Crysthiane Saveriano Rubião Silva

Apoptose precoce, proliferação celular sincrônica tardia e perfil de expressão de proteínas ao complexo esclerose tuberosa e às doenças renais policísticas durante tubulogênese *in vitro*

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Crysthiane Saveriano Rubião
Apoptose precoce, proliferação celular sincrônica tardia e perfil de expressão de proteínas ao complexo esclerose tuberosa e às doenças renais policísticas durante tubulogênese *in vitro* / Crysthiane Saveriano Rubião Silva. -- São Paulo, 2013.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Esclerose tuberosa 2.Doenças renais policísticas 3.Túbulos renais 4.Biologia do desenvolvimento 5.Células cultivadas 6.Células epiteliais 7.Proliferação celular 8.Apoptose

USP/FM/DBD-051/13

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular, LIM 29, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio finaceiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílios 2009/04053-6 e CAPES (bolsa de mestrado)

*À minha mãe, **Irma Saveriano Rubião Silva** pelo eterno amor, me mostrar o caminho nas horas incertas e pelo apoio incondicional em todos os momentos.*

*Ao meu pai, **Luiz Rubião Silva**, pelo amor, carinho e compreensão. Obrigada por todos as palavras de incentivo e educação, apoio nos momentos mais difíceis, me fez acreditar que cada dia seria diferente.*

*A minha avó **Lucrecia Rodrigues Silva,** por fazer parte de minha educação, amor e por entender meus momentos de ausência.*

*Ao **Felipe Augusto André Ishiy**, pelo apoio incondicional, amor, companheirismo nos inúmeros finais de semana no laboratório, sempre ao meu lado em todos os momentos me incentivou e me ensinou a ser uma pessoa melhor a cada dia. Amo você.*

"There's nothing you can make that can't be made
No one you can save that can't be saved
Nothing you can do, but you can learn how to be you in time
It's easy"

Lennon and McCartney

Ao meu orientador ***Professor Dr. Luiz Fernando Onuchic****, por sua qualidade humana e seriedade profissional, um verdadeiro exemplo de orientador, sua sabedoria, dedicação e interesse guiou meus passos e me permitiu crescer profissionalmente tornando possível a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão.*

A ***Dra. Luciana Haddad****, do Laboratório de Genômica Funcional IB-USP pela co-orientação, colaboração científica e material neste projeto.*

A ***Andressa Godoy Amaral*** *pela amizade, ajuda nos momentos críticos, por colaborar na confecção desta dissertação e pela palavras de conforto*

Aos amigos ***Ana Paula Almeida Bastos, Zenaide Providello Moysés, Jonathan M.Fonseca e William Felix*** *verdadeiros amigos que ganhei, obrigada por cada voto de incentivo, paciência, confiança e momentos de descontração.*

Aos amigos, ***Bruno, Elieser, Fernanda, Margoth, Diego, Renata*** *pelo apoio, confiança, paciência, e pelos muitos momentos de descontração em todo esse período.*

Ao ***Dr. Juliano Dettoni*** *pela amizade e contribuição no aprimoramento e análises das imunofluorescências.*

Aos colegas do LIM-29, ***Dra. Irene, Amanda, Shirley, Alexandre, Cléo, Rodrigo, Filipe, Daniel, Andressa, Thalita, Leila, Priscila, Helio e Carina*** *pela amizade, apoio e compartilhamento de momentos muito agradáveis.*

A ***Cleonice Silva*** *(LIM29) e* ***Ivone*** *(LIM 16) por estarem sempre presentes nos momentos de dúvidas.*

A amiga ***Marcela Gonçalves,*** *por estar sempre presente em diferentes fases de minha vida, obrigada pela confiança e amizade.*

A amiga ***Dra Adriana Pires****, pela amizade e por contribuir com o meu crescimento profissional.*

As amigas ***Clarissa Chagas Donda, Nathalie Sigaki*** *e* ***Rebeca Pedrosa*** *por estarem sempre ao meu lado.*

Ao ***Dr. Isac de Castro*** *pelo apoio na realização das análises estatísticas.*

Ao ***Waldir Caldeira*** *pelo apoio e incentivo no início de meu mestrado.*

A ***Ana Lucia Garippo*** *(Incor) pelo incentivo nas horas de desespero, ensinamentos e apoio técnico excepcional.*

Ao ***todos integrantes do LIM 12 e LIM 16,*** *pelo apoio e disponibilização de vosso espaço e materiais para realização de meus experimentos.*

A minha segunda família ***Maria Augusta, Edson*** *e* ***Carlos Ishiy*** *pelo carinho nas horas em que mais precisei. A ajuda de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Muito Obrigada*

A realização deste trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, a todos, meus sinceros agradecimentos

A ***Deus****, por me amparar nos momentos difíceis, guiando-me em todos momentos.*

À ***Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo e CAPES*** *pela concessão da bolsa.*

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

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

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

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

SUMÁRIO

Índice de Figuras..... v

Índice de Tabelas..... viii

Lista de Siglas..... ix

Lista de Símbolos..... xv

Resumo..... xviii

Summary..... xxi

1.INTRODUÇÃO..... 1

1.1 O complexo da Esclerose Tuberosa (TSC) 1

1.2. Manifestações Clínicas..... 2

1.3. Genética da Esclerose Tuberose..... 5

1.4 Lesões Císticas Renais no TSC..... 6

1.5. As proteínas Hamartina e tuberina nos rins..... 8

1.6. A Doença Renal policística autossômica dominante (DRAPD) 9

1.6.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas..... 9

1.6.2. Genética e Bases Moleculares da DRPAD..... 11

1.6.3. Mecanismo da Formação de Cistos na DRPAD..... 14

1.7. Doença Renal Policística Recessiva..... 15

1.7.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas..... 15

1.7.2. Genética e Bases Moleculares da DRPAR..... 16

1.8. Vias de sinalização Envolvidas na Patogênese da TSC e DRPAD..... 17

1.9. A Síndrome de Delação de Genes Contíguos *TSC2-PKD1*..... 21

1.10. Organogênese e Morfogênese Renais..... 21

1.11. Tubulogênese *in vitro*..... 23

2. OBJETIVOS..... 26

3. MÉTODOS..... 27

3.1. Linhagem Celular..... 27

3.2. Cultivo de células IMCD em sistema bidimensional..... 27

3.3. Cultivo de células IMCD em sistema tridimensional com gel de colágeno ou matrigel..... 27

3.4. Cultivo de IMCD em sistema tridimensional em gel de colágeno tipo I / Matrigel..... 29

3.5. Anticorpos..... 30

3.6. Imunofluorescência Indireta de células em sistema bidimensional..... 31

3.7. Imunofluorescência Indireta de células em sistema tridimensional..... 31

3.8. Microscopia Confocal..... 32

3.9. Análise de Proliferação Celular e Apoptose..... 33

3.10. Expressão relativa de policistina-1 e policistina-2 em estruturas tubulares..... 33

3.11. *Western Bloting*..... 34

3.12. Análise Estatística..... 35

4. RESULTADOS..... 36

4.1. Distribuição subcelular da hamartina e tuberina em IMCD sob condições 2D.... 36

4.2. Estruturas obtidas ao cultivo de IMCD em sistema tridimensional em gel de colágeno tipo I..... 39

4.3. Expressão de hamartina e tuberina em IMCD após cultivo 3D em Colágeno tipo I..... 42

4.4. Análises de formação tubulogênica em Colágeno/Matrigel 3D..... 43

4.5. Expressão de hamartina e tuberina em túbulos derivados de células IMCD..... 51

4.6. Expressão de policistina-1, policistina-2 e poliductina em túbulos derivados de células IMCD..... 55

5. DISCUSSÃO..... 59

6. CONCLUSÃO..... 70

7. ANEXOS..... 72

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das estruturas da policistina-1 e da policistina-2 e representação de seus domínios fundamentais..... 07

Figura 2. Mecanismo molecular da cistogênese focal na DRPAD, baseado no modelo de dois eventos..... 12

Figura 3. Associação entre o complexo hamartina/tuberina e a via mTOR..... 22

Figura 4. Polarização celular em túbulos e cistos. Os domínios basolateral e apical da membrana das células estão indicados, assim como o lúmen de túbulos ou cistos..... 26

Figura 5. Cultivo bidimensional de células IMCD 4DIV..... 34

Figura 6. Co-localização de tuberina e hamartina em cultivo bidimensional..... 36

Figura 7. Células IMCD cultivadas em colágeno tipo I formam estruturas alongadas após 9DIV..... 37

Figura 8. Cultivo tridimensional de células IMCD em colágeno tipo I ao longo de nove dias de cultivo..... 38

Figura 9. Cultivo tridimensional de células IMCD em Matrigel puro..... 39

Figura 10. Co-localização de tuberina e hamartina em cultivo tridimensional..... 42

Figura 11. Cultivo de células IMCD em colágeno/matrigel 3D..... 55

Figura 12. Estrutura tubular com epitélio simples e lúmen no 12DIV..... 56

Figura 13. Visualização da formação luminal através de seções *z* obtidas por microscopia confocal..... 57

Figura 14. Imunofluorescência indireta realizada com o anticorpo anti β-catenina..... 58

Figura 15. Perfil de expressão de ZO-1 em cultura de células IMCD em colágeno/matrigel 3D no12 DIV..... 61

Figura 16. Perfil de expressão da α-tubulina acetilada em túbulos bem

formados.....64

Figura 17. Análise comparativa da proliferação celular entre estruturas alongadas em 6 DIV..... 65

Figura 18. Análise comparativa de taxa de apoptose celular entre estruturas alongadas 6DIV..... 68

Figura 19. Co-localização da expressão de tuberina e hamartina em cultura tridimensional (3D) de células IMCD nos 12DIV..... 70

Figura 20. Co-localização da expressão de tuberina e hamartina em cultura tridimensional de células IMCD no 6 DIV..... 72

Figura 21. Análise da intensidade de co-localização entre tuberina e hamartina..... 73

Figura 22. Expressão de hamartina e tuberina por *Western blotting*..... 75

Figura 23. Perfil de expressão de policistina-1 e policistina-2 em cultura tridimensional de células IMCD no 12 DIV..... 77

Figura 24. Perfil de expressão de policistina-1 e policistina-2 em cultura tridimensional de células IMCD no 6 DIV.....79

Figura 25. Razão de intensidade de fluorescência entre áreas não ramificadas e ramificadas, para policistina-1 e policistina-2..... 80

Figura 26. Perfil de expressão de poliductina em cultura tridimensional de células IMCD no 12 DIV 81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. **Critérios principais e secundários para o diagnóstico do TSC**..... 55

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SIGLAS

aa	aminoácidos
AIC	aneurisma intracraniano
Akt	*protein kinases B*
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AP-1	*activator protein 1*
C	cistos
Cdk2	*cyclin-dependent kinase 2*
CAP	Cílio apical primário
DHPAD	doença hepática policística autossômica dominante
DRCt	doença renal crônica terminal
DRP	doença renal policística
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante tipo 1
DRPAD2	doença renal policística autossômica dominante tipo 2
DRPAR	doença renal policística autossômica recessiva
ERK	*extracellular signal-regulated protein kinase*
ERM	Proteínas ezrina, radixina e moesina
eIF4E	*Eukaryotic translation initiation factor 4E*
floxed	*flanked by loxP*
FRT	*flippase recognition target*
GAP	GTPase da tuberina
GPS	*G-protein-coupled receptor proteolytic site*

HALT-PKD	HALT *progression of polycystic kidney disease*
HGF	*Hepatocyte growth factor*
HT	heterozigoto
JAK2	*janus kinase 2*
JAK2-STAT1	*janus kinase 2 – signal transducer and activator of transcription 1*
KIF3A	*kinesin family member 3A*
LAM	Linfagioleiomiomatose pulmonar
MAPK	*mitogen-actived protein kinase*
MC	microcistos
MDCK	*Madin-Darby canine kidney*
MEC	Matrix extracelular
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
mIMCD	mouse inner medullary collectind duct
NFL	neurofilamento
PACS-1	*phosphofurin acidic cluster sorting protein 1*
PACS-2	*phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*
PD1	poliductina
PBS	*phosphate buffered saline*
PC1	policistina-1
PC2	policistina- 2
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PCK	*polycystic kidney*

pcy	*polycystic*
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinase
PKD1	*polycystic kidney disease 1*
PKD2	*polycystic kidney disease 2*
PKHD1	*polycystic kidney and hepatic disease 1*
PKG	*cGMP-dependent protein kinase*
PP2A	proteína fosfatase 2A
REJ	*receptor for egg jelly*
Rheb	*ras homolog enriched in brain*
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
siRNA	RNA curto interferente
shRNA	grampo curto de RNA
SV	selvagem
TSC1	*Tuberous clerosis complex 1*
TSC2	*tuberous sclerosis complex 2*
VHL	*Von Hippel Lindau*
Wnt	*Wingless-int*
3D	sistema tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
Ca^{++}	cálcio
Cl^{-}	cloreto
dL	decilitros
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
ºC	graus Celsius
h	hora
^{125}I	iodo-125
kb	kilobase
kg	kilogramas
L	litro
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
µg	micrograma
µm	micrômetro
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
mmol	milimolar
min	minutos
mol	molar
ng	nanograma
p	coeficiente de significância estatística
pb	par de base
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
%	porcentagem
K^{+}	potássio
sem	semanas
s	segundos
Na^{+}	sódio
UA	unidades arbitrárias
UI/ml	unidades por mililitros
X	vezes

RESUMO

RESUMO

Silva CSR. **Apoptose Precoce, Proliferação Celular Sincrônica Tardia e Perfil de Expressão de Proteínas Relacionadas ao Complexo Esclerose Tuberosa e às Doenças Renais Policísticas Durante Tubulogênese *In Vitro*.** [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013

Resumo

O complexo esclerose tuberosa (CET) e as doenças renais policísticas autossômica dominante (DRPAD) e autossômica recessiva (DRPAR) são doenças monogênicas associadas a cistogênese renal. Os produtos dos genes mutados nessas enfermidades, respectivamente tuberina e hamartina para CET, policistina-1 (PC1) e policistina-2 para DRPAD, e poliductina/fibrocistina para DRPAR, modulam proliferação, diferenciação, apoptose, crescimento e/ou migração celular. Neste estudo empregamos um sistema tridimensional de cultura de células IMCD para caracterizar os perfis de expressão dessas proteínas durante a tubulogênese. Usando uma matriz de colágeno tipo I/Matrigel e fator de crescimento de hepatócito (HGF), a formação de estruturas alongadas se iniciou dois dias após o plaqueamento *in vitro* (2 DIV), ao passo que o desenvolvimento de lúmen ocorreu entre 10-14 DIV. A marcação para caspase-3 ativa foi mais intensa nas fases iniciais da tubulogênese, enquanto a marcação para Ki-67 foi uniformemente pronunciada em estágios mais tardios. A tuberina e a hamartina apresentaram expressão citoplasmática e co-localização acentuada em 6 e 12 DIV. A PC1 apresentou maior expressão nas porções ramificadas dos túbulos que nas não ramificadas no 12 DIV, um padrão não verificado para a PC2. Estas proteínas exibiram expressão citoplasmática, assim como expressão ocasional e pontual na membrana plasmática. PD1 também apresentou expressão citoplasmática. Nossos dados sugerem que a apoptose e a ciclagem celular sincrônica durante a tubulogênese *in vitro* são mais acentuadas, respectivamente, em fases mais precoces e mais tardias da formação tubular. Nossos achados demonstram, além disso, que as proteínas relacionadas ao CET e às DRPs são expressas *in vitro* durante a

tubulogênese, apoiando um papel importante para a interação tuberina-hamartina na formação tubular, e são consistentes com o padrão de expressão diferencial da PC1 observado durante a nefrogênese.

Descritores: 1.Esclerose tuberosa 2.Doenças renais policísticas 3.Túbulos renais 4.Biologia do desenvolvimento 5.Células cultivadas 6.Células epiteliais 7.Proliferação celular 8.Apoptose

SUMMARY

SUMMARY

Tuberous sclerosis complex (TSC) and autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases (ADPKD and ARPKD) are monogenic diseases associated with renal cystogenesis. The products of the genes mutated in these disorders, respectively tuberin and hamartin for TSC, and polycystin-1 (PC1), polycystin-2 (PC2) and polyductin/fibrocystin (PD1) for PKD, modulate cell proliferation, differentiation, apoptosis, growth and/or migration. We have employed an IMCD tridimensional cell culture system to characterize their expression profiles along tubulogenesis. Using a type I collagen/Matrigel matrix and hepatocyte growth factor (HGF), the formation of elongated structures initiated 2 days after *in vitro* plating (2 DIV) while lumen developed between 10-14 DIV. Active caspase-3 labeling was more intense in initial phases of tubulogenesis while Ki-67 staining was uniformly pronounced in later stages. Tuberin and hamartin showed cytoplasmic expression and marked co-localization at 6 and 12 DIV. PC1 displayed higher expression in branching than non-branching portions of the tubules at 12 DIV, a pattern not verified for PC2. These proteins presented cytoplasmic and occasional, punctate membrane expression. PD1 also showed cytoplasmic expression. Our data suggest that apoptosis and synchronous cell cycling during *in vitro* tubulogenesis are more remarkable, respectively, in early and later steps of tubule formation. In addition, our findings demonstrate that the TSC and PKD proteins are expressed *in vitro* during tubulogenesis, supporting an important role for tuberin-hamartin interaction in tubular formation, and are consistent with the differential PC1 expression pattern observed during nephrogenesis.

Descritores: 1.Tuberous Sclerosis 2.Polycystic kidney diseases 3.Kidney Tubules 4.Developmental Biology 5.Cells cultured 6.Epithelial Cells 7.Cell Proliferation 8.Apoptose

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Complexo da Esclerose Tuberosa (TSC)

O complexo da esclerose tuberosa (TSC, do inglês, *Tuberous Sclerosis Complex*) é um transtorno multissistêmico, com expressão variável, caracterizado por lesões com células displásicas, denominadas hamártias (apresentando maior potencial de proliferação que o tecido adjacente) e hamartomas (tumores benignos com crescimento lento). Nesta enfermidade, hamártias e hamartomas acometem comumente o cérebro, rins, pulmões, retina, coração e pele, embora outros órgãos possam também ser envolvidos (Shepherd e Gomez, 1991; Roach *et al.*, 1998; Hyman *et al.*, 2000; Curatolo *et al.*, 2001).

O TSC é uma doença genética de herança autossômica dominante, causada por mutações nos genes supressores de tumor *TSC1* ou *TSC2*, os quais codificam para as proteínas hamartina e tuberina, respectivamente (European Consortium.,1993; Van Slegtenhorst *et al.*, 1997). O TSC pode ocorrer tanto como casos esporádicos (70% dos casos), em que ocorrem mutações germinativas novas, quanto como casos familiais (30%), em que as mutações são herdadas. A mutação no gene *TSC2* é cinco vezes mais comum que em *TSC1* nos casos esporádicos, diferença não observada em casos familiais (Kwiatkowski *et al.*, 2005). Estima-se que uma a cada seis mil pessoas seja portadora de mutação em *TSC1* ou *TSC2* (Kwiatkowski *et al.*, 2005). Dessa forma, embora raro, estima-se que o TSC afete aproximadamente um milhão de pessoas no mundo, das quais ao menos 30.000 brasileiros.

1.2. Manifestações Clínicas

As lesões do TSC associadas às mais altas morbidade e mortalidade incluem:

a) tuberosidades corticais (hamártias focais no córtex cerebral, caracterizadas pela presença de neurônios anormais alargados, gliose e células gigantes pouco diferenciadas com fenótipo neuronal/glial), presentes em cerca de 90% dos pacientes. Podem se manifestar clinicamente desde o nascimento, por meio de crises convulsivas refratárias ao tratamento medicamentoso em 40% dos casos, e se associar à deficiência intelectual moderada a grave, autismo e outros distúrbios do comportamento (Crino *et al.*,2006; Hyman *et al* 2000; Marcotte *et al* 2006; Chu-Shore *et al.*, 2010);

b) angiomiolipomas renais no adulto (hamartomas com caráter infiltrativo de composição histológica mista e variável, apresentando tecido adiposo, músculo liso hiperplásico e hipertrófico e exuberante vascularização) ocorrendo em até 80% pacientes com TSC (Shepherd e Gomez, 1991; Walsh e Sanqueza, 2009);

c) linfangioleiomiomatose (LAM) pulmonar, lesão rara (6% dos pacientes), bilateral, difusa e grave, podendo evoluir para insuficiência respiratória aguda. Acomete, na vasta maioria dos casos, pacientes do sexo feminino, mais comumente de forma isolada, embora possa se apresentar associada a angiomiolipomas e com caracterização similar a estes, mas com predomínio de vasos linfáticos (Moss *et al.*, 2001);

d) doença renal policística em 5% dos casos (Shepherd e Gomez, 1991; Hyman *et al.*,2000; Henske *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008).

Dada a alta frequência do comprometimento cerebral, as complicações neurológicas são as mais prevalentes. Segue-se, então, o acometimento renal, onde o desenvolvimento de angiomiolipomas e doença renal policística podem determinar evolução para insuficiência renal crônica (Cook *et al.*, 1996; O'Callaghan *et al.*, 2004; Rosser *et al.*, 2006). Hamartomas e hamártias de outra natureza, por sua vez, também são observados em pacientes com TSC, conforme listado na Tabela 1. Tais lesões podem ser traduzidas ao exame físico como lesões cutâneas, incluindo máculas hipocrômicas, fibromas ungueais e angiofibromas faciais.

O diagnóstico do TSC é essencialmente clínico, baseando-se em achados de exame físico e exames de imagens. Visto que as lesões descritas na Tabela 1 podem ocorrer de maneira isolada, procedeu-se à classificação de tais manifestações em critérios principais e secundários, de modo a elaborar critérios diagnósticos.

TABELA 1: Critérios principais e secundários para o diagnóstico do TSC

Critérios principais:

- Angiofibromas faciais ou espessamento da pele na região frontal
- Fibromas ungueais ou periungueais, não traumáticos
- Máculas hipomelanóticas (três ou mais)
- Espessamento da pele na região lombar
- Hamartomas nodulares múltiplos na retina
- Tuberosidades corticais**
- Nódulos subependimais
- Astrocitoma gigante subependimal
- Rabdomioma cardíaco, isolado ou múltiplos
- Linfangioleiomiomatose (LAM) pulmonar*
- Angiomiolipoma renal*

Critérios secundários:

- Microcrateras escuras aleatoriamente distribuídas no esmalte dentário
- Pólipos retais hamartomatosos
- Cistos ósseos
- Linhas de migração radial na substância branca cerebral**
- Fibromas gengivais
- Hamartoma não renal
- Acromia retiniana
- Lesões em confete hipercromáticas na pele
- Cistos renais múltiplos

---

* Quando o paciente apresenta LAM e angiomiolipomas renais, outros critérios do TSC devem estar presentes antes de se fazer o diagnóstico de TSC.
** Tuberosidades corticais, em presença de linhas de migração radial: considera-se somente o critério primário.

O diagnóstico clínico, por seu turno, é considerado definitivo, provável ou possível, de acordo com os seguintes critérios:

a) Diagnóstico definitivo de TSC: dois critérios principais ou um critério principal e dois secundários.

b) Diagnóstico provável de TSC: um critério principal e um secundário.

c) Diagnóstico possível de TSC: um critério principal ou dois ou mais critérios secundários.

1.3. Genética da Esclerose Tuberosa

Uma vez que o TSC pode ocorrer por mutação em um de dois genes, *TSC1* ou *TSC2* (European Consortium,1993; van Slegtenhorst *et al.*, 1997), testou-se a hipótese de que os produtos da expressão desses genes, respectivamente as proteínas hamartina e tuberina, interagissem fisicamente, formando um complexo molecular que regulasse funções como proliferação, diferenciação, crescimento e migração celular. Disfunções nessas atividades biológicas levariam ao surgimento dos tumores benignos observados nos pacientes com TSC. A haploinsuficência de *TSC1* ou *TSC2*, contudo, não é suficiente para o desenvolvimento desses tumores. Como genes supressores de tumor, as lesões surgem em virtude de uma segunda mutação, desta vez somática, seguindo o modelo knudsoniano (Knudson, 1971). Em sintonia com esse mecanismo, dois resultados importantes foram demonstrados: (i) interação entre hamartina e tuberina (Plank *et al.*,1998; van Slegtenhorst *et al.*, 1998); e (ii) perda de heterozigose nos *loci TSC1* ou *TSC2*, em diferentes tecidos tumorais de pacientes com TSC (Green *et al.*,1994; Henske *et al.*, 1996).

1.4. Lesões Císticas Renais no TSC

A doença cística renal ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes com esclerose tuberosa (Dabora *et al.*,2001., Rakowski *et al.*,2006), manifestando-se frequentemente como cistos ocasionais ou numerosos derivados de diferentes partes do néfron, na região cortical ou medular. Tal envolvimento não poupa o glomérulo e pode conferir ao rim acometido uma aparência esponjosa (Casper *et al.*, 2002; Bissler *et al.*,2010). Deve-se destacar que nos critérios diagnósticos mencionados (Tabela 1), apenas a presença de cistos renais múltiplos constitui-se em critério secundário (Laucks *et al.*,1981). Enquanto o desenvolvimento de angiomiolipomas ocorre principalmente em adultos com esta enfermidade, o surgimento de cistos renais não se acompanha de um pico etário claro de prevalência (Steiner MJ *et al.*,1993; Kernelly *et al.*, 1994; Ewalt *et al.*,1998).

Os cistos renais são geralmente assintomáticos e identificados junto ao quadro global do TSC, em casos já envolvendo outros órgãos ou mesmo os rins por angiomiolipomas. Podem, entretanto, também constituir a primeira manifestação do TSC em pacientes que desenvolverão posteriormente outros sinais da doença (Webb *et al.*, 1993). A evolução dos cistos renais do TSC é variável, podendo ciclar entre regressão e progressão numérica e de tamanho. Se sintomáticos, as manifestações clínicas decorrem de efeito de massa, com compressão e obstrução de estruturas do tecido, causando perda funcional e hipertensão arterial. A manifestação precoce (no primeiro ano de vida) e grave da doença cística renal sugere sua associação com doença renal policística autossômica dominante (O´Callaghan *et al.*, 1975; Stapleton *et al.*, 1980).

Embora os cistos renais tendam a serem maiores no TSC, são raramente distintos dos que ocorrem na doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) à análise por ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética. A co-ocorrência de cistos renais e angiomiolipomas (10% dos casos de TSC), contudo, fortalece o diagnóstico de TSC (diagnóstico provável de TSC). Os cistos tendem a apresentar epitélio simples no TSC, com células eosinófilas, granulares e com núcleo grande, com aparência de epitélio tubular proximal, embora estudos de microdissecção tenham demonstrado que possam se originar de diferentes partes do néfron (Bernstein *et al.*, 1986; Björnsson *et al.*, 1996; Senger, 2000).

