *knockout* para *Pkd1* (80, 81). Ishimoto e cols mostraram que as alterações mitocondriais encontradas nos modelos animais e células DRPAD também se

acompanharam de redução no número de cópias de DNA mitocondrial, diminuição da expressão da proteína PGC-1 (*proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α*) e aumento de marcadores de estresse oxidativo. Vale ressaltar que PGC-1 é um regulador chave da biogênese mitocondrial, sendo modulada por PPAR α . É interessante mencionar que células *Pkd1*^{+/-} provenientes de epitélio não cístico de pacientes DRPAD também apresentaram fenótipo mitocondrial alterado. Tratamento com MitoQuinona, um antioxidante mitocondrial, restabeleceu parâmetros funcionais e diminuiu a taxa de proliferação de células *Pkd1*^{+/-} (80). Esses resultados sugerem que anormalidades mitocondriais morfofuncionais ocorram precocemente na DRPAD e que sejam importantes na patogênese da doença. Avançando nesse cenário, um estudo publicado recentemente mostrou em um sistema *in vitro* que, seguindo-se à indução de sua expressão heteróloga, o fragmento C-terminal de PC1 (CTT) foi detectado na matriz mitocondrial (81). Vale dizer que a expressão de CTT em células *Pkd1*^{-/-} foi capaz de resgatar alguns parâmetros mitocondriais alterados. É importante atentar, contudo, que esse achado não foi confirmado em células sem superexpressão de CTT (81).

Enzimas mitocondriais envolvidas na FOX são dependentes de Ca²⁺, de modo que defeitos na homeostase desse cátion podem prejudicar o metabolismo oxidativo da mitocôndria. Padovano e cols mostraram que a interação de PC1 com EGLN3 (*egl-9 family hypoxia inducible factor 3*), uma proteína sensível aos níveis de O₂, modula a localização e a atividade de canal permeável a Ca²⁺ do complexo PC1/PC2. Tanto hipóxia quanto mutação em *Pkd1* leva a uma diminuição de liberação de Ca²⁺ do RE e diminuição de sua captação pela mitocôndria. Esta menor captação de Ca²⁺, por sua vez, pode prejudicar a fosforilação oxidativa mitocondrial (82). De modo interessante, células deficientes em PC1 (PC1KD) tratadas com um ativador do CaSR (*calcium-sensing receptor*) apresentaram aumento do conteúdo de Ca²⁺ mitocondrial e resgate do déficit energético (83). Na vigência de inibição de IP3R, entretanto, células PC1KD tratadas com ativador de CaSR não apresentaram resgate do fenótipo mitocondrial, sugerindo que IP3R seja fundamental para a mobilização de Ca²⁺ do RE para a mitocôndria (83).

A relação entre Ca²⁺ e mitocôndria também foi explorada por Kuo e cols em um trabalho publicado neste ano (84). O retículo endoplasmático (RE) e a mitocôndria estão fisicamente muito próximos, facilitando o fluxo de Ca²⁺ entre tais organelas. Esse trabalho mostrou que PC2 modula a expressão de mitofusina-2 (MFN2), uma proteína

essencial para fusão mitocondrial e que funciona como uma proteína de ancoramento entre RE e mitocôndria. Interessantemente, células *knockdown* para PC2 apresentaram aumento na expressão de MFN2, aumento da sinalização de Ca^{2+} mitocondrial mediada pelo RE e aumento da ativação bioenergética e mitocondrial (84).

As principais alterações metabólicas encontradas em células renais DRPAD estão esquematizadas na Figura 2.

Figura 2. Alterações metabólicas na DRPAD. ACCβ: acetil CoA carboxilase β; Akt: proteína quinase B; AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; B-Raf: *v-ras murine sarcoma viral oncogene homolog B1*; CAC: ciclo do ácido cítrico, CAMKK: *calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase*, cAMP: adenosina monofosfato cíclico; ERK: *extracellular signal-regulated protein kinase*; FOX: fosforilação oxidativa; Glut: Glutamina, IP3R: receptor de inositol trifosfato; LKB1: *liver kinase B1*, MTORC1: *mechanistic target of rapamycin complex 1*; OAG: β-oxidação de ácidos graxos, PC1: policistina-1; PC2: policistina-2; Rheb: *ras homolog enriched in brain*; RyR2: receptor de rianodina 2, SERCA: *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*, TSC2: tuberina; TSC1: hamartina. Proteínas ou mensageiros celulares na cor azul estão ativados ou aumentados na DRPAD, em amarelo estão inibidos ou reduzidos na DRPAD.

1.5 Patogênese da Disfunção Cardíaca Associada à DRPAD: Um Entendimento em Evolução

O envolvimento cardiovascular se inicia precocemente no curso da DRPAD e, na era pós-diálise, passou a se constituir na principal causa de mortalidade em indivíduos afetados pela doença (85, 86). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o fator de risco cardiovascular mais frequente para DREF em pacientes com DRPAD (87). Vale ressaltar que a HAS está presente em 50-70% dos pacientes antes que prejuízo na função renal seja detectado (88, 89) e 10 anos antes (32-34 anos) que na população com hipertensão arterial essencial (45-55 anos) (90).

A gênese da HAS é complexa e multifatorial na DRPAD. Em trabalho anterior de nosso laboratório, utilizamos dois modelos de camundongos geneticamente modificados ortólogos à DRPAD humana para elucidar aspectos centrais da patogênese da HAS nessa enfermidade (91). O primeiro modelo, heterozigoto para um alelo nulo de *Pkd1*, não apresenta cistos renais até a idade de 15 semanas, representando o estado de haploinsuficiência pura (*Pkd1*^{+/-}) que caracteriza o *background* genético na doença humana (92). O segundo modelo consiste em um camundongo *knockout* condicional (*Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}), com mutações inativadoras somáticas em ambos os alelos *Pkd1* distribuídas em mosaico (92). Essa estratégia nos permitiu mostrar que a expansão cística é o principal determinante para o desenvolvimento da HAS na DRPAD. A expansão dos cistos leva a compressão vascular setorial e, conseqüentemente, a áreas focais de isquemia renal, ativando o sistema renina angiotensina (SRA) (91). Nesse estudo, mostramos um papel central do SRA intrarrenal nesse processo.

Outros mecanismos importantes também podem contribuir para o desenvolvimento da HAS na DRPAD. Entre eles, destacam-se uma resposta vasodilatadora dependente de endotélio prejudicada, acompanhada de diminuição na produção de óxido nítrico (NO) (93-96) e hiperatividade do sistema simpático (97, 98). À semelhança do que ocorre nas células epiteliais renais, acredita-se que PC1 e PC2 também se associem no CAP das células endoteliais vasculares, atuando como um sensor ao fluxo sanguíneo, capaz de modular a concentração de cálcio intracelular e a produção de NO (99, 100). O fato de células embrionárias endoteliais de camundongos *Pkd1*^{-/-} e *Pkd2*^{-/-} perderem a capacidade de gerar NO em resposta à tensão de cisalhamento ampara esse conceito (101, 102).

O coração adulto não é capaz de se regenerar após injúria, uma vez que cardiomiócitos adultos praticamente não se proliferam. Como resposta adaptativa, as células cardíacas se hipertrofiam e tornam-se binucleadas. Nesse sentido, o remodelamento cardíaco observado em pacientes com DRPAD poderia ser considerado uma resposta secundária à HAS. Esse conceito é amparado pelo fato de pacientes com DRPAD hipertensos apresentarem uma maior frequência de hipertrofia de ventrículo esquerdo que pacientes normotensos (103). Homens com DRPAD hipertensos, contudo, apresentam um maior índice de massa do ventrículo esquerdo que hipertensos essenciais (104), e pacientes com DRPAD normotensos também apresentam esse parâmetro aumentado comparados a indivíduos controle não afetados (105). Além disso, Oflaz e cols detectaram disfunção diastólica biventricular em pacientes com DRPAD hipertensos e normotensos, ambos com função renal preservada, sugerindo que alterações cardíacas devam preceder o desenvolvimento de HAS na DRPAD (106). Mais recentemente, por fim, Paavola e cols observaram maior prevalência de cardiomiopatia dilatada idiopática (CMDI) em pacientes DRPAD, principalmente com mutações em *PKD2* (DRPAD2). Vale notar que CMDI foi detectada em pacientes DRPAD2 hipertensos e normotensos (107).

Nesse cenário, estudos recentes voltaram-se à elucidação mais profunda dos mecanismos envolvidos na determinação e evolução do fenótipo cardíaco associado à DRPAD. Um importante estudo conduzido por Balbo e cols em nosso laboratório mostrou que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}), animais não císticos e normotensos, apresentaram disfunção sistólica e redução da deformação miocárdica, caracterizadas por diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e redução de *strain* e *strain rate* (108). Camundongos císticos hipertensos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}, por sua vez, apresentaram não apenas diminuição de FEVE e de deformabilidade cardíaca, como também aumento da relação entre as ondas E/A e do tempo de desaceleração da válvula mitral, alterações consistentes com disfunção diastólica (108). Análises de tecido cardíaco de animais *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} mostraram índices de apoptose aumentados e fibrose discreta. Por fim, camundongos *Pkd1*^{V/V}, um modelo severamente cístico, também apresentou diminuição da FEVE na idade de 18 dias (Figura 3). Esses resultados apoiam fortemente um papel primário da deficiência de *PKD1/Pkd1* na disfunção cardíaca associada à DRPAD, enquanto sugerem que a elevação da pressão arterial possa piorar tal fenótipo com a idade (108).

Figura 3. A) Análise da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE%) de camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT) e *Pkd1*^{V/V} (VV) com 18 dias de vida; B) Imagens representativas da FEVE em modo M. Retirado e adaptado de Balbo *et al.*, 2016.

Tais achados não surpreendem, na medida em que as policistinas se associam ao desenvolvimento cardiovascular. De fato, camundongos *Pkd1*^{-/-} apresentam letalidade embrionária devido a anormalidades no desenvolvimento cardíaco e PC1 se expressa nos tratos de saída cardíaca, coxins endocárdicos, folhetos valvares e miocárdio (19). Interessantemente, PC1 parece estar envolvida em diferentes respostas modulatórias em estado basal e frente a insultos cardíacos. Recentemente, Pedrozo e cols. demonstraram que PC1 é necessária para o desenvolvimento de hipertrofia induzida por estiramento/sobrecarga de pressão (HIE) em camundongos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (109). Esse estudo revelou que PC1 atua na estabilização e na atenuação da degradação da subunidade $\alpha 1C$ do canal de Ca^{2+} do tipo L (LTCC), um canal central no desenvolvimento da hipertrofia dependente de Ca^{2+} . Frente a um insulto de estiramento, portanto, PC1 favorece o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (109). PC1 também pode interagir e regular canais de potássio (Kv) envolvidos na repolarização dos cardiomiócitos (110). A inativação de *Pkd1* em cardiomiócitos resultou em um potencial de ação de menor duração, um efeito oposto ao determinado pela superexpressão da porção C-terminal de PC1. Vale destacar que os cardiomiócitos deficientes em *Pkd1* exibem estoque de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático reduzido e diminuição da atividade de SERCA. Esse estudo revelou, portanto, que PC1 interage primariamente com canais Kv, modulando a repolarização e a contratilidade dos cardiomiócitos (110).

PC2 também está envolvida em respostas modulatórias associadas à função cardíaca basal e a respostas frente a insultos. Um estudo conduzido em *zebrafish* mostrou que PC2 regula a ciclagem de Ca^{2+} intracelular, fundamental para a atividade funcional cardíaca. Vale notar que a falta de PC2 levou a uma redução de débito cardíaco e frequência cardíaca, bloqueio atrioventricular e edema (107). Esse estudo sugere, também, que as alterações observadas em mutantes para *Pkd2* sejam secundárias às anormalidades do Ca^{2+} intracelular encontradas nesses animais. Um estudo subsequente revelou, ainda, que camundongos *Pkd2*^{+/-} apresentam um acoplamento excitação-contração dessensibilizado em cardiomiócito e contratilidade aumentada em resposta a estímulo adrenérgico (111). Vale ressaltar que tais alterações funcionais se acompanharam de aumento da expressão cardíaca de RyR2 e SERCA e da fosforilação de troponina I (TropI) por PKA, assim como de diminuição da fosforilação de PLB (*Phospholamban*) por PKA em animais haploinsuficientes para *Pkd2*. Mais recentemente, esse grupo mostrou que camundongos haploinsuficientes para *Pkd2* de nove meses de idade cursaram com paredes de ventrículo esquerdo mais finas, consistentes com cardiomiopatia dilatada, além de FEVE diminuída (112). Em uma extensão conceitual, resultados de um estudo seguinte mostraram que camundongos selvagens tratados com isoproterenol por sete dias apresentaram aumento da massa do VE e aumento de expressão cardíaca de PC2, cromogranina B (CGB) e peptídeo natriurético tipo B (PNB). Três dias após o término da estimulação adrenérgica, o aumento da massa do VE foi revertido. Camundongos *Pkd2*^{+/-}, por sua vez, não apresentaram aumento de PC2-CGB-PNB e o aumento da massa do VE não foi revertido após o término da estimulação adrenérgica (113). Esses achados sugerem que estresse cardíaco possa modular o eixo de sinalização PC2-CGB-BNP, e que esta via regule a produção de peptídeos natriuréticos cardioprotetores. O comprometimento deste mecanismo, portanto, pode potencialmente contribuir para a disfunção cardíaca em pacientes com DRPAD.

PC2 parece ser também essencial no controle da autofagia em células cardíacas (114, 115). Cardiomiócitos derivados de células-tronco com silenciamento de *PKD2* (HES2-CM) apresentaram redução do fluxo autofágico e aumento de apoptose em resposta à deprivação de glicose. Nestas células, restrição de glicose não foi capaz de modular a expressão de mTOR e AMPK fosforiladas. Esses autores também sugerem que a interação entre PC2 e RyR2 module a liberação de Ca^{2+} do RE nas células cardíacas e que alterações nesse processo resultem no fenótipo alterado encontrado nas células com deficiência de PC2 (115). Em concordância com esse achado, cardiomiócitos isolados de camundongos com inativação de *Pkd2* em tecido cardíaco (*Pkd2*^{F/F}; *α Mhc-cre*) também apresentaram fluxo autofágico prejudicado frente a

deprivação de nutrientes e alterações de transiente de Ca^{2+} intracelular em resposta à estimulação elétrica e à cafeína (114).

O coração é um órgão metabolicamente muito ativo. De fato, 25 a 30% do volume dos cardiomiócitos é constituído por mitocôndrias. Vale notar que a maior parte da energia empregada pelo coração é proveniente da β -oxidação de ácidos graxos (OAG, 60-80%), seguida da utilização de glicose, lactato e corpos cetônicos (116). A patogênese da insuficiência cardíaca é complexa e depende de muitos fatores; no entanto, o papel da disfunção mitocondrial tem sido amplamente reconhecido nas últimas décadas. O comprometimento funcional da mitocôndria leva a uma baixa produção de ATP inicialmente, diminuindo a capacidade de contração/relaxamento do coração. Em estágios mais avançados, induz a morte de cardiomiócitos (117). O coração com déficit energético tenta restabelecer sua produção de ATP de duas formas: aumentando a OAG e estimulando as vias glicolíticas, uma vez que a glicose gera mais moléculas de ATP por mol de O_2 (118). Em situações patológicas, no entanto, é comum observarmos uma reativação do perfil genético fetal associado à diminuição do uso dos ácidos graxos como substrato energético e aumento do uso de glicose (119-122). Nesse sentido, um estudo recente revelou aumento de expressão dos genes fetais *Nppb* e *Acta1* em coração de camundongos cpk, um modelo animal de rápida progressão de doença policística renal que desenvolve hipertrofia e alterações de repolarização ventricular (123).

Nesse cenário dinâmico, envolvendo um importante papel da disfunção metabólica na patogênese renal da DRPAD, o intenso e particular perfil metabólico do cardiomiócito e a presença de disfunção miocárdica primária na DRPAD, formulamos a hipótese de que as células cardíacas também pudessem apresentar alterações metabólicas e mitocondriais relevantes nesta doença, contribuindo para o desenvolvimento de seu fenótipo cardíaco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo central

O objetivo central deste projeto foi investigar as bases metabólicas e celulares da patogênese da disfunção cardíaca associada à DRPAD. Para tanto, avaliamos parâmetros representativos do metabolismo energético cardíaco de diferentes naturezas em um modelo de camundongo com deficiência de *Pkd1* (*Pkd1*^{V/V}), homozigoto para um alelo hipomórfico de *Pkd1*, severamente cístico (11) e com disfunção cardíaca precoce (108) (Figura 3).

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a razão peso cardíaco/peso corpóreo de camundongos *Pkd1*^{V/V} (VV) e seus controles *Pkd1*^{+/+} (WT), na idade de 14-15 dias.
2. Determinar o diâmetro de cardiomiócitos de camundongos VV e WT por meio de análise morfométrica.
3. Avaliar o perfil de expressão do marcador de hipertrofia cardíaca ERK2 em tecido cardíaco de camundongos VV e WT.
4. Avaliar e caracterizar apoptose em tecido cardíaco de camundongos VV e WT por meio de imunistoquímica para caspase-3 clivada e expressão dos genes *Bcl2*, *Bcl2-XL* e *Bax*.
5. Avaliar o perfil inflamatório de tecido cardíaco de camundongos VV e WT por meio da expressão de *Il1β* e *Il6* e galectina-3.
6. Avaliar o perfil de expressão das proteínas AMPK, ACCβ, RPS6 (*ribosomal protein S6*) e PGC-1α e dos genes *Pgc1α*, *Ppara*, *Hif1α* (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*), *Cpt1* (*carnitine palmitoyltransferase 1*), *Sirt1*, *Nppa* (*natriuretic peptide A*), *Acta1* (*actin alpha1*), *Myh7* (*myosin heavy chain 7*), *Myh6* (*myosin heavy chain 6*) e *Fasn* (*fatty acid synthase*) em tecido cardíaco de camundongos VV e WT.

7. Avaliar a densidade volumétrica citoplasmática de mitocôndrias e gotículas lipídicas em tecido cardíaco de camundongos VV e WT.
8. Realizar análises morfométricas de mitocôndrias em tecido cardíaco de camundongos VV e WT.
9. Avaliar o perfil de expressão das proteínas envolvidas no processo de dinâmica mitocondrial MFN2 (*mitofusin-2*) e DRP1 (*dynamic-related protein-1*) em tecido cardíaco de camundongos VV e WT.
10. Avaliar a taxa de consumo de oxigênio de corações de camundongos VV e WT e de cardiomiócitos extraídos de neonatos VV e WT em resposta à glicose.
11. Avaliar o perfil metabolômico de corações VV e WT, pela técnica de ressonância magnética nuclear.
12. Avaliar o potencial terapêutico da metformina, por meio da análise de sobrevivência de animais VV tratados e não tratados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Utilizamos como modelo experimental um camundongo homozigoto para um alelo hipomórfico de *Pkd1* que impede a clivagem da PC1 no sítio GPS (*Pkd1^V*) (11). Animais heterozigotos (*Pkd1^{V/+}*) são férteis e não apresentam fenótipo cístico, enquanto os homozigotos para o alelo hipomórfico (*Pkd1^{V/V}*) apresentam um fenótipo cístico progressivo que se inicia no terceiro dia pós-natal, insuficiência renal progressiva e menor crescimento corporal. Além da grave evolução cística renal, esses animais apresentam disfunção sistólica com 18 dias de vida (108) (Figura 3). Sua genotipagem baseou-se na técnica de PCR associada a um par de *primers*: um sense (5'-CCAAACAACCTCAGACCAGG-3') e outro antisense (5'-ACCAGGACAGCAAGAAAAC-3'). O alelo mutante *Pkd1^V* possui um sítio FRT retido no local de inserção do gene de resistência à neomicina (Neo) e foi identificado pela amplificação de um produto de 329 pb, enquanto o alelo selvagem *Pkd1⁺* foi identificado por um produto de 280 pb. A identificação dos produtos foi realizada em gel de agarose 2% corado com *SYBR Safe DNA gel Stain* (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EUA) e a visualização em transiluminador e foto-documentador ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) (Figura 4). Os camundongos foram eutanasiados por meio de decapitação sob anestesia/inconsciência induzida pela administração intraperitoneal de tiopental (0,5 mg/g de peso corpóreo).

Nosso estudo foi conduzido em camundongos de 14 a 15 dias de idade para experimentos com tecido cardíaco e neonatos de 1 a 3 dias de idade para cultura de cardiomiócitos. Com exceção da curva de sobrevivência, todos os experimentos com tecido e de extração de cardiomiócitos foram conduzidos em animais machos, de modo a evitar heterogeneidade experimental secundária ao sexo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da USP/Hospital das Clínicas da FMUSP (nº 193/15) e seguiu os padrões nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais.

Figura 4. Genotipagem em gel de agarose 2%. PM: marcador de peso molecular de 100bp. A e B: camundongos *Pkd1*^{+/+} (WT); C: *Pkd1*^{V/V} (VV); D, E e F: *Pkd1*^{+/V} (HT).

3.2 Curva de sobrevida e tratamento com metformina

A geração de camundongos *Pkd1*^{V/V} baseou-se no cruzamento entre pais heterozigotos *Pkd1*^{V/+}. A partir de P2, os animais foram tratados diariamente com metformina (Sigma, San Luis, MO, EUA) 62,5 mg/kg de peso corpóreo (PC) ou salina via intraperitoneal, até sua morte. A verificação dos óbitos foi feita diariamente. Os animais mortos foram recolhidos e uma amostra de tecido caudal foi coletada para genotipagem.

3.3 Análise histológica

Os corações dos camundongos VV e WT foram coletados seguindo-se à eutanásia, pesados e parte do material destinado ao processamento histológico. As amostras de tecido cardíaco foram fixadas em formalina de Millonig (formol 4% em tampão de fosfato de sódio, pH 7,4) por cerca de 24 h e, a seguir, processadas em uma série graduada de etanol, incluídas em parafina e submetidas a cortes histológicos com espessura de 3 μ m. O material foi então corado com hematoxilina-eosina para observação das estruturas celulares sob microscopia de luz. A análise morfométrica dos cardiomiócitos baseou-se na análise de 50 fibras cardíacas por animal, tendo a mensuração de seu diâmetro sido realizada com o *software* Image J (124).

3.4 Imunoistoquímica para caspase-3 clivada

A análise de apoptose celular foi realizada pela técnica de imunoistoquímica para caspase-3 clivada. As lâminas foram inicialmente desparafinizadas, hidratadas e submetidas a recuperação antigênica em panela de vapor por 35 min em tampão citrato pH 6,0 (*Target retrieval solution concentrated* 10X, Dako, Carpinteria, CA, EUA). Após lavagens em água corrente e água destilada, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% diluído em metanol, por duas vezes de 10 min. Para evitar ligações inespecíficas, realizamos ainda bloqueio com o reagente *Rodent Block M* (BioCare Medical, Concord, CA, EUA) por 30 min a 37°C e com o reagente CAS-BlockTM (Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) por 10 min a 37°C. Cada lâmina foi então incubada com o anticorpo primário *overnight* a 4°C (CP229B, BioCare), diluído 1:1000 em tampão fosfato (PBS) e acrescido de albumina sérica bovina (BSA) 1%. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o polímero *Rabbit on Rodent HRP-Polymer* (BioCare) durante 30 min a 37°C. Após lavagem em PBS, as lâminas foram reveladas com o substrato cromogênico DAB (Dako) e contracoradas com hematoxilina de Carazzi. Em cada secção de tecido foram analisados o máximo de campos possível no aumento de 400x. As taxas de apoptose foram expressas como o número de células positivas por campo.

3.5 Microscopia eletrônica

Fragmentos de tecido destinados à microscopia eletrônica foram fixados por 2 h à temperatura ambiente (TA), em tampão de Karnovsky (paraformaldeído 1% + glutaraldeído 3% em tampão de cacodilato de sódio 0,07 M). Após 2 h, o fixador foi substituído por tampão cacodilato de sódio 0,07 M e as amostras processadas, emblocadas e cortadas. Os fragmentos de coração foram então incubados com tetróxido de ósmio aquoso 2%, desidratados em uma série gradual de etanol e emblocados em resina L.R.White (London Resin Company, Berkshire, Inglaterra, Reino Unido). Secções ultrafinas foram obtidas utilizando o ultramicrotomo Ultratome LKB, montadas em tela de níquel e contracoradas com acetato de uranil 4% e citrato de chumbo Reynolds. As imagens foram adquiridas em microscópio eletrônico de transmissão (Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 SpiritBiotwin, Field Electron and Ion Company, Hillsboro, OR, EUA). Foram adquiridas 10 imagens por animal (aumento de 9300x) e as quantificações de densidade volumétrica citoplasmática das mitocondriais e das gotículas

lipídicas foram realizadas empregando o *software* Image J com o auxílio de uma grade projetada na imagem de 300 quadrados de $0,5\mu\text{m}^2$ cada. As análises morfométricas das mitocôndrias também foram feitas usando o mesmo software e incluíram os seguintes parâmetros: área, perímetro, maior diâmetro (Feret's *diameter*), índice de esfericidade (*roundness*, 1 indica uma esfera perfeita) e razão entre comprimento e largura (*aspect ratio*).

3.6 RT-PCR em Tempo Real

As amostras de tecido cardíaco congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C foram utilizadas para extração de RNA total utilizando o kit *ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System* (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A homogeneização do tecido cardíaco foi realizada no equipamento *Bead Ruptor 24* (Omni Inc., Kennesaw, GA, EUA), com microesferas de cerâmica de 1,4 mm de diâmetro, a 5000 mpm por 45 s. A quantificação de RNA foi realizada em espectrofotômetro Qubit 2.0, utilizando o kit *RNA Broad Range (BR)* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Por fim, as amostras de RNA foram submetidas a verificação da integridade por eletroforese capilar no equipamento Tape Station 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A síntese de cDNA foi realizada a partir de $1\mu\text{g}$ de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm e direcionadas para a reação de transcrição reversa utilizando o kit ImProm-II (Promega). As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific) utilizando ensaios *TaqMan* (Thermo Fisher Scientific) para os genes *Bcl2* (B-cell lymphoma protein 2), *Bcl2-XL* (B-cell lymphoma-extra-large), *Bax* (BCL2-associated X protein), *Il6* (interleukin-6), *Il1b* (interleukin-1 β), *Col1a1* (collagen type I alpha-1) e *Col3a1* (collagen type III alpha-1) ou *mix Power Up Sybr green* (Thermo-Fisher) para *Sirt1* (sirtuin-1), *Cpt1* (carnitine palmitoyltransferase 1A), *Ppara* (peroxisome proliferator-activated receptor α), *Pgc1a* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α), *Hif1a* (hypoxia inducible factor-1 α), *Acta1* (actin alpha 1, skeletal muscle), *Nppa* (natriuretic peptide A), *Myh7* (myosin heavy chain 7) e *Myh6* (myosin heavy chain 6). Os ensaios *TaqMan* e as sequências dos *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. Utilizamos o gene constitutivo *Gapdh* como controle endógeno das reações. Os produtos das reações de qPCR foram quantificados pelo método relativo $\Delta\Delta\text{Ct}$ e expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 1. Ensaios *TaqMan* e sequências dos *primers*

Gene	<i>Ensaio TaqMan</i>		
<i>Bax</i>	Mm00432051_m1		
<i>Bcl2</i>	Mm00477631_m1		
<i>Bcl2-XL</i>	Mm00437783_m1		
<i>Il1β</i>	Mm 00434228_m1		
<i>Il6</i>	Mm 00446190_m1		
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1		
<i>Col3a1</i>	Mm00802300_m1		
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1		
Gene	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>	
<i>Ppar</i>	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA	
<i>Pgc1</i>	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG	
<i>Hif1a</i>	ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG	CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG	
<i>Sirt1</i>	TGATTGGCACCGATCCTCG	CCACAGCGTCATATCATCCAG	
<i>Cpt1</i>	GCACACCAGGCAGTAGCTTT	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA	
<i>Nppa</i>	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	GGGGGCATGACCTCATCTT	
<i>Acta1</i>	CCCAAAGCTAACCGGGAGAAG	CCAGAATCCAACACGATGCC	
<i>Myh6</i>	GCCCAGTACCTCCGAAAGTC	GCCTTAACATACTCCTCCTTGTC	
<i>Myh7</i>	CCTGCGGAAGTCTGAGAAGG	CTCGGGACACGATCTTGGC	
<i>Gapdh</i>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

3.7 Western blotting

As amostras de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão de homogeneização T-PER (Thermo Fisher Scientific) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Thermo Fisher Scientific). A homogeneização foi realizada com o equipamento *Bead Ruptor* 24 (Omni Inc.), com microesferas de cerâmica de 1,4 mm de diâmetro, a 5000 rpm (movimentos por minuto) por 45 s. O homogenato foi centrifugado a 13400 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a determinação da concentração de proteínas utilizando o reagente Pierce 660 nm (Thermo Fisher Scientific). Quantidades equitativas de proteína foram submetidas a SDS-PAGE em gel de gradiente de poliacrilamida 4-20% (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad). O bloqueio foi realizado com BSA 3% ou leite em pó desnatado 5% por 2 h (Tabela 2). As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários específicos para camundongo anti-ERK2 total e fosforilada, anti-galectina-3, anti-AMPK total e fosforilada, anti-ACCβ fosforilada, anti-RPS6 total e fosforilada, anti PGC1α, anti-MFN2, anti-DRP1 e anti-GAPDH, seguidas da incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP por 1 h, TA (Tabela 1). A revelação foi realizada com *Clarity Western ECL* (Bio-Rad). O sinal quimioluminescente, por sua vez, foi detectado pelo sistema digital de aquisição de imagens ALLIANCE 4.7 (UVITEC) e quantificado por análise densitométrica com o *software* Image J. O sinal quimioluminescente de cada proteína alvo foi normalizado pelo respectivo sinal de GAPDH e os resultados expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 2. Anticorpos e diluições