Um terceiro tipo de lesão renal observado em pacientes com TSC é o carcinoma de células renais, embora a associação deste com esta enfermidade esteja atualmente sendo questionada (Tello *et al.*,1998). Uma característica incomum dos carcinomas renais em pacientes TSC é a sua heterogeneidade histológica, incluindo carcinomas de células claras, carcinomas papilares e oncocitomas também relatados em pacientes TSC. Essa heterogeneidade contrasta fortemente com outros transtornos genéticos, como a doença de von Hippel-Lindau (VHL), cujo gene está deletado mais frequentemente em carcinomas de células claras (Bjornsson *et al.*,1996., Al-Saleem *et al.*,1998.,Henske *et al.*,2005). Não se sabe, ademais, se a evolução do carcinoma de células renais associado ao TSC difere da evolução do carcinoma de células renais da população em geral (Henske *et al.*,2005).

1.5. As proteínas hamartina e tuberina nos rins

As proteínas hamartina e tuberina apresentam uma expressão muito abrangente em tecidos e estágios de desenvolvimento de mamíferos. Embora hamartina e tuberina sejam co-expressas em muitos tipos celulares, outros apresentam a expressão de apenas uma delas (Murthy *et al.*, 2000, 2001). Em ratos, no período embrionário, a expressão dessas proteínas é ubiqua nos dias analisados E13, E16 e E19. Após o nascimento, a expressão da hamartina e da tuberina se reduz até o animal atingir a idade adulta, fase em que se observa basicamente a expressão das duas proteínas no cérebro (Murthy *et al.*, 2001). Isto é condizente com a idéia de o TSC ser um transtorno do desenvolvimento, com manifestações ao longo do período pós-natal, em sintonia com a queda progressiva da velocidade de desenvolvimento orgânico.

Por outro lado, em análises de imunofluorescência, a expressão de hamartina e tuberina foi observada no rim de ratos adultos, especificamente nos túbulos distais, no segmento conector e ductos coletores. A expressão da hamartina também foi encontrada na porção ascendente das alças de Henle e nas células justaglomerulares. No nível subcelular, a hamartina é encontrada no domínio apical da membrana plasmática, enquanto a tuberina se distribui difusamente no citoplasma e também no domínio apical da membrana plasmática, onde houve co-localização com a hamartina (Murthy *et al.*, 2000). A localização dessas proteínas no rim é fundamental à compreensão da patogênese do TSC, uma vez que o mesmo se constitui no segundo órgão mais frequentemente afetado nessa moléstia (Shepherd e Gomez, 1991).

1.6. A Doença renal policística autossômica dominante (DRPAD)

1.6.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma das doenças humanas hereditárias mais comum e constitui-se na principal doença renal monogênica, com uma prevalência de 1:400 a 1:1000 em populações de descendência europeia (Igarashi *et al*., 2009). Embora sua expressão clínica ocorra tipicamente na idade adulta, esta efermidade pode se manifestar antes dos 18 anos de idade em 1 a 2% dos casos (Gabow *et al*.,1992).

A DRPAD responde por 4,4% dos pacientes em diálise crônica ou transplantados renais nos EUA (U.S. Renal Data System, *Annual Data Report., 2003)*. Com penetrância de virtualmente 100%, a DRPAD é responsável por aproximadamente 5% dos casos de doença renal crônica terminal (Gabow *et al*.,1992; Harris *et al*., 2009). Nunes e cols, 2008 mostraram que esta enfermidade é responsável por aproximadamente 7,5% dos casos de doença renal crônica terminal (DRCt) no sul do Brasil, enquanto no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, 8,9% dos pacientes em DRCt encaminhados para terapia renal substitutiva eram portadores dessa moléstia (Balbo *et al*., 2007).Cerca de metade dos pacientes atingem os 58 anos de idade sem evoluir para DRCt (Gabow *et al*.,1992 ; Harris *et al*., 2009). Estes dados indicam o grande impacto médico e socioeconômico dessa desordem. Interessantemente, as taxas anuais de incidência de DRCt sugerem uma progressão mais rápida da doença em homens que em mulheres (Reed *et al*., 2008).

A DRPAD apresenta um fenótipo renal predominantemente, caracterizado pela formação de cistos renais múltiplos e bilaterais, seguindo um processo de aumento progressivo do volume renal, comprometimento da arquitetura do órgão e perda gradual da função renal. Esta doença associa-se também a manifestações extrarrenais representadas por cistos hepáticos, aneurismas intracranianos e alterações valvares cardíacas (Gabow *et al*., 1992). Os cistos renais na DRPAD podem se originar do epitélio de diferentes segmentos do néfron, embora estudos anteriores sugiram que os derivados dos ductos coletores sejam mais numerosos e maiores (Devuyst *et al*., 1996). Os cistos associados à DRPAD são revestidos por uma camada única de células epiteliais, menos diferenciadas e associadas a taxas elevadas de proliferação e apoptose (Igarashi *et al*., 2002).

A manifestação extrarrenal mais comum na DRPAD são os cistos hepáticos sendo geralmente detectados 10 anos após o aparecimento dos primeiros cistos renais. Disfunções hepáticas, contudo, são raras nesta doença, mesmo na presença de envolvimento cístico hepático intenso (Bae *et al*., 2006). Os aneurismas intracranianos (AICs) constituem-se em outra manifestação clínica importante na DRPAD. Os AICs acometem cerca de 8% dos pacientes, uma frequência três a quatro vezes maior que a da população geral (Pirson *et al*., 2002; Rinkel *et al*., 2008).

Os principais sintomas observados nos pacientes com DRPAD, como dor em flanco, lombar ou abdominal e plenitude pós-prandial, são consequência do aumento do tamanho dos rins, enquanto hematúria, infecção urinária e nefrolitíase constituem-se em complicações classicamente associadas aos cistos renais.

1.6.2. Genética e Bases Moleculares da DRPAD

A DRPAD é uma doença geneticamente heterogênea, sendo decorrente de mutações em um de dois genes: *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) ou *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*). Mutações em *PKD1* são responsáveis por cerca de 85% dos casos, enquanto aproximadamente 15% devem-se a mutações em *PKD2* (Igarashi *et al*., 2002; Iglesias *et al*., 1983) . O gene *PKD1* está localizado na região cromossômica 16p13.3 e, quando mutado, a doença é denominada DRPAD tipo 1 (DRPAD1), enquanto que o gene *PKD2*, mapeado a 4q21, quando mutado, dá origem à DRPAD tipo 2 (DRPAD2). Embora mutações em *PKD1* e *PKD2* determinem as mesmas manifestações renais e extrarrenais, pacientes com DRPAD1 apresentam uma forma mais grave da doença quando comparados a pacientes com DRPAD2 (Harris *et al*., 2009; Hateboer *et al*., 1999). A idade média para DRCt é de 54 anos na DRPAD1 e de 74 anos na DRPAD2 (Hateboer *et al*.,1999).

O gene *PKD1* distribui-se por um segmento genômico de cerca de 52 kb, compreende 46 éxons e dá origem a um transcrito de 14,2 kb, associado a um quadro de leitura aberta de aproximadamente 12,9 kb. *PKD1* codifica policistina-1 (PC1), uma glicoproteína integral de membrana com uma porção extracelular N-terminal com 3.074 aminoácidos, 11 domínios transmembrânicos e um segmento C-terminal intracelular curto com 197 aminoácidos (Harris PC *et al*., 2009) (Figura 1). A porção extracelular de PC1 contém domínios importantes para interações proteína-proteína e proteína-carboidrato. O gene *PKD2*, por sua vez, estende-se por um segmento genômico de aproximadamente 68 kb, compreende 15 éxons e expressa um RNA mensageiro de 5,4 kb, relacionado a um quadro de leitura aberta de 2,9 kb (Harris *et*

al., 2009). Esse gene codifica policistina-2 (PC2), também uma glicoproteína integral de membrana, porém com seis domínios transmembrânicos e ambas as extremidades N- e C-terminais intracitosólicas (Figura 1). A cauda intracelular da PC1 contém um domínio *coiled-coil*, envolvido na interação física com a porção C-terminal da PC2 e capaz de mediar transdução de sinais. PC2 funciona como um canal de cátions não-seletivo com permeabilidade a Ca^{2+}, cuja atividade é regulada pela PC1, que por sua vez atua como um receptor de membrana (Delmas *et al*, Cell 2004). A interação física entre PC1 e PC2 desempenha, portanto, um papel fundamental na homeostase do Ca^{++} intracelular e, consequentemente, em diversas vias de sinalização como proliferação celular, apoptose, diferenciação e expressão gênica (Delmas *et al*., 2004).

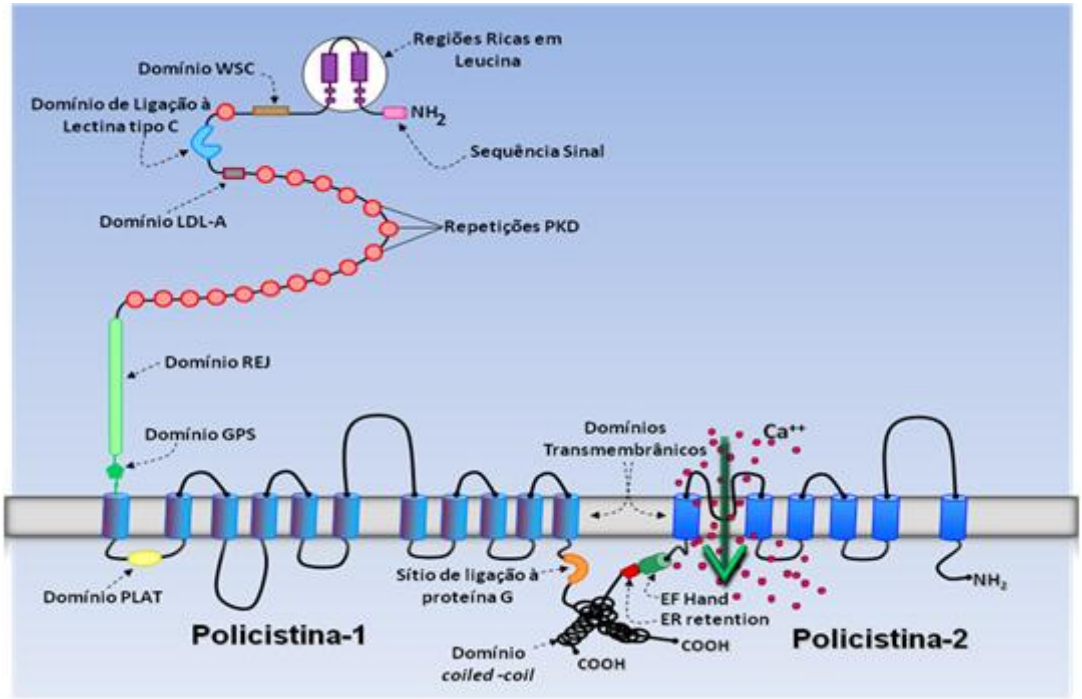


Figura 1. Esquema das estruturas da policistina-1 e da policistina-2 e representação de seus domínios fundamentais (cedida por Ana Paula Bastos)

Em túbulos maduros, PC1 se expressa na membrana basolateral, em sítios de interação célula-célula e célula-matriz extracelular, em vesículas citoplasmáticas e, possivelmente, no retículo endoplasmático (Chauvet *et al*., 2004; Scheffers *et al*., 2000). PC2, por outro lado, é encontrada predominantemente no retículo endoplasmático e em menor intensidade no cílio primário, na membrana plasmática, no centrossomo e nos eixos mitóticos de células em divisão. Merece destaque a co-localização de PC1 e PC2 no cílio apical primário (CAP) das células epiteliais tubulares renais. Nessa organela o complexo PC1-PC2 desempenha um papel central, modulando diversas ações biológicas dependentes de cálcio (Praetorius e Spring, 2003). Interessantemente, várias proteínas codificadas por genes mutados em doenças renais císticas humanas foram localizadas no complexo corpo basal/cílio apical primário, caracterizando a conexão entre CAP e doenças renais policísticas.

Durante o desenvolvimento renal, PC1 apresenta níveis elevados de expressão no período inicial da nefrogênese, de 5 a 24 semanas, porém, após 24 semanas seu nível de expressão diminui drasticamente, atingindo níveis muito baixos no rim adulto. PC2, por outro lado, é expressa durante toda a nefrogênese e mantém níveis elevados no rim maduro (Grimm *et al*., 2003). Alinhados a esse perfil de expressão, PC1 possui um papel biológico essencial na tubulogênese renal. Um estudo prévio demonstrou que células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), transfectadas de forma estável com *PKD1* e cultivadas em meio gel de colágeno de três dimensões, formaram estruturas tubulares epiteliais bem desenvolvidas, ao passo que as mesmas células, submetidas à transfecção controle negativa e cultivadas nas mesmas condições, formaram estruturas císticas (Boletta *et al*., 2000). Além disso, a

expressão de PC1 induziu redução na taxa de proliferação celular e resistência a apoptose neste modelo experimental.

É importante notar que PC1 também apresenta características compatíveis com uma molécula de adesão, observação consistente com sua localização em estruturas de adesão celular e junções célula-célula (Gallagher *et al*., 2000; Nauli *et al*., 2003; Yoder *et al*., 2002). PC1 forma um complexo nas junções de adesão com caderina-E e cateninas-α, β, e γ. Em um ambiente celular com privação de Ca^{++}, PC1 e caderina-E são sequestradas em vesículas citoplasmáticas. A restauração do Ca^{++}, por sua vez, deflagra o recrutamento de ambas as proteínas para restabelecer sítios de contato célula-célula (Streets *et al*., 2003; Markoff *et al*, 2007). Além disso, um estudo propôs que a PC1 regule também a força mecânica de adesão entre as células, através do controle da formação de junções de adesão estabilizadas e associadas à actina (Boca *et al*., 2007).

1.6.3. Mecanismo da Formação de Cistos na DRPAD

A formação cística na DRPAD constitui-se em um processo focal, acometendo segmentos de menos de 1% dos néfrons. Estudos demonstraram através de análises de amostras de DNA do epitélio de cistos renais individuais que na DRPAD os cistos são monoclonais. Mostrou-se, portanto, que embora a transmissão genética desta doença obedeça um padrão dominante, no nível celular/molecular o mecanismo de formação dos cistos é recessivo (Qian *et al*., 1996). Esse modelo estabelece, assim, um padrão *knudsoniano* para a cistogênese na DRPAD, incluindo dois eventos, onde o primeiro é representado pela mutação germinativa, enquanto o

segundo constitui-se em uma mutação somática no alelo previamente normal (Figura 2). Vale dizer que este modelo se aplica tanto à DRPAD1 como à DRPAD2, assim como a cistos renais e hepáticos.

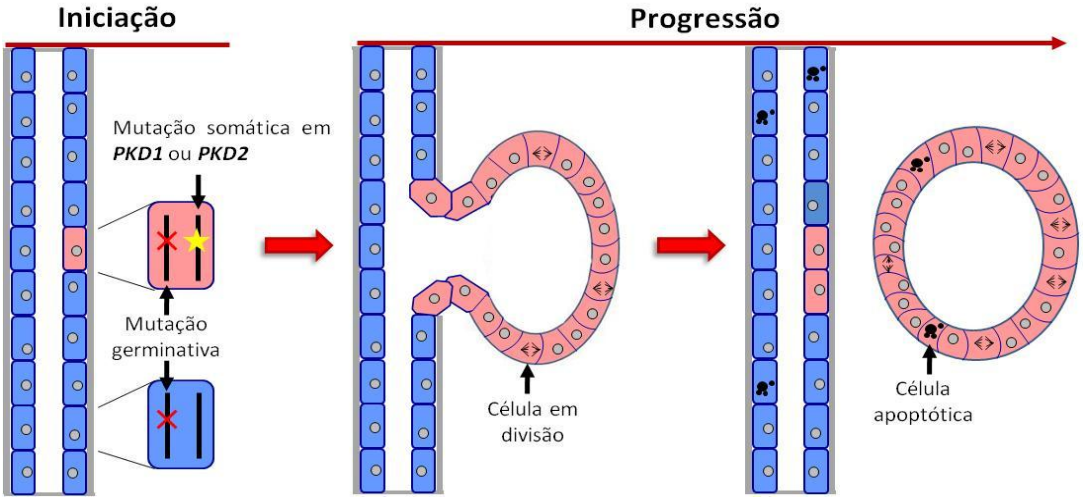


Figura 2. Mecanismo molecular da cistogênese focal na DRPAD, baseado no modelo de dois eventos. Figura cedida por Ana Paula Bastos

1.7. Doença Renal Policística Recessiva

1.7.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas

A doença policística autossômica recessiva (DRPAR) é bem menos comum que a DRPAD, acometendo aproximadamente 1/20000 nascidos vivos (Zerres *et al*., 1998a). Caracteriza-se por dilatações de ductos coletores renais e disgenesia biliar associada à fibrose portal (Zerres *et al*., 1998b). Embora a maior parte dos casos seja diagnosticada na infância, sua variabilidade fenotípica é grande, incluindo desde a

forma perinatal severa até apresentações clínicas mais tardias e brandas. O fenótipo fetal caracteriza-se por rins aumentados e hiperecogênicos e oligoidrâmnio decorrente de baixo débito urinário. Estes fetos desenvolvem ainda hiperplasia pulmonar, anomalias faciais e deformidades de coluna e membros. Ao nascimento, estes neonatos frequentemente manifestam um grau crítico de hipoplasia pulmonar e acabam morrendo em um curto período de tempo.

Os pacientes que sobrevivem ao período perinatal, apresentam morbidade e mortalidade relacionadas principalmente à hipertensão arterial sistêmica severa, insuficiência renal progressiva e hipertensão portal secundária a fibrose do trato portal (Guay-Woodford *et al*., 2003).

1.7.2. Genética e Bases Moleculares da DRPAR

Todas as formas típicas da DRPAR se associam a mutações patogênicas no gene *PKHD1*, localizado na região cromossômica 6p12.2. Este gene se estende por um segmento genômico de aproximadamente 470 kb e inclui ao menos 86 éxons, que se associam em múltiplas variantes por *splicing*. O transcrito associado ao quadro de leitura aberto mais longo codifica poliductina (PD1), também denominada fibrocistin (Harris *et al*., 2009 Menezes *et al*., 2006). Com base nos produtos alternativos de *splicing* de *PKHD1*(*Polycystyc Kidney Disease 1*), prevê-se que o gene codifique proteínas associadas à membrana, que poderiam atuar como receptores de superfície celular, bem como proteínas solúveis que poderiam, por sua vez, atuar como ligantes em vias de transdução de sinal (Menezes *et al*., 2004). Várias evidências sugerem que este complexo perfil de *splicing* seja biologicamente relevante.

PD1 também se localiza no corpo basal/axonema do CA (Menezes *et al*., 2004). É importante notar que a redução da expressão de PD1 por meio de RNA curto interferente (siRNA) diminuiu o tamanho e alterou a estrutura do cílio primário, indicando que esta proteína é fundamental para a manutenção dessa organela. Além disso, a inibição da expressão de PD1 por grampo curto de RNA (shRNA) comprometeu o processo de tubulogênese de células IMCD (*inner medullary collecting duct*) cultivadas em meio gel de três dimensões, sugerindo o envolvimento dessa PD1 nesse processo (Menezes *et al*., 2006).

1.8. Vias de Sinalização Envolvidas na Patogênese da TSC e DRPAD

O complexo hamartina-tuberina tem interações bem documentadas com algumas proteínas-chave. Sobressai-se a sua associação, através da tuberina, com a pequena Rheb (*GTPase enriquecida em cérebro*), que controla a mTOR (*alvo mamífero da rapamicina*), um regulador central da proliferação e crescimento celular. A interação entre o complexo hamartina-tuberina e Rheb se dá por sua interação com o domínio ativador de GTPase da tuberina (GAP), levando a sua inativação. Quando rheb está inativa, a via mTOR é inibida. A via da insulina-mTOR aumenta a captação de aminoácidos, a síntese protéica e o crescimento celular, em oposição ao que se observa quando o complexo *TSC1*/*TSC2* está ativo (Castro *et al.*, 2003; Garami *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Interessantemente, estudos mostraram que a porção C-terminal da PC1 é capaz de interagir com tuberina e suprimir a atividade da mTor e do eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) (Torres *et al., 2009).* Esta interação retém a tuberina

próxima à membrana plasmática, evitando sua fosforilação e inativação por AKT (protein kinases B) (Distefano *et al.*, 2009; Dere *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos nessa regulação ainda não estão completamente elucidados, porém é importante notar que, na ausência ou baixos níveis de PC1, não há inibição de Rheb. Este cenário leva à ativação de mTOR e consequente aumento da proliferação celular, contribuindo para o fenótipo da TSC e da DRPAD (Shillingford *et al.*, 2006; Dere e cols. 2010) (Distefano *et al.*, 2009; Dere *et al.*, 2010).

Lesões do TSC, inclusive cistos renais, apresentam hiperfosforilação de mTOR, alteração que identifica células em que o complexo hamartina-tuberina está deficiente (Schillingford *et al.*, 2006).

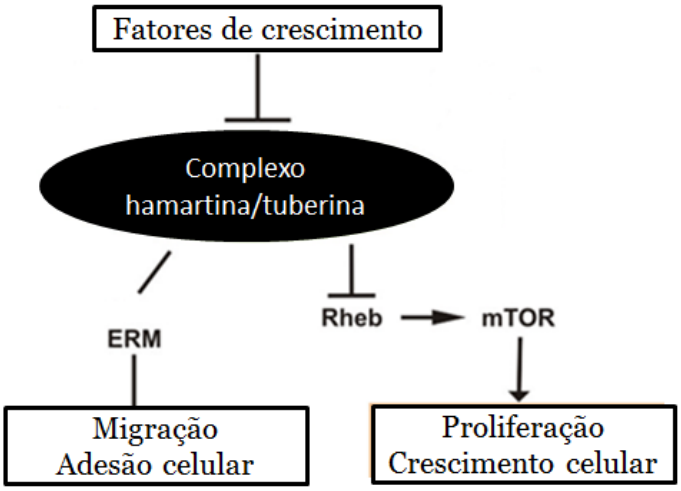


Figura 3. Associação entre o complexo hamartina/tuberina e a via mTOR.

Outras interações importantes referem-se às proteínas ezrina, radixina e moesina (ERM), que se associam à hamartina e se ligam à actina, modulando o arranjo de microfilamentos, processo importante na migração e adesão celular (Lamb *et al.*, 2000). Uma segunda interação da hamartina com o citoesqueleto se dá com a

cadeia leve do neurofilamento (NFL). Esta interação ocorre de forma específica nos neurônios, mas não é reprodutiva em outros tipos celulares, em que a expressão de outros membros da família dos filamentos intermediários é característica (Haddad *et al.*, 2002).

O baixo índice de mutações somáticas (segundo evento) observado em cistos renais, ao contrário de cistadenomas e carcinomas renais de camundongos nocautes para *Tsc1*, sugeriu que a super-ativação do mTOR seja um evento mais tardio na progressão dessas lesões (Wilson *et al.*, 2006). Bonnet e cols (2009) observaram, em modelos murinos heterozigotos para *Tsc1*, *Tsc2* e *Pkd1*, uma desorientação mitótica de células tubulares renais e de células do ducto hepático biliar anterior à formação de cistos. Bonnet e cols (2009) e Hartman e cols (2009) demonstraram, ainda, nos animais heterozigotos para *Tsc1* ou *Tsc2*, que os produtos desses genes estão envolvidos no controle da formação do cílio apical primário, de modo independente do complexo 1 do mTOR, sugerindo que defeitos da polaridade celular possam contribuir para a cistogênese renal.

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo fenótipo alterado da DRPAD ainda não são totalmente compreendidos, porém a participação de diversas vias alteradas pode elucidar, ao menos parcialmente, a patogênese molecular da DRPAD.

Células DRPAD apresentam uma resposta hiperproliferativa anormal ao AMPc (*Cyclic adenosine monophosphate*), efeito aparentemente relacionado à homeostase defeituosa de Ca^{2+} intracelular e não verificada para células renais epiteliais normais (Torres *et al.*, 2007). A diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} poderia estimular a adenil ciclase-6 e inibir a fosfodiesterase-1 dependente de cálcio/calmodulina, favorecendo o acúmulo intracelular de AMPc (Hanaoka *et al.*,

2000). Essas anormalidades levam à ativação da via MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase*), promovendo proliferação celular e secreção transepitelial de fluido, características fundamentais da DRPAD (Hanaoka *et al*., 2000).

O complexo PC1-PC2 é capaz de ativar a via JAK2-STAT1 (*janus kinase 2 - signal transducer and activator of transcription 1*), permitindo a formação de homodímeros STAT-1, que se translocam ao núcleo celular e se ligam à região promotora do gene p21 (*ciclin dependente kinase inhibitor 1*), estimulando a sua transcrição. p21, por sua vez, inibe a atividade de Cdk2 (cyclin dependent kinase 2), paralisando o ciclo celular em G0/G1. O aumento da taxa de proliferação em células DRPAD parece depender da incoordenação do ciclo celular, mediada pela diminuição da expressão de p21 (Park *et* al., 2007).

Outra característica importante da DRPAD é a perda da polaridade celular planar, podendo levar à conversão de estruturas tubulares em císticas. Essa alteração pode ser causada por disfunções centrossomais, amplificação ou ativação da via de sinalização Wnt *(wingless-int*) canônica dependente da catenina-β e inibição da via de sinalização Wnt não-canônica independente da catenina-β (Walz *et* al., 2010).

Adicionalmente, PC1 pode atuar como um receptor acoplado à proteína G e regular, também por esta via, processos celulares como proliferação, diferenciação, polaridade e secreção de fluido (Delmas *et* al., 2004; Parnell *et* al., 1998).

1.9. A Síndrome de Deleção de Genes Contíguos *TSC2-PKD1*

Após a clonagem dos genes *TSC1* e *TSC2*, uma observação interessante em relação às lesões renais foi de que os pacientes com TSC associado a uma forma grave da doença policística renal (DRP) podem ter deleção contígua dos genes *TSC2* e *PKD1*, um dos causadores da DRPAD, uma vez que eles se dispõem imediatamente adjacentes e em orientações opostas em 16p13.3 (Harris 1995; Mochizuki *et al.*,1996; European Consortium.,1996; Longa *et al.*1997; Sampson *et al.*, 1997). Ao contrário dos cistos renais do TSC, normalmente assintomáticos e sem alterar significativamente a função renal, a síndrome de genes contíguos *TSC2*/*PKD1*, afetando cerca de 5% dos pacientes com TSC, causa danos renais intensos, capazes de levar à doença renal crônica, terminal, ao longo segunda década de vida (Sampson *et al.*, 1997).

1.10. Organogênese e Morfogênese Renais

O rim embrionário humano se desenvolve ao longo de várias semanas até se tornar funcional por volta da décima terceira semana de gestação (Sadler.,2009; Larsen.,1997). Neste processo, durante a vida intra-uterina humana se desenvolvem três sistemas renais em sequência crânio-caudal: o pronefro, o mesonefro e os metanefro. O primeiro desses sistemas é rudimentar e não funcional. O segundo pode funcionar por um curto período no início do período fetal e o terceiro forma os rins permanentes (Sadler, 2009; Saxe'n *et al.*,1987).

O rim mesonéfrico surge como uma série de túbulos que se formam a partir do mesoderma intermediário, durante a quarta semana de gestação humana. Túbulos mesonéfricos prolongam-se rapidamente, adquirindo um novelo de capilares que formam o glomérulo na extremidade medial. Os túbulos formados ao redor do glomérulo, por sua vez, formam a cápsula de Bowman que, junto com o glomérulo, forma o corpúsculo renal. Na extremidade oposta ao túbulo desemboca o ducto longitudinal coletor, chamado ducto mesonéfrico ou ducto de Wolff. O rim mesonéfrico tem cerca de 40 pares de néfrons e permanece funcional até o final do quarto mês de gestação humana (Sadler *et al.*,2009)

Os rins metanéfricos são induzidos a se formar no mesoderma intermediário da região sacral do embrião, localizado em ambos os lados dos somitos e medial ao mesoderma lateral. Na formação do metanefro, dois sistemas se desenvolvem de forma fisicamente independente, mas controlados simultaneamente pela sinalização parácrina. A formação do sistema coletor a partir do broto ureteral, por seu turno, depende da tubulogênese adequada e é iniciada após a 5ª semana de gestação em humanos. O broto ureteral surge em resposta a sinais deflagrados pelo mesênquima metanéfrico adjacente (Piscione *et al.*,2002). A ramificação do broto ureteral é então iniciada, após este invadir o mesênquima metanéfrico.

Sinais do broto ureteral promovem a diferenciação do mesênquima que conduz o estabelecimento de diferentes linhagens celulares. Uma sub-população de células mesenquimais diferencia-se em células epiteliais (Legallicier *et al.*,2001). A epitelização inicia-se com a agregação das células mesenquimais na extremidade do broto ureteral que as invadiu (Pohl *et al.*,2000). Essa conversão fenotípica das células mesenquimais para epitélio está associada à expressão de componentes da matriz

extracelular. Tais componentes possuem um papel funcional, crucial no estabelecimento da polaridade celular e do fenótipo epitelial necessários à morfogênese associada à ramificação do broto ureteral (Brenner *et al.*,1990).

O processo de ramificação ureteral conclui-se após 20 ou 22 semanas de gestação. Em humanos, os domínios corticais e medulares do rim em desenvolvimento são estabelecidos entre a 22ª e a 44ª semana de gestação. O córtex renal, que representa 70% do volume total do rim, torna-se organizado e relativamente compacto, circundando a periferia do órgão. Representando 30% do volume renal, a medula modifica-se para uma forma de cone, onde o ápice é formado pela convergência de ductos coletores na medula interna, dando origem à papila renal (Cebrian *et al.*,2004).

1.11. Tubulogênese *in vitro*

Como vimos, a organogênese renal ocorre por ramificação (Stuart *et al.*,1995; Pohl *et al.*,2000). O cultivo de células *in vitro*, em componentes da matriz extracelular (MEC) em gel, permite mimetizar condições *in vivo* da tubulogênese de diferentes órgãos, como os rins, em um sistema tridimensional (3D) (Boletta *et al.*,2000). Neste sistema, a interação entre proteínas integrantes da membrana celular e componentes da matriz extracelular fazem com que as células migrem além dos eixos *x* e *y*, passando também a incluir o eixo *z*, condição que favorece a formação de estruturas tridimensionais em forma de cisto (cistogênese) ou de túbulos (tubulogênese). No néfron normal e na cistogênese associada à doença cística, observada em pacientes com TSC, o domínio basal das células encontra-se em

contato com a MEC ou membrana basal, enquanto o domínio apical encontra-se voltado para uma luz. Na cistogênese *in vitro* há condições muito limitadas de migração celular. Na tubulogênese, as células se mantêm polarizadas, há migração celular ativa e constante remodelamento das interações de adesão intercelulares e das células com a matriz (Williams e Clark, 2003). Desta forma, o cultivo tridimensional de células epiteliais renais consiste em uma ferramenta com potencial para investigar os sinais moleculares que definem a arquitetura epitelial, incluindo sua capacidade proliferativa e migratória, sua polaridade e adesão celular.

Em modelos de formação tubulogênica *in vitro*, o tipo celular MDCK (do inglês, *Mardin Darby canine kidney*) pode seguir dois processos distintos. Quando células MDCK são ressuspensas em uma matriz de gel de colágeno na ausência de fatores de crescimento tubulogênicos, formam cistos espontaneamente. Estas mesmas células, contudo, quando cultivadas na presença de HGF (*hepatocyt grownth factor*), alongam-se, ramificam-se e formam túbulos com lúmen visível (Williams e Clark, 2003).

Neste cenário, levantamos a hipótese de uma possível relação funcional das proteínas hamartina, tuberina, policistina-1, policistina-2 e poliductina durante o processo de tubulogênese. Para tanto, utilizamos um sistema tridimensional (3D) de cultura de células IMCD para mimetizar as condições de tubulogênese *in vivo* e caracterizar os perfis de expressão celular e subcelular dessas proteínas, assim como, a coordenação de proliferação celular e apoptose neste processo.

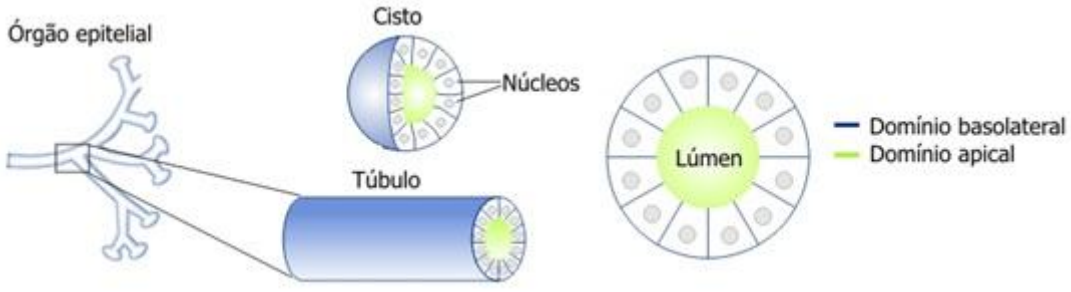


Figura 4. Polarização celular em túbulos e cistos. Os domínios basolateral e apical da membrana das células estão indicados, assim como o lúmen de túbulos ou cistos. (Nogueira, baseado em O´Brien, 2002).

2. OBJETIVOS

Objetivo Central

Estabelecer um sistema tridimensional de cultura de células IMCD para caracterizar mecanismos celulares e os perfis de expressão das proteínas codificadas pelos genes mutados no CET, na DRPAD e na DRPAR, durante o processo de tubulogênese *in vitro*.

Objetivos Específicos

1. Estabelecer um sistema tridimensional de cultura de células IMCD, utilizando uma matriz composta por colágeno tipo I / Matrigel e fator de crescimento de hepatócito.

2. Determinar os perfis de expressão de ZO-1, β-catenina e α-tubulina acetilada em túbulos derivados de células IMCD.

3. Analisar os perfis, quantificar e comparar as taxas de apoptose e de proliferação celular entre estruturas alongadas formadas no 6° DIV e túbulos correspondentes ao 12° DIV.

4. Determinar os perfis de expressão de tuberina e hamartina e realizar análise de co-localização dessas proteínas durante o processo de tubulogênese.

5. Determinar os perfis de expressão de policistina-1, policistina-2 e poliductina durante o processo de tubulogênese.

3. MÉTODOS

3.1. Linhagem Celular

A linhagem celular imortalizada IMCD (*inner medullary collecting duct*) empregada, originada de camundongo (m-IMCD3), foi cedida pelo Prof. Oscar Fernando Pavão dos Santos (Disciplina de Nefrologia, UNIFESP).

3.2. Cultivo de células IMCD em sistema bidimensional

As culturas bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) de IMCD foram mantidas em atmosfera umidificada com CO_2 5%, a 37°C e manipuladas de forma estéril. No sistema 2D, as células foram cultivadas em garrafas T75, em meio de cultura DMEM *high glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) acrescido de SFB (soro fetal bovino) 10%, piruvato sódico 10 mM, penicilina 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.3. Cultivo de células IMCD em sistema tridimensional com gel de colágeno ou Matrigel

O protocolo utilizado foi padronizado em nosso laboratório a partir da descrição de (Williams e Clark 2003). A cultura é composta de gel de colágeno tipo I ou de matriz de membrana basal Matrigel® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), contendo células suspensas. A mistura é feita em gelo, com pipetas e todos os reagentes gelados, para não favorecer a gelificação durante o procedimento. Os tubos

também são gelados e o procedimento é realizado de forma estéril. Para esse tipo de cultura, utilizamos células IMCD oriundas de cultura 2D de até três passagens depois do descongelamento. As culturas 3D consistiram de células dissociadas por TryPLE Express (Invitrogen, Carlsbad CA), ressuspendidas em colágeno tipo I ou Matrigel®, seguidas da gelificação a 37°C. A preparação do gel foi feita em gelo, seguindo a ordem de acréscimo dos seguintes reagentes: 800 µL de colágeno tipo I (para concentração final de 4%), 100 µL de meio DMEM com piruvato concentrado 10x e 100 µL de SFB inativado, seguido de titulação com HCl 1.0 N ou NaOH 1.0 N para ajustar o pH para 7,4. Cada poço das placas de 48 poços utilizadas foi revestido com 150 µL da mistura líquida a 4°C, procedimento seguido de solidificação a 37°C por 30 min. O plaqueamento foi realizado utilizando 2 x 10^2 células ressuspendidas em 150 µL da mistura líquida contendo colágeno tipo I, a 4°C, colocada sobre a primeira camada de gel já formada. Após 30 min de solidificação da segunda camada a 37°C, foram colocados 200 µL de meio em cada poço, composto por DMEM com piruvato, SFB inativado 10%, penicilina, estreptomicina e glutamina 1%. O meio foi trocado diariamente com auxílio de uma pipeta P200, sem atingir o gel.

Nas culturas 3D conduzidas com Matrigel, as células foram dissociadas com TryPLE Express (Invitrogen, Carlsbad CA) e misturadas a Matrigel puro, preparado a 4°C. Seguiu-se, então, gelificação a 37°C. Após nove dias *in vitro*, os géis foram fixados. Em alguns ensaios, foi acrescentado fator de crescimento de hepatócito (HGF) para a concentração final de 20 ng/mL.

3.4. Cultivo de IMCD em sistema tridimensional em gel de colágeno tipo I / Matrigel

O protocolo utilizado foi cedido pela Profa. Rachel Giles (University Medical Center Utrecht, Utrecht, Holanda) (Giles *et al*., 2011). Células IMCD foram cultivadas em condições 2D a 37°C e CO_2 5%, em meio completo (DMEM *high glucose - Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – com FBS 10% e penicilina e estreptomicina 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Um sistema de cultura de células *in vitro* 3D foi estabelecido em placas de 24 poços, usando uma mistura de gel subjacente (200 μL por poço) contendo DMEM 1x, $NaHCO_3$ 44 mM, PBS (*phosphate-buffered saline*) 5%, FBS 5%, meio completo 35% e colágeno tipo I 3,44 mg/mL (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). O gel de cima (200 μL por poço) foi composto por Matrigel sem fatores de crescimento 70% (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) contendo células (4.000 células por poço), DMEM 1x, $NaHCO_3$ 44 mM, PBS 5% e FBS 5%. Este gel contendo células foi plaqueado sobre o gel subjacente e incubado a 37°C. Após gelificação por 30 min, o gel foi coberto com meio completo com HGF na concentração de 50 ng/mL. O meio de cultura foi substituído diariamente para manter o pH, a nutrição e os níveis de HGF, e as culturas foram analisadas em 6 e 12 DIV. Alternativamente, placas de 6 ou 48 poços também foram utilizadas.

3.5. Anticorpos

Os anticorpos (Ac) utilizados no presente estudo para detector as proteínas alvo incluíram um Ac policlonal anti-tuberina gerado em coelho (IA22, Sigma Aldrich, St Louis, WI), um Ac policlonal anti-tuberina gerado em coelho (C20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), um Ac monoclonal anti-hamartina gerado por camundongo (1B2, gentilmente cedido por Vijaya Ramesh, Massachusetts General Hospital, MA), um Ac policlonal anti-hamartina gerado em coelho (HF6, gentilmente cedido por Vijaya Ramesh, Massachusetts General Hospital, MA), um Ac policlonal anti-PC1 gerado em coelho (5183, gentilmente cedido por Feng Qian, University of Maryland, MD), um Ac policlonal anti-PC2 gerado em coelho (3314, gentilmente cedido por Feng Qian, University of Maryland, MD), e um Ac policlonal anti-PD1 gerado em coelho (αPF2, gerado e validado em nosso laboratório). Também incluímos marcadores subcelulares para controlar nossas análises de expressão, usando um Ac monoclonal anti-ZO-1 gerado em rato (Invitrogen, Carlsbad, CA), um Ac monoclonal anti-α–tubulina acetilada gerado por camundongo (Sigma Aldrich, St Louis, WI), e um Ac policlonal anti-β-catenina gerado em coelho (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proliferação celular e apoptose foram avaliadas empregando, respectivamente, um Ac monoclonal anti-Ki-67 gerado em coelho (SP6, Abcam, Cambridge, MA) e um Ac policlonal anti-caspase 3 ativa gerado em coelho (Sigma, St Louis, WI).

3.6. Imunofluorescência Indireta de células em sistema bidimensional

As células foram cultivadas em placas de seis poços contendo lamínulas redondas de 16 cm de diâmetro. Após o tempo de cultivo determinado em cada experimento, as células foram fixadas em paraformaldeído 2% em PBS por 20 min. As células fixadas foram permeabilizadas em NP40 0,1% em PBS por 20 min, à temperatura ambiente (TA). Após duas lavagens em PBS, procedeu-se o bloqueio em BSA 5% e soro da espécie animal onde foi gerado o anticorpo secundário (5%) diluído em PBS por 1 h, a TA. As células foram incubadas a 4ºC por 24 h, em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário diluído. Seguiu-se, então, incubação a 4ºC por 1 h, em anticorpo secundário conjugado a Alexa 594 (1:200) ou Alexa 488 (1:200) (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA) diluído em solução de bloqueio, seguido de cinco lavagens em PBS. As lamínulas foram montadas em lâmina com Prolong Gold contendo DAPI (4',6-diamidino-2-pfenilindol) e foram seladas com esmalte e conservadas a 4ºC. As imagens foram analisadas, então, ao microscópio confocal Zeiss LSM510 (Oberkochen, Alemanha).

3.7. Imunofluorescência Indireta de células em sistema tridimensional

As células provenientes de culturas em sistema 3D foram fixadas utilizando paraformaldeído 4%. Os géis foram lavados em PBS com MgCl2 1 mM e CaCl2 0,1 mM, permeabilizadas com Triton X-100 0.5% (Sigma Aldrich, St Louis, WI) por 30 min e bloqueadas com solução BSA 1% / PBS por 40 min à TA. Os anticorpos primários 1B2 (1:10), IA22 (1:50), 5183 (1:500), 3314 (1:500) e αPF2 (1:5) foram

empregados em tampão de permeabilização, a 4°C. Também foram empregados os Acs primários anti-ZO1 (1:500), anti-β-catenina (1:500), anti-α-tubulina acetilada (1:1000), anti-Ki-67 (1:200) e anti-caspase-3 ativa (1:400). Os géis foram lavados em tampão de permeabilização e submetidos a uma incubação de 4 h com o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 ou Alexa Fluor 488 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) à TA. Seguiu-se uma lavagem com PBS. Os géis foram então contrastados com DAPI (4 ',6-diamidino-2-fenilindol) e montados com meio de montagem Prolong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.8. Microscopia Confocal

As imagens foram capturadas no microscópio confocal invertido Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Análises quantitativas de co-localização foram realizadas por coloração concomitante das proteínas de interesse, imunomarcadas indiretamente com fluorocromos de espectros de emissão distintos e não sobrepostos (Alexafluor 488 e Alexafluor 594). A média de intensidade de co-localização dos canais 594 e 488 foi estabelecida pelo agrupamento de seções z, chamada p.zero. A avaliação da co-localização de hamartina e tuberina foi realizada pela análise de treze imagens e, para cada imagem treze campos foram selecionados aleatoriamente para análise numérica. Os dados foram submetidos ao teste de correlação linear de Pearson.

3.9. Análise de Proliferação Celular e apoptose

As análises de proliferação celular e apoptose foram realizadas com os anticorpos anti-Ki-67 e anti- caspase 3 ativa, incubados overnight a 4°C no gel 3D. A quantificação de núcleos positivos para Ki-67 e células positivas para caspase 3 foram realizadas por microscopia confocal no aumento de 200x. Os resultados foram expressos como núcleos positivos/ núcleos totais (positivos para DAPI) para Ki-67e células positivas/ células totais para caspase 3 ativa. Doze estruturas tubulares foram analisadas para ambas as análises.

3.10. Expressão relativa de policistina-1 e policistina-2 em estruturas tubulares

Para quantificar as distribuições relativas de PC1 e PC2, utilizamos sete imagens de imunofluorescência para cada proteína e analisamos as taxas de intensidade de sinal entre regiões não ramificadas e ramificadas de estruturas nitidamente tubulares. A intensidade de fluorescência foi mensurada com o software Scion Image (Scion Image, Frederick, MD) e os resultados foram expressos como a relação de intensidade de sinal entre áreas não ramificas/ áreas ramificadas.

3.11. *Western Blotting*

Culturas 3D foram inicialmente realizadas em placas de 6 poços. Após doze dias *in vitro*, o meio de cultura foi removido do gel no poço, e cada gel foi lavado com 1000 µL de solução de recuperação celular (Cell Recovery Solution, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Com o auxílio de uma ponteira P1000, o gel foi enrolado para formar uma espécie de goma na ponta da mesma, permitindo sua transferência a um microtubo. Cada poço foi lavado com mais 1000 µL de solução de recuperação celular, os quais foram transferidos ao mesmo microtubo. Este foi então incubado em gelo por cerca de 60 min ou até a dissolução do gel. O microtubo contendo o gel foi a seguir centrifugado a 100 g por 5 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo células foi ressuspendido em 100 µL de solução de lise (T-PER, Thermo Scientific) contendo inibidores de protease. Após 30 min de incubação em gelo, o lisado foi centrifugado para remover debris celulares e Matrigel. Seguiu-se a quantificação de proteína presente no sobrenadante usando o método de Bradford (Bio Rad, Hercules, CA). Amostras de 50 a 100 µg de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 6%. As proteínas foram então transferidas para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride membrane, 45 µm, BioRad) e reveladas com o corante vermelho de Ponceau (Sigma, St Louis WI) para controle da eficiência da transferência. Seguiu-se bloqueio *overnight* a 4°C com TBS-T (Tris 25 mM, NaCl 140 mM, tween-20 0,5%,) acrescido de leite desnatado 5% e incubação da membrana *overnight* a 4°C com o anticorpo primário diluído em TBST com BSA 3% (C20 1/200 e HF6 1/200). A membrana foi então lavada em TBS-T e incubada com anticorpo secundário conjugado à

peroxidase na diluição de 1/10.000 (GE Life Sciences, Piscataway NJ), lavada e revelada usando o sistema *ECL* (Enhanced chemiluminescence Detection, GE Life Sciences, Piscataway, NJ).

3.12. Análise Estatística

Os dados foram pré-analisados pelo teste de distância K-S. Quando paramétricos, as análises foram realizadas utilizando o teste *t* não pareado, e os resultados espressos como média ± DP. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney* e os resultados foram apresentados como mediana (intervalo interquartil). A correlação de Pearson foi aplicada para análise quantitativa de co-localização para tuberina e hamartina. Aceitamos um erro alfa menor ou iguala 5% para rejeitar a hipótese de nulidade. Os testes foram aplicados utilizando o software GraphPad 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

No presente trabalho, utilizamos células IMCD de camundongo para avaliar o processo de tubulogênese renal, uma vez que esta linhagem é derivada de células renais e expressam as cinco proteínas alvo de nosso estudo. Temos como meta analisar o tipo de estrutura 3D formada *in vitro*, investigar a influência de componentes da matriz extracelular e comparar a expressão e a distribuição subcelular de hamartina, tuberina, policistina-1, policistina-2 e poliductina nas células IMCD, em condições de cultivo tridimensional (3D).

4.1. Distribuição subcelular da hamartina e tuberina em IMCD sob condições 2D

A distribuição subcelular das proteínas hamartina e tuberina em células IMCD cultivadas em sistema 2D (Figura 5) foi investigada por imunofluorescência indireta, testando-se diferentes anticorpos para cada uma dessas proteínas. Realizamos análises com o anticorpo policlonal gerado em coelho IA22, que identifica a parte N-terminal da tuberina. O sinal correspondente à tuberina foi observado difusamente no citoplasma, com aspecto granular (Figura 6).

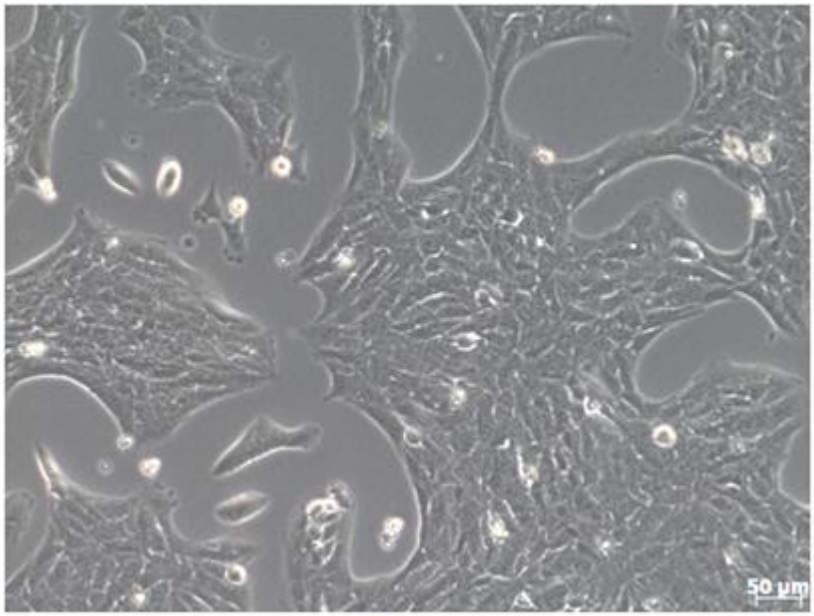


Figura 5: Cultivo bidimensional de células IMCD 4DIV. Barra de escala: 50 µm.

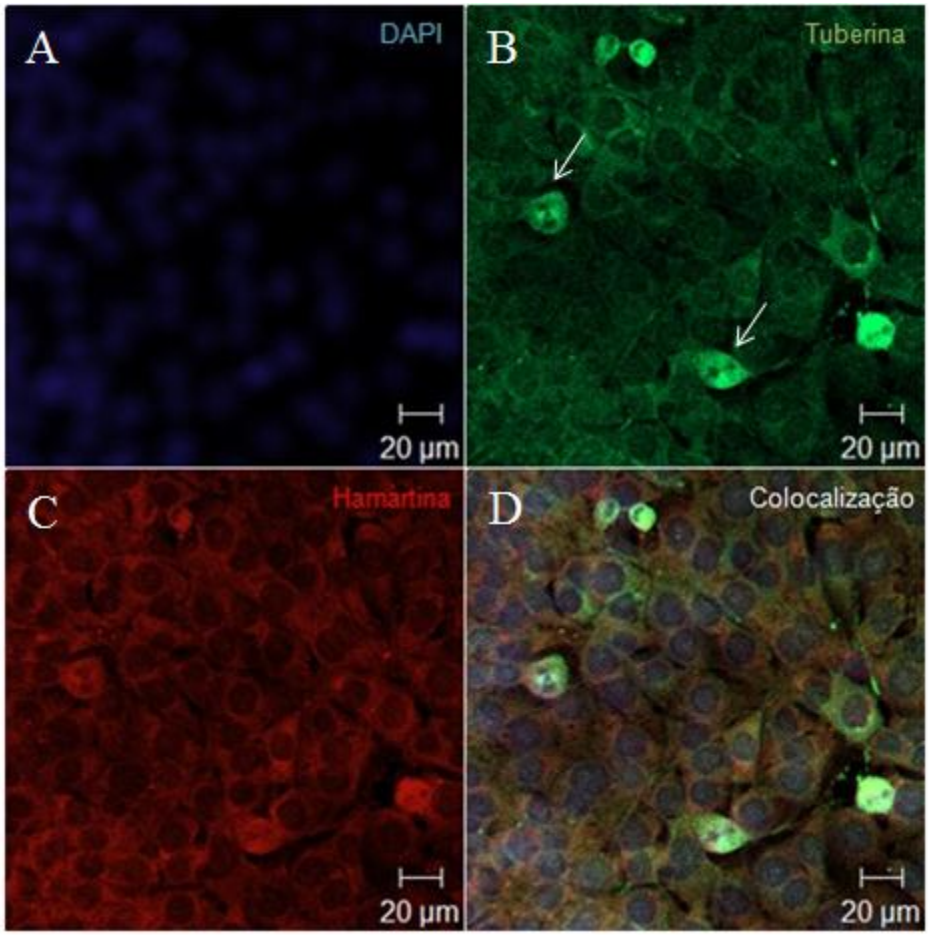


Figura 6: Co-localização de tuberina e hamartina em cultivo bidimensional. (A) DAPI (B) anticorpo policlonal IA22 (C) anticorpo policlonal 1B2, foram empregados para visualização de tuberina e hamartina, respectivamente. Tuberina foi visualizada com Alexa Fluor 488 e hamartina com Alexa Fluor 594. (C) colocalização de tuberina e hamartina. As setas indicam células aparentemente mitóticas, em que a distribuição da tuberina encontra-se mais polarizada. Barra de escala: 20µm.

Análises de colocalização envolvendo a combinação dos anticorpos IA22 (anti-tuberina) e 1B2 revelaram co-localização entre hamartina e tuberina em algumas células isoladas (Figura 6). Conforme descrito, contudo, em células em que se observa a co-expressão dessas proteínas, a hamartina apresenta níveis mais baixos de expressão que a tuberina, assim como uma distribuição subcelular mais restrita (Murthy *et al.*,2000, 2001).

A distribuição subcelular da hamartina e da tuberina *in vitro* e *in vivo* parece depender da fase do ciclo celular e da polaridade celular. Marcação nuclear foi descrita

para a tuberina, e em menor frequência, para a hamartina, quando as células estão na fase G0/G1 (Astrinidis *et al*., 2003; Rosner *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c). Na maioria das células, entretanto, tuberina distribui-se geralmente ao citoplasma. Vale dizer que diversos estudos têm relatado uma distribuição polarizada para hamartina, em diferentes linhagens celulares e células provenientes de rins e cérebro (Lamb *et al.*, 2000; Murthy *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2002). Dessa forma, optamos por continuar as análises com a combinação 1B2 (anti-hamartina) e IA22 (anti-tuberina), uma vez que 1B2, embora pouco sensível em análises morfológicas, é específico e apresenta resultados reprodutíveis.

4.2. Estruturas obtidas ao cultivo de IMCD em sistema tridimensional em gel de colágeno tipo I

Os primeiros experimentos de cultivo tridimensional (3D) foram dedicados à reprodução do sistema de cultivo *in vitro* em gel de colágeno tipo I. Utilizamos 2 x 10^2 células/mL, cultivadas por nove dias *in vitro* (DIV) e fixadas em paraformaldeído a 4%. Desde o terceiro dia de cultivo *in vitro* 3D, observamos a formação de estruturas alongadas com ramificações, em meio completo sem o acréscimo de fatores de crescimento. Analisamos também a expressão da α-tubulina, uma das duas proteínas constituintes centrais de microtúbulos e com marcação citoplamática, para visualizar as estruturas alongadas nas culturas celulares 3D. Dois exemplos de estruturas alongadas após cultivo de 9 DIV são mostrados na (Figura 7A e F). Não observamos a formação de estruturas tubulares típicas através das seções *z* de cada imagem (Figura 7B, C, D, E, G, H, I e J). Essas análises sugerem que as estruturas observadas *in vitro* assemelham-se mais a cordões celulares do que propriamente túbulos com lúmen interno.