Proteína	Fabricante	Bloqueio	Anticorpo 1º		Anticorpo 2º
ERK1/2	Cell signaling #9102	TBST + Molico 5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
P-ERK1/2	Cell signaling #9101	TBST + BSA5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
Galectina-3	Hibridoma M3/38*	TBST + Molico 5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-rato	1:8000 em TBST + Molico 5%
AMPK	Cell signaling #2603	TBST + Molico 5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
P-AMPK	Cell signaling #4188	TBST + BSA5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
P-ACCβ	Santa Cruz sc30446R	TBST + BSA5%	1:200 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
RPS6	Cell signaling #2217	TBST + Molico 5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
P-RPS6	Cell signaling #2215	TBST + BSA5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
DRP1	Cell signaling #8570	TBST + Molico 5%	1:2000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
MFN2	Cell signaling #9482	TBST + Molico 5%	1:1000 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
PGC1α	Santa Cruz sc13067	TBST + Molico 5%	1:200 em TBST + BSA 3%	Anti-coelho	1:8000 em TBST + Molico 5%
GAPDH	R&D System MAB5718	TBST + Molico 5%	1:2000 em TBST + BSA 3%	Anti-camundongo	1:8000 em TBST + Molico 5%

*Gentilmente cedido pelo Dr.Roger Chammas

3.8 Cultura primária de cardiomiócitos

Cardiomiócitos foram isolados e cultivados com o kit *Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation kit* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Os corações dos neonatos foram dissecados e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo solução HBSS gelada. Cada coração foi extraído separadamente. O órgão foi picotado em fragmentos de 1-3 mm³ e lavado duas vezes com HBSS. Em seguida o tecido foi incubado com um meio de digestão composto por 200 uL da enzima 1 + 10 uL da enzima 2, por 2 h a 37°C. Após cuidadosa remoção do meio de digestão, o tecido foi lavado novamente com HBSS. O tecido foi então dissociado com o auxílio de uma pipeta P1000 em 500 uL de meio de cultura acrescido de soro fetal bovino 10% e penicilina/estreptomicina 1% (meio completo). Após a dissociação completa do tecido, mais 500 uL de meio completo foram adicionados a cada microtubo. Cada coração digerido rendeu entre 1 x 10⁶ e 2 x 10⁶ células/ml. Para os experimentos de OCR, as células viáveis foram contadas e 40.000 células foram plaqueadas nas microplacas *Seahorse XF24 Cell Culture Microplate* (Agilent Technologies). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C com CO₂ 5%. Após 24 h, o meio de cultura inicial foi substituído por meio completo suplementado com *Cardiomyocyte Growth Supplement*. A cultura foi monitorada diariamente e o meio suplementado foi renovado a cada 2-3 dias. Com base na informação do fabricante de que cerca de 80% das células da cultura são cardiomiócitos no 7º dia de cultivo, nossos experimentos foram conduzidos nesse dia experimental.

3.9 Medidas de consumo de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio do tecido cardíaco foi obtida no equipamento de respirometria de alta resolução Oroboros O2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Tirol, Austria). Para tanto, os corações foram dissecados e imediatamente inseridos na câmara do equipamento contendo solução de Krebs (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 1,25 mM e glicose 10 mM, pH7,4) 37°C e sob agitação constante. A aquisição dos dados foi realizada durante 5 min pelo *software* DatLab4 (Oroboros Instruments). Os resultados foram normalizados pelo peso do coração.

O consumo de oxigênio dos cardiomiócitos em cultura, por sua vez, foi avaliado utilizando o equipamento *Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Agilent Technologies). O meio de cultura foi removido antes do ensaio e substituído por 0,5 mL de meio de experimentação sem bicarbonato (NaCl 114 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1,16 mM, CaCl_2 2,5 mM e glicose 25 mM, pH 7,2). As células foram então incubadas a 37°C por 1 h na ausência de CO_2 . As medidas de consumo de oxigênio foram obtidas empregando a metodologia do teste de estresse mitocondrial da Agilent (*Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress*). Nesse ensaio a respiração basal é obtida no início do experimento, antes da adição dos moduladores da respiração mitocondrial. O consumo de oxigênio associado à síntese de ATP e associado ao vazamento de elétrons foi obtido após a adição de oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$). Na sequência, o desacoplador CCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone) foi acrescentado na concentração de 5 μM para a determinação da respiração máxima. Por fim, a respiração não mitocondrial foi analisada pela adição de rotenona 1 μM + antimicina A 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5). Esse ensaio também permitiu a mensuração da acidificação do meio (mpH) em resposta aos moduladores descritos acima. Os dados foram analisados utilizando o *software* Seahorse Wave (Agilent Technologies).

Figura 5. Esquema de avaliação da respiração mitocondrial utilizando modulares da cadeia transportadora de elétrons (reproduzido do manual do usuário do kit 103015-100 da *Agilent Technologies*).

3.10 Análise metabolômica

As análises metabolômicas foram realizadas por ressonância magnética de prótons em alta resolução. Para tanto, corações de animais VV e WT foram pulverizados em nitrogênio líquido com o auxílio de um cadinho e pistilo de porcelana. O tecido pulverizado foi submetido à extração de metabólitos por meio de metanol e clorofórmio. Nesse procedimento, aproximadamente 30 mg de tecido pulverizado foram ressuspensos em 334 μL de metanol e 166 μL de clorofórmio e vortexados por 1 min. Na sequência, as amostras foram incubadas em banho ultrassônico (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, EUA) por 5 min a 40 kHz. As amostras foram mantidas em gelo por 15 min e, após esse período de incubação, 250 μL de clorofórmio e 250 μL de água ultrapura (1:1 v/v) foram adicionados às mesmas. Seguiu-se, então, centrifugação a 14000 rpm a 4°C e por 25 min para separação da fase polar. Esta fase foi coletada e submetida a liofilização por 6 h em *Speedvac* (Eppendorf, Hamburg, Germany). Tais amostras foram diluídas a seguir em 540 μL de água deuterada acrescida de 60 μL de tampão fostato a 100 mM contendo 0,5 mM de TMSP (*3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionic acid*), este utilizado como referência de *shift* químico. A análise do perfil metabólico e a determinação das concentrações de metabólitos foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências do CNPEM. Os espectros ^1H RMN das amostras foram adquiridos utilizando o espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Varian-Agilent Inova* (Agilent Technologies), equipado com sonda criogênica de tripla ressonância operando na frequência de ^1H de 600 MHz e temperatura constante de 25°C. Um total de 256 varreduras foram coletadas com 32.000 pontos e tempo de aquisição de 4 s em uma janela de largura espectral de 16 ppm. Um tempo de espera de 1.5 s foi incorporado entre as varreduras, durante o qual um campo contínuo de radiofrequência de pré-saturação de água foi aplicado. As correções da fase espectral e da linha base, bem como a identificação e quantificação dos metabólitos presentes nas amostras, foram realizadas com o *software* Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc, Edmonton, Alberta, Canadá). A área do pico individual de cada metabólito foi normalizada pela área total do espectro para cada animal. Tal medida visou o ajuste do efeito de massa de tecido pesado, uma vez que junto com o tecido podemos pesar cristais de gelo que se formam durante a pulverização do tecido no cadinho de porcelana.

3.11 Análise estatística

Os dados contínuos foram comparados à curva normal pelo teste de Shapiro-Wilk e classificados em paramétricos ou não paramétricos. A comparação entre dois grupos foi avaliada pelo teste t de Student bicaudal para dados paramétricos ou com o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Os dados de sobrevida foram analisados pela curva de Kaplan-Meier e teste de Log-rank. Essas análises foram realizadas com o *software* GraphPad 8.0 Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os resultados de metabolômica, por sua vez, foram inicialmente analisados por métodos multivariados e, posteriormente, por métodos univariados. Inicialmente os dados foram analisados pelo *partial least square discriminant analysis* (PLS-DA) e os metabólitos discriminatórios identificados pelo *VIP score* (*variable importance on the projection*). Os dados de metabolômica também foram visualizados por *Volcano plot*, usando como critério de seleção *fold change threshold* de 1,5 no eixo x e t-test de 0,1 no eixo y, e por *Heatmap*, utilizando o método de distância euclidiana e algoritmo de clusterização de Ward. As análises de metabolômica foram realizadas utilizando as ferramentas online do *software* MetaboAnalyst 2.0 (125). Neste estudo aceitamos risco alfa menor ou igual a 5% e risco beta menor ou igual a 20%.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação de parâmetros biométricos, morfométricos e de hipertrofia cardíaca

Camundongos VV apresentaram corações com menor peso comparados aos controles WT na idade de 14-15 dias de vida ($32,5 \pm 8,7$ vs $42,8 \pm 6,9$ mg, $p < 0.001$) (Figura 6 A). Na mesma idade, o diâmetro das fibras cardíacas foi avaliado por histoquímica e não observamos diferença entre os dois grupos (Figura 6 B). A expressão proteica de P-ERK2, um marcador de hipertrofia cardíaca, também não diferiu entre os grupos (Figura 6 C). No entanto, quando o peso do coração foi normalizado pelo peso corpóreo, observamos um aumento nos animais VV quando comparados aos WT (Figura 6 D). Esse aumento nos animais VV decorreu aparentemente da perda significativa de peso corpóreo que observamos nesses animais perto de seu óbito (15-16 dias de vida) (Figura 6 E). A composição dos dados de expressão de P-ERK2 e de massa cardíaca sugerem fortemente, portanto, que a deficiência em *Pkd1* associada à ausência de sua clivagem no sítio GPS não induz uma resposta hipertrófica em coração dos camundongos.

4.2 Avaliação de apoptose no tecido cardíaco

As análises imunoistoquímicas para caspase-3 clivada em tecido cardíaco revelaram maior taxa de apoptose em camundongos VV que em WTs [$0,160$ ($0,102$ - $0,353$) vs $0,043$ ($0,0$ - $0,105$) células positivas/campo, $p < 0,01$] (Figura 7 A e B). Nessa linha, observamos que a expressão cardíaca do gene anti-apoptótico *Bcl2* está diminuída nos animais VV em comparação aos WTs ($0,67 \pm 0,15$ vs $1,06 \pm 0,37$, $p < 0,05$) (Figura 7 C), enquanto a expressão dos genes *Bcl2-XL* e *Bax* não diferiu entre os grupos (Figuras 7 D e E, respectivamente)

Figura 6. Parâmetros estruturais e hipertróficos cardíacos. Análise comparativa de A) Peso cardíaco em camundongos $Pkd1^{+/+}$ (n = 18) e $Pkd1^{V/V}$ (n = 18); B) Diâmetro do cardiomiócito em corações $Pkd1^{+/+}$ (n = 5) e $Pkd1^{V/V}$ (n = 5) e C) Expressão de ERK2 fosforilada em corações $Pkd1^{+/+}$ (n = 8) e $Pkd1^{V/V}$ (n = 8); D) Peso cardíaco normalizado por peso corporal em camundongos $Pkd1^{+/+}$ (n = 18) e $Pkd1^{V/V}$ (n = 18); E) Perda de peso corporal entre P12 e P15-16 dias de vida (n = 13). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. * P < 0,05 e *** P < 0,001.

Figura 7. Apoptose no tecido cardíaco. A) Análise comparativa de marcação para caspase-3 clivada entre corações $Pkd1^{+/+}$ (n = 10) e $Pkd1^{V/V}$ (n = 10); B) Imagem representativa para $Pkd1^{+/+}$ e C) Imagem representativa para $Pkd1^{V/V}$. Aumento original, 400x; barra de escala 10 μ m; setas indicam marcação positiva para caspase-3 clivada. Análise comparativa da expressão do gene $Bcl2$ (D), $Bcl2-XL$ (E) e Bax (F) entre corações $Pkd1^{+/+}$ (n = 8) e $Pkd1^{V/V}$ (n = 8);. Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados apresentados em mediana e intervalo interquartil. * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4.3 Avaliação de inflamação no tecido cardíaco

Avaliamos também a expressão de marcadores pró-inflamatórios no tecido cardíaco desses animais. Observamos aumento na expressão de *Il-6* e *Il-1 β* nos VVs comparados aos controles WT [2,4 (1,2-4,2) vs 1,0 (0,49-1,45) UA, $p < 0,05$] e [3,9 (2,4-6,2) vs 1,1 (0,82-1,59) UA, $p < 0,001$], respectivamente (Figura 8 A e B). A expressão de galectina-3, um marcador de macrófago, também está aumentada em corações VV em relação a WT [3,0 (1,7-8,7) vs 0,82 (0,78-1,11), $p < 0,01$] (Figura 8 C). Em sintonia com esses resultados, nossa análise por microscopia eletrônica revelou a presença de células inflamatórias em miocárdio de animais VV, achado não encontrado em camundongos WT (Figura 8 D). Vale destacar que o estado inflamatório observado no tecido cardíaco de animais VV não evoluiu para fibrose na idade avaliada (14-15 dias), uma vez que a expressão de *Colla1* está diminuída nesse grupo e a expressão de *Colla3* não diferiu entre VVs e WTs (Figura 9 A e B). Esses resultados sugerem que apoptose e inflamação podem contribuir para o fenótipo cardíaco disfuncional encontrado em camundongos VV.

4.4 Avaliação de sensores de metabolismo energético e de oxigênio em tecido cardíaco

A proteína AMPK é um sensor energético celular que regula a atividade de diversas outras proteínas, entre elas mTOR (63). As análises de *Western blotting* revelaram menor expressão de AMPK total e AMPK fosforilada em tecido cardíaco de camundongos VV que no de seus controles WT ($-29 \pm 7,8\%$, $p < 0,01$; $-46 \pm 12\%$, $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 10 A e C). A expressão cardíaca da proteína RPS6 fosforilada (forma ativa), um alvo de mTORC1 (mTOR complexo 1), também se mostrou reduzida em animais VV em comparação a WT ($-58 \pm 15\%$, $p < 0,01$) (Figura 11 A). Outro sensor energético celular é a proteína Sirtuína-1, uma deacetilase NAD-dependente, que se encontra aumentada em rins policísticos de camundongos deficientes em *Pkd1* (72). Nesse contexto, avaliamos a expressão de *Sirt1* em tecido cardíaco. Diferentemente do rim, não observamos diferença em sua expressão entre corações VV e WT (Figura 12 A). Por fim, avaliamos a expressão de *Hif1 α* , um sensor regulado pelo nível de oxigênio intracelular. Neste caso, observamos aumento na expressão cardíaca desse gene em camundongos VV comparados a WT ($1,42 \pm 0,24$ vs $1,02 \pm 0,27$ AU, $p < 0,01$) (Figura 12 A).

Figura 8. Inflamação no tecido cardíaco. Análise comparativa da expressão gênica de *Il6* (A); *Il1 β* (B) e expressão da proteína galectina-3 (C) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8); D) Imagens representativas de células inflamatórias no miocárdio de camundongos *Pkd1*^{V/V} - painel superior: neutrófilos no interstício cardíaco em contato próximo com cardiomiócitos; e painel inferior: monócitos no interior de um pequeno vaso cardíaco. Ampliação original, 9300x, barra de escala de 5 μ m. Os dados foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. * P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001.

Figura 9. Marcadores de fibrose em tecido cardíaco. Análise comparativa da expressão de *Col1α1* (A) e *Col3α1* (B) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, com os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. * P < 0,05.

Figura 10. Análises comparativas da expressão de AMPK total (A); AMPK fosforilada (B) e AMPK fosforilada /AMPK total (C) entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001.

Figura 11. Análises comparativas da expressão de A) RPS6 total e fosforilada entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{v/v} (n = 8) e B) ACCβ fosforilada entre corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{v/v} (n = 7). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP, enquanto os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, tendo os resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4.5 Avaliação de reguladores do metabolismo de lipídeos em tecido cardíaco

Ácidos graxos são a principal fonte de substrato para produção de ATP em coração adulto (60-80%) (118). A proteína ACC β , também regulada por AMPK, participa do controle da oxidação fosforilativa de ácidos graxos dentro da mitocôndria. Em concordância com a redução de AMPK, a expressão de ACC β fosforilada também se mostrou mais baixa em tecido cardíaco VV que em WT ($-35 \pm 15\%$, $p < 0,05$) (Figura 11 B). A expressão cardíaca dos genes *Cpt1* e *Ppara* seguiu o mesmo padrão, encontrando-se reduzida para ambos em animais VV em relação a camundongos WT ($0,76 \pm 0,25$ vs $1,04 \pm 0,28$ UA, $p < 0,05$, e $0,79 \pm 0,21$ vs $1,02 \pm 0,27$ UA, $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 12 A). Nesse sentido, também avaliamos a expressão gênica e proteica de PGC1 α . Observamos uma diminuição significativa da expressão da proteína ($0,78 \pm 0,20$ vs $1,00 \pm 0,12$ UA, $p < 0,05$) (Figura 12 B) e uma tendência de diminuição da expressão gênica ($p = 0,071$) (Figura 12 A). Em conjunto, esses resultados sugerem que a oxidação fosforilativa de ácidos graxos encontra-se diminuída no coração de camundongos VV.

Para verificar se a diminuição do uso de ácidos graxos como substrato energético poderia favorecer o acúmulo de lipídeos, avaliamos a densidade volumétrica de gotículas lipídicas em tecido cardíaco VV e WT por microscopia eletrônica. Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre corações VV e WT (Figura 13 A). O grupo VV, no entanto, apresentou um maior valor numérico para este parâmetro que o WT, porém também se acompanhou de alta variabilidade entre os animais ($2,79 \pm 2,02\%$ vs $1,59 \pm 0,87\%$). Não observamos diferença para a expressão de *Fasn* entre os grupos, mas uma elevada variabilidade no grupo VV também foi detectada nesse ensaio [$1,21$ ($0,81-1,54$) vs $0,83$ ($0,35-2,72$) UA] (Figura 13 B).

Figura 12. Análise comparativa da expressão de A) *Pgc1α* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8); B) *Ppara* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 10) e *Pkd1*^{V/V} (n = 11); *Cpt1* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 10) e *Pkd1*^{V/V} (n = 11); *Sirt1* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8) e *Hif1α* em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). B) Expressão comparativa da proteína PGC1α nos corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P < 0,05 e ** P < 0,01.

Figura 13. Análise comparativa da A) Densidade volumétrica citoplasmática de gotículas lipídicas em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 5) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5) e B) Expressão de *Fasn* nos corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP, enquanto os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, tendo os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil.

4.6 Avaliação do perfil transcricional em tecido cardíaco

A reprogramação fetal consiste num processo adaptativo comum em corações disfuncionais. Essa resposta adaptativa potencial foi investigada em tecido cardíaco VV por meio da análise da expressão de genes diferencialmente expressos nas fases fetal e adulta. A expressão dos genes fetais *Nppa* (*Anp*) e *Acta1* mostrou-se mais elevada em corações VV que WT ($3,35 \pm 1,54$ vs $1,10 \pm 0,54$ UA, $p < 0,01$, e $2,26 \pm 0,94$ vs $1,07 \pm 0,38$ UA, $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 14). Esses resultados sugerem que a deficiência de *Pkd1* possa favorecer um status transcricional fetal em tecido cardíaco. Avaliamos também a expressão de *Myh7* e *Myh6*, genes que codificam respectivamente as isoformas fetal e adulta da miosina, e não observamos diferenças entre corações VV e WT (Figura 14).

Figura 14. Análise comparativa da expressão de *Anp*, (A) *Acta1* (B), *Myh7* (C) e *Myh6* (D) em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 7) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P < 0,05 e ** P < 0,01.

4.7 Avaliação da densidade e morfologia das mitocôndrias em tecido cardíaco

A densidade volumétrica citoplasmática e parâmetros morfológicos mitocondriais foram avaliados em tecido cardíaco por meio de microscopia eletrônica. Essas análises revelaram que cardiomiócitos VV apresentam maior densidade mitocondrial que seus controles WT ($49,5 \pm 1,8$ vs $41,3 \pm 3,0\%$, $p < 0,001$) (Figura 15), associada porém a mitocôndrias menores em área (597 ± 59 vs $739 \pm 77 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$), perímetro ($3,03 \pm 0,15$ vs $3,47 \pm 0,26 \mu\text{m}$, $p < 0,05$) e diâmetro ($1,14 \pm 0,06$ vs $1,31 \pm 0,09 \mu\text{m}$, $p < 0,01$) que as de seus controles WT (Tabela 2). Avaliamos também os descritores de forma *roundness* e *aspect ratio*, não tendo observado diferenças entre células cardíacas VV e WT (Tabela 2). Por fim, avaliamos a expressão das proteínas DRP1 e MFN2, marcadores de fusão e fissão mitocondrial, respectivamente. Não foram detectadas diferenças significantes entre corações VV e WT (Figuras 16 A e B, respectivamente).

Figura 15. Densidade e morfologia mitocondrial em tecido cardíaco. A) Análise comparativa de densidade volumétrica citoplasmática mitocondrial em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 5) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5); B) Imagem representativa de coração *Pkd1*^{+/+} e C) imagem representativa de coração *Pkd1*^{V/V}; ampliação original, x9300, barra de escala de 2 μm . Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média $\pm$ DP. *** P < 0,001. LD: gotículas lipídicas, MF: miofibrila, Mit: mitocôndrias, e N: núcleos.

Tabela 3. Parâmetros morfométricos mitocondriais

	<i>Pkd1</i> ^{+/+}	<i>Pkd1</i> ^{V/V}
Área superficial (μm²)	739,5 ± 77,0	597,3 ± 59,0 *
Perímetro (μm)	3,47 ± 0,26	3,03 ± 0,15 *
Diamêtro de Feret (μm)^a	1,31 ± 0,089	1,14 ± 0,057 **
Roundness (0-1)^b	0,59 ± 0,021	0,61 ± 0,019
Aspect ratio^c	1,89 ± 0,087	1,80 ± 0,065

^aO diâmetro de Feret representa a maior distância entre dois pontos dentro de uma mitocôndria; ^broundness foi calculada como $4 \cdot (\text{área de superfície}) / (\pi \cdot (\text{maior eixo})^2)$, constituindo-se em um índice de esfericidade onde o valor 1 indica um esferoide perfeito; ^caspect ratio foi calculada através da relação (maior eixo) / (menor eixo) e reflete a relação “comprimento / largura”. Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP, n = 5 por grupo. * P < 0,05 e ** P < 0,01.

Figura 16. Análise comparativa da expressão de DRP1(A) e MFN2 (B) em corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n=8). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP.

4.8 Avaliação do consumo de oxigênio em tecido cardíaco e em cultura de cardiomiócitos

Para verificar se as anormalidades estruturais e de densidade mitocondrial associavam-se a impacto funcional, avaliamos o consumo de oxigênio de corações VV e WT por meio de respirômetria de alta resolução. Corações VV apresentaram maior consumo de oxigênio que corações WT na presença de glicose 10 mM (928 ± 157 vs 762 ± 104 pmol O₂/min/mg tecido, $p < 0,05$) (Figura 17 A). Também avaliamos o consumo de oxigênio em cardiomiócitos de neonatos na presença de glicose 25 mM, em condição basal e em resposta a moduladores da respiração mitocondrial (Figura 17 B). Cardiomiócitos VV apresentaram uma tendência de aumento na respiração basal ($p = 0,094$) (Figura 19 A) e no vazamento de prótons ($p = 0,058$) (Figura 19 C). Surpreendentemente, detectamos aumento significativo na respiração máxima e na capacidade de reserva em mitocôndrias de cardiomiócitos VV versus WT (327 ± 24 vs 216 ± 64 pmol O₂/min, $p < 0,01$, e $269 \pm 20,4$ vs $174 \pm 50,8$ pmol O₂/min, $p < 0,01$) (Figuras 19 D e E, respectivamente). Detectamos, também, uma maior acidificação do meio de cultura de células VV após estímulo com CCCP em comparação ao meio de cardiomiócitos WT ($32 \pm 5,5$ vs $23 \pm 7,0$ mpH/min, $p < 0,05$) (Figura 18 A). A acidificação do meio de cultura pode decorrer do aumento da produção de lactato gerado pela glicólise aeróbica. Para quantificar tal efeito nos cardiomiócitos, mensuramos a concentração de lactato no meio de cultivo dessas células. Não encontramos diferença, contudo, entre os grupos VV e WT (Figura 18 B), achado que indica que o aumento de acidificação no meio de cultura VV não é causado por glicólise aeróbica.

Figura 17. Análise comparativa do consumo de oxigênio nos A) corações *Pkd1*^{+/+} (n = 8) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8) e B) cardiomiócitos *Pkd1*^{+/+} (n = 6) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5) em condição basal e após adição sequencial de oligomicina, CCCP e antimicina/rotenona. Dados comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P <0,05 e ** P <0,01.

Figura 18. A) Acidificação do meio extracelular de cardiomiócitos *Pkd1*^{+/+} (n = 6) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5) em condição basal e após adição sequencial de oligomicina, CCCP e antimicina/rotenona. B) Análise comparativa da produção de lactato em meio de cultura de cardiomiócitos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{V/V} (n = 4). Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. Dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, tendo os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. *P <0,05.

Figura 19. Quantificação do consumo de oxigênio em cardiomiócitos *Pkd1*^{+/+} (n = 6) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5). A) Basal; B) Relacionado à produção de ATP (consumo na presença de oligomicina menos o basal); C) Relacionado ao vazamento de prótons (insensível à oligomicina); D) Máximo (induzido pelo desacoplador CCCP); E) Capacidade de reserva (consumo máximo menos o basal) e F) Não mitocondrial (insensível à antimicina mais rotenona). Os dados foram comparados pelo teste t, com os resultados apresentados como média ± DP. * P < 0,05 e ** P < 0,01. *Pkd1*^{+/+} (n = 6) e *Pkd1*^{V/V} (n = 5).

4.9 Avaliação do perfil de metabólitos em tecido cardíaco

Experimentos de ressonância nuclear magnética foram conduzidos para avaliar o perfil de metabólitos em tecido cardíaco. Essa técnica permitiu a identificação de 56 metabólitos em nossas condições experimentais 2-aminoadipate, 3-hidroxi butirato, AMP, ATP, acetato, adenosina, alanina, asparagina, aspartato, butirato, carnitina, carnosina, citrato, creatina, etanol, formato, fumarato, GTP, glicose, glicose-6-fosfato, glutamato, glutamina, glicerol, glicina, histidina, hidroxi-acetona, IMP, inosina, isoleucina, lactato, leucina, lisina, malato, malonato, manose, metanol, metionina, NAD⁺, niacinamida, O-acetilcarnitina, O-fosfocolina, oxipurinol, pantotenato, fenilalanina, prolina, piruvato, sarcosina, serina, succinato, taurina, tirosina, UDP-glicose, UMP, valina, mioinositol e glicerofosfocolina.

A análise de PLS-DA (*Partial Least Square-Discriminant Analysis*) revelou segregação entre os grupos WT e VV tanto no gráfico de componente 1 vs componente 2, quanto no gráfico de componente 1 vs componente 3 (Figura 20 A e B, respectivamente). Com base no VIP score ≥ 1 , os metabólitos discriminatórios aumentados nos corações VV incluíram mioinositol, pantotenato, taurina, butirato, creatina, glutamina, glicerofosfocolina, 2-aminoadipato e citrato (Figura 20 D), enquanto os metabólitos diminuídos compreenderam serina, alanina, tirosina, lactato, valina, prolina, metionina, glutamato, glicose, glicina, aspartato, isoleucina, UMP, glicerol, histidina e acetato (Figura 20 D). Os dados também foram visualizados por gráfico de Volcano, tendo como metabólitos com variação de concentração acima de 1,5 vezes e $t < 0,1$ mioinositol, pantotenato, butirato, glutamina e glicerofosfocolina aumentados, e tirosina e glicose diminuídos (Figura 20 E). Os dados também foram analisados e visualizados por *Heatmap*, evidenciando novamente boa segregação entre os grupos (Figura 20 C). Tais resultados indicam que corações VV possuem uma assinatura de metabólitos distinta da de corações WT e que essa diferença está principalmente relacionada a alterações no metabolismo de aminoácidos, lipídeos e glicose.

Figura 20. Perfil metabólico no coração. A e B) Análise de *Partial Least Square-Discriminant* (PLS-DA); C) *Heatmap* aplicado aos metabólitos identificados, mostrando separação entre os corações *Pkd1*^{+/+} (n = 9) e *Pkd1*^{V/V} (n = 8). Os metabólitos mais discriminatórios foram identificados pelas pontuações do *variable importance on the projection* (pontuação VIP ≥ 1) e (D) gráfico *volcano*, usando como critério de seleção o limiar de mudança (x) de 1,5 vezes e teste t (y) de 0,1 (E).

4.10 Avaliação do potencial terapêutico da metformina sobre o fenótipo cardíaco

Dada a importância da proteína AMPK no contexto renal da DRPAD, decidimos avaliar o efeito da metformina sobre o fenótipo cardíaco de animais VV. Para tanto, animais VV foram tratados diariamente com 62,5 mg de metformina/kg de peso corporal ou solução salina, via intraperitoneal, de P1 até sua morte ou até P15 para avaliação da função cardíaca. Não observamos diferença de sobrevida, entretanto, entre animais VV tratados com metformina e com salina (Figura 21 A). Esses resultados sugerem que a ativação isolada de AMPK não estendeu a sobrevida de animais VV nas condições experimentais deste trabalho.