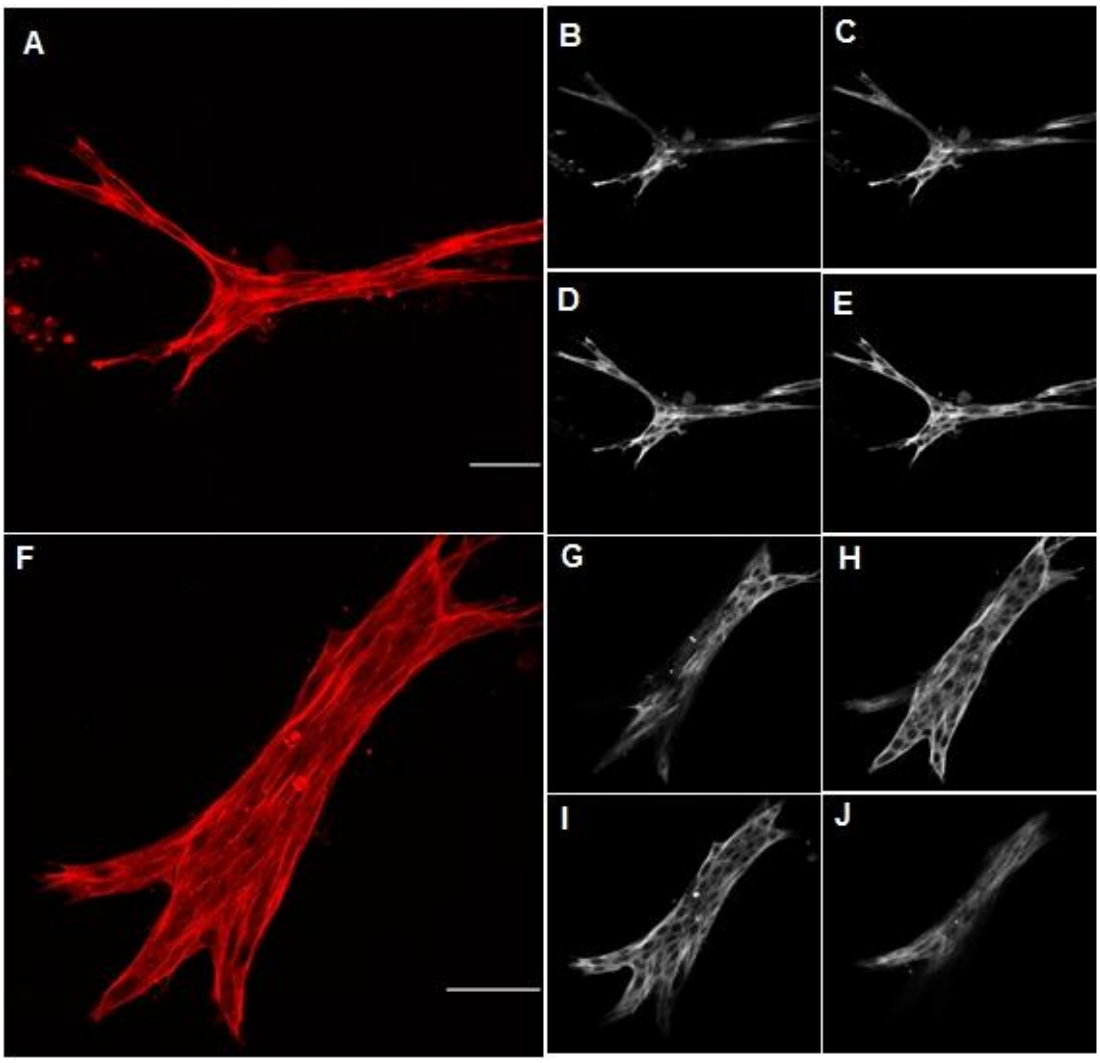


Figura 7: Células IMCD cultivadas em colágeno tipo I formam estruturas alongadas após 9DIV Imagens em diferentes níveis *z* (B, C, D e E ou G, H, I e J) e agrupamento destas (A e F, respectivamente) de dois campos microscópicos (A-E e F-J). Barra: 50 µm.

O fator de crescimento de hepatócito (HGF) já foi relatado como indutor de formação tubular *in vitro* e *in vivo*, assim como da cistogênese *in vitro* em células epiteliais de origem renal (Montesano *et al.*, 1991; Cantley *et al.*,1994; Barros *et al.*,1995; Karihaloo *et al.*,2005). Mantivemos as mesmas condições de cultivo e adicionamos HGF ao meio de cultura. Em observações seriadas entre 1 e 9 DIV, estruturas em cordões e suas ramificações desenvolveram-se visivelmente mais rapidamente a partir de células tratadas com HGF (Figura 8B), quando comparadas às

células sem HGF (Figura 8A). A rápida formação de cordões celulares em presença de HGF e ramificações precoces, sendo mais intensas a partir do terceiro DIV, podem ser explicadas pelo aumento da proliferação celular induzida pelo mesmo ou pela modificação do padrão de estruturas formadas (Figura 8). As culturas 3D de IMCD, realizadas sem HGF, por sua vez, apresentaram um crescimento bem mais lento de cordões celulares até o quinto DIV. Observamos a partir do 5DIV algumas ramificações, seguidas, no entanto, por uma desaceleração sugestiva de morte celular após 9DIV (Figura 8).

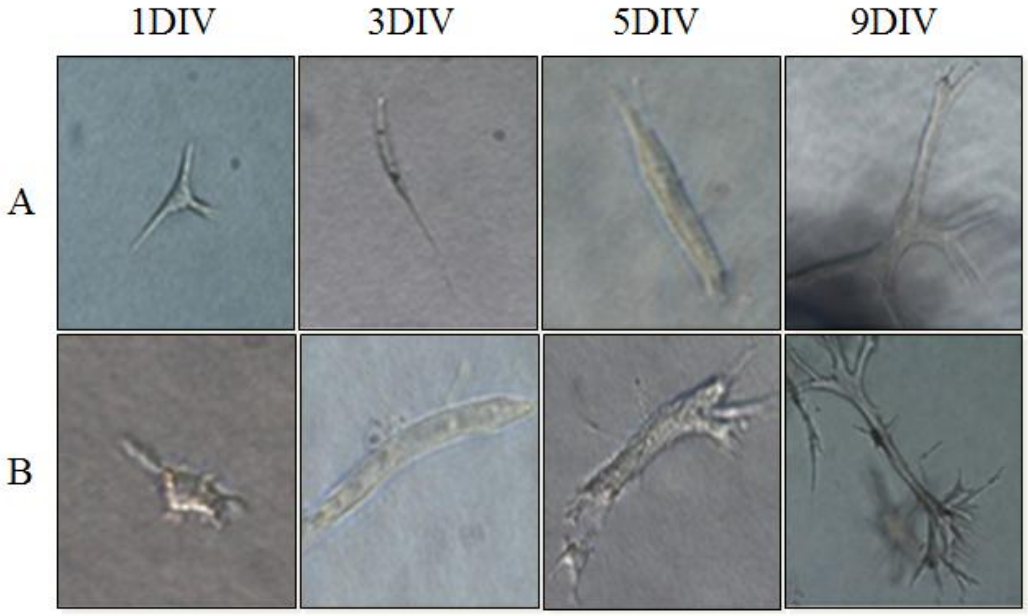


Figura 8: Cultivo tridimensional de células IMCD em colágeno tipo I ao longo de nove dias de cultivo. (**A)** Células em colágeno tipo I sem HGF (aumento de 400x); (**B)** Células em colágeno tipo I com HGF (aumento de 400x).

Análises realizadas de células IMCD em cultivo com Matrigel, sem colágeno tipo I ou HGF, mostraram o desenvolvimento de estruturas císticas a partir do quinto DIV, que amadureceram até o 9DIV. Não observamos, contudo, estruturas tubulares/cordões nestas condições (Figura 9).

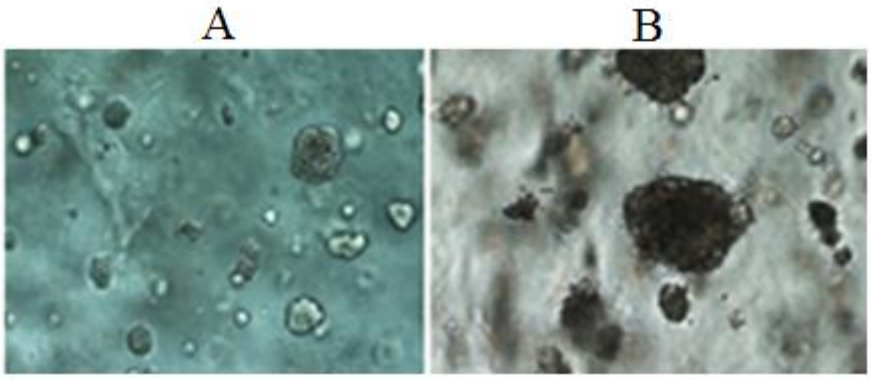


Figura 9: Cultivo tridimensional de células IMCD em Matrigel puro. (**A)** 5DIV e (**B)** 9DIV (aumento de 200x).

Em conclusão, estruturas alongadas foram formadas com células IMCD quando cultivadas em colágeno do tipo I. Essas estruturas ramificaram-se intensamente no curso de uma semana, enquanto foi mantida a viabilidade celular; porém, não observamos lúmen nessas estruturas.

4.3. Expressão de hamartina e tuberina em IMCD após cultivo 3D em Colágeno tipo I

Hamartina e tuberina já foram observadas *in vivo* no domínio apical de células epiteliais renais (Murthy, Haddad, *et al.*, 2000). Na análise com os anticorpos 1B2 e IA22, embora a marcação tenha se mostrado difusa para ambas as proteínas (Figura 10), observou-se maior intensidade de colocalização nas condições 3D em relação às condições 2D (Figura 6). Não observamos sinal nos domínios apical e basolateral no cultivo 3D em gel de colágeno.

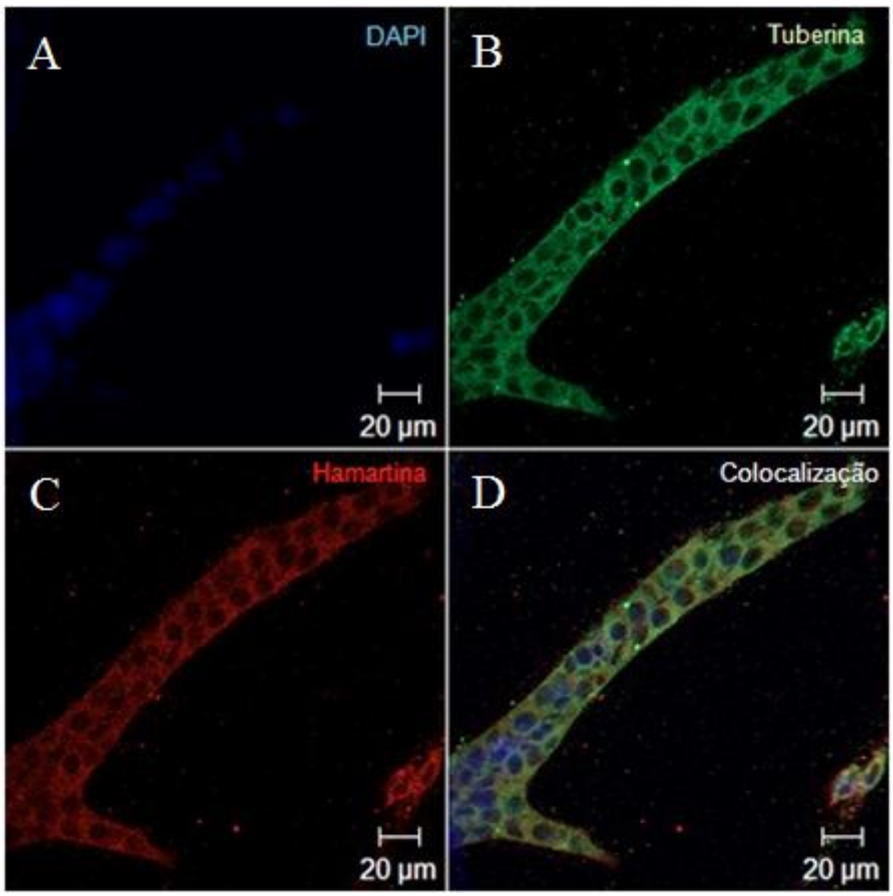


Figura 10: Co-localização de tuberina e hamartina em cultivo tridimensional. (A) DAPI (B) anticorpo IA22 (C) anticorpo 1B2, foram empregados para visualização de tuberina e hamartina, respectivamente. Tuberina foi visualizada com Alexa Fluor 488 e hamartina com Alexa Fluor 594. (C) colocalização de tuberina e hamartina. Barra de escala: 20µm.

4.4 Análises de formação tubulogênica em Colágeno/Matrigel 3D

Buscando viabilizar a formação de estruturas tubulares e formação luminal, testamos uma terceira composição de elementos da matriz extracelular, uma combinação de Colágeno tipo I e Matrigel, em presença de HGF. As novas condições de cultivo celular geraram um microambiente favorável à viabilidade celular, permitindo a formação gradual de estruturas multicelulares, essenciais à tubulogênese. A concentração ideal de semeadura de células foi repadronizada para este sistema, testando-se três

diluições seriadas: $2x10^2$, $2x10^3$, $2x10^4$ células/ml. Esta análise revelou que a concentração mais apropriada de semeadura para este modelo 3D foi $2x10^4$ células/ml e está de acordo com os dados obtidos por Giles *et al*.2011.

Nestas condições, a formação de estruturas alongadas foi observada a partir do segundo DIV até o décimo DIV, processo acompanhado pelo desenvolvimento gradual de ramificações que se formaram a partir dos cistos celulares (Figuras 11 A, B, D, E, F, G e H). Um número considerável de estruturas ramificadas apresentaram uma monocamada epitelial claramente definida e lúmen bem desenvolvido, características básicas de túbulos renais (Figuras 12 e 13). A transição do cisto até a formação de estruturas tubulares com lúmen foi caracterizada pela extensão de processos celulares a partir do cisto (Figura 14 A), seguido pela formação de cordões celulares (Figura 14B, C e D) e, finalmente, pela formação de túbulos com monocamada epitelial e lúmen bem definido, como demonstrado na Figura 12 pelo agrupamento de seções z de 1µm.

Baseado na análise dinâmica da formação tubular, estabelecemos dois tempos, 6DIV e 12DIV, para fixar as estruturas tubulares em paraformaldeido 4% e proceder com análises sistemáticas.

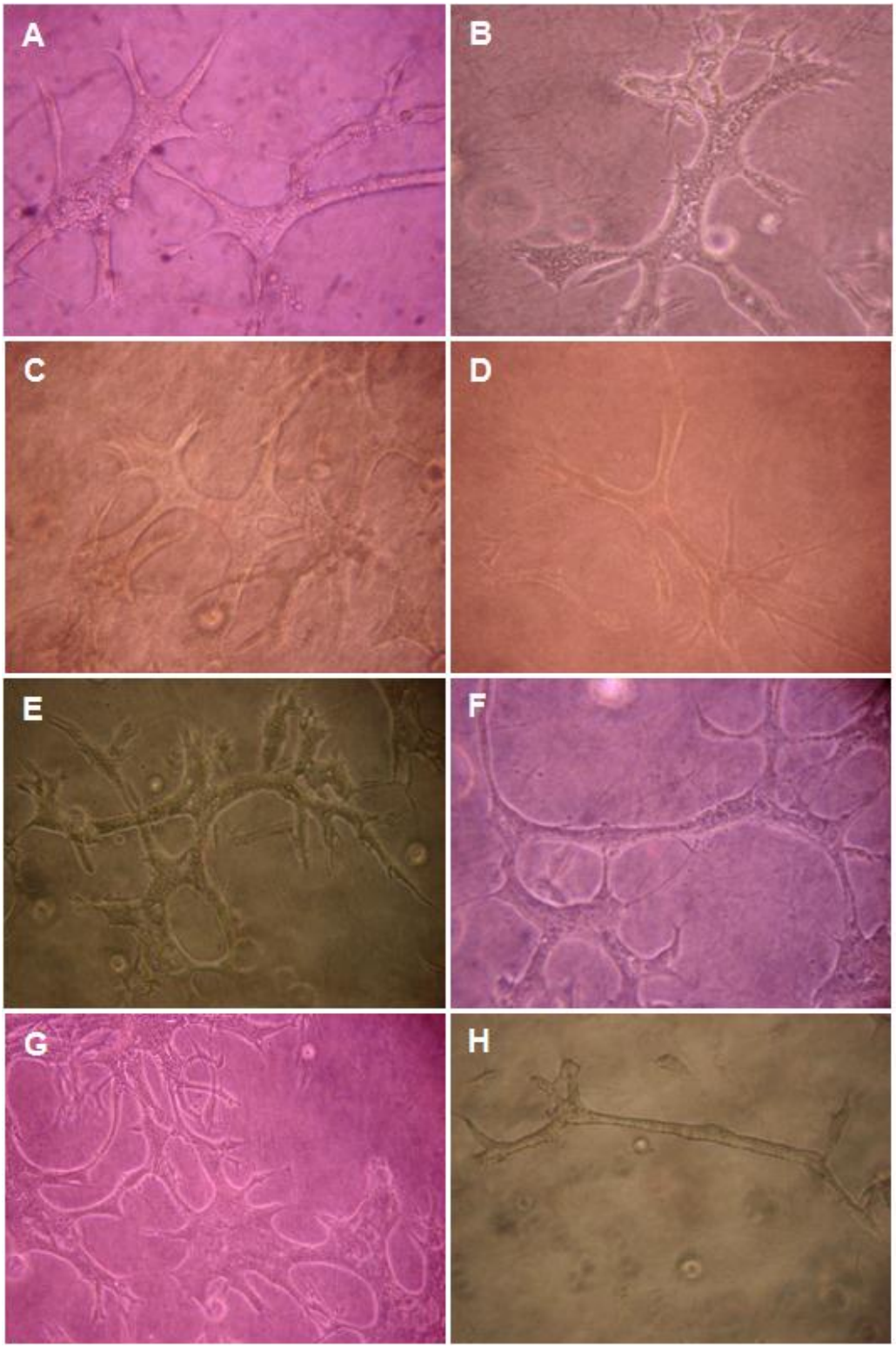


Figura 11: Cultivo de células IMCD em colágeno/matrigel 3D. A formação de estruturas alongadas foi observada entre 2 DIV e 10 DIV *in vitro*, este processo foi acompanhado por um desenvolvimento gradual de ramificações (A-H).

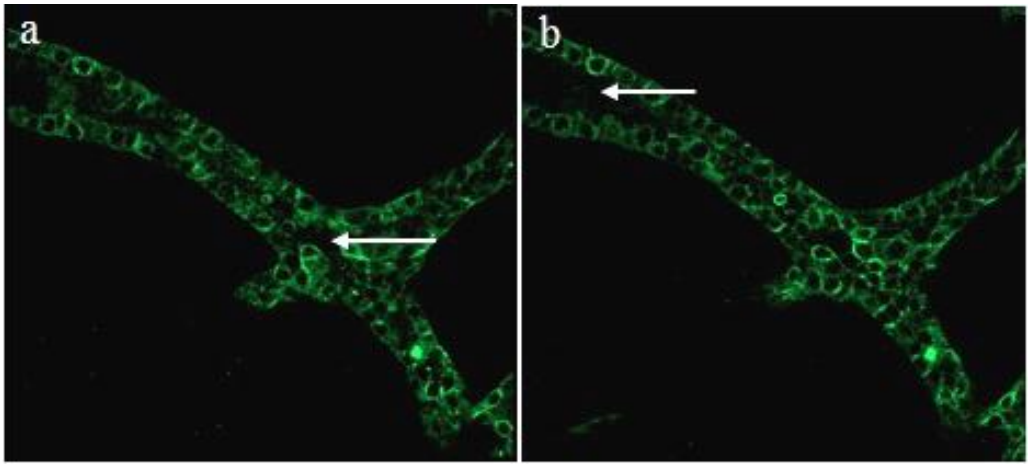


Figura 12: Estrutura tubular com epitélio simples e lúmen no 12DIV. Imunofluorescência indireta realizada com o anticorpo anti α-tubulina acetilada, anticorpo secundário Alexa Fluor 488. Aumento, 100x. As setas indicam formação luminal (a,b).

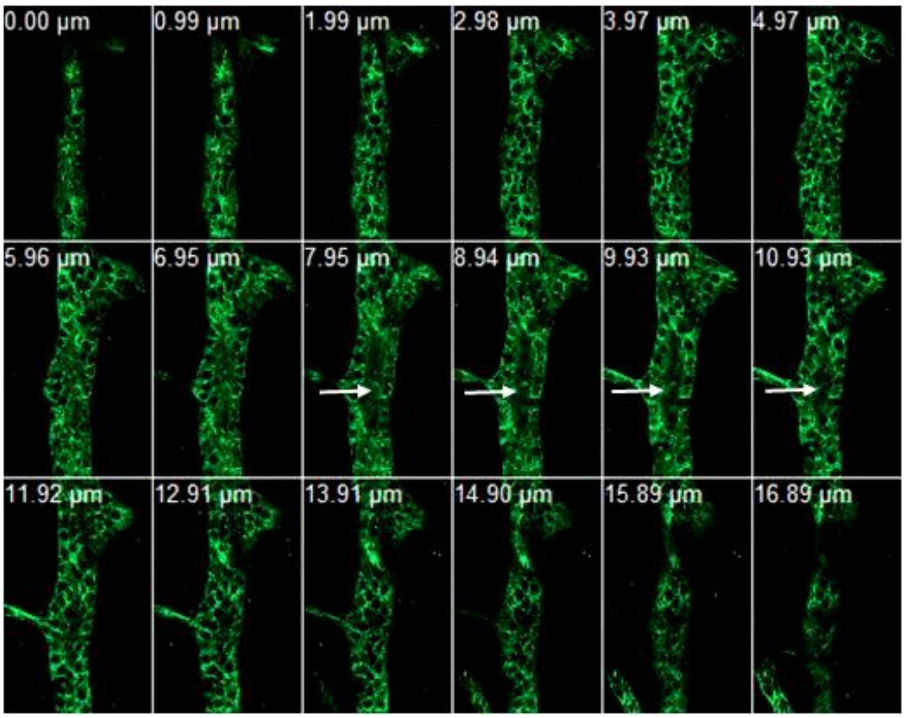


Figura 13: Visualização da formação luminal através de seções *z* obtidas por microscopia confocal. As setas indicam formação luminal. Imunofluorescência indireta realizada com o anticorpo anti α-tubulina acetilada, anticorpo secundário Alexa Fluor 488. Aumento, 100x.

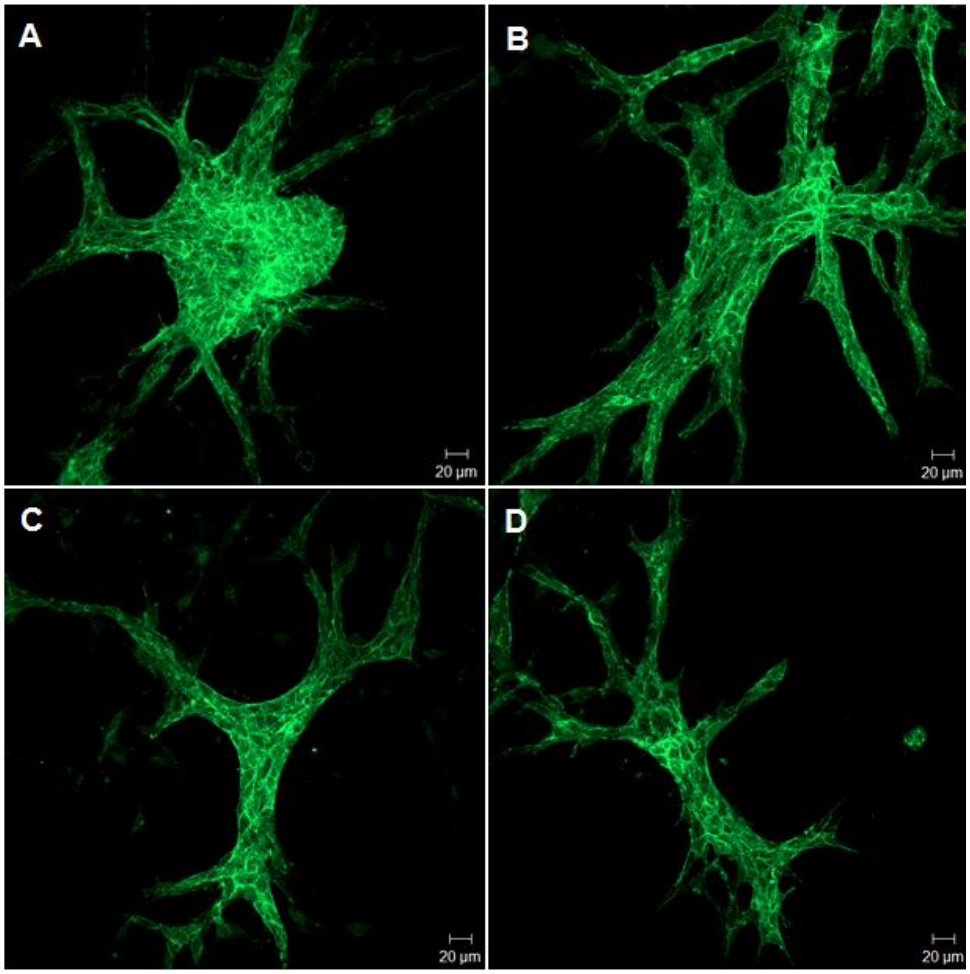


Figura 14: Imunofluorescência indireta realizada com o anticorpo anti β-catenina (A, B, C e D) anticorpo secundário Alexa Fluor 488. Aumento, 100x. .

Nossas análises de formação luminal incluíram a análise da expressão da proteína ZO-1/TJP1 (*zonula occludens protein 1* ou *tight junction protein 1*), indicativa de formação de junções ocludentes. Em túbulos derivados de células IMCD, ZO-1 foi expressa em sítios de contato célula-célula, consistente com a transição ápico-lateral da membrana (Figura 15). Estas análises sugerem aquisição de polaridade no décimo segundo dia *in vitro*. A caracterização das estruturas tubulares também incluiu a análise da proteína α-tubulina acetilada, sabidamente expressa em microtúbulos estáveis e cílio primário. O padrão de expressão observado para α-tubulina acetilada nas células

tubulares foi consistente com seu perfil de expressão, demonstrando uma marcação heterogênea, citoplasmática e submembranosa (Figura 16).

Uma vez que a tubulogênese epitelial envolve rearranjos celulares complexos que requerem mecanismos de adesão e migração celular, além da polarização celular, decidimos analisar a expressão de β-catenina, uma proteína que transita entre o citoplasma, membrana plasmática e núcleo e parece estar envolvida na tubulogênese (Dietrich et al., 2002; Karihaloo et al., 2005). Foi demonstrado que a β-catenina modula a organização dos microtúbulos e migração celular, mecanismos fundamentais para a tubulogênese (Pollack et *al*., 1997). Nas estruturas tubulares derivadas das células IMCD, a β-catenina apresentou uma marcação citoplasmática suave e um acúmulo entre células (Figura 14D), seguindo um padrão consistente com estruturas em desenvolvimento.

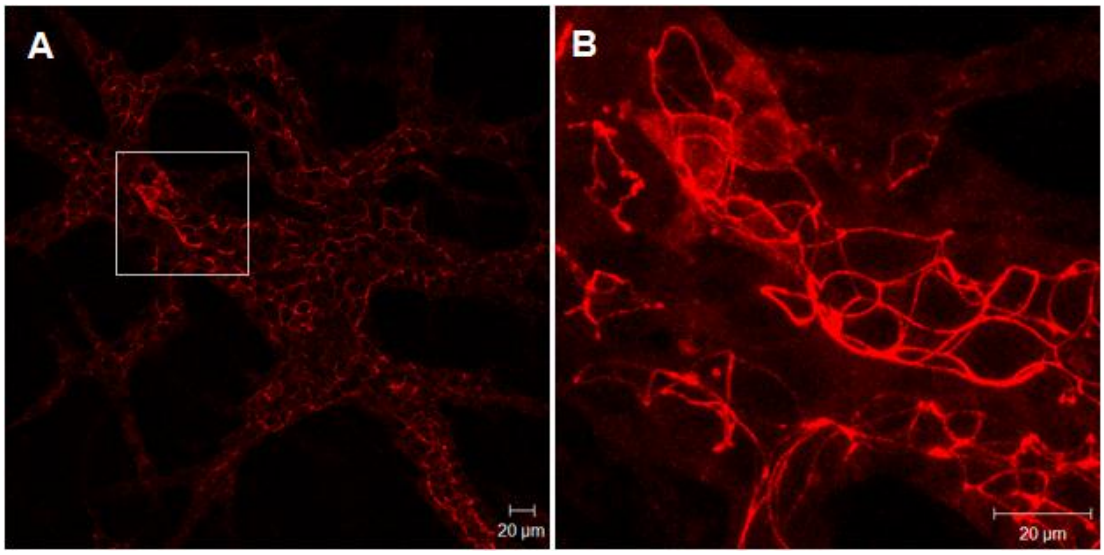


Figura 15: Perfil de expressão de ZO-1 em cultura de células IMCD em colágeno/matrigel 3 D no 12DIV. (A) Imagem original; (B) aumento de 3x da área selecionada em A. ZO-1 foi visualizado com Alexa Fluor 594. Barra 20µm.

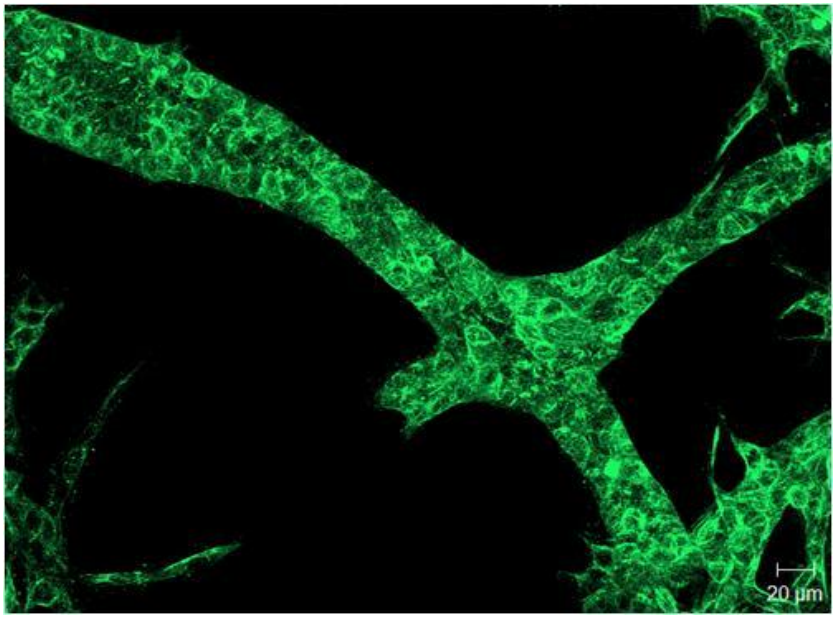


Figura 16: Perfil de expressão da α-tubulina acetilada em túbulos bem formados. Imunofluorescência indireta realizada com o anticorpo anti α-tubulina acetilada e anticorpo secundário Alexa Fluor 488. Aumento, 100x.

Apoptose e proliferação celular são processos celulares sabidamente envolvidos com a tubulogênese e com lumenogênese (Datta *et al*., 2011). A análise de 13 estruturas tubulares distintas, nos tempos 6 DIV e 12 DIV, demonstrou de forma significativa uma maior quantidade de células em fase S, marcadas com anticorpo anti-Ki67, no estágio mais avançado da tubulogênese (12 DIV) quando comparado ao sexto DIV (85.1% [77.8 a 89.6] *versus* 36.7% [26.3 a 59.8]; $p<0.0001$, Figura 17). Este resultado, além de demonstrar o estado proliferativo dessas células, sugere que a população de células tubulares em 12 DIV estão mais sincronizadas do que seis dias antes.

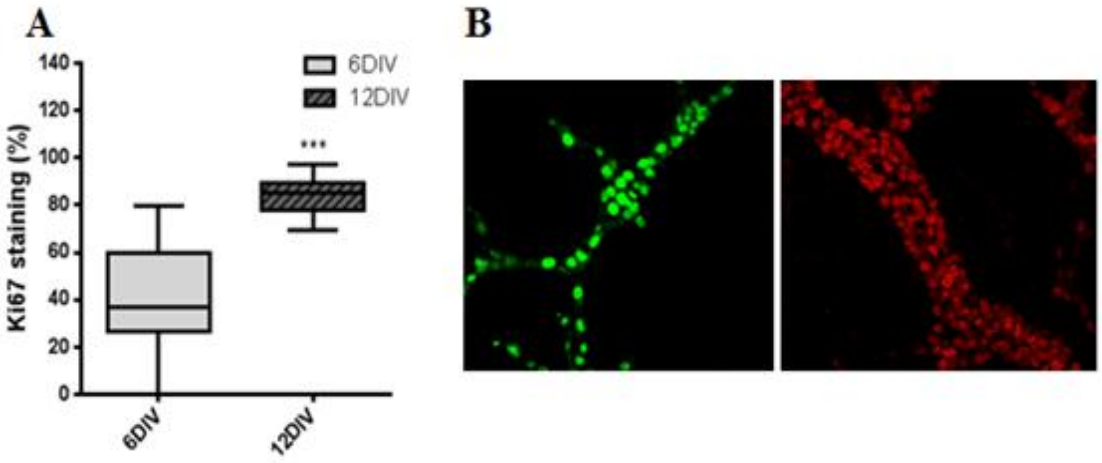


Figura 17: (A) Análise comparativa da proliferação celular entre estruturas alongadas em 6 DIV (n=12) e túbulos com 12 DIV (n=12) baseada na quantificação de Ki-67. A comparação foi realizada utilizando-se o teste de Mann Whitney, com dados representados como mediana (intervalo interquartil) *** p<0.001 *versus* 6 DIV (B) Imagens representativas de marcação por Ki-67 em 6DIV à esquerda e 12DIV à direita. Aumento 200x.

A taxa de apoptose, por outro lado, sugerida pela marcação com anticorpo anti-caspase 3 ativa, foi significativamente maior nas estruturas alongadas do sexto DIV do que nos túbulos com 12 DIV (24.1% [16.3 a 39.1] *versus* (4.2% [2.7 a 6.3]; p<0.001, Figura 18).

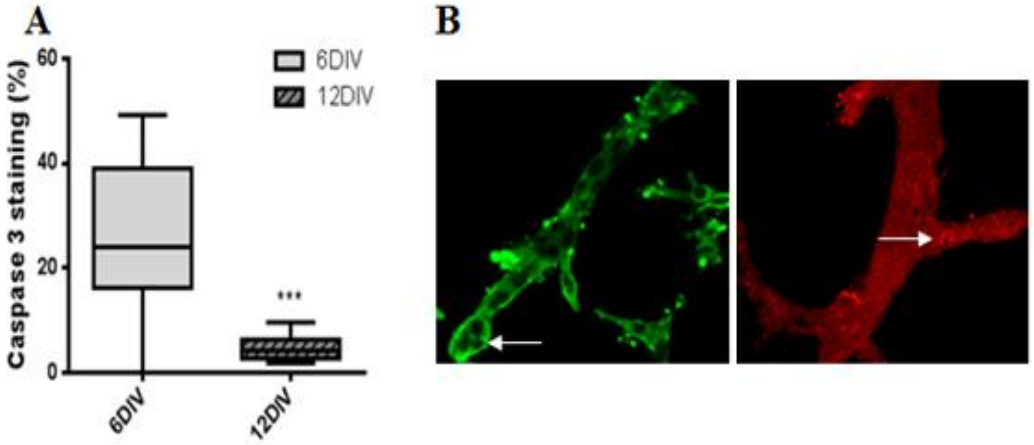


Figura 18: (A) Análise comparativa de taxa de apoptose celular entre estruturas alongadas 6DIV (n=12) e túbulos12 DIV (n=12) baseada na quantificação de caspase-3 comparada A comparação foi realizada utilizando-se o teste de Mann Whitney, com dados representados como mediana (intervalo interquartil) *** p<0.001 *versus* 6 DIV. (B) Imagens representativas de marcação por Ki-67 em 6DIV à esquerda e 12DIV à direita. Aumento 200x.

4.5. Expressão de tuberina e hamartina em túbulos derivados de células IMCD

Os perfis de expressão de tuberina e hamartina foram analisados nas estruturas tubulares no 6DIV e 12DIV. No12^{o} DIV, o anticorpo IA22 revelou um sinal citoplasmático para tuberina (Figura 19 A, A'), padrão também detectado pelo anticorpo 1B2 para hamartina (Figura 19 B, B') em quase todas as células. Achados similares foram obtidos nas estruturas alongadas obtidas no 6DIV (Figura 20 A e B). Análises de co-localização mostraram, ademais, um padrão mais intenso e homogêneo para hamartina em sistema 3D do que o descrito anteriormente para rim de rato (Murthy *et* al., 2000) (Figuras 19C, C' e 20 C).

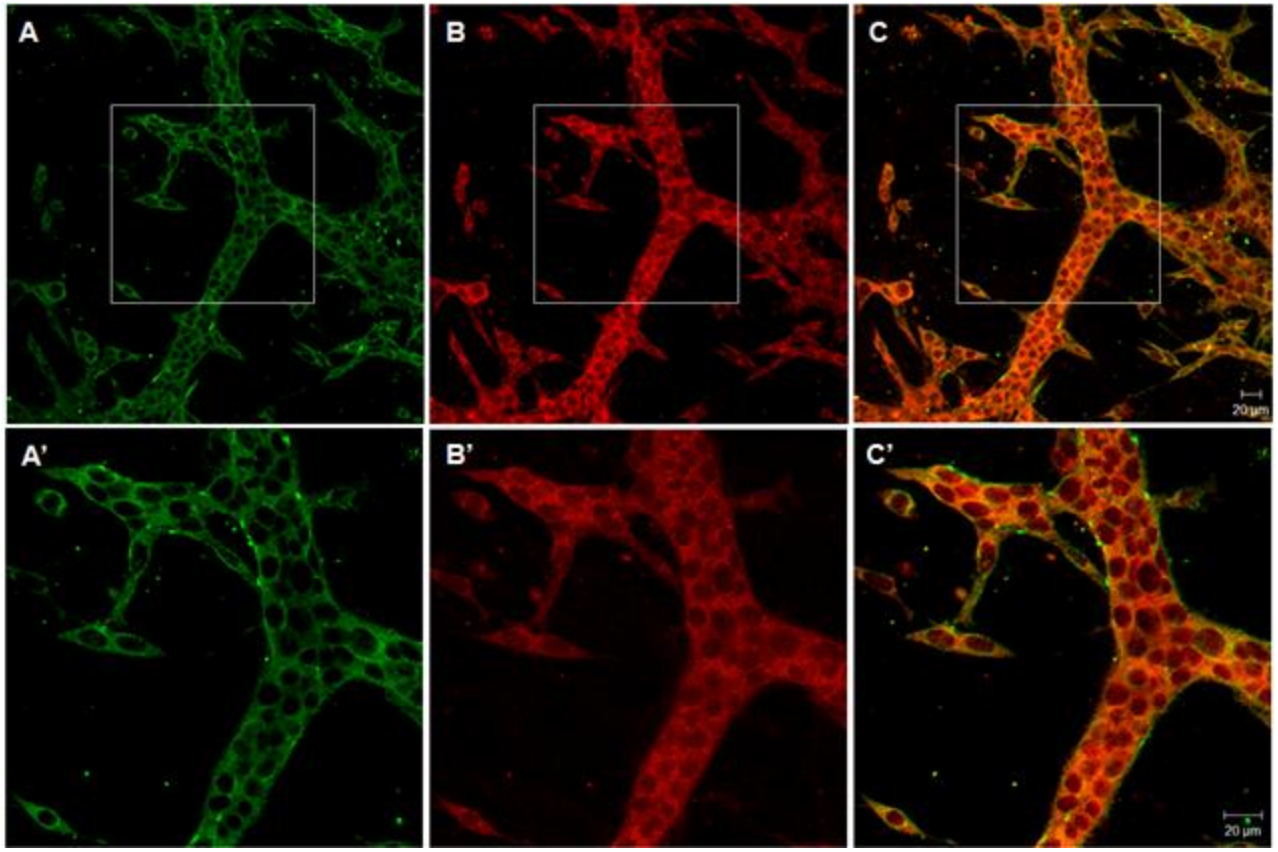


Figura 19: Co-localização da expressão de tuberina e hamartina em cultura tridimensional de células IMCD no 12 DIV (A) Expressão de tuberina, aumento original: 200x; (A') zoom 3x da area selecionada em A. (B) Expressão de hamartina, aumento original: 200x; (B') zoom 3x da area selecionada em B. (C) Co-localização de tuberina e hamartina, aumento original: 200x; (C') zoom 3x da area selecionada em C. Tuberina: Alexa Fluor 488; hamartina: Alexa Fluor 594

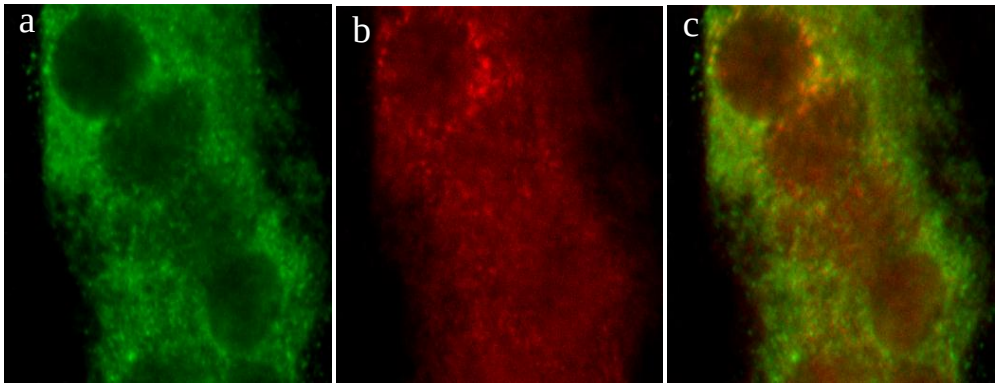


Figure 20. Co-localização da expressão de tuberina e hamartina em cultura tridimensional de células IMCD no 6 DIV (A) Expressão de tuberina; (B) expressão de hamartina,e (C) Co-localização de tuberina e hamartina. Aumento original, 400x. Tuberina: Alexa Fluor 488; hamartina: Alexa Fluor 594

A colocalização dessas proteínas foi confirmada pela análise dos dados pela correlação de Pearson, apresentando R=0.62 (Figura 21). Embora não tenha sido observada marcação luminal para hamartina e tuberina, nenhuma estrutura com lúmem foi observada nessa preparação específica. Verificamos ainda que o sinal de co-localização foi mais intenso na borda das células, sugerindo que essas proteínas distribuem-se à membrana plasmática ou no citoesqueleto adjacente (Figura 19 C e C').

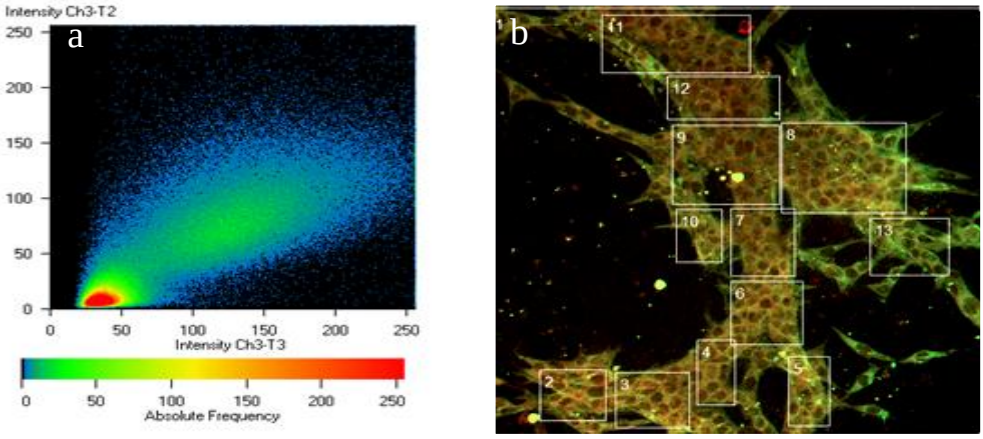


Figure 21. Análise da intensidade de co-localização entre tuberina e hamartina. (a) gráfico de intensidade realizado a partir da seleção total da área em b. (b) Imagem representativa das áreas selecionadas para análise de intensidade. Tuberina: Alexafluor 488 e Hamartina: Alexafluor 594.

Análises de *Western blot* para hamartina e tuberina, em extrato proteico total de túbulos *in vitro*, revelou bandas com massa molecular esperada, confirmando, de forma adicional, a expressão de ambas as proteínas nessas estruturas (Figura 22).

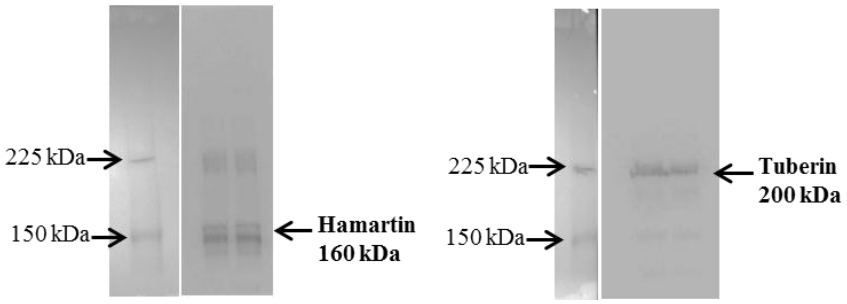


Figura 22: Expressão de hamartina e tuberina por *Western blotting* As setas indicam as bandas de interesse: hamartina 160kDa e tuberina 200kDa.

4.6. Expressão de policistina-1, policistina-2 e poliductina em túbulos derivados de células IMCD

Os perfis de expressão de PC1 e PC2 foram investigados no 6DIV e 12DIV. No 12° DIV, ambas as proteínas apresentaram expressão citoplasmática predominante nas células tubulares, acompanhada de uma expressão pronunciadamente menor, irregular e pontual na membrana (Figura 23 A e B). No 6 DIV , PC1 e PC2 também apresentaram expressão citoplasmática predominante (Figures 24A, B). Interessantemente, PC1 apresentou expressão mais intensa nas áreas de ramificação dos túbulos que nas porções não ramificadas (Figure 23A), um perfil consistente com os altos níveis de expressão encontrados nos estágios iniciais da nefrogênese quando comparado ao rim maduro (Chauvet *et* al., 2002). PC2, por outro lado, não reproduziu este perfil de expressão, apresentando uma expressão difusa e homogênea ao longo dos segmentos tubulares avaliados (Figura 23B).

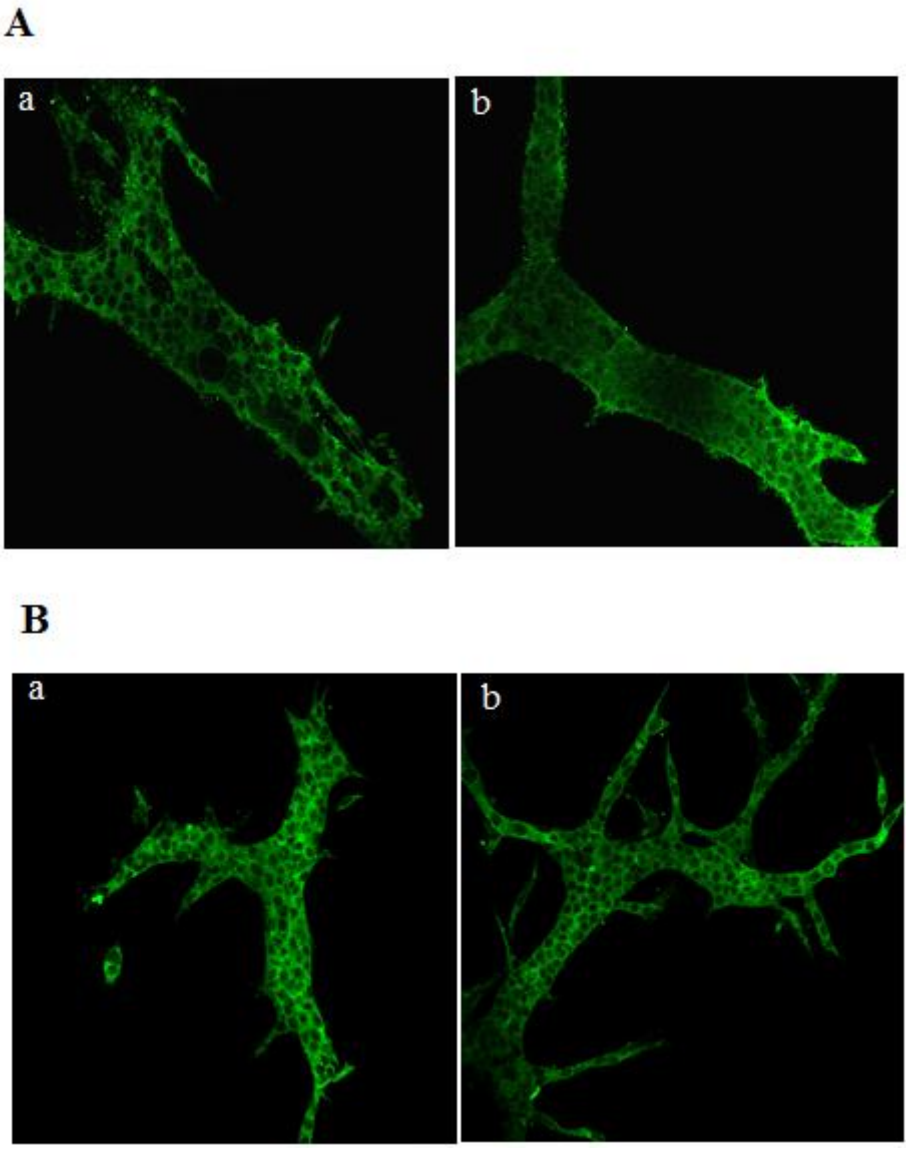


Figure 23: Perfil de expressão de policistina-1 e policistina-2 em cultura tridimensional de células IMCD no 12 DIV.(A) Policistina-1; aumento original, 200x (a e b) (B) Policistina-2; aumento original, 200x (a e b). Alexa Fluor 488.

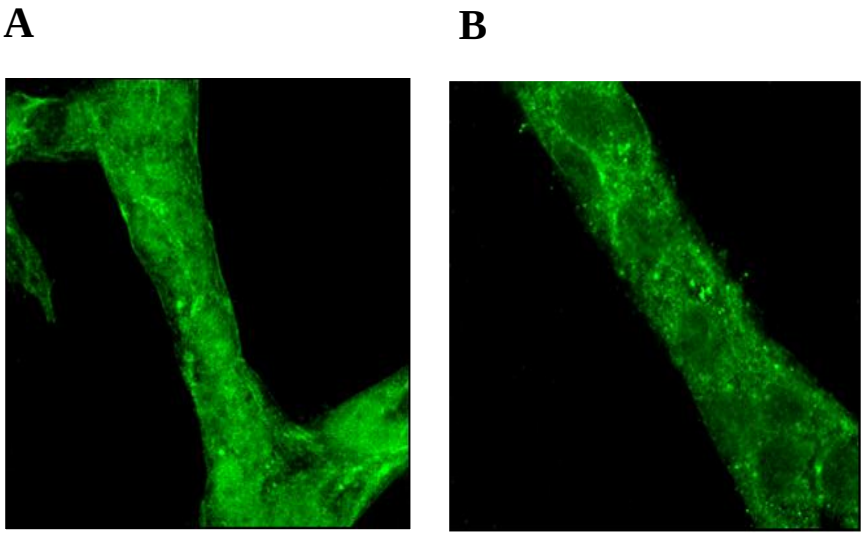


Figure 24: Perfil de expressão de policistina-1 e policistina-2 em cultura tridimensional de células IMCD no 6 DIV.(A) Policistina-1; aumento original,400x e (B) Policistina-2; aumento original, 400x. Alexa Fluor 488

Esse perfil de expressão marcadamente assimétrico de PC1 foi quantitativamente confirmado pela razão de intensidade de fluorescência de áreas não ramificadas por áreas ramificadas de sete estruturas tubulares independentes para cada proteína. A razão de intensidade de sinal foi significativamente menor para PC1 (0.785 $\pm$ 0.085) comparado à PC2 (0.999 $\pm$ 0,095; $p<0.001$, Figura 25).

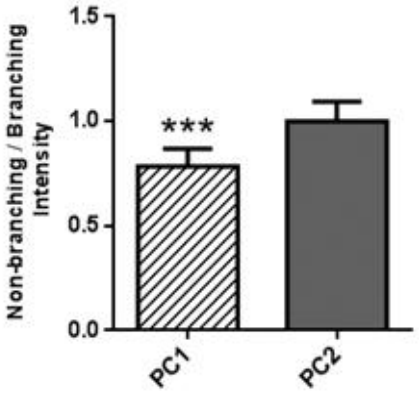


Figura 25: Razão de intensidade de fluorescência entre áreas não ramificadas e ramificadas, para policistina-1 e policistina-2. A comparação foi realizada utizando-se o teste *t* com dados representados como média ± DP. ***p<0.001 versus PC2.

A caracterização do perfil de expressão de PD1 também foi alvo de nossas análises. Nossos achados revelaram que estruturas tubulares derivadas de células IMCD apresentaram marcação citoplasmática (Figura 26), perfil consistente com os resultados encontrados por Menezes e cols. (2004) estudando o botão uretérico de camundongos e estruturas tubulares embrionárias.