Figura 21: A) Análise de sobrevida de camundongos *Pkd1^{V/V}* tratados com metformina 62,5 mg/ kg de PC (n = 13) ou salina na mesma proporção (n = 12). Os dados de sobrevida foram representados através da curva de Kaplan-Meier e os dados analisados utilizando o teste de Log-rank.

5. DISCUSSÃO

Estudos realizados ao longo dos últimos 25 anos têm revelado que patogênese da doença renal associada à DRPAD é bastante complexa. Embora os mecanismos envolvidos nesse processo sejam ainda pouco ou não suficientemente compreendidos, alterações fundamentais da atividade ou regulação de várias vias moleculares, assim como do fenótipo celular, foram identificadas ao longo desse período. Na DRPAD, o fenótipo das células epiteliais císticas caracteriza-se por aumento de proliferação e apoptose, desdiferenciação, polaridade celular alterada e polaridade planar defeituosa (126). Tais alterações se acompanham de remodelamento da matriz extracelular e de um epitélio cístico que promove secreção transepitelial de fluido (126). Evidências recentes expandiram o número de vias envolvidas na formação e crescimento de cistos renais, destacando-se a reprogramação metabólica e anormalidades mitocondriais (77, 79-84). É importante destacar que as alterações metabólicas identificadas parecem exercer um papel primário no processo patogênico da DRPAD, uma vez que terapias direcionadas a essas alterações retardaram a progressão do fenótipo cístico renal em modelos animais ortólogos à doença humana (60-62, 73, 127). Tais intervenções, visando o restabelecimento ou reaproximação do perfil metabólico celular basal, incluíram 2-deoxiglicose, um inibidor competitivo da glicólise (60, 61, 127), restrição calórica (62) e redução da ingestão de lipídeos (73).

A disfunção cardíaca ocupa posição de destaque entre as manifestações extrarenais da DRPAD. Estudos recentes revelaram que o comprometimento funcional de PC1 ou PC2 é capaz de determinar disfunção cardíaca significativa em diferentes modelos animais, sugerindo fortemente um papel primário da deficiência da atividade desses genes no desenvolvimento do fenótipo cardíaco disfuncional associado à DRPAD. A deficiência de *Pkd2* em *zebrafish* resultou em regulação defeituosa de cálcio intracelular, baixo débito cardíaco e bloqueio átrio-ventricular (107). Camundongos *Pkd2*^{+/-}, por sua vez, são hipersensíveis à estimulação β-adrenérgica (111) e não são capazes de modular o eixo de sinalização cardioprotetor PC2-cromogranina B-peptídeo natriurético em resposta à administração de isoproterenol (113). As anormalidades da resposta β-adrenérgica ocorreram em concomitância com o alterações da expressão cardíaca de RyR2, SERCA, troponina I e fosfolambam fosforiladas (111). Deve-se realçar que PC1 controla a estabilidade do canal de Ca²⁺ L-Type, necessário para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida por estresse

mecânico (109), e pode interagir diretamente com canais Kv, regulando a atividade elétrica, a ciclagem de Ca^{2+} e a função contrátil de cardiomiócitos (110).

A elevada atividade metabólica do coração é consistente com o grande número de mitocôndrias presente nas células cardíacas. A relação entre insuficiência cardíaca e remodelamento metabólico tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. Frente a essa nova realidade, terapias emergentes direcionadas às anormalidades mitocondriais podem se constituir em abordagens promissoras na área das cardiomiopatias (116, 128). Além de prejuízo na produção de ATP, a disfunção mitocondrial consiste na principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas capazes de induzir lesão e apoptose nos cardiomiócitos (129).

Nesse cenário, levantamos a hipótese de que o remodelamento metabólico e defeitos mitocondriais também poderiam contribuir para o desenvolvimento da disfunção cardíaca associada à DRPAD. Para avaliar tal hipótese, utilizamos camundongos geneticamente modificados *Pkd1*^{v/v}, uma vez que esse modelo experimental é ortólogo à DRPAD humana, desenvolve disfunção cardíaca precoce e apresenta um perfil homogêneo de redução da atividade gênica, caracterizado por ausência de clivagem de PC1 no sítio GPS. Esse padrão de deficiência de *Pkd1* se associa a um fenótipo cístico renal precoce e grave, porém pós-natal (11, 108).

Dadas as propriedades celulares de PC1 e a associação entre hipertrofia cardíaca e anormalidades mitocondriais (130), analisamos inicialmente parâmetros estruturais cardíacos a expressão de marcadores de hipertrofia desse órgão em nosso modelo experimental (Figura 6). Não detectamos aumento no diâmetro das fibras cardíacas nem na expressão do marcador de hipertrofia P-ERK2 em camundongos VV. Ao avaliar o peso do coração, animais mutantes para *Pkd1* apresentaram menor massa cardíaca que WT. No entanto, quando o peso cardíaco foi normalizado pelo peso corpóreo o padrão se inverteu. A observação de uma perda substantiva de peso corporal próxima ao óbito para a maior parte dos camundongos VV, contudo, sugere que o aumento da razão peso do coração/peso corpóreo decorra apenas da redução circunstancial do peso dos animais e não de um aumento primário da massa cardíaca. Em apoio a esta conclusão, analisamos o comprimento da tíbia de três animais VV e três WT e não detectamos diferença entre os grupos (dados não apresentados devido ao reduzido tamanho amostral). Tomados em conjunto, portanto, nossos resultados sugerem fortemente que a disfunção sistólica associada à ausência de clivagem de PC1 não se acompanhe de resposta hipertrófica. Vale ressaltar que nossos resultados encontram-se em linha com o estudo prévio

de Pedrozo e cols., que mostrou que o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose intersticial cardíaca induzido por estímulo de sobrecarga de pressão requer a atividade funcional de PC1 (109).

Em um importante trabalho de nosso laboratório, mostramos o envolvimento da apoptose na disfunção cardíaca associada à deficiência de *Pkd1* (108). Esse fenótipo foi investigado mais profundamente no presente estudo, em que detectamos aumento na marcação de caspase-3 clivada em tecido cardíaco VV (Figura 7). Vale destacar que esta enzima exerce um papel fundamental no processo de apoptose. A mitocôndria, por sua vez, é uma organela central no controle da apoptose intrínseca. Em condições fisiológicas, proteínas anti-apoptóticas interagem com proteínas pró-apoptóticas no sentido de evitar a oligomerização das últimas e a formação de poros na membrana externa da mitocôndria. Em situações desfavoráveis, contudo, o desbalanço entre essas proteínas favorece a formação de tais poros, levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM), extravasamento do conteúdo intermembranoso e ativação de apoptose. Neste estudo, mostramos que a expressão do gene anti-apoptótico *Bcl2* está diminuída em corações VV (Figura 7), sugerindo que a via de apoptose dependente da mitocôndria possa estar contribuindo para o fenótipo cardíaco disfuncional presente nos animais VV. Vale ressaltar que uma taxa relativamente pequena de apoptose cardíaca pode ter um impacto funcional significativo, uma vez que os cardiomiócitos praticamente não se proliferam depois de P10 (131) e podem sofrer apoptose *interruptus*. De fato, nesta última condição a apoptose não chega à clivagem de DNA mas mesmo incompleta associa-se a um impacto funcional negativo (132).

Inflamação é um fator importante na patogênese renal da DRPAD (133). A avaliação de marcadores inflamatórios em tecido cardíaco revelou maior expressão de *Il-6* e *Il-1 β* em camundongos VV que em animais WT (Figura 8). Aumento de *Il-6* e *Il-1 β* é observado em outros modelos de cardiomiopatias, estando seus níveis correlacionados positivamente com a gravidade da disfunção cardíaca e com o prognóstico (134, 135). Em apoio a esses resultados, nossas imagens de microscopia eletrônica revelaram a presença de neutrófilos no interstício cardíaco e monócitos no interior de vaso de pequeno calibre em camundongo VV, achados não observados em corações WT (Figura 8). Nossos resultados mostraram também elevação nos níveis galectina-3, um marcador de macrófagos ativados, em corações VV (Figura 8). Esse achado acompanha conceitualmente os resultados prévios de Balbo e cols, que mostraram aumento da expressão de galectina-3 no coração de camundongos císticos deficientes em *Pkd1*, bem como resgate da função cardíaca promovido pela inativação de *Lgals3* - o gene codificador

de galectina-3 - em diferentes modelos animais de deficiência de *Pkd1* (108). Vale notar que um desses modelos foi o camundongo VV.

Além de apoptose, PMEM também pode induzir a inflamação. Componentes extravasados do espaço intermembranoso, incluindo cardiolipina (136, 137), EROs (138, 139) e DNA mitocondrial (mtDNA) (140-142), são reconhecidos por receptores da imunidade inata, levando à liberação de citocinas e quimiocinas que recrutam ou ativam outras células inflamatórias nos tecidos afetados (143, 144). O aumento de consumo de oxigênio observado em tecidos inflamados, por sua vez, pode levar a um aumento da atividade de HIF-1 α em resposta à hipóxia (145). Neste estudo, demonstramos que a expressão de *Hif1 α* está aumentada em corações VV em relação aos WT (Figura 12), resposta também encontrada em rins DRPAD em humanos e camundongos (146, 147). É importante ressaltar que a resposta inflamatória presente no nosso modelo não progrediu para fibrose cardíaca (Figura 9). É possível que a morte precoce de nossos animais, assim como a observação prévia de que PC1 é necessária para o desenvolvimento de fibrose intersticial cardíaca após sobrecarga de pressão em camundongos (109), tenham contribuído para essa não progressão para fibrose em corações VV.

Com base no cenário metabólico recentemente descrito em rins policísticos e a estreita relação entre mitocôndria, inflamação e apoptose, decidimos avaliar vias metabólicas relevantes à deficiência de *Pkd1* e potencialmente envolvidas no fenótipo cardíaco associado à DRPAD. Iniciamos essa abordagem analisando a expressão da proteína AMPK. Nossos resultados mostraram diminuição tanto da expressão de AMPK total quanto de AMPK fosforilada em tecido cardíaco VV (Figura 10). Tais achados seguem observações anteriores de redução da expressão dessa proteína em rins deficientes em *Pkd1* (62, 65, 71, 148). Embora essa regulação negativa não seja totalmente compreendida, ela pode ser mediada por LKB1 (*liver kinase B1*) (70) e CAMKK (*calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase*) (65), cujas atividades encontram-se desreguladas em células renais DRPAD. A diminuição de AMPK resulta no aumento da atividade do mTORC1, um fator importante de progressão cística em rins ADPKD (60-62). Para verificar se tal anormalidade também estava presente em corações deficientes em *Pkd1*, avaliamos a expressão RPS6, alvo de mTORC1. Surpreendentemente, a expressão de RPS6 fosforilada mostrou-se reduzida em tecido cardíaco VV (Figura 11). Esse resultado sugere que a regulação da via AMPK-mTORC1 possa diferir significativamente entre diferentes tecidos com deficiência de *Pkd1*.

mTORC1 pode ser regulada por outros mecanismos além da AMPK, incluindo a disponibilidade de aminoácidos na célula (149, 150). Na vigência de privação de aminoácidos, mTORC1 distribui-se de forma difusa no citoplasma da célula. Após adição de aminoácidos, o complexo se transloca para a superfície dos lisossomos, onde interage com Rheb para sua ativação (149, 150). Interessantemente, o perfil metabolômico dos corações VV revelou diminuição nos níveis de vários aminoácidos (serina, alanina, tirosina, valina, prolina, metionina, glutamato, glicina, aspartato, isoleucina e histidina) (Figura 20), sugerindo que depleção de aminoácidos deva contribuir para a diminuição da atividade de mTORC1 nesses animais. É importante ressaltar que mTOR é necessária para o crescimento e viabilidade de cardiomiócitos. De fato, sua inativação no miocárdio de camundongos jovens resultou em rápido desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada, associada a translocação anormal de proteínas, aumento de apoptose e fibrose (151). Nessa mesma linha, ratos diabéticos suplementados com aminoácidos apresentaram resgate da expressão de mTOR, aumento na capacidade de contração e resposta oxidativa (152).

Durante a cardiogênese intrauterina, o coração é exposto a um ambiente com baixa concentração de oxigênio. Tal condição altera-se drasticamente após o nascimento. A mudança na disponibilidade de oxigênio governa a ativação de um circuito regulatório de transcrição responsável por uma reprogramação metabólica cardíaca (153). Nesse contexto, o coração diminui o uso de glicose e aumenta a fosforilação oxidativa dos ácidos graxos para geração de ATP (154). O consumo de oxigênio também é modulado em resposta à maturação cardíaca e à taxa de proliferação. De Carvalho e cols. demonstraram que cardiomiócitos provenientes de neonatos com 1 dia de vida apresentaram maior consumo de oxigênio e taxa de proliferação que cardiomiócitos extraídos de neonatos com 7 dias de vida, sugerindo que a necessidade de energia diminui à medida que a proliferação tende a cessar no coração (155). É importante mencionar, no entanto, que em condições patológicas como hipóxia, isquemia, hipertrofia, atrofia, diabetes e hipotireoidismo, o coração pós-natal pode retornar às características fetais, reativando a programação transcricional fetal (revisado em (121, 156). Uma característica da insuficiência cardíaca, portanto, é a diminuição do uso de ácidos graxos como substrato energético e aumento do uso de glicose, lactato, corpos cetônicos e aminoácidos no processo de geração de ATP (157-159). Nesse cenário e diante de nossos achados, a avaliação metabólica de corações disfuncionais associados à deficiência de *Pkd1* tornou-se um ponto central para caracterização desse fenótipo.

Um dos reguladores centrais da fosforilação oxidativa de ácidos graxos é a enzima ACC β , que catalisa a carboxilação de Acetil-CoA para produção de Malonil-CoA (MCoA) e é regulada por AMPK. Em acordo com a expressão reduzida de AMPK fosforilada em corações VV, a expressão de ACC β fosforilada também se mostrou diminuída em comparação a seus controles selvagens (Figura 11). De modo consistente, corações VV apresentaram redução da expressão do gene *Cpt1*, achado que indica uma redução na fosforilação oxidativa de ácidos graxos (Figura 12). Em células renais deficientes em *Pkd1*, a diminuição da OAG pode induzir aumento no número e tamanho de gotículas lipídicas (81). Nossa análise por microscopia eletrônica, entretanto, não revelou diferença significativa na densidade volumétrica de gotículas lipídicas entre os corações dos dois grupos de camundongos (Figura 13 A). Vale mencionar, contudo, que esses resultados apresentaram uma alta variabilidade dentro do grupo VV, também observada para a expressão de *Fasn* (Figura 13 B). Acreditamos que um dos fatores que possa contribuir para a heterogeneidade dos resultados é inerente à variabilidade individual dos camundongos e quão debilitado eles estão no dia da eutanásia. Observamos na prática que enquanto alguns camundongos estão maiores e menos debilitados, outros estão raquíticos e muito debilitados. Estudos futuros com metodologias adicionais mais específicas e precisas, por sua vez, como lipidômica, poderão trazer maior clareza ao entendimento da relação entre deficiência de *Pkd1* e biossíntese cardíaca de lipídeos.

O complexo PPAR α -PGC1 α modula a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos e glicose no coração (160). Ademais, PPAR α e PGC1 α também regulam a expressão de *Cpt1*, contribuindo para a modulação da OAG (161). Estudos prévios mostraram sub-regulação de PPAR α e PGC1 α no contexto de doença renal crônica associada a deficiência de *Pkd1/PKD1*, em humanos e modelos animais (77, 78, 80). Em suporte à relevância funcional desses achados, a ativação de PPAR α com fenofibrato resultou em aumento da expressão de genes envolvidos na OAG e FOX, acompanhado da diminuição da proliferação e inflamação em rins de camundongos *Pkd1*^{RC/RC} (78). Seguindo um padrão semelhante, mostramos que a expressão de *Ppara* e PGC1 α /*Pgc1a* encontra-se diminuída em coração VV (Figura 12), podendo contribuir para a redução da OAG nos corações VV. A mudança do perfil transcricional metabólico fetal para o perfil pós-natal ocorre concomitantemente com aumento da expressão de PPAR α /PGC1 α (122). Em situações patológicas, no entanto, há uma reativação do perfil genético fetal e diminuição de PPAR α /PGC1 α , sugerindo uma relação entre eles (119-122). Um estudo recente mostrou aumento da expressão dos genes fetais *Nppb* e *Acta1* em coração de camundongos cpk, um

modelo animal de doença policística renal de rápida progressão (123). Tais resultados nos direcionaram para a avaliação da expressão de genes fetais em corações VV. Detectamos aumento na expressão dos genes fetais *Nppa* e *Acta1*, enquanto a expressão de *Myh7* e *Myh6* não diferiu entre VVs e WTs (Figura 14). Nossos resultados indicam uma correlação entre a diminuição de *Ppara* e *PGC1α/Pgc1α* e aumento de expressão de genes fetais e mostram que corações VV não são capazes de fazer a transição apropriada do perfil transcricional fetal para o pós-natal.

Mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas, com função está intimamente relacionada à fissão, fusão, motilidade, posição e forma (162). Cardiomiócitos VV apresentaram maior densidade volumétrica citoplasmática de mitocôndrias (Figura 15), porém, elas apresentaram menor área, perímetro e diâmetro (Tabela 3). Esse fenótipo também foi observado em células renais deficientes em *Pkd1* de camundongos e humanos (80, 81). Apesar desses resultados indicarem maior fragmentação mitocondrial, não detectamos diferenças na expressão de MFN2 e DRP1 entre corações VV e WT (Figura 16), indicando que essas proteínas não estão envolvidas no desenvolvimento desse fenótipo. Um estudo recente mostrou, por sua vez, que células renais com redução da expressão de PC2 (PC2KD) apresentaram aumento na expressão de MFN2 (84). Nesse estudo, os autores sugerem que MFN2 funcione como uma proteína de ancoragem que facilita o tráfico de cálcio entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria, aumentando a ativação bioenergética, a área e a densidade mitocondrial (84). Esse cenário, no entanto, ainda é incerto, uma vez que células renais deficientes em *PKD1/Pkd1* apresentaram diminuição de expressão proteica e gênica de *PGC1α/Pgc1α* e mitocôndrias fragmentadas (80), enquanto o estudo conduzido em células PC2KD reportou um aumento de 40 vezes na expressão de *Pgc1α* e mitocôndrias alongadas nessas células (84).

Para investigar se as alterações estruturais mitocondriais identificadas se associavam a alterações funcionais, realizamos experimentos de consumo de oxigênio em tecido cardíaco e em cultura de cardiomiócitos de animais neonatos. Notavelmente, corações VV apresentaram maior consumo de oxigênio que corações selvagens em resposta à glicose (Figura 17 A). Em conjunto, nossos resultados sugerem que o aumento da densidade de mitocôndrias e o status inflamatório possam ser ao menos parcialmente responsáveis pelo aumento no consumo de oxigênio observado em corações VV. A análise metabolômica revelou, por sua vez, um menor nível de glicose nos corações VV (Figura 20 D e E), sugerindo que a glicose esteja sendo utilizada como substrato energético mais intensamente nesses animais que nos controles WT. Esse aumento no uso da glicose é consistente com nossos outros achados metabólicos e

encontra-se em linha com os estudos que mostram aumento de consumo de glicose em diferentes modelos de disfunção cardíaca. O consumo preferencial de glicose observado recapitula o fenótipo cardíaco fetal e pode representar uma resposta adaptativa para manutenção da função cardíaca (121, 157, 158). O aumento de glicólise aeróbica observada em células renais DRPAD (60-62, 127, 163), entretanto, não ocorre no coração VV, uma vez que o nível de lactato mostrou-se reduzido no tecido cardíaco desses camundongos (Figura 20 D).

Para confirmar esse fenótipo, analisamos o consumo de oxigênio de cardiomiócitos de neonatos em cultura em condições basais e frente a moduladores da cadeia respiratória mitocondrial (Figura 17 B). Cardiomiócitos VV apresentaram aumento da respiração máxima e da capacidade de reserva em meio contendo glicose, assim como tendência de aumento da respiração basal e vazamento de prótons, quando comparados a cardiomiócitos WT (Figura 19). Tais resultados corroboram nossos dados obtidos em tecido cardíaco. Esses resultados sugerem que as adaptações mitocondriais no coração VV possam ocorrer em um estágio precoce do desenvolvimento cardíaco, indicando um possível efeito primário da deficiência de *Pkd1* no desenvolvimento desse fenótipo. Nesse mesmo experimento, observamos aumento na acidificação do meio de cultura das células VV seguindo-se à injeção do desacoplador CCCP (Figura 18 A). Esse aumento é provavelmente resultado da completa oxidação da glicose em CO₂ e água, levando à formação H₂CO₃. Esse processo, portanto, não se associa a aumento de lactato (Figura 18 B). Devemos ressaltar, contudo, que respiração mitocondrial é um tema ainda controverso em células renais DRPAD. De fato, diferentes resultados foram obtidos dependendo do gene mutado, da zigose e do tipo de mutação (73, 77, 79, 80, 82, 84). Estudos anteriores mostraram que células renais *Pkd1*^{-/-} apresentaram diminuição na respiração basal e na respiração máxima (79, 82), enquanto células renais *Pkd1*^{+/-} apresentaram aumento na respiração basal sem alterações da respiração máxima (80). Células com diminuição de expressão de PC1 (PC1KD) ou PC2 (PC2KD), por sua vez, apresentam ambos parâmetros diminuídos (80). Um estudo mais recente, por outro lado, revelou aumento na respiração basal e diminuição na respiração máxima em células PC2KD comparadas a células controle (84).

Analisamos ainda o perfil de metabólitos em corações VV e WT por RMN. A boa segregação observada para corações VV no teste de PSL-DA sugeriu fortemente que órgãos VV e WT apresentam perfis metabólicos distintos (Figura 20 A e B). De acordo os resultados de VIP score (Figura 20 D), grande parte da diferença presente no grupo VV deve-se a níveis reduzidos de 11 (serina, alanina, tirosina, valina, prolina, metionina, glutamato, glicina, aspartato, isoleucina e histidina) entre os 16 aminoácidos identificados por RMN. Nesse

cenário, é bastante provável que os aminoácidos mencionados possam estar sendo utilizados como substrato energético e para a síntese dos metabólitos detectados em níveis mais altos. Entre os metabólitos presentes em níveis mais elevados em corações VV, taurina e creatina estão envolvidas, respectivamente, no transporte reticular sarcoplasmático de Ca^{2+} (164) e no sistema de transferência de energia nesse órgão (165). Outros metabólitos supra regulados em corações VV estão envolvidos no metabolismo lipídico. Análises baseadas no KEGG revelam participação do pantotenato na biossíntese de CoA, participação do mioinositol no metabolismo do fosfato de inositol e participação da glicerofosfocolina no metabolismo dos glicerofosfolípides. Em apoio aos nossos resultados, um estudo metabolômico realizado em ratos com cardiomiopatia induzida por doxorubicina mostrou como padrão principal alterações em lipídios, aminoácidos, vitaminas e compostos envolvidos no metabolismo energético (166).

Outro aspecto interessante observado na maioria das células cancerígenas é o aumento do consumo e dependência da glutamina (167). Nessas células, a glutamina é transformada em glutamato por uma glutaminase mitocondrial (75). O glutamato, por sua vez, é convertido em α -cetoglutarato, que entra no ciclo do TCA para gerar ATP (75). O glutamato também pode interagir com a cisteína para formar glutathione, um importante agente antioxidante (168). Assim como as células cancerígenas, as células renais com deficiência de *Pkd1* apresentam maior captação de glutamina e usam preferencialmente esse aminoácido para alimentar o ciclo do ácido cítrico e sustentar a síntese *de novo* de ácidos graxos (79). Neste estudo recente, o aumento da captação de glutamina é aparentemente acompanhado do aumento em seu consumo, uma vez que a concentração de glutamina não diferiu entre os rins deficientes em *Pkd1* e seus respectivos controles e a concentração de glutamato diminuiu nos deficientes em *Pkd1*. Nossos resultados revelaram, no entanto, aumento do nível de glutamina e diminuição da concentração de glutamato nos corações VV (Figura 20 D e E). Esses resultados podem potencialmente decorrer do aumento da captação de glutamina ou da redução de seu consumo. A diminuição de glutamato nos corações VV, por outro lado, apoia sua utilização na anaplerose e na biossíntese de glutathione.

Baseados nos resultados encontrados em coração e sabendo que o tratamento com metformina retardou o crescimento cístico em modelos de camundongo e zebrafish (71, 169), decidimos também avaliar seu potencial terapêutico cardíaco em nosso modelo experimental. Não verificamos melhora na sobrevida entre camundongos VV tratados com metformina ou com salina. Embora a metformina seja amplamente utilizada na prática médica, seus mecanismos de ação ainda não são completamente elucidados. Um dos mecanismos propostos

é a ativação indireta de AMPK, através da inibição da produção de ATP na mitocôndria e consequente aumento de AMP (170). Outra questão importante e incerta relacionada à metformina é a dose e tempo de tratamento. Em modelos animais, doses e regimes de administração diferentes geraram resultados discordantes. Um trabalho bastante recente conduzido em um modelo de camundongo com cistogênese tardia mostrou que o tratamento crônico com metformina na água de beber não resultou em melhora do fenótipo cístico renal (148). Quando metformina foi administrada em conjunto com salsalato, um ativador direto de AMPK, observou-se uma melhora significativa no índice cístico (148), mas o efeito de metformina mais salsalato não diferiu do de apenas salsalato. Em nosso estudo utilizamos a dose de 62,5mg/kg/dia e a via intraperitoneal, depois de observar alta mortalidade em doses maiores. É possível que a gravidade do fenótipo renal de nosso modelo animal tenha mascarado efeitos benéficos potenciais dessa droga.

Um ponto importante a ser levantado em relação aos achados de nosso estudo é que, *a priori*, não poderíamos descartar que as anormalidades detectadas nos corações VV pudessem ser secundárias à insuficiência renal desenvolvida por tais camundongos. De fato, mostramos anteriormente que camundongos VV com 18 dias de idade apresentam rins severamente císticos associados a aumento pronunciado de ureia sérica (108), sugerindo que nossos animais VV com 15 dias de idade também apresentem disfunção renal substancial. Parte de nossos achados em cardiomiócitos, no entanto, foram obtidos em células neonatais, uma idade em que os camundongos VV ainda não desenvolveram disfunção renal (11). Esses dados apoiam, portanto, um papel primário da deficiência cardíaca de *Pkd1* nas alterações detectadas nos cardiomiócitos e corações VV. Um suporte adicional ao papel principal da deficiência de *Pkd1* na determinação do fenótipo cardíaco VV baseia-se em um estudo anterior, que revelou que camundongos *Pkd1*^{+/-} não císticos, normotensos e com função renal normal, também desenvolveram disfunção cardíaca significativa (108). Por fim, este mesmo estudo revelou que a menor fração de ejeção detectada em camundongos VV de 18 dias foi completamente resgatada pelo nocaute de galectina-3, mesmo na presença de insuficiência renal, sugerindo fortemente que o desenvolvimento do fenótipo cardíaco do camundongo VV seja independente do prejuízo de sua função renal (108).

Nossos resultados nos permitem concluir, portanto, que as bases da disfunção cardíaca do camundongo VV compartilham mecanismos celulares, moleculares e metabólicos com a patogênese da doença renal cística, incluindo aumento de apoptose e inflamação, regulação negativa da atividade da AMPK e ACC β , alterações no metabolismo lipídico e anormalidades

estruturais e funcionais mitocondriais. Identificamos também um perfil metabólico distinto nos corações VV, consistente com as alterações metabólicas e mitocondriais observadas. Outros resultados, no entanto, divergem do fenótipo renal correspondente. Ao contrário dos rins, mTORC1 é regulado negativamente, a glicose não é direcionada para a glicólise aeróbica e a glutamina encontra-se aumentada nos corações de animais *Pkd1*^{V/V}. É possível que diferenças biológicas entre coração e rim sejam responsáveis, ao menos parcialmente, por comportamentos moleculares e bioquímicos distintos. De fato, o envolvimento cardíaco não é focal na DRPAD, não inclui cistogênese, não está relacionado ao transporte epitelial de fluido e os cardiomiócitos apresentam taxa de proliferação virtualmente nula em corações adultos. Os principais resultados encontrados neste trabalho encontram-se esquematizados na Figura 22.

Em conjunto, nossos resultados constituem um marco conceitual na compreensão da patogênese da disfunção cardíaca associada à deficiência de *Pkd1* e, dada a natureza de nosso modelo animal, sugerem que tais alterações possam ser aplicáveis à DRPAD humana. Nossos resultados devem incentivar estudos futuros desenhados para esclarecer mais profundamente os distúrbios metabólicos e mitocondriais potencialmente associados à disfunção cardíaca na DRPAD. Tais passos sequenciais deverão esclarecer se as alterações metabólicas cardíacas identificadas se constituem em causa ou consequência de outras alterações subjacentes em corações DRPAD e trazer, por fim, o necessário embasamento científico para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas específicas.