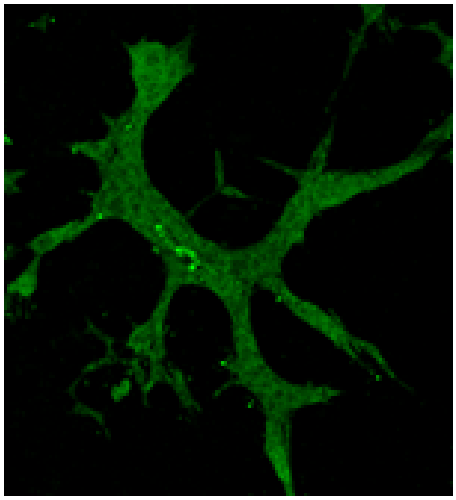


Figura 26: Perfil de expressão de poliductina em cultura tridimensional de células IMCD no 12 DIV. Aumento original, 200x. Alexa Fluor 488.

5. DISCUSSÃO

A formação de túbulos renais é um exemplo típico de como estruturas epiteliais ductais são essenciais para uma série de funções vitais. A tubulogênese consiste, de fato, no processo mais complexo de arquitetura epitelial, requerendo uma coordenação refinada de um grande número de processos celulares e moleculares. Entre eles, destacam-se a mitose, apoptose, polarização, diferenciação, adesão, motilidade, organização do citoesqueleto, proteólise e uma série de vias de sinalização intracelular (Karihaloo *et al*., 2005; Pohl *et al*., 2000). O desenvolvimento de estruturas tubulares renais ocorre através da extensão de processos celulares, seguidos da expansão progressiva de cordões multicelulares, sua ramificação e formação de lúmen. A formação luminal, por sua vez, é consequência do estabelecimento da polaridade celular, a base biológica para as funções de transporte tubular (Pohl *et al*., 2000). Vale notar que a aquisição da polaridade celular ápico-basolateral envolve processos dinâmicos e interdependentes, incluindo o estabelecimento de complexos juncionais intercelulares, a reorganização do citoesqueleto e a especificação dos domínios de membrana (Lubarsky *et al*., 2003).

Embora estudos *in vivo* tenham elucidado aspectos importantes da tubulogênese renal, algumas caracteristícas fundamentais e mecanismos envolvidos na formação tubular só podem ser estudados em modelos *in vitro*. O desenvolvimento de modelos de culturas celulares tridimensionais, contendo matrizes específicas, permite a formação de estruturas tubulares a partir de células epiteliais, com características e organização semelhantes às encontradas nos tecidos (Karihaloo *et al*., 2005; Barros *et al*., 1995). As linhagens celulares MDCK e IMCD, por sua vez, têm-se mostrado apropriadas para o cultivo tridimensional e para ensaios de tubulogênese (Barros *et al*., 1995; O'Brien *et al*., 2002).

Tubulogênese *in vitro* e polaridade celular ápico-basolateral e planar

A polaridade característica de células epiteliais resulta de um programa de polarização epitelial que coordena a distribuição subcelular de lipídeos e proteínas, como as caderinas e as integrinas. Como conseqüência, as superfícies apical e basolateral do epitélio polarizado estão equipadas com populações distintas de canais, transportadores e bombas, sendo uma condição indispensável para o transporte vetorial de soluto e fluido (Caplan., 1997).

A manutenção contínua da polaridade basolateral em epitélios é essencial para a integridade e função dos órgãos epiteliais. Nos rins, este processo é especialmente crítico, onde as funções primárias de reabsorção e secreção são possibilitadas pela distribuição polarizada de transportadores específicos, com o domínio apical voltado ao lúmen do néfron e a porção basal do domínio basolateral voltada à lâmina basal (Bryant *et al*., 2008; Mellman *et al*., 2008). Alguns marcadores protéicos para as junções ocludentes, como as proteínas *zona occludens* 1 a 3 (ZO1, ZO2 e ZO3, também conhecidas como proteínas de junções ocludentes, TJP1-3), podem ser usados para identificação dessas junções por imunofluorescência indireta.

As linhagens de células epiteliais renais, tais como MDCK, UB (derivada do broto uretérico) e IMCD, em cultivo 3D em géis de colágeno tipo I, são utilizadas para análises dos mecanismos de tubulogênese e ramificação epitelial (Rosen *et* al., 1994; Barros *et* al., 1995). MDCK tem uma tendência cistogênica *in vitro* sob condições 3D e, quando se acrescenta o HGF, as células passam à tubulogênese (Williams e Clark, 2003). Nesse sistema, muitas vezes, o HGF só é acrescentado após o quarto DIV, induzindo a tubulogênese a partir do cisto já mais desenvolvido.

As tendências à cistogênese ou tubulogênese, bem como a formação luminal, dependem logicamente do padrão de expressão gênica do tipo celular em determinadas condições, possibilitando interações entre macromoléculas do seu repertório e com outras do meio externo, na matriz extracelular e no meio de cultura. Tubulogênese de IMCD em Matrigel também foi demonstrada, à semelhança de relatos anteriores para esse tipo celular em colágeno tipo I. Em ambos os casos, a eficiência do sistema tubulogênico dependeu da expressão de integrinas α1-β1 por

IMCD, receptoras eficientes para colágeno e laminina. Essa situação contrastou com dados obtidos com a linhagem UB, que apresentou padrão de expressão de integrinas diferente da de IMCD, inviabilizando a tubulogênese 3D pela baixa afinidade com colágeno tipo I. A formação de lúmen não foi avaliada nesses sistemas. A procedência do soro animal utilizado *in vitro* e o número de passagens da linhagem celular imortalizada podem influenciar o fenótipo tubulogênico (Williams e Clark, 2003). Variações nesses fatores não influenciaram nossas condições de cultivo 3D (dados não mostrados).

Em nosso modelo, a ressuspensão das células IMCD em matrizes de colágeno tipo I / Matrigel aumentou a viabilidade celular e levou à formação de estruturas tubulares com lúmen. Secções seriadas de géis 3D com células IMCD foram realizadas por meio de microscopia confocal no 12º DIV, revelando a presença de lúmen em várias estruturas tubulares avaliadas. Assim como já foi descrito para modelos de tubulogênese celular usando células MDCK, HGF desempenhou um papel fundamental na indução desse processo em nosso modelo (Santos *et al*., 1993). Nossos resultados revelaram, de fato, que as células IMCD ressuspensas em Matrigel 3D puro formaram apenas cistos, mesmo na presença de HGF, enquanto em Matrigel / colágeno tipo I suplementado com HGF formaram estruturas tubulares ramificadas com lúmen. Nossos dados corroboraram o trabalho de Karihaloo e cols., que também utilizaram células IMCD em modelos de tubulogênese (Karihaloo *et al*., 2005). Em nosso sistema, a formação de estruturas alongadas iniciou-se no 2° DIV, ao passo que lúmen foi observado entre 10-14 DIV.

A formação luminal é diretamente relacionada à polaridade celular epitelial ápico-basolateral, um processo acompanhado pela formação de junções ocludentes, estruturas que separam os domínios, apical e basolateral. Interessantemente, as células epiteliais provenientes de estruturas císticas perdem temporariamente sua polaridade, porém a recuperam durante a tubulogênese, sugerindo que a regulação de junções célula-célula seja importante para a formação tubular (Pollack *et* al., 1998). É interessante notar que complexos juncionais sofrem rearranjos durante a tubulogênese (Pollack *et* al., 1998). Neste trabalho, observamos que a proteína ZO-1, presente nas junções ocludentes, foi expressa em sítios de contato célula-célula das estruturas tubulares no 12° DIV, resultado consistente com expressão na transição

ápico-lateral da membrana plasmática. Esta observação se alinha a um estudo anterior, que relata a permanência de ZO-1 em sítios de contato célula-célula durante a formação de túbulos (Pollack *et* al., 1998). Nossos resultados mostram, portanto, o desenvolvimento de polaridade em túbulos induzidos *in vitro*, apoiando a premissa de que polaridade e reorganização da membrana são processos essenciais para a tubulogênese.

A proteína β-catenina também parece desempenhar um papel central na tubulogênese, através da sua ligação à proteína APC (Pollack *et* al., 1998). Essa interação promove a organização dos microtúbulos e consequente regulação da migração celular, permitindo a necessária extensão celular para a formação de túbulos. Nossos experimentos mostraram que a β-catenina apresenta um padrão de marcação intensa nas junções célula-célula no 12º DIV, associado a uma marcação citoplasmática discreta. Esse acúmulo de β-catenina nas junções célula-célula é consistente com sua translocação do citoplasma para a membrana plasmática e apoia a formação de túbulos bem diferenciados.

A tubulina α acetilada mostrou, por sua vez, um perfil de expressão citoplasmático e submembranoso consistente com a disposição dos microtúbulos, um achado que apoia o papel fundamental da organização do citoesqueleto na tubulogênese. A acetilação de tubulina está associada ao aumento da estabilidade de microtúbulos, como no fuso mitótico, cílio, flagelo ou como observamos no citoplasma, de forma subjacente à membrana plasmática, com aspecto bem definido, nas células IMCD em túbulos. Não se observou cílio primário em nenhuma preparação, embora as condições de análise não tenham sido adequadas, uma vez que não se utilizou uma magnificação apropriada, marcação dupla para precisar sua localização ou microscopia eletrônica de varredura. Este é um aspecto interessante a se pesquisar, uma vez que PKD e TSC são patologias que vêm sendo caracterizadas como ciliopatias, transtornos que acometem o cílio primário de células específicas. Em modelos animais, demonstrou-se que PC1, hamartina e tuberina regulam o comprimento e a orientação do cílio primário de células renais (Bonnet *et al*., 2009). Como demonstrado por Fischer *et al* (2006), a orientação do fuso mitótico em células epiteliais é distorcida de forma significativa nas células epiteliais renais de modelos

animais com PKD. Esses achados são exemplos da deficiência da polaridade planar celular em TSC e PKD.

Acredita-se que o processo de tubulogênese com formação de lúmen se inicia com a extensão de processos celulares, seguida pelo desenvolvimento de cordões multicelulares em ramificação e, finalmente, a formação luminal. A formação luminal tem como pré-requisito o estabelecimento de polaridade celular, com a definição dos domínios apical e basolateral. Alguns fatores envolvidos na ramificação de túbulos têm também um papel na inibição da formação luminal. Enquanto a ramificação do túbulo envolve intensa proliferação, migração e remodelagem de adesão celular, a formação luminal parece depender de um equilíbrio entre índices de proliferação celular e apoptose, como demonstrado para células epiteliais derivadas da glândula mamária (Debnath *et al*., 2002). Na linhagem de rim embrionário, UB, a formação luminal em sistema 3D é dependente do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), mas de forma ainda inferior ao meio condicionado de cultura de fibroblasto, filtrado (Sakurai *et* al., 1997). Nossas análises com meio condicionado não resultaram em resultados satisfatórios (dados não mostrados). Em nenhum experimento omitimos o soro fetal bovino da mistura para formação do gel de colágeno tipo I. Por outro lado, como descrito, não adicionamos SFB ao gel de Matrigel® puro (somente ao meio de cultura). Desta forma, a tendência cistogênica observada nestas condições pode ser devido à falta de fatores de crescimento e não somente ao componente da matriz extracelular.

A constituição do lúmen é um processo complexo e gradual que envolve apoptose e proliferação celular seletivas no túbulo em desenvolvimento (O'Brien *et* al., 2002). Interessantemente, as estruturas tubulares do 12º DIV apresentaram taxa de proliferação celular significantemente maior e taxa de apoptose significantemente menor que as estruturas alongadas do 6° DIV. Esses resultados estão de acordo com a coordenação entre proliferação e apoptose celular durante tubulogênese e expande esse conceito, corroborando o modelo de "cavitação", em que, nos estágios iniciais da tubulogênese, células internas do cordão que não tenham contato com a matriz extracelular morrem, permitindo a criação de um espaço luminal (Datta *et al*., 2001).

Nickel e colaboradores demonstraram que, no curto prazo, as células IMCD expressam o domínio C-terminal da policistina 1 que está intimamente ligada à

formação de túbulos contendo lúmen. Nos ensaios tubulogênicos realizados no longo prazo em células IMCD, ocorre um truncamento do domínio C-terminal da policistina-1 impedindo a tubulogênese *in vitro*. Nos ensaios realizados em uma mistura de Matrigel e colágeno tipo I, as células IMCD superexpressando o domínio C-terminal da policistina-1 demonstraram extenso alongamento e ramificação durante os primeiros dias de cultura, resultando na formação de estruturas lineares multicelulares ramificadas no quarto dia. Mais tarde, estas estruturas desenvolveram túbulos com lúmen central. Em contraste à expressão do mutante truncado da policistina-1, não houve processo de ramificação durante os dias iniciais de cultura, resultando na formação de estruturas esféricas multicelulares e sem lúmen durante o cultivo por quatro a cinco dias (Nickel *et al*., 2002).

Expressão de hamartina e tuberina *in vitro* durante tubulogênese de IMCD

Tuberina e hamartina são amplamente expressas em tecidos de mamíferos, particularmente em estágios de desenvolvimento embrionário (Murthy *et* al., 2000; Murthy *et al*., 2001). Embora essas proteínas sejam co-expressas em muitos tipos celulares, algumas células expressam apenas uma delas (Murthy *et* al., 2000; Murthy *et al*., 2001). Em camundongo, tuberina e hamartina são expressas de forma ubíqua nos dias E13, E16 e E19, porém sua expressão é reduzida progressivamente até a fase adulta, quando passam a se concentrar no cérebro (Murthy *et al*., 2001). Essas observações são consistentes com o fato de o TSC ser considerado um transtorno do desenvolvimento, com manifestações que se estendem ao longo do período pós-natal mas cujas malformações devem ter sido definidas *in utero*.

Um estudo detalhado de imunofluroescência indireta de rins de ratos analisou a distribuição das proteínas hamartina e tuberina. Elas são co-expressas no segmento distal do néfron, compreendendo o túbulo contorcido distal, o segmento conector e o ducto coletor, no córtex e medula renais, embora hamartina tenha uma distribuição mais abrangente que tuberina e cada proteína possa ser observada de forma isolada em diferentes segmentos. Nos túbulos distais e ductos coletores, tuberina tem uma localização restrita às células intercalares do tipo A, enquanto hamartina é encontrada também nas do tipo B e células principais. Hamartina localiza-se no

domínio apical da membrana dessas células e no citoplasma adjacente, enquanto tuberina é difusamente citoplasmática e pode se colocalizar com a hamartina no domínio apical da membrana. Em algumas células, tuberina foi observada no domínio basolateral sem distribuição apical. De forma diferente da tuberina, hamartina é expressa na porção ascendente da alça de Henle e em células justaglomerulares produtoras de renina (Murthy *et al*., 2000). A não detecção de hamartina no domínio apical de células IMCD em estruturas tubulares, no presente estudo, pode se dever à falta de observação de lúmen nas estruturas analisadas. Por outro lado, a hamartina foi detectada *in vivo* no rato, em co-localização com tuberina, próximo à membrana plasmática e espaço submembranoso em células e túbulos.

Modelos de camundongos modificados geneticamente, nocaute em heterozigose para *Tsc1* ou *Tsc2*, desenvolvem ciastadenomas e carcinoma de célula renal, com frequência maior para $Tsc2^{+/-}$ que para $Tsc1^{+/-}$ e, para ambos os casos, há identificação do evento mutacional somático (Kobayashi *et al*., 1999; Onda *et al*., 1999; Kobayashi *et al*., 2001; Kwiattkowski *et al*., 2002). Comparados a todas as lesões já observadas nos modelos animais para TSC, os cistadenomas renais são as mais frequentes. Os cistos renais observados nesses modelos são menores e menos numerosos do que os cistadenomas. O predomínio de cistos nos animais mais jovens corrobora um modelo em que essas lesões progredirão a cistadenomas e posteriormente a carcinoma de célula renal. Este modelo é apoiado pela menor frequência de perda de heterozigosidade nos cistos que em cistadenomas e carcinoma de célula renal, sugerindo que a haploinsuficiência de *Tsc1* ou *Tsc2* seja suficiente para o aparecimento dos cistos renais e um segundo evento mutacional necessário para seu desenvolvimento em cistadenomas (Wilson *et al*., 2006).

Estes estudos indicam que o modelo de tubulogênese *in vitro*, apresentado aqui, em que hamartina e tuberina são co-expressas em células IMCD e se colocalizam, deve ser mais bem explorado, visando à modificação genética dessas células pela repressão da expressão de um ou ambos os genes *Tsc1* ou *Tsc2*, bem como em associação à modificação genética de *Pkd1* ou *Pkd2*. Aspectos interessantes a serem investigados com esse tipo de experimento incluem os efeitos dessas proteínas sobre a adesão celular, além das polaridades ápico-basolateral e planar da célula, como mencionado acima. A perda da tuberina está associada à perda de adesão celular e

favorece a invasão celular ao ativar a via de β-catenina e redirecionar caderina E para fora da membrana plasmática (Li *et al*., 2003; Barnes *et al*., 2010). O substrato de matriz extracelular de culturas 3D é muito apropriado a esse tipo de análise de adesão e invasão celular.

Nossos resultados revelaram expressão citoplasmática de tuberina e hamatina em células tubulares no 12º DIV, com co-localização acentuada e relativamente homogênea. Esse mesmo padrão de expressão foi observado nas estruturas alongadas no 6° DIV. As análises de *Western blot* confirmaram a expressão de tuberina e hamartina em túbulos *in vitro*. Tais resultados são consistentes com sua alta expressão em estruturas em desenvolvimento, com sua esperada localização subcelular citoplasmática, com sua interação física direta e com seus papéis de proliferação e crescimento celular. Nossos dados sugerem, portanto, papéis integrados de tuberina e hamartina nas fases iniciais da tubulogênese renal.

Embora PKD grave em pacientes com TSC aconteça mais frequentemente pela deficiência de PC1 devido à síndrome de deleção contígua dos genes *TSC2* e *PKD1* (Dixon *et* al., 2011), a tuberina interage funcionalmente com PC1 de diversas formas. Primeiramente, a deficiência de tuberina retém PC1 no complexo de Golgi (Kleymenova *et* al., 2001). Sabe-se que tuberina modula os efeitos de fatores de crescimento na via do mTOR através da inibição da pequena GTPase rheb, integrando crescimento, proliferação e diferenciação celulares (Tee *et* al., 2003; Inoki *et* al., 2003). De forma semelhante às células sem tuberina, células epiteliais renais de indivíduos com ADPKD e modelos de pKD em camundongo apresentam mTOR hiperativo (Schillingford *et al*., 2006). A região C-terminal de PC1 interage com tuberina, regulando o tamanho celular de forma dependente de mTOR, prevenindo a fosforilação inativadora de tuberina pelas cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) na serina 664 ou AKT na serina 939 (Distefano *et* al., 2009; Dere *et al*., 2010).

Expressão de PC1 e PC2 *in vitro* durante tubulogênese de IMCD

PC1 e PC2 são proteínas de membrana que interagem fisicamente e formam um complexo, regulando proliferação celular, diferenciação celular e apoptose, além de desempenhar um papel importante nas interações célula-célula e célula-matriz (Zhou *et al*., 2009). PC1 é expressa na membrana plasmática, vesículas citoplasmáticas, cílio apical primário e, provavelmente, no retículo endoplasmático e no núcleo, enquanto PC2 é expressa predominantemente na membrana do retículo endoplasmático e, em menor quantidade, na membrana plasmática, cílio apical primário e centrossomo (Torres *et* al., 2009). A expressão de PC1 é substancialmente maior em tecidos em desenvolvimento, apresentando uma diminuição drástica em tecidos adultos (Geng *et* al., 1996). Ao longo da nefrogênese, PC1 é expressa nos ductos de Wolf e túbulos mesonéfricos em embriões humanos de 5-6 semanas e nos túbulos proximais em embriões de 10 semanas. Este nível persiste até a 24ª semana (Chauvet *et* al., 2002). Em seguida, os níveis de expressão diminuem acentuadamente, atingindo níveis muito baixos no rim adulto. PC2, por outro lado, é expressa durante toda a nefrogênese (Chauvet *et al*., 2002). PC2 também é observada nos ductos de Wolf e túbulos mesonéfricos na 5ª-6ª semanas de vida embrionária mas também no broto uretérico e blastema metanéfrico. Na 10ª semana embrionária, PC2 é detectada nas ramificações do broto uretérico e nos néfrons em desenvolvimento. Entre 10-38 semanas sua expressão diminui no túbulo proximal, mas permanece alta nos túbulos distais e ductos coletores corticais, padrão que se mantém nos rins maduros.

O papel da PC1 na tubulogênese foi previamente analisado utilizando células MDCK transfectadas com *PKD1*, cultivadas em um sistema de cultura 3D sem a adição de fatores de crescimento (Boletta *et al*., 2000). PC1 reduziu notavelmente a proliferação celular, induziu resistência à apoptose e permitiu que as células progredissem a tubulogênese. Células MDCK que não receberam o constructo de *PKD1*, ao contrário, deram origem apenas a estruturas císticas. Esses dados demonstraram de forma elegante o papel da PC1 no desenvolvimento da tubulogênese. Além disso, utilizando uma mistura de Matrigel / colágeno tipo I, na

ausência de fatores de crescimento, Nickel e cols. demonstraram que células IMCD transfectadas de modo a expressarem a porção C-terminal da PC1 formaram estruturas multicelulares com ramificações lineares e presença de lúmen (Nickel *et* al., 2002). Em linha com tais observações, também se mostrou que PC2 está envolvida na modulação de proliferação e morfogênese com ramificação de células epiteliais renais (Grimm *et al*., 2006). Nossos resultados mostraram que as células tubulares apresentaram marcação para PC1, porém a marcação mostrou-se maior nas porções ramificadas que nas não ramificadas das estruturas tubulares no 12° DIV. A expressão de PC2, por sua vez, foi detectada de forma homogênea ao longo dos segmentos tubulares. Células das estruturas alongadas no 6° DIV também apresentaram marcação para PC1 e PC2. Estes resultados são consistentes com o perfil de expressão diferenciado e variável da PC1, bem como com o perfil de expressão mais homogêneo de PC2 durante a nefrogênese. Ambas as proteínas apresentaram predominantemente expressão citoplasmática, com marcação irregular, fraca e puntiforme na membrana plasmática. Nossos resultados estão, portanto, de acordo com as observações de que a superexpressão de PC1 completa ou de sua porção C-terminal induzem migração celular e morfogênese em células epiteliais renais (Nickel *et al*., 2002; Boca *et al.,* 2007) e medeia adesão celular, organização do citoesqueleto e desenvolvimento de polaridade celular planar (Luyten *et al*., 2010). Nossos resultados apoiam, além disso, papéis relevantes e precoces de PC1 e PC2 no processo de tubulogênese.

PKHD1 é altamente expresso no rim, e em níveis mais baixos no fígado, pâncreas e pulmão (Menezes *et al*., 2004; Ward *et al*., 2003). PD1 é expressa no cílio apical primário, membrana plasmática luminal e citoplasma de células derivadas de ductos coletores (Menezes *et al*., 2004; Ward *et al*., 2003), e está envolvida na tubulogênese (Mai *et* al.,2005). Sua *down-regulation* em células IMCD de camundongos levou à diminuição da proliferação celular e a um aumento da morte celular. A expressão citoplasmática difusa observada em células tubulares no 12° DIV é apoiada por observações de Menezes e cols. no broto uretérico e em estruturas tubulares embrionárias (Menezes *et al*.,2004). Esses achados estão em concordância com a observação de que a *down-regulation* de PD1 resulta em comprometimento das interações célula-célula, desorganização do citoesqueleto, redução da adesão

dependente de integrinas e aumento da apoptose, apoiando um papel determinante para PD1 na tubulogênese.

O fenótipo cístico renal abrange inúmeros mecanismos celulares e de desenvolvimento coordenados, que se encontram alterados na TSC, ADPKD e ARPKD. Nosso estudo demonstrou que as proteínas codificadas pelos genes mutados nessas doenças são expressas ao longo da tubulogênese *in vitro*, seguindo padrões que são consistentes com suas funções e propriedades, assim como com o desenvolvimento de túbulos renais bem diferenciados. Nossos resultados sugerem, ainda, interações entre algumas dessas proteínas durante o processo de tubulogênese. No entanto, enquanto os nossos resultados sugerem uma coordenação funcional entre tuberina, hamartina, policistina-1, policistina-2 e poliductina na formação tubular, análises moleculares, bioquímicas e de expressão mais profundas são necessárias para elucidar esse processo.

6. CONCLUSÕES

1. Células IMCD, cultivadas sob condições 3D, em presença de colágeno tipo I, tendem a formar cordões multicelulares que se ramificam a partir do quinto DIV. O acréscimo de HGF intensifica a formação de cordões e ramificações, observados desde o primeiro DIV, que ficam mais intensos a partir do terceiro DIV.

2. O cultivo 3D de IMCD em Matrigel, na ausência de HGF, favorece a formação cística *in vitro*.

3. A combinação de Matrigel e colágeno tipo I em duas fases, com HGF no meio de cultura, permitiu a tubulogênese e lumenogênese a partir de cistos *in vitro*.

4. Durante a tubulogênese, a apoptose, evidenciada pela marcação com anti-caspase 3 ativa, foi mais significativa no sexto DIV que no 12º DIV. Células proliferativas, na fase S do ciclo celular, apresentaram-se de forma sincrônica no 12º DIV. Estas células foram significativamente mais abundantes no 12º DIV que no 6º DIV.

5. A expressão de hamarina e tuberina em células IMCD aumentou após sua semeadura em sistema 3D. Não foi possível a detecção da hamartina ou tuberina em domínio apical ou basolateral. No entanto, nas preparações utilizadas não se observou lúmen nos túbulos.

6. PD1 distribuiu-se homogeneamente no citoplasma, enquanto PC1 e PC2 localizaram-se predominantemente no citoplasma mas também, em menor intensidade e de forma pontual, na membrana plasmática.

7. PC1 distribuiu-se com maior frequência nas células de pontos de ramificação dos túbulos que nas células de porções não ramificadas, um padrão não observado para PC2.

8. Nossos dados indicam que o sistema de cultivo tridimensional de IMCD, estabelecido *in vitro*, é apropriado ao estudo funcional das relações entre PC1, PC2, PD1, tuberina e hamartina.

ARTIGO SUBMETIDO NO PERIÓDICO NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION

Early Apoptosis, Late Synchronous Cell Proliferation, and Expression Profile of TSC and PKD Proteins During *In Vitro* Tubulogenesis

Crysthiane S. R. Silva[1], Deborah Azzi-Nogueira[2], Felipe A. Ishiy[2], Andressa G. Amaral[1], Oscar F. P. Santos[3], Luciana A. Haddad[2], Luiz F. Onuchic[1,#].