Figura 22. Representação esquemática da reprogramação metabólica em células e tecidos cardíacos *Pkd1^{V/V}*. A atividade da AMPK é regulada negativamente nos corações VV, resultando em diminuição da ACCβ fosforilada, uma enzima chave da oxidação de ácidos graxos (FAO). Os genes fetais cardíacos *Nppa* e *Acta1* estão aumentados, enquanto a expressão dos genes *Cpt1*, *Ppara* e *Pgc1α* está reduzida, contribuindo para a diminuição da FAO nos cardiomiócitos. A diminuição da FAO pode induzir o uso de glicose e aminoácidos para alimentar o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Os aminoácidos também podem ser utilizados para sustentar a biossíntese de metabólitos potencialmente envolvidos no metabolismo lipídico e no estresse oxidativo. Nesse cenário, um conjunto definido de aminoácidos encontra-se diminuído nos corações VV, diminuindo a atividade da mTORC1. Apoptose e inflamação podem ocorrer devido à permeabilização da membrana externa mitocondrial. O aumento no consumo de oxigênio nos cardiomiócitos VV induzem a expressão de *Hif1α*. ACoA = acetil-CoA, CAC = ciclo do ácido cítrico, CG = complexo Golgi, MCoA = malonil-CoA, FA = ácido graxo, ER = retículo endoplasmático, MIT = mitocôndria, NU = núcleo e PC2 = policistina-2.

6. CONCLUSÕES

- O coração disfuncional *Pkd1^{v/v}* não apresenta resposta hipertrófica cardíaca na idade avaliada;
- Inflamação e apoptose participam da patogênese da disfunção cardíaca em camundongos *Pkd1^{v/v}*;
- Nossos resultados mostraram diminuição da atividade de AMPK e RPS6 em corações *Pkd1^{v/v}*;
- Os nossos resultados sugerem uma diminuição de fosforilação oxidativa de ácidos graxos em corações *Pkd1^{v/v}*;
- Nossos achados sugerem manutenção ou reativação do perfil transcricional fetal em corações *Pkd1^{v/v}*;
- Nossos resultados revelaram anormalidades estruturais mitocondriais em tecido cardíaco de camundongos *Pkd1^{v/v}*;
- Nossos achados mostraram aumento no consumo de oxigênio em resposta à glicose em tecido cardíaco e cardiomiócitos neonatos *Pkd1^{v/v}*;
- Alterações no consumo de oxigênio em cardiomiócitos extraídos de neonatos com até 3 dias de vida apoiam um papel primário da deficiência de *Pkd1* no fenótipo mitocondrial alterado.
- Mostramos aumento da expressão do sensor de oxigênio *Hif1 α* em coração *Pkd1^{v/v}*;

- Corações *Pkd1^{v/v}* apresentam uma assinatura de metabólitos distinta dos controles selvagens, associada principalmente a diminuição de aminoácidos e glicose e aumento de compostos envolvidos em metabolismo lipídico.
- A diminuição da fosforilação oxidativa de ácidos graxos com a concomitante diminuição de glicose e aminoácidos nos corações *Pkd1^{v/v}*, sugerem que estes possam estar sendo utilizados como substrato energético e, possivelmente, para sustentar a biossíntese de compostos envolvidos no metabolismo lipídico e no estresse oxidativo.
- Nossos resultados revelaram que diferentemente de células renais com deficiência de PC1, células cardíacas *Pkd1^{v/v}* não apresentam aumento de glicólise aeróbica nem de consumo de glutamina.
- Com base em nossos achados revelamos que drogas que modulam o metabolismo podem ter efeitos distintos em rim e coração com deficiência de *Pkd1*.
- A natureza de nosso modelo animal sugere que as alterações metabólicas e mitocondriais observadas nos camundongos *Pkd1^{v/v}* devam provavelmente se aplicar a pacientes com DRPAD.

7. BIBLIOGRAFIA*

1. Lanktree MB, Haghighi A, Guiard E, Iliuta IA, Song X, Harris PC, et al. Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(10):2593-600.
2. Willey CJ, Blais JD, Hall AK, Krasa HB, Makin AJ, Czerwiec FS. Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(8):1356-63.
3. Antignac C, Calvet JP, Germino GG, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, Harris PC, et al. The Future of Polycystic Kidney Disease Research--As Seen By the 12 Kaplan Awardees. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(9):2081-95.
4. Lanktree MB, Chapman AB. New treatment paradigms for ADPKD: moving towards precision medicine. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(12):750-68.
5. Ong AC, Devuyst O, Knebelmann B, Walz G, Diseases E-EWGfIK. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management. *Lancet*. 2015;385(9981):1993-2002.
6. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 1993;329(5):332-42.
7. Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC. Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(1):13-23.
8. Cornec-Le Gall E, Alam A, Perrone RD. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*. 2019;393(10174):919-35.
9. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, et al. Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1193-207.
10. Oatley P, Stewart AP, Sandford R, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging reveals the domain structure of polycystin-1. *Biochemistry*. 2012;51(13):2879-88.
11. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García-González MA, et al. 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.
12. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet*. 1997;16(2):179-83.
13. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, et al. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16981-6.

14. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med.* 2009;60:321-37.
15. 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.
16. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, et al. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):278-88.
17. Scheffers MS, Le H, van der Bent P, Leonhard W, Prins F, Spruit L, et al. Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells. *Hum Mol Genet.* 2002;11(1):59-67.
18. Foggensteiner L, Bevan AP, Thomas R, Coleman N, Boulter C, Bradley J, et al. Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(5):814-27.
19. Ibraghimov-Beskrovnyaya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, Coleman N, Thiru S, Petry LR, et al. Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6397-402.
20. Lemos FO, Ehrlich BE. Polycystin and calcium signaling in cell death and survival. *Cell Calcium.* 2018;69:37-45.
21. Zhang P, Luo Y, Chasan B, González-Perrett S, Montalbetti N, Timpanaro GA, et al. The multimeric structure of polycystin-2 (TRPP2): structural-functional correlates of homo- and hetero-multimers with TRPC1. *Hum Mol Genet.* 2009;18(7):1238-51.
22. Köttgen M, Buchholz B, Garcia-Gonzalez MA, Kotsis F, Fu X, Doerken M, et al. TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J Cell Biol.* 2008;182(3):437-47.
23. Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, et al. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol.* 2002;4(3):191-7.
24. Anyatonwu GI, Estrada M, Tian X, Somlo S, Ehrlich BE. Regulation of ryanodine receptor-dependent calcium signaling by polycystin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(15):6454-9.
25. 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.
26. Aguiari G, Trimi V, Bogo M, Mangolini A, Szabadkai G, Pinton P, et al. Novel role for polycystin-1 in modulating cell proliferation through calcium oscillations in kidney cells. *Cell Prolif.* 2008;41(3):554-73.
27. 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.

28. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, et al. Pkd1 haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(11):2389-402.
29. 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.
30. 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.
31. Hopp K, Ward CJ, Hommerding CJ, Nasr SH, Tuan HF, Gainullin VG, et al. Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4257-73.
32. 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.
33. 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.
34. Ye H, Wang X, Sussman CR, Hopp K, Irazabal MV, Bakeberg JL, et al. Modulation of Polycystic Kidney Disease Severity by Phosphodiesterase 1 and 3 Subfamilies. *J Am Soc Nephrol*. 2015.
35. Pinto CS, Reif GA, Nivens E, White C, Wallace DP. Calmodulin-sensitive adenylyl cyclases mediate AVP-dependent cAMP production and Cl⁻ secretion by human autosomal dominant polycystic kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(10):F1412-24.
36. Li H, Findlay IA, Sheppard DN. The relationship between cell proliferation, Cl⁻ secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. *Kidney Int*. 2004;66(5):1926-38.
37. Roitbak T, Ward CJ, Harris PC, Bacallao R, Ness SA, Wandering-Ness A. A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1334-46.
38. Silberberg M, Charron AJ, Bacallao R, Wandering-Ness A. Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(6):F1153-63.
39. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, et al. 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.
40. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(9):648-57.

41. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, et al. 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.
42. Dere R, Wilson PD, Sandford RN, Walker CL. Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PLoS One*. 2010;5(2):e9239.
43. Weimbs T. Regulation of mTOR by polycystin-1: is polycystic kidney disease a case of futile repair? *Cell Cycle*. 2006;5(21):2425-9.
44. Distefano G, Boca M, Rowe I, Wodarczyk C, Ma L, Piontek KB, et al. Polycystin-1 regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of tuberlin to control cell size through mTOR and its downstream effectors S6K and 4EBP1. *Mol Cell Biol*. 2009;29(9):2359-71.
45. Belibi F, Zafar I, Ravichandran K, Segvic AB, Jani A, Ljubanovic DG, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and autophagy in polycystic kidney disease (PKD). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(5):F1235-43.
46. Zhu P, Sieben CJ, Xu X, Harris PC, Lin X. Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Hum Mol Genet*. 2017;26(1):158-72.
47. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, et al. 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.
48. Jonassen JA, San Agustin J, Folliot JA, Pazour GJ. Deletion of IFT20 in the mouse kidney causes misorientation of the mitotic spindle and cystic kidney disease. *J Cell Biol*. 2008;183(3):377-84.
49. Ma M, Tian X, Igarashi P, Pazour GJ, Somlo S. Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet*. 2013;45(9):1004-12.
50. Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*. 2013;450(1):9-21.
51. Kim I, Ding T, Fu Y, Li C, Cui L, Li A, et al. Conditional mutation of Pkd2 causes cystogenesis and upregulates beta-catenin. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(12):2556-69.
52. Li A, Xu Y, Fan S, Meng J, Shen X, Xiao Q, et al. Canonical Wnt inhibitors ameliorate cystogenesis in a mouse ortholog of human ADPKD. *JCI Insight*. 2018;3(5).
53. Benzing T, Simons M, Walz G. Wnt signaling in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(5):1389-98.
54. Song X, Di Giovanni V, He N, Wang K, Ingram A, Rosenblum ND, et al. Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks. *Hum Mol Genet*. 2009;18(13):2328-43.

55. Lal M, Song X, Pluznick JL, Di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND, et al. Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum Mol Genet.* 2008;17(20):3105-17.
56. Luyten A, Su X, Gondela S, Chen Y, Rompani S, Takakura A, et al. Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(9):1521-32.
57. Kim S, Nie H, Nesin V, Tran U, Outeda P, Bai CX, et al. The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nat Cell Biol.* 2016;18(7):752-64.
58. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Krönig C, et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet.* 2005;37(5):537-43.
59. Miller MM, Iglesias DM, Zhang Z, Corsini R, Chu L, Murawski I, et al. T-cell factor/ β -catenin activity is suppressed in two different models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2011;80(2):146-53.
60. Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, Ulisse V, Quilici G, Pema M, et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat Med.* 2013;19(4):488-93.
61. Chiaravalli M, Rowe I, Mannella V, Quilici G, Canu T, Bianchi V, et al. 2-Deoxy-d-Glucose Ameliorates PKD Progression. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):1958-69.
62. Warner G, Hein KZ, Nin V, Edwards M, Chini CC, Hopp K, et al. Food Restriction Ameliorates the Development of Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(5):1437-47.
63. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008;30(2):214-26.
64. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003;115(5):577-90.
65. Shi W, Xu D, Gu J, Xue C, Yang B, Fu L, et al. Saikosaponin-d inhibits proliferation by up-regulating autophagy via the CaMKK β -AMPK-mTOR pathway in ADPKD cells. *Mol Cell Biochem.* 2018;449(1-2):219-26.
66. Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan YY, Granter SR, Chin L, et al. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol Cell.* 2009;33(2):237-47.
67. Kawashima I, Mitsumori T, Nozaki Y, Yamamoto T, Shobu-Sueki Y, Nakajima K, et al. Negative regulation of the LKB1/AMPK pathway by ERK in human acute myeloid leukemia cells. *Exp Hematol.* 2015;43(7):524-33.e1.
68. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(1):18-32.

69. Viau A, Bienaimé F, Lukas K, Todkar AP, Knoll M, Yakulov TA, et al. Cilia-localized LKB1 regulates chemokine signaling, macrophage recruitment, and tissue homeostasis in the kidney. *EMBO J*. 2018;37(15).
70. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Brecht S, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1115-22.
71. Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, King JD, Li H, Zhang L, et al. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2462-7.
72. Zhou X, Fan LX, Sweeney WE, Denu JM, Avner ED, Li X. Sirtuin 1 inhibition delays cyst formation in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *J Clin Invest*. 2013;123(7):3084-98.
73. Menezes LF, Lin CC, Zhou F, Germino GG. Fatty Acid Oxidation is Impaired in An Orthologous Mouse Model of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *EBioMedicine*. 2016;5:183-92.
74. Jayapalan S, Saboorian MH, Edmunds JW, Aukema HM. High dietary fat intake increases renal cyst disease progression in Han:SPRD-cy rats. *J Nutr*. 2000;130(9):2356-60.
75. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principios de bioquímica*. 6ª ed. Barcelona: Omega ;; 2015. 1 v. (pag. var.) p.
76. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(2):121-35.
77. Hajarnis S, Lakhia R, Yheskel M, Williams D, Sorourian M, Liu X, et al. microRNA-17 family promotes polycystic kidney disease progression through modulation of mitochondrial metabolism. *Nat Commun*. 2017;8:14395.
78. Lakhia R, Yheskel M, Flaten A, Quittner-Strom EB, Holland WL, Patel V. PPAR α agonist fenofibrate enhances fatty acid β -oxidation and attenuates polycystic kidney and liver disease in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(1):F122-F31.
79. Podrini C, Rowe I, Pagliarini R, Costa ASH, Chiaravalli M, Di Meo I, et al. Dissection of metabolic reprogramming in polycystic kidney disease reveals coordinated rewiring of bioenergetic pathways. *Commun Biol*. 2018;1:194.
80. Ishimoto Y, Inagi R, Yoshihara D, Kugita M, Nagao S, Shimizu A, et al. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell Biol*. 2017.
81. Lin CC, Kurashige M, Liu Y, Terabayashi T, Ishimoto Y, Wang T, et al. A cleavage product of Polycystin-1 is a mitochondrial matrix protein that affects mitochondria morphology and function when heterologously expressed. *Sci Rep*. 2018;8(1):2743.
82. Padovano V, Kuo IY, Stavola LK, Aerni HR, Flaherty BJ, Chapin HC, et al. The polycystins are modulated by cellular oxygen-sensing pathways and regulate mitochondrial function. *Mol Biol Cell*. 2017;28(2):261-9.

83. Di Mise A, Ranieri M, Centrone M, Venneri M, Tamma G, Valenti D, et al. Activation of the Calcium-Sensing Receptor Corrects the Impaired Mitochondrial Energy Status Observed in Renal Polycystin-1 Knockdown Cells Modeling Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Front Mol Biosci*. 2018;5:77.
84. Kuo IY, Brill AL, Lemos FO, Jiang JY, Falcone JL, Kimmerling EP, et al. Polycystin 2 regulates mitochondrial Ca. *Sci Signal*. 2019;12(580).
85. Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Bae KT, Baumgarten DA, et al. Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int*. 2003;64(3):1035-45.
86. Qian Q, Li A, King BF, Kamath PS, Lager DJ, Huston J, et al. Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology*. 2003;37(1):164-71.
87. Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, et al. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 1992;41(5):1311-9.
88. Chapman AB, Schrier RW. Pathogenesis of hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Nephrol*. 1991;11(6):653-60.
89. Ecker T, Schrier RW. Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(1):194-200.
90. Schrier RW, Johnson AM, McFann K, Chapman AB. The role of parental hypertension in the frequency and age of diagnosis of hypertension in offspring with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2003;64(5):1792-9.
91. Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM, et al. Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in Pkd1-deficient mice. *Kidney Int*. 2014;85(5):1137-50.
92. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al. A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3035-43.
93. Hocher B, Zart R, Schwarz A, Vogt V, Braun C, Thöne-Reineke C, et al. Renal endothelin system in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(7):1169-77.
94. 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.
95. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Endothelium-dependent relaxation of small resistance vessels is impaired in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(8):1371-6.
96. Merta M, Reiterová J, Rysavá R, Tesar V, Závada J, Jáchymová M, et al. Role of endothelin and nitric oxide in the pathogenesis of arterial hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol Res*. 2003;52(4):433-7.

97. Klein IH, Ligtenberg G, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic activity is increased in polycystic kidney disease and is associated with hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(11):2427-33.
98. Cerasola G, Vecchi M, Mulè G, Cottone S, Mangano MT, Andronico G, et al. Sympathetic activity and blood pressure pattern in autosomal dominant polycystic kidney disease hypertensives. *Am J Nephrol.* 1998;18(5):391-8.
99. Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Lauritzen I, Arhatte M, et al. Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell.* 2009;139(3):587-96.
100. Rahbari-Oskoui F, Williams O, Chapman A. Mechanisms and management of hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(12):2194-201.
101. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation.* 2008;117(9):1161-71.
102. AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, et al. Ciliary polycystin-2 is a mechanosensitive calcium channel involved in nitric oxide signaling cascades. *Circ Res.* 2009;104(7):860-9.
103. Chapman AB, Johnson AM, Rainguet S, Hossack K, Gabow P, Schrier RW. Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(8):1292-7.
104. Martinez-Vea A, Valero FA, Bardaji A, Gutierrez C, Broch M, Garcia C, et al. Left ventricular hypertrophy in hypertensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: influence of blood pressure and humoral and neurohormonal factors. *Am J Nephrol.* 2000;20(3):193-200.
105. Doultou TW, Saggarr-Malik AK, He FJ, Carney C, Markandu ND, Sagnella GA, et al. The effect of sodium and angiotensin-converting enzyme inhibition on the classic circulating renin-angiotensin system in autosomal-dominant polycystic kidney disease patients. *J Hypertens.* 2006;24(5):939-45.
106. Oflaz H, Alisir S, Buyukaydin B, Kocaman O, Turgut F, Namli S, et al. Biventricular diastolic dysfunction in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2005;68(5):2244-9.
107. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IY, Yuan S, Sun Z, et al. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;58:199-208.
108. Balbo BE, Amaral AG, Fonseca JM, de Castro I, Salemi VM, Souza LE, et al. Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice with phenotype rescue by galectin-3 knockout. *Kidney Int.* 2016;90(3):580-97.
109. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernández C, et al. Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation.* 2015;131(24):2131-42.

110. Altamirano F, Schiattarella GG, French KM, Kim SY, Engelberger F, Kyrychenko S, et al. Polycystin-1 Assembles with Kv Channels to Govern Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. *Circulation*. 2019.
111. Kuo IY, Kwaczala AT, Nguyen L, Russell KS, Campbell SG, Ehrlich BE. Decreased polycystin 2 expression alters calcium-contraction coupling and changes β -adrenergic signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16604-9.
112. Kuo IY, Duong SL, Nguyen L, Ehrlich BE. Decreased Polycystin 2 Levels Result in Non-Renal Cardiac Dysfunction with Aging. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153632.
113. Giehl E, Lemos FO, Huang Y, Giordano FJ, Kuo IY, Ehrlich BE. Polycystin 2-dependent cardio-protective mechanisms revealed by cardiac stress. *Pflugers Arch*. 2017;469(11):1507-17.
114. Criollo A, Altamirano F, Pedrozo Z, Schiattarella GG, Li DL, Rivera-Mejías P, et al. Polycystin-2-dependent control of cardiomyocyte autophagy. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;118:110-21.
115. Lu J, Boheler KR, Jiang L, Chan CW, Tse WW, Keung W, et al. Polycystin-2 Plays an Essential Role in Glucose Starvation-Induced Autophagy in Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells*. 2018;36(4):501-13.
116. Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(4):238-50.
117. Marín-García J, Akhmedov AT. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2016;21(2):123-36.
118. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90(1):207-58.
119. Duncan JG, Finck BN. The PPARalpha-PGC-1alpha Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. *PPAR Res*. 2008;2008:253817.
120. Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem*. 2002;277(6):4098-103.
121. Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188:191-8.
122. Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(4):339-45.
123. Salah SM, Meisenheimer JD, Rao R, Peda JD, Wallace DP, Foster D, et al. MCP-1 promotes detrimental cardiac physiology, pulmonary edema, and death in the. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;317(2):F343-F60.

124. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):529.
125. Chong J, Yamamoto M, Xia J. MetaboAnalystR 2.0: From Raw Spectra to Biological Insights. *Metabolites*. 2019;9(3).
126. Bastos AP, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(7):606-17.
127. Riwanto M, Kapoor S, Rodriguez D, Edenhofer I, Segerer S, Wüthrich RP. Inhibition of Aerobic Glycolysis Attenuates Disease Progression in Polycystic Kidney Disease. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146654.
128. Fukushima A, Milner K, Gupta A, Lopaschuk GD. Myocardial Energy Substrate Metabolism in Heart Failure : from Pathways to Therapeutic Targets. *Curr Pharm Des*. 2015;21(25):3654-64.
129. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):333-43.
130. Facundo HDTF, Brainard RE, Caldas FRL, Lucas AMB. Mitochondria and Cardiac Hypertrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2017;982:203-26.
131. Hirai M, Chen J, Evans SM. Tissue-Specific Cell Cycle Indicator Reveals Unexpected Findings for Cardiac Myocyte Proliferation. *Circ Res*. 2016;118(1):20-8.
132. Haider N, Narula N, Narula J. Apoptosis in heart failure represents programmed cell survival, not death, of cardiomyocytes and likelihood of reverse remodeling. *J Card Fail*. 2002;8(6 Suppl):S512-7.
133. Song CJ, Zimmerman KA, Henke SJ, Yoder BK. Inflammation and Fibrosis in Polycystic Kidney Disease. *Results Probl Cell Differ*. 2017;60:323-44.
134. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1201-6.
135. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart*. 1997;78(3):273-7.
136. Dudek J. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:90.
137. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*. 2013;39(2):311-23.
138. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*. 2005;1(6):409-14.

139. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* 2000;165(2):1013-21.
140. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 2004;75(6):995-1000.
141. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock.* 2010;34(1):55-9.
142. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104-7.
143. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):389-402.
144. Banoth B, Cassel SL. Mitochondria in innate immune signaling. *Transl Res.* 2018;202:52-68.
145. Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Ownby ED, Kukreja RC, Fowler AA. Activation of hypoxia-inducible factor-1 via prolyl-4 hydroxylase-2 gene silencing attenuates acute inflammatory responses in postischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(3):H1571-80.
146. Bernhardt WM, Wiesener MS, Weidemann A, Schmitt R, Weichert W, Lechler P, et al. Involvement of hypoxia-inducible transcription factors in polycystic kidney disease. *Am J Pathol.* 2007;170(3):830-42.
147. Kraus A, Peters DJM, Klanke B, Weidemann A, Willam C, Schley G, et al. HIF-1 α promotes cyst progression in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2018;94(5):887-99.
148. Leonhard WN, Song X, Kanhai AA, Iliuta IA, Bozovic A, Steinberg GR, et al. Salsalate, but not metformin or canagliflozin, slows kidney cyst growth in an adult-onset mouse model of polycystic kidney disease. *EBioMedicine.* 2019;47:436-45.
149. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 2008;320(5882):1496-501.
150. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 2010;141(2):290-303.
151. Mazelin L, Panthu B, Nicot AS, Belotti E, Tintignac L, Teixeira G, et al. mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:213-25.
152. Pellegrino MA, Patrini C, Pasini E, Brocca L, Flati V, Corsetti G, et al. Amino acid supplementation counteracts metabolic and functional damage in the diabetic rat heart. *Am J Cardiol.* 2008;101(11A):49E-56E.

153. Patterson AJ, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med*. 2010;10(7):653-66.
154. Lalowski MM, Björk S, Finckenberg P, Soliymani R, Tarkia M, Calza G, et al. Characterizing the Key Metabolic Pathways of the Neonatal Mouse Heart Using a Quantitative Combinatorial Omics Approach. *Front Physiol*. 2018;9:365.
155. de Carvalho AETS, Bassaneze V, Forni MF, Keusseyan AA, Kowaltowski AJ, Krieger JE. Early Postnatal Cardiomyocyte Proliferation Requires High Oxidative Energy Metabolism. *Sci Rep*. 2017;7(1):15434.
156. Katanasaka Y, Suzuki H, Sunagawa Y, Hasegawa K, Morimoto T. Regulation of Cardiac Transcription Factor GATA4 by Post-Translational Modification in Cardiomyocyte Hypertrophy and Heart Failure. *Int Heart J*. 2016;57(6):672-5.
157. Bertero E, Sequeira V, Maack C. Hungry Hearts. *Circ Heart Fail*. 2018;11(12):e005642.
158. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(8):457-70.
159. McNulty PH, Jacob R, Deckelbaum LI, Young LH. Effect of hyperinsulinemia on myocardial amino acid uptake in patients with coronary artery disease. *Metabolism*. 2000;49(10):1365-9.
160. Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*. 2007;115(19):2540-8.
161. Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;325(1-2):54-63.
162. Sprenger HG, Langer T. The Good and the Bad of Mitochondrial Breakups. *Trends Cell Biol*. 2019.
163. Priolo C, Henske EP. Metabolic reprogramming in polycystic kidney disease. *Nat Med*. 2013;19(4):407-9.
164. Ramila KC, Jong CJ, Pastukh V, Ito T, Azuma J, Schaffer SW. Role of protein phosphorylation in excitation-contraction coupling in taurine deficient hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308(3):H232-9.
165. Gabr RE, El-Sharkawy AM, Schär M, Panjra GS, Gerstenblith G, Weiss RG, et al. Cardiac work is related to creatine kinase energy supply in human heart failure: a cardiovascular magnetic resonance spectroscopy study. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2018;20(1):81.
166. Chen Y, Tang Y, Zhang YC, Huang XH, Xie YQ, Xiang Y. A metabolomic study of rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy and Shengmai injection treatment. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125209.

167. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(11):749.
168. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3143-53.
169. Chang MY, Ma TL, Hung CC, Tian YC, Chen YC, Yang CW, et al. Metformin Inhibits Cyst Formation in a Zebrafish Model of Polycystin-2 Deficiency. *Sci Rep*. 2017;7(1):7161.
170. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122(6):253-70.

* De acordo com: Vancouver, ordem de citação. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

As referências foram inseridas utilizando-se ferramentas on-line do *software* EndNote.

8. ANEXO

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

URL: <https://circres-submit.aha-journals.org>

Manuscript Number: CIRCRES/2019/316219

Title: Cardiac dysfunction in Pkd1 deficient mice is associated with metabolic rewiring, inflammation and apoptosis

Authors:

Andressa Amaral
Camille da Silva
Kinulpe Honorato-Sampaio
Amaro Duarte-Neto
Antonio Bloise
Laura Cassina
Alessandra Boletta
Alicia Kowaltowski
Luiz Onuchic

For Circulation
distribute.

Circulation Research Online Submission: <https://circres-submit.aha-journals.org>

Circulation Research Homepage: <http://circres.aha-journals.org>

Circulation Research Editorial Office

3355 Keaswick Rd, Main Bldg 103

Baltimore, MD 21211

CircRes@circresearch.org

Telephone: 410-327-5005

Cardiac dysfunction in *Pkd1* deficient mice is associated with metabolic rewiring, inflammation and apoptosis

Andressa G. Amaral¹, Camille C. C. da Silva², Kinulpe Honorato-Sampaio³, Amaro N. Duarte-Neto⁴, Antonio C. Bloise⁵, Laura Cassina⁶, Alessandra Boletta⁶, Alicia J. Kowaltowski² and Luiz F. Onuchic^{1*}

¹Disciplinas de Nefrologia e Medicina Molecular, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brazil; ⁴Departamento de Emergências Clínicas,

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁵Departamento de Física Geral, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁶Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute,

Milan, Italy.

Short Title: Metabolic and cellular defects in *Pkd1*^{wt} mice heart

***Corresponding author:**

Luiz F. Onuchic, MD, PhD

University of São Paulo School of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine. Avenida Dr. Arnaldo, 455 - Sala 4304, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

Email: lonuchic@usp.br

Total word count (text): 8000

Subject codes: Animal Models of Human Disease, Cardiomyopathy, Mechanisms, Metabolism and Cellular Reprogramming

ABSTRACT

Rationale: Cardiovascular manifestations account for significant morbidity and mortality in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Association between idiopathic dilated cardiomyopathy and ADPKD as well as a primary role for *Pkd1* and *Pkd2* deficiency in this dysfunction have been recently described, however the pathogenic mechanisms remain largely unknown.

Objective: To investigate the metabolic and cellular basis of the ADPKD-associated cardiac phenotype.

Methods and Results: We used a mouse homozygous for a *Pkd1* hypomorphic allele (*Pkd1^{VV}*, VV) with early cardiac dysfunction as our experimental model. Dysfunctional VV hearts were not hypertrophic but displayed increased apoptosis and inflammation compared to wild-type controls. Expression of *Nppa* and *Acta1* was increased in VV cardiac tissue, revealing inappropriate transcriptional transition to the mature state. Downregulation of *Ppara*, *Pgc1a*/PGC1, total and phosphorylated AMPK and phosphorylated ACC β , in turn, was associated with abnormal lipid metabolism and increased glucose oxidation. Unlike *Pkd1*-deficient kidneys, mTORC1 is downregulated, glucose is not targeted for aerobic glycolysis and glutamine is increased in VV hearts. Such findings were accompanied by increased mitochondrial density with decreased size and increased oxygen consumption in response to glucose. NMR experiments identified a distinct metabolite profile in VV hearts, associated with decreased levels of glucose and amino acids (serine, alanine, tyrosine, valine, proline, methionine, glutamate, glycine, aspartate, isoleucine and histidine). These data suggest that glucose and amino acids may be used as energetic substrate and to sustain biosynthesis of metabolites likely involved in lipid metabolism and oxidative stress.

Conclusions: This is the first description of cardiac metabolic rewiring associated with *Pkd1* deficiency, revealing a pattern just partially similar to the metabolic profile previously observed in the cystic kidney phenotype. Our results constitute, therefore, a conceptual marker in the elucidation of the heart dysfunction pathogenesis associated with *Pkd1* deficiency, findings likely applicable to the cardiac phenotype in human ADPKD.