[1]Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; [2]Department of Genetics and Evolutionary Biology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; São Paulo, Brazil; [3]Division of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

[#]Corresponding author:
Avenida Dr. Arnaldo, 455 - Sala 4304
São Paulo - SP - 01246-903
Brazil
Telephone: 55-11-3061-8399
Fax: 55-11-3061-8361
E-mail: lonuchic@usp.br

ABSTRACT

Background: Tuberous sclerosis complex (TSC) and autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases (ADPKD and ARPKD) are monogenic diseases associated with renal cystogenesis. The products of the genes mutated in these disorders, respectively tuberin and hamartin for TSC, and polycystin-1 (PC1), polycystin-2 (PC2) and polyductin/fibrocystin (PD1) for PKD, modulate cell proliferation, differentiation, apoptosis, growth and/or migration. **Methods**: We have employed an IMCD tridimensional cell culture system to characterize their expression profiles along tubulogenesis. **Results**: Using a type I collagen/Matrigel matrix and hepatocyte growth factor (HGF), the formation of elongated structures initiated 2 days after *in vitro* plating (2 DIV) while lumen developed between 10-14 DIV. Active caspase-3 labeling was more intense in initial phases of tubulogenesis while Ki-67 staining was uniformly pronounced in later stages. Tuberin and hamartin showed cytoplasmic expression and marked co-localization at 6 and 12 DIV. PC1 displayed higher expression in branching than non-branching portions at 12 DIV, a pattern not verified for PC2. These proteins presented cytoplasmic and occasional, punctate membrane expression. PD1 also showed cytoplasmic expression. **Conclusions**: Our data suggest that apoptosis and synchronous cell cycling during *in vitro* tubulogenesis are more remarkable, respectively, in early and later steps of tubule formation. In addition, our findings demonstrate that the TSC and PKD proteins are expressed *in vitro* during tubulogenesis, supporting an important role for tuberin-hamartin interaction in tubular formation, and are consistent with the differential PC1 expression pattern observed during nephrogenesis.

Keywords: Tuberin, Hamartin, Polycystin-1, Polycystin-2, Protein Expression, Tubulogenesis

Short Summary:

We used an IMCD tridimensional cell culture system to characterize the expression profiles of tuberin, hamartin, polycystin-1, polycystin-2 and polyductin/fibrocystin, as well as cell mechanisms, during tubulogenesis. Lumen formation occurred between 10-14 days after *in vitro* plating (DIV). Interestingly, 12-DIV tubules displayed higher cell proliferation and lower apoptotic rates than 6-DIV elongated structures, suggesting that apoptosis is more intense in initial phases of tubulogenesis and cell proliferation is more pronounced in later stages. Tuberin and hamartin showed cytoplasmic expression with marked co-localization, while PC1 displayed higher expression in branching than non-branching portions, an observation consistent with the differential PC1 expression verified during nephrogenesis.

INTRODUCTION

Tuberous sclerosis complex (TSC), autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), and autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) are monogenic systemic diseases classically associated with renal abnormalities. While ADPKD is characterized by the bilateral development of multiple renal cysts, progressive increase in kidney size, disruption of the organ architecture and a gradual loss of renal function (1), most TSC patients develop renal angiomyolipomas and a smaller portion of them kidney cysts (2). ARPKD, in turn, is associated with diffuse dilation of collecting tubules, nephromegaly and renal function decline (3). ADPKD is the most common life-threatening human monogenic disease. Approximately 50% of the cases, in fact, reach end-stage renal disease (ESRD) by the end of the sixth decade of life (4). Although ESRD may occur in some TSC patients, most of the clinically relevant renal complications are related to angiomyolipomas or, in nearly 5% of the patients, to PKD due to a contiguous gene deletion syndrome (5). ARPKD typically affects the kidneys and the biliary tract, and is primarily a pediatric disorder (6).

TSC is caused by mutations in one of two genes, *TSC1* (*Tuberous Sclerosis Complex 1*) or *TSC2* (*Tuberous Sclerosis Complex 2*). They function as tumor-suppressor genes and encode, respectively, hamartin (160 kDa) and tuberin (200 kDa) (7). Such proteins form a macromolecular complex involved in the regulation of cellular proliferation, differentiation, growth and migration (8), as inhibitors of the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway (9). ADPKD is also genetically heterogeneous, occurring due to mutations in *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) or *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*). These genes encode, respectively, the integral membrane glycoproteins polycystin-1 (PC1, 485 kDa) and polycystin-2 (PC2, 110 kDa), also associated with modulation of cell proliferation, differentiation, apoptosis and migration (1, 10). ARPKD, on the other hand, is genetically homogeneous, due to mutations in the *PKHD1* (*Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1*) gene (11, 12), which encodes a large membrane protein, polyductin/fibrocystin (PD1), a likely regulator of ductal structure formation (13).

Tubulogenesis is part of branching morphogenesis that takes place during development of epithelial organs, such as the kidneys, and is regulated by distinct, coordinated cell processes (14). Hamartin, tuberin, PC1, PC2 and PD1 are developmental proteins directly involved in nephrogenesis. PC2 is a nonselective cation channel permeable to Ca^{++}, whose activity is modulated by PC1 (15). This protein, in turn, is thought to function as a membrane receptor, as well as an adhesion molecule (1). PC1 has been shown to inhibit cell proliferation and apoptosis and induce spontaneous tubulogenesis in MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells, suggesting that its control on cell proliferation is crucial to allow renal epithelial cells to evolve to terminal differentiation, without succumbing to apoptosis (16). The PC1-PC2 interaction and the relationship between their expression profiles along tubulogenesis, however, remain unclear. PD1 is also thought to function as a membrane receptor, although potential alternative isoforms may act as ligands (17). Notably, PD1 inhibition hampers tubulogenesis in IMCD (inner medullary collecting duct) cell cultures (18). Hamartin and tuberin have been detected in kidney distal tubules, connecting segment and collecting ducts (19), and are essential to establish and maintain apico-basolateral and planar cell polarity in the mouse and rat renal epithelia (20, 21, 22, 23). Tuberin is necessary for the proper subcellular localization of PC1 (24). In addition, mouse kidney cells deficient in either PKD or TSC proteins have increased mTOR activity (25), and cyst formation and development may be blocked by mTOR inhibition (23, 26). Although a molecular relationship has been established among TSC and PKD proteins, an *in vitro* system suitable for studying them during tubulogenesis is lacking.

In the current study, we have used an IMCD tridimensional (3D) cell culture system and characterized the cellular and subcellular tuberin, hamartin, PC1, PC2 and PD1 expression profiles during *in vitro* tubulogenesis, as well as the coordination of proliferation and apoptosis in this process. All five proteins are expressed during initial and late phases of tubulogenesis, whereas PC1 is at higher levels in the branching portions of the tubule. Apoptosis is more pronounced in the early stage of tubule formation while cell proliferation is more intense in later stages. Our results, therefore, support the participation of tuberin, hamartin, PC1, PC2 and PD1 in

tubulogenesis and clarify the coordination of cellular processes during tubule formation.

METHODS

IMCD Three-Dimensional Cell Culture System

IMCD (m-IMCD3, mouse inner medullary collecting duct) cells were cultured under two-dimensional (2D) conditions, at 37°C and 5% CO_2, in complete medium (DMEM high glucose - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA). A tridimensional (3D) *in vitro* cell culture system was established in 24-well dishes using an underlying gel mix (200 μL per well) containing 1x DMEM, 44 mM $NaHCO_3$, 5% phosphate-buffered saline (PBS), 5% FBS, 35% complete medium and 3.44 mg/mL rat tail collagen type I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) (27). The upper gel (200 μL per well) was composed of 70% growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) containing cells (4,000 cells per well), 1x DMEM, 44 mM $NaHCO_3$, 5% PBS, 5% FBS. The cell-containing upper gel was plated on top of the underlying gel and incubated at 37°C. After gelification for 30 min, the gel was overlaid with complete medium with hepatocyte growth factor (HGF) at a 50-ng/mL concentration. The culture medium was replaced on a daily basis to maintain pH, nutrition and HGF levels, and the cultures were analyzed at 6 and 12 days after *in vitro* plating (DIV). Alternatively, 6- or 48-well dishes were employed.

Antibodies

The antibodies (Ab) used in the present study to detect the target proteins included a rabbit anti-tuberin polyclonal Ab (IA22, Sigma Aldrich, St Louis, WI), a rabbit anti-tuberin polyclonal Ab (C20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a mouse anti-hamartin monoclonal Ab (1B2, gently provided by Vijaya Ramesh, Massachusetts General Hospital, MA), a rabbit anti-hamartin polyclonal Ab (HF6, gently provided by Vijaya Ramesh, Massachusetts General Hospital, MA), a rabbit anti-PC1 polyclonal Ab (5183, gently provided by Feng Qian, University of Maryland, MD), a rabbit anti-PC2 polyclonal Ab (3314, gently provided by Feng Qian, University of Maryland, MD), and a rabbit anti-PD1 polyclonal Ab (αPF2, generated and validated in our

laboratory). We have also included subcellular markers to control our expression analyses, using a rat anti-ZO-1 monoclonal Ab (Invitrogen, Carlsbad, CA), a mouse anti-α–acetylated tubulin monoclonal Ab (Sigma Aldrich, St Louis, WI), and a rabbit anti-β catenin polyclonal Ab (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cell proliferation and apoptosis were evaluated employing, respectively, a rabbit anti-Ki67 monoclonal Ab (SP6, Abcam, Cambridge, MA), and a rabbit anti-active caspase-3 polyclonal Ab (Sigma, St Louis, WI).

Immunofluorescence

Cells from 3D cultures were fixed using 4% paraformaldehyde. Gels were washed in PBS with 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, permeabilized with 0.5% triton X-100 for 30 min, and blocked with 1% BSA/PBS solution for 40 min at room temperature (RT). The primary antibodies 1B2, IA22, 5183, 3314 and αPF2 were employed in 10-, 50-, 500-, 500- and 5-fold dilutions, respectively, while anti-ZO-1, anti-β-catenin, anti-acetylated α-tubulin, anti-Ki-67 and anti-active caspase-3 were used in 500-, 500-, 1,000-, 200- and 400-fold dilutions, respectively, in permeabilization buffer at RT. The gels were washed in permeabilization buffer and submitted to a 4-h incubation with the secondary antibody conjugated to either Alexa Fluor 594 or Alexa Fluor 488 (200-fold dilution) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) at RT. Slides were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), and mounted with Prolong Gold mounting medium (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Confocal Microscopy

Confocal images were acquired with a Zeiss LSM 510 inverted laser scanning confocal microscope (Germany). Quantitative analysis of co-localization was supported by concomitant staining performance. The average co-localization intensity of the 594 and 488 channels was established by grouping 1-μm *z* sections, a process described as p.zero. The evaluation of tuberin and hamartin co-localization, in turn, comprised 13 selected images and, for each image, 13 fields were selected for numerical analysis.

Analyses of Cell Proliferation and Apoptosis

Incubations with the SP6 anti-Ki-67 and the anti-active caspase-3 Abs were carried out overnight at 4 ºC in 3D gels. Quantifications of Ki-67-positive nuclei and active caspase-3-positive cells were performed under confocal microscopy at x200 magnification, yielding results expressed as positive nuclei/total nuclei (DAPI-positive) and positive cells/total cells ratios, respectively. Twelve tubular structures were analyzed in each case.

Polycystin-1 and Polycystin-2 Relative Expression Profiles is Tubular Structures

To quantify the relative distributions of PC1 and PC2 in different parts of the tubules, signal intensity ratios between central, non-branching tubular portions and branching regions were determined for both proteins in clear tubular structures and compared. This procedure was performed using the Scion Image software (Scion Image, Frederick, MD).

Western Blotting

Cells were collected from Matrigel using Cell Recovery Solution (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and then lysed with T-PER (Tissue Protein Extraction; Thermo Scientific, Logan, UT) containing protease inhibitors. Lysates were pelleted to remove cellular debris and Matrigel, followed by quantification of protein present in the supernatant using the Bradford assay (Bio Rad, Hercules, CA). Fifty or 100-µg protein samples were submitted to 4 or 6% SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were blotted into polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane following standard conditions. Membranes were blocked overnight at 4C in Tris-buffered saline containing 0.5% Tween 20 (TBST) and 5% nonfat milk. Primary antibodies were diluted in TBST, 3% BSA, and incubated overnight at 4°C, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary Abs (Invitrogen, Carlsbad, CA). Enhanced chemiluminescence detection (ECL) was performed according to the manufacture’s instructions (GE Life Sciences, Piscataway, NJ).

Statistical Analyses

The data were preanalyzed using the K-S test. When parametric, the analyses were performed with nonpaired *t* test, and the results were presented as mean and standard deviation. When nonparametric, we used the Mann-Whitney test between two groups, and the data were presented as median (lower quartile to upper quartile). Pearson correlation was applied for quantitative co-localization analysis. We have accepted an α error $\leq 5\%$ to reject the null hypothesis. The tests were applied using GraphPad 5.00 (Prism Software).

RESULTS

IMCD Cells During *in vitro* Tubulogenesis

We have used a mouse IMCD 3D cell culture system to evaluate renal tubulogenesis, since this is a kidney-derived cell line functionally relevant for the five target proteins investigated in our study. The conditions employed allowed long-term viability to the progressively formed multi-cellular structures, which reproduced the classical features of tubulogenesis.

In the presence of HGF, formation of elongated structures was observed from the second to the tenth DIV, a process that was accompanied by gradual development of branches (Figure 1A and B). A considerable number of such structures displayed a clearly defined epithelial monolayer and well-developed lumen, basic features of constituted renal tubules (Figure 1A). Notably, tubular assembly was preceded by the formation of cystic structures with lumen (data not shown). The transition from cyst to lumen was characterized by the extension of cellular buds from cyst (Figure 1C), followed by the formation of cellular strands (Figure 1C) and, finally, by the formation of tubular structures with single-cell epithelia and well-defined lumen, as demonstrated in Figure 1A through z section clustering. Based on the dynamic analysis of elongated structure development and tubule formation, we established 6 DIV and 12 DIV as the adequate times to have the tubules fixed in 4% paraformaldehyde and systematically analyzed.

Our analysis of lumen formation included the observation of ZO-1/TJP1 (zonula occludens protein 1 or tight junction protein 1) expression, indicating tight junction formation. In the IMCD-derived tubules, ZO-1 was detected at sites of cell-cell contact consistent with apical-lateral membrane transition (Figure 1D and E). This finding suggests achievement of polarity by 12 DIV. Our tubular structure characterization has also included the analysis of acetylated α–tubulin, a protein of stable microtubules. The expression pattern observed in the tubular cells was consistent with this fact, displaying heterogeneous, sharp cytoplasmic and submembranous signal (Figure 1A).

Since epithelial tubulogenesis involves complex cellular rearrangements that require cell adhesion and migration mechanisms, besides cell polarization, the *in vitro* induced tubules were also analyzed for β-catenin, a protein that shuffles among the cytoplasm, the plasma membrane and the nucleus (28, 29). β-catenin has been shown to modulate microtubule organization and cell migration, participating in tubulogenesis (30). In our IMCD tubular structures, β-catenin was mildly expressed in the cytoplasm and presented signal accumulation in cell-cell interface (Figure 1B), following a pattern consistent with developmental structures.

The analysis of 12 distinct tubular structures fixed at either 6 DIV or 12 DIV unraveled significantly more cells in S-phase, labeled by the anti-Ki-67 antibody, at the latest stage than earlier (85.1% [77.8 to 89.6] *versus* 36.7% [26.3 to 59.8]; $p<0.0001$, Figures 2A). These data imply that these cells are in a proliferative state. Moreover, the results suggest that tubular cell population at 12 DIV is more synchronous than six days before. The apoptotic rate, on the other hand, measured by staining of active caspase-3, was higher in 6-DIV elongated structures than in 12-DIV tubules (24.1% [16.3 to 39.1] *versus* 4.2% [2.7 to 6.3]; $p<0.001$, Figures 2B).

Hamartin and Tuberin Expression in IMCD-Derived Tubules

The expression profiles of tuberin and hamartin were also analyzed in the tubular structures at both 6 DIV and 12 DIV. On the 12th DIV, the IA22 Ab revealed positive cytoplasmic signal for tuberin (Figure 3A), a pattern also detected for hamartin by the 1B2 Ab (Figure 3B) nearly in all cells analyzed. Similar findings were obtained in elongated structures at 6 DIV, for which a magnified image is shown in Fig. 3D. Combined expression analyses showed, moreover, cytoplasmic hamartin and tuberin co-localization, following a more extensive hamartin pattern than previously observed in the rat kidney (19) (Figures 3C and D). Significant co-localization of these proteins was confirmed by data analysis using Pearson correlation, which yielded $R=0.62$ (Figure 3E). Although no apical signal was detected for any of the proteins, no lumen had been observed in that specific preparation. Yet, the most intense co-localization signal between hamartin and tuberin was detected on the border of the cells, suggesting plasma membrane or underneath cytoskeleton (Figure 3C). Western blot

analyses of hamartin and tuberin in whole protein extracts from *in vitro* tubules revealed bands at the expected molecular mass, confirming at an additional level the expression of both proteins in these structures (Figure 3F).

Polycystin-1, Polycystin-2 and Polyductin Expression in IMCD-Derived Tubules

PC1 and PC2 had their expression profiles also investigated at 6 and 12 DIV. At 12 DIV, both PC1 and PC2 displayed predominant cytoplasmic expression in tubular cells, with much less intense, irregular and punctate membrane signal (Figure 4). Six-DIV structures displayed cystoplasmic staining for both proteins (Figure 4). Interestingly, PC1 showed higher expression in branching areas of tubulogenesis than in non-branching tubular portions at 12 DIV (Figure 4), a profile consistent with its significantly higher levels in early nephrogenesis than in mature kidneys (31). PC2, on the other hand, did not reproduce this expression feature, being diffusely detected in the cytoplasm of tubular cells but following a homogeneous pattern throughout the evaluated tubular segments (Figure 4). The remarkable PC1 asymmetric expression profile in *in vitro* tubulogenesis was quantitatively confirmed by the determination of PC1 and PC2 signal intensity ratios between non-branching and branching tubular portions in seven independent tubular structures for each of the proteins. The mentioned ratio was indeed significantly lower for PC1 (0.785 $\pm$ 0.085) than for PC2 (0.999 $\pm$ 0,095; $p<0.001$, Figure 4).The characterization of PD1 expression was also part of our analysis. Our findings reveal that the IMCD cells forming the tubular structures displayed PD1 staining in the cytoplasm (Figure 4), a pattern that is consistent with Menezes et al's results in mouse ureteric bud and tubular structures in embryonic life (17).

DISCUSSION

The formation of renal tubules is the most typical example of how epithelial ductal structures are essential for a number of vital functions. Tubulogenesis is, in fact, the most complex process involving epithelial architecture, requiring refined coordination of a large number of cellular and molecular processes. Among them, mitosis, apoptosis, polarization, differentiation, adhesion, motility, cytoskeleton organization, proteolysis and a series of signaling pathways stand out (32, 33). The development of renal tubular structures occurs through the extension of cellular processes, followed by progressive expansion of multi-cellular cords, their branching and lumen formation. Luminal formation, in turn, is a consequence of the establishment of cell polarity, the biological basis for tubular transport functions (33). Notably, apico-basolateral cell polarity acquisition involves dynamic and interdependent processes, including assembly of intercellular junctional complexes, cytoskeleton reorganization, and membrane domain specification (34).

While *in vivo* studies have elucidated important aspects of renal tubulogenesis, the assessment of several fundamental features and mechanisms of tubular formation can only be performed in *in vitro* models. Tridimensional cell culture models using specific matrices allowed the development and assembly of epithelial cells into tubular structures with tissue-like organization (32, 35). MDCK and IMCD cells have been shown to be appropriate to reach tubulogenesis (35, 36).

In our system, the resuspension of IMCD cells in a type I collagen/Matrigel matrix increased cell viability and led to the formation of lumen-containing structures. As it has been reported for MDCK cell-based *in vitro* tubulogenesis, HGF played an essential role to induce this process in our model (37). Our findings revealed, indeed, that IMCD cells in 3D pure matrigel formed only cysts, even in the presence of HGF, while in matrigel/collagen type I with HGF they formed branched tubular structures with lumen. These observations followed Karihaloo *et al*‘s work with IMCD cells (32). The formation of elongated structures initiated at 2 DIV in our system, whereas tubule lumen developed between 10-14 DIV. Several factors have been reported to affect the tubular phenotype, including the serum origin used in the culture, the

number of cell line passages, interactions between extracellular matrix and culture medium molecules, and distinct gene expression profiles (38). In our model, however, variations in the three first factors did not significantly influence the results.

Junctional complexes undergo rearrangements in tubulogenesis, suggesting that regulation of cell-cell junctions play an important role in tubular formation. In fact, cell-cell as well as cell matrix contacts are essential for tubule lumen formation (14). In our tubular structures, the tight junction protein ZO-1 was expressed in cell-cell contact sites consistent with apical-lateral membrane transition at 12 DIV. This observation is in accordance with a previous study that reports its permanence in cell-cell contacts during tubule formation (14). Our results indicate, therefore, the development of polarity in the *in vitro*-induced tubules, supporting polarity and membrane reorganization as essential properties to allow tubulogenesis. β-catenin has also been proposed to play a central role in tubulogenesis, through its binding to APC (30). This interaction promotes microtubule organization and consequent regulation of cell migration, allowing the necessary cell extension for tubule formation. Our IMCD-derived tubules displayed significant β-catenin accumulation in cell-cell junctions associated with mild cytoplasm expression at 12 DIV. No nuclear staining has been observed. This pattern is consistent with its shuffling from cytoplasm to plasma membrane and supports the formation of well-differentiated tubules. Acetylated α–tubulin showed, in turn, a cytoplasmic and submembranous expression profile consistent with stable microtubule disposition, a finding that supports the key role of cytoskeleton organization in tubulogenesis.

Apoptosis and cell proliferation are two other major aspects for the constitution of lumen in the developing tubule (36). Interestingly, 12-DIV tubular structures showed significantly higher cell proliferation and lower cell apoptosis rates than 6-DIV elongated structures. These findings are in line with coordination between proliferation and apoptosis during tubulogenesis and expand this concept, supporting the ‘cavitation’ model where in initial tubulogenesis inner cord cells that lack contact with the extracellular matrix die generating a luminal space (39).

Tuberin and hamartin are comprehensively expressed in mammal tissues, particularly in developmental stages (19, 40). However, although these proteins are co-expressed

in many cell types, some express only one of them (19, 40). In mouse, tuberin and hamartin are ubiquitously expressed on days E13, E16 and E19, but their expression is progressively reduced until adult life, when it becomes mostly concentrated in brain (40). These observations are consistent with the developmental nature of TSC, with manifestations of early onset that extend throughout the postnatal period.

Although severe PKD in TSC patients is mostly related to PC1 loss of function due to *TSC2-PKD1* contiguous gene deletion syndrome (5), tuberin appears to functionally interact with PC1 in different ways. Firstly, tuberin loss retains PC1 in the Golgi (24). It is known that tuberin modulates growth factor effects in the mTOR pathway through the inhibition of the small GTPase rheb, integrating cell growth, proliferation and differentiation (9, 41). Similarly to *Tsc2* null cells, renal epithelial cells from human ADPKD and PKD mouse models present hyperactivated mTOR (25). Notably, PC1 C-terminus interacts with tuberin, regulating cell size in an mTOR-dependent way, preventing inactivating phosphorylation of tuberin by extracellular signal-regulated kinase (ERK) in Ser 664 or AKT in Ser 939 (42, 43).

Our findings revealed tuberin and hamartin cytoplasmic expression in tubular cells at 12 DIV, with marked and relatively homogeneous co-localization. A similar expression pattern was detected at 6 DIV. Western blot analyses confirmed tuberin and hamartin expression in *in vitro* tubules. Such results are consistent with their high expression in developmental structures, their expected cytoplasmic sub-cellular localization, direct physical interaction, and roles in modulating cell proliferation and growth. Our data suggest, therefore, early, developmental and integrated roles for tuberin and hamartin in kidney tubulogenesis.

PC1 and PC2 are membrane proteins and binding partners that regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis, and play important roles in cell-cell and cell-matrix interactions (44). PC1 is expressed in plasma membrane, cytoplasmic vesicles, primary cilium and, probably, in endoplasmic reticulum and nucleus, while PC2 is expressed predominantly in the endoplasmic reticulum membrane and, to a lesser extent, in plasma membrane, primary cilium and centrosome (1). PC1 expression is substantially higher in developing tissues, displaying a dramatic decrease in adult tissues (45). In human kidney, PC1 is expressed in the Wolfian duct and mesonephric tubules in 5-6-week human embryos and in proximal tubules at 10

weeks, with this level persisting until week 24 (31). The expression levels then decline, reaching very low levels in adult kidneys. PC2, on the other hand, is expressed throughout nephrogenesis (31). PC2 is observed in Wolfian duct and mesonephric tubules at 5-6 weeks of embryonic life but also in ureteric bud and induced metanephric blastema. At 10 weeks, it is detected in the ureteric bud branches and developing nephrons. From 10 to 38 weeks its expression decreases in proximal tubules but persists high in distal tubules and cortical collecting ducts, a pattern that remains in mature kidneys.

The role of PC1 in tubulogenesis has been analyzed using a 3D cell culture system seeded with *PKD1*-transfected MDCK cells, without the addition of growth factors (16). PC1 remarkably reduced cell proliferation, induced resistance to apoptosis and enabled the cells to progress to tubulogenesis. Mock-transfected MDCK cells, in contrary, gave rise to cystic structures. These data demonstrated the PC1 comprehensive developmental role in tubule formation. In addition, using a Matrigel/collagen type I mixture in the absence of growth factors, Nickel *et al* reported that IMCD cells transfected to express recombinant PC1 C-terminus formed multi-cellular branched linear structures with lumen (46). In line with these observations, PC2 has also been shown to modulate proliferation and branching morphogenesis in kidney epithelial cells (47). In our study, tubular cells stained for PC1, with higher expression in the branching than non-branching portions at 12 DIV. PC2 signal, in turn, was detected throughout the tridimensional segment. Cells of 6-DIV elongated structures also stained positively. These findings are consistent with the differential, variable PC1 expression pattern, as well as with the more homogeneous PC2 expression profile described in nephrogenesis. Both proteins displayed predominant cytoplasmic expression, with irregular, weak and punctate staining in membrane. Our data are therefore in agreement with the observations that PC1 full-length/C-terminus overexpression induces cell migration and morphogenesis in renal epithelial cells (46, 48) and mediates cell adhesion, cytoskeletal assembly and planar cell polarity (49). Our results support, moreover, early, relevant and developmental roles for PC1 and PC2 in tubulogenesis.

PKHD1 is highly expressed in kidney, and at lower levels in liver, pancreas and lung (13). PD1 is expressed in primary apical cilium, luminal plasma membrane and

cytoplasm of cells derived from collecting duct (17, 50) and is involved in tubulogenesis (18). Its down-regulation in mouse IMCD cells led to decreased cell proliferation and increased cell death. The diffuse cytoplasmic expression observed in tubular cells at 12 DIV is supported by Menezes *et al*'s observations in mouse ureteric bud and embryonic tubular structures (17). Such findings are in pace with the observation that PD1 down-regulation leads to impairment of cell-cell interaction, cytoskeleton disorganization, reduction in integrin-dependent adhesion and increased apoptosis, supporting a determinant role for PD1 in tubulogenesis.

The cystic kidney phenotype brings together a number of cellular and developmental coordinated mechanisms disrupted in TSC, ADPKD and ARPKD. Our study demonstrates that the proteins encoded by the genes mutated in these diseases are expressed along *in vitro* tubulogenesis, following patterns that are consistent with their functions and properties, as well as with the development of well-differentiated renal tubules. Our results suggest, in addition, interaction between some of these proteins during this process. However, while our findings also suggest a functional coordination among tuberin, hamartin, PC1, PC2 and PD1 to reach tubule formation, further molecular, biochemical and expression analyses are required to elucidate this process.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rachel Giles, Ph.D., Ana L. Garippo, Ph.D., and Waldir Caldeira, M.Sc., for technical suggestions and support; Juliano Dettoni, M.D., for technical support; Isac de Castro, Ph.D., for help in the statistical analyses; and Feng Qian, Ph.D., and Vijaya Ramesh, Ph.D., for providing essential antibodies. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Grants 2009/04053-6 to CSS and LFO, and 2011/14329-9 to LAH), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Support to CSS) and the University of São Paulo (support to DAN). These studies utilized resources provided by the NIDDK sponsored Johns Hopkins Polycystic Kidney Disease Research and Clinical Core Center (grant P30DK090868).

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. Kidney Int 2009; 76: 149-168.

2. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med 2006; 355: 1345-1356.

3. Guay-Woodford LM, Desmond RA. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. Pediatrics. 2003; 111(5 Pt 1): 1072-1080.
4. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 1993; 329: 332-342.
5. Dixon BP, Hulbert JC, Bissler JJ. Tuberous sclerosis complex renal disease. Nephron Exp Nephrol 2011; 118: e15-20.
6. Zerres K, Mucher G, Becker J, Steinkamm C, Rudnik-Schöneborn S, Heikkilä P et al. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. Am J Med Genet 1998; 76: 137-144.
7. Virginie Mieulet, Richard F. Lamb. Tuberous sclerosis complex: linking cancer to metabolism. Trends Mol Med 2010; 16: 329-335.
8. Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, Henske EP. Tuberin, the tuberous sclerosos complex 2 tumor suppressor genes product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. Oncogene 2002; 21: 8470-8476.
9. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as GTPase-activating protein complex toward Rheb. Curr Biol 2003; 13: 1259-1268.
10. Bastos AP, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. Braz J Med Biol Res 2011; 44: 606-617.
11. Onuchic L, Furu L, Nagassawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z et al. PKHD1, the policystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein

containing multiple IPT domains and PbH1 repeats. Am J Human Genet 2002; 70: 1305-1317.

12. Ward C, Hogan M, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X et al. The gene mutated in autossomal recessive polycystic disease encodes a large, receptor-like protein. Nat Genet 2002; 30: 259-269.
13. Menezes LF, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal recessive polycystic kidney disease. Braz J Med Biol Res 2006; 39: 1537-1548.
14. Pollack AL, Runyan RB, Mostov KE. Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell–cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor–induced tubulogenesis. Dev Biol 1998; 204: 64–79.
15. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. Annu Rev Med 2009; 60: 321-337.
16. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K *et al*. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. Mol Cell 2000; 6: 1267-1273.
17. Menezes LF, Cai Y, Nagasawa Y, Silva AM, Watkins ML, Da Silva AM et al. Polyductin, the *PKHD1* gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. Kidney Int 2004; 66: 1345-1355.
18. Mai W, Chen D, Ding T, Kim I, Park S, Cho SY et al. Inhibition of Pkhd1 impairs tubulomorphogenesis of cultured IMCD cells. Mol Biol Cell 2005; 16: 4398-4409.
19. Murthy V, Haddad L A, Smith N, Pinney D, Tyszkoswski R, Brown D et al. Similarities and differences in the subcellular localization of hamartin and tuberin in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278: F737-F746.
20. Traykova-Brauch M, Schönig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M ET AL. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. Nat Med 2008; 14: 979-984.
21. Bonnet CS, Aldred M, von Ruhland C, Harris R, Sandford R, Cheadle JP. Defects in cell polarity underlie TSC and ADPKD-associated cystogenesis. Hum Mol Genet 2009; 18: 2166-2176.

22. Hartman TR, Liu D, Zilfou JT, Robb V, Morrison T, Watnick T, Henske EP. The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. Hum Mol Genet 2009; 18: 151-163.
23. Armour EA, Carson RP, Ess KC. Cystogenesis and elongated primary cilia in Tsc1-deficient distal convoluted tubules. Am J Physiol Renal Physiol 2012; 303: F584-592.
24. Kleymenova E, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Kugoh H, Everitt J, Xu H, Kiguchi K ET AL. Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. Mol Cell 2001; 7: 823-832.
25. 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 USA 2006; 103: 5466-5471.
26. Zhou J, Brugarolas J, Parada LF. Loss of Tsc1, but not Pten, in renal tubular cells causes polycystic kidney disease by activating mTORC1. Hum Mol Genet 2009; 18: 4428-4441.
27. Giles RH, Sang L, Jackson PK. Functional analysis of renal ciliopaty disease alleles in 3D spheroid culture. J Am Soc Nephrol 2011; 22: 806A.
28. Dietrich C, Scherwat J, Faust D, Oesch F. Subcellular localization of beta-catenin is regulated by cell density. Biochem Biophys Res Commun 2002; 292: 195–199.
29. Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. Curr Opin Cell Biol 1995; 7: 634-40.
30. Pollack AL, Barth AIM, Altschuler Y, Nelson W J, Mostov KE. Dynamics of beta-catenin interactions with APC protein regulate epithelial tubulogenesis. J Cell Biol 1997; 137: 1651-1662.
31. Chauvet V, Qian F, Boute N, Cai Y, Phakdeekitacharoen B, Onuchic LF et al. Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. Am J Pathol 2002; 160: 973-983.

32. Karihaloo A, Nickel C, Cantley LG. Signals Which Build a Tubule. Nephron Exp Nephrol 2005; 100: e40-45.
33. Pohl M, Stuart RO, Sakurai H. Branching morphogenesis during kidney development. Annu Rev Physiol 2000; 62: 595-620.
34. Lubarsky B, Krasnow MA. Tube morphogenesis: Making and shaping biological tubes. Cell 2003; 112: 19-28.
35. Barros EJG, Santos OFP, Matsumoto K, Nakamura T, Nigam SK. Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: Implications for epithelial tissue development. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4412-4416.
36. O'Brien LE, Zegers MMP, Mostov KE. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. Nature Rev 2002; 3: 531-537.
37. Santos OF, Nigam SK. HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix and TGF-beta. Dev Biol 1993; 160: 293-302.
38. Williams MJ, Clark P. Microscopic analysis of the cellular events during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced epithelial tubulogenesis. J Anat 2003; 203: 483-503.
39. Datta A, Bryant DM, Mostov KE. Molecular Regulation of Lumen Morphogenesis Review. Current Biology 2011; 21: R126–R136.
40. Murthy V, Stemmer-Rachamimov AO, Haddad LA, Roy JE, Cutone AN, Beauchamp RL et al. Developmental expression of the tuberous sclerosis proteins tuberin and hamartin. Acta Neuropathol 2001; 3: 202-210.
41. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell 2003; 115: 577-590.
42. Distefano G, Boca M, Rowe I, Wodarczyk C, Ma L, Piontek KB, Germino GG, Pandolfi PP, Boletta A. 2009 Polycystin-1 Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase-DependentPhosphorylation of Tuberin To Control Cell Size through mTOR and Its Downstream Effectors S6K and 4EBP1. Mol Cell Biol 29: 2359-71.

43. Dere R, Wilson PD, Sandford RN, Walker CL. Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. PloS One 5(2): 1-14, 2010.
44. Zhou J. Polycystins and Primary Cilia: Primers for Cell Cycle Progression. Annu Rev Physiol 2009; 71: 83-113.
45. Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F, et al. 1996. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. J Clin Invest 1996; 98: 2674–2682.
46. Nickel C, Benzing T, Sellin L, Gerke P, Karihaloo A, Liu ZX et al. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. J Clin Invest 2002; 109: 481-489.
47. Grimm AH, Karihaloo A, Cai Y, Cantley LG, Caplan MJ. Polycystin-2 regulates proliferation and branching morphogenesis in kidney epithelial cells. J Biol Chem 2006; 281: 137-144.
48. Boca M, D'Amato L, Distefano G, Polishchuk RS, Germino GG, Boletta A. Polycystin-1 induces cell migration by regulating phosphatidylinositol 3-kinase-dependent cytoskeletal rearrangements and GSK3beta-dependent cell cell mechanical adhesion. Mol Biol Cell. 2007; 18: 4050-4061.
49. Luyten A, Su X, Gondela S. Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol 2010; 9: 1521-1532.
50. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. Hum Mol Genet 2003; 12: 2703-2710.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Tubule formation after 3D culturing for 12 DIV. (A-B) Branching, elongated structures, stained with antibodies for acetylated α-tubulin (A) or β-catenin (B). (C) Cellular bud extension from cyst and formation of cellular strands; β-catenin staining. (D) ZO-1/TJP1 staining. Tubular structure with epithelial monolayer and lumen (arrows) is shown in (A), where the staining for acetylated α-tubulin is observed sharply defining the cell limits. In (B), β-catenin is blurredly detected in the cytoplasm besides the cell boundaries. (E) is a 3-fold magnification from the section depicted within the square in (D) after ZO-1 staining, determining cell contacts, which have been associated with tight junctions. Scale bars: 25 μm.

Figure 2. Decreased apoptosis and enhanced synchronous proliferating cell population in IMCD tubules at 12 DIV. (A) The two right panels show cells stained by Ki-67 antibody, indicative of S-phase, from 6-DIV or 12-DIV elongated structures (n = 12 each), as indicated. The left plot presents the median (lower quartile to upper quartile) of the percentage of cells stained for Ki-67 for each period (6 or 12 DIV). (B) The two right panels show cells stained by active caspase-3 antibody (arrows), indicative of apoptosis, from 6-DIV or 12-DIV elongated structures (n = 12 each), as indicated. The left plot presents the median (lower quartile to upper quartile) of the percentage of cells stained for active caspase 3 for each period (6 or 12 DIV). *** $p<0.001$ *versus* 6 DIV, Mann-Whitney test. Scale bars: 25 μm.

Figure 3. Tuberin and hamartin extensively co-localize in IMCD tubules. (A and C) Tuberin expression profile at 12 DIV (a and b). (B and C) Hamartin expression profile at 12 DIV (a and b). (C) represents the overlapping between images (A) and (B), where arrows show intense overlay near the cell membrane. Ab, Bb and Cb are three-fold magnification respectively from Aa, Ba and Ca, as indicated by the squared line. (D) Tuberin (a) and hamartin (b) expression profiles in 6-DIV tubules, and the overlapping (c) of images (a) and (b). (E) Tuberin/hamartin co-localization intensity analysis. The graph displays the correlation between signals from the two LASER filters that captured Alexa Fluor 488 (tuberin) and Alexa Fluor 594 (hamartin) intensities, according to the immunofluorescence panel shown on the right. (F) Tuberin (a) and hamartin (b) expression analyses by Western blotting of 12DIV tubule lysate. Molecular mass (200 and 160 kDa) are indicated on the left. Hamartin and tuberin expected mass is indicated by arrows (F). Scale bars: 25 μm (A – C, E) and 4μm (D).

Figure 4. PC1 is more expressed in tubular branching than non-branching portions, a pattern not detected for PC2. PC1 and PC2 expression profiles in IMCD tubules are indicated for 6-DIV and 12-DIV cultures. PD1 expression profile is indicated for 12-DIV. The graph shows the ratios between non-branching and branching for polycystin-1 (PC1) and polycystin-2 (PC2) at 12 DIV. Comparison performed using the nonpaired *t*-test, with the data expressed as mean and standard deviation. ***$p<0.001$ *versus* PC2. Scale bars: 25 μm for 12 DIV and 5 μm for 6 DIV.

FIGURE 1

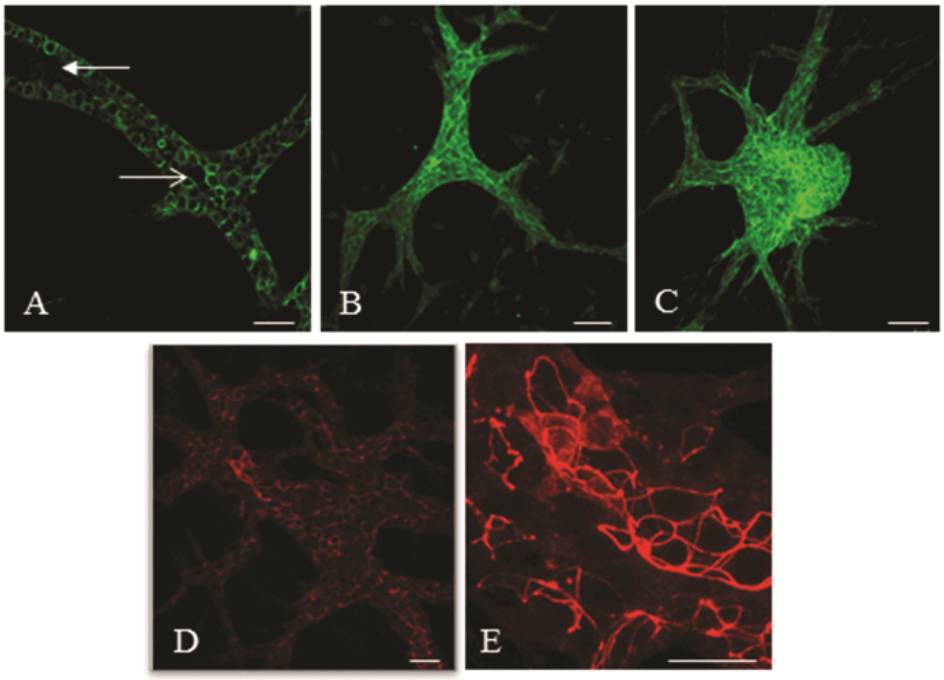


FIGURE 2

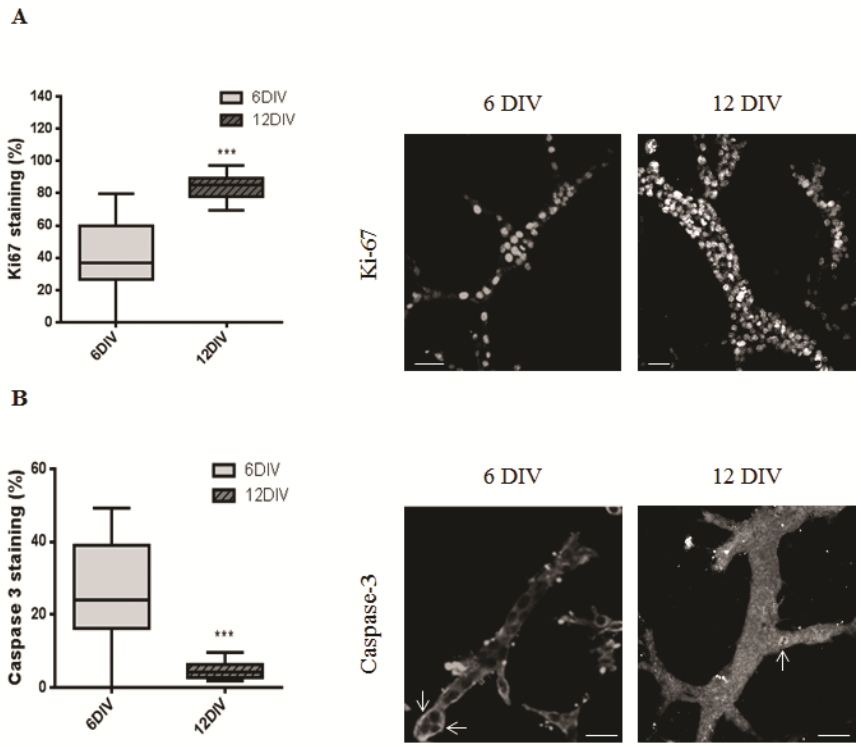

A
Ki67 staining (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
6DIV
12DIV
***
6DIV
12DIV
6 DIV
12 DIV
Ki-67
B
Caspase 3 staining (%)
60
40
20
0
6DIV
12DIV
***
6DIV
12DIV
6 DIV
12 DIV
Caspase-3

FIGURE 3

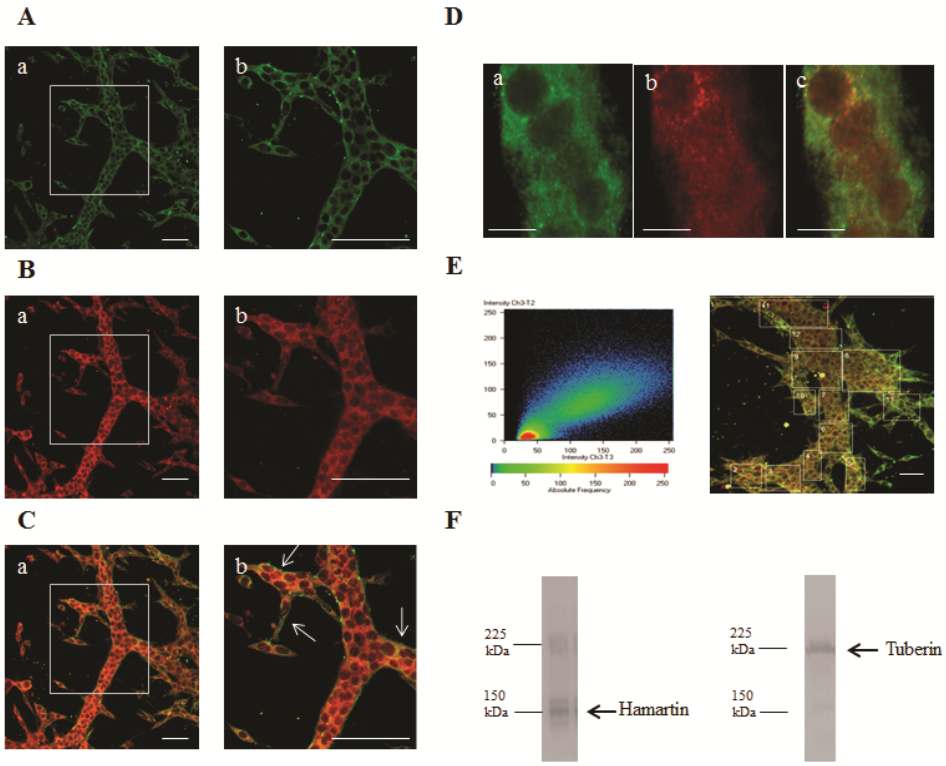
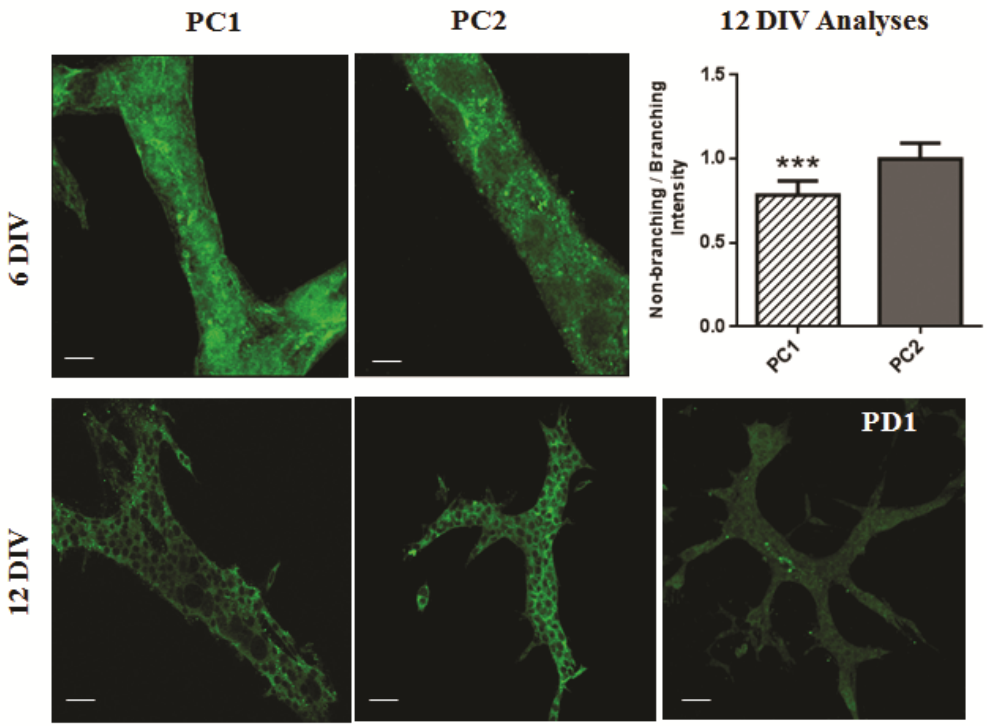

A
a
b
B
a
b
C
a
b
D
a
b
c
E
F
225 kDa
150 kDa
Hamartin
225 kDa
150 kDa
Tuberin

FIGURE 4


PC1
PC2
12 DIV Analyses
6 DIV
12 DIV
PD1
Non-branching / Branching Intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
***
PC1
PC2

8. REFERÊNCIAS

Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. Annu Rev Immunol. 1996; 14:483-510.

Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. Journal of Clinical Oncology 2005; 23: 5386–403.

Affolter M, Zeller R, Caussinus E. Tissue remodelling through branching morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10: 831–842.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. Biologia Molecular da Célula.5. Ed., Artmed Editora, 2004.

Al-Saleem T, Wessner LL, Scheithauer BW, Patterson K,Roach ES, Dreyer SJ, et al. Malignant tumors of the kidney, brain, andsoft tissues in children and young adults with the tuberous sclerosis complex. Cancer 1998; 83: 2208–2216

Armour EA, Carson RP, Ess KC. Cystogenesis and elongated primary cilia in Tsc1-deficient distal convoluted tubules. Am J Physiol Renal Physiol 2012; 303: F584-592.

Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, Henske EP. Tuberin, the tuberous sclerosos complex 2 tumor suppressor genes product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. Oncogene 2002; 21: 8470-8476.

Barasch J, Yang J, Qiao J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *The Journal of clinical investigation*. 1999; 103(9):1299-307.

Bae KT, Zhu F, Chapman AB, Torres VE, Grantham JJ, Guay-Woodford LM et al. Magnetic resonance imaging evaluation of hepatic cysts in early autosomal-dominant polycystic kidney disease: the Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Diseas e cohort. Clin J Am Soc Nephrol 2006;1(1):64-9.

Barros EJG, Santos OFP, Matsumoto K, Nakamura T, Nigam SK. Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: Implications for epithelial tissue development. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4412-4416.

Barnes EA, Kenerson HL, Jiang X, Yeung RS. Tuberin regulates E-cadherin localization: implications in epithelial-mesenchymal transition. Am J Pathol 2010; 177: 1765-1778.

Baskin HJ Jr. The pathogenesis and imaging of the tuberous sclerosis complex. Pediatr Radiol 2008; 38: 936–952.

Bastos AP, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. Braz J Med Biol Res 2011; 44: 606-617.

Bernstein J, Evan A P, Gardner KD Jr. Epithelial Hyperplasia in Human Polycystic Kidney Diseases. American Journal of Pathology 1987; 129(1): 92-101.

Bernstein J. Renal cystic disease in the tuberous sclerosis complex. Pediatr Nephrol 1993; 7(4): 490-495

Bisceglia M, Galliani M. Renal cystic diseases. *Pediatric radiology*. 2010; 40(6): 939-46.

Bissler JJ, M. F., Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, Schmithorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J, Salisbury S, Franz DN .Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. N Engl J Med 2008; 358(2): 140-151.

Bissler JJ, Siroky BJ, Yin H: Glomerulocystic kidney disease. Pediatr Nephrol 2010; 25:2049-56

Bjornsson J, Short MP,Kwiatowski DJ, Henske EP. Tuberous sclerosos- associated renal cell carcinoma. Am Journal of Pathology , 1996; 149: 1201-1208

Bjornsti MA, Houghton PJ. The tor pathway: a target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004; 4:335–48.

Boca M, D'Amato L, Distefano G, Polishchuk RS, Germino GG, Boletta A. Polycystin-1 induces cell migration by regulating phosphatidylinositol 3-kinase-dependent cytoskeletal rearrangements and GSK3beta-dependent cell cell mechanical adhesion. Mol Biol Cell. 2007; 18: 4050-4061.

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

Bonnet CS, Aldred M, von Ruhland C, Harris R, Sandford R, Cheadle JP. Defects in cell polarity underlie TSC and ADPKD-associated cystogenesis. Hum Mol Genet 2009; 18: 2166-2176.

Brenner BM. Determinants of epithelial differentiation during early nephrogenesis. J Am Soc Nephrol , 1990; 1:127-139.

Breysem L, Nijs E, Proesmans W, Smet MH. Tuberous sclerosis with cystic renal disease and multifocal renal cell carcinoma in a baby girl. Pediatr Radiol , 2002; 32(9): 677-680.

Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM et al. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease--a contiguous gene syndrome. Nat Genet. 1994;8:328-32.

Bruno Eduardo Pedroso Balbo, Rosa Maria Cavalcante, João Egídio Romão Júnior, Rui Toledo de Barros, Roberto Zatz e Hugo Abensur. Perfil dos pacientes encaminhados à terapia renal substitutiva de um ambulatório de nefrologia pertencente a um hospital terciário. Jornal Brasileiro de Nefrologia 2007; 29(4):205-208.

Bryant DM , Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. Nat Rev Mol Cell Biol . 2008; 9(11): 887-901.

Casper KA, Donnelly LF, Chen B et al (2002) Tuberous sclerosis complex: renal imaging findings. Radiology 225:451–456

Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D..Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas. Cancer Res 1995; 55: 224-227.

Cantley LG, Barros EJ, Gandhi M, Rauchman M, Nigam SK.. Regulation of mitogenesis, motogenesis, and tubulogenesis by hepatocyte growth factor in renal collecting duct cells..Am J Physiol .1994; 267: 271- 280.

Caplan, MJ. Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. AJP - Renal Physiology 1997; 272(4):425-F429.

Caplan MJ. Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. Am J Physiol 1997; 272(4 Pt 2): F425-F429.

Castagnetti M, Vezzù B, Laverda A, Zampieri S, Rigamonti W. Urological Counseling and Followup in Pediatric Tuberous Sclerosis Complex. J Urol 2007; 178(5): 2155-2159.

Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. J Biol Chem 2003; 278(35):32493-6.

Cebrian C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA. Morphometric index of the developing murine kidney. Dev Dyn 2004; 231(3): 601-8.

Chan SY, Chan W. Huge renal angiomyolipomas in tuberous sclerosis complex. Nephrology 2005; 382–386.

Chauvet V, Qian F, Boute N, Cai Y, Phakdeekitacharoen B, Onuchic LF et al. Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. Am J Pathol 2002; 160: 973-983.

Cook JA, Oliver K, Mueller RF, Sampson J. A cross sectional study of renal involvement in tuberous sclerosis. J Med Genet. 1996; 33(6):480-4.

Crino PB, Marcotte L. The neurobiology of tuberous sclerosis complex. Seminars in pediatric neurology. 2006; 13:37-42.

Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med 2006; 355: 1345-1356.

Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. Lancet 2008; 372: 657–668.

Curatolo P, Seri S, Verdecchia M, Bombardieri R. Infantile spasms in tuberous sclerosis complex. Brain Dev 2001; 23:502–507.

Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A et al: Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. Am J Hum Genet 2001;68:64-80

Davies DM, J. S., Tattersfield AE, Kingswood JC, Cox JA, McCartney DL, Doyle T, Elmslie F, Saggar A, de Vries PJ, Sampson JR . Sirolimus therapy in tuberous sclerosis or sporadic lymphangioleiomyomatosis. N Engl J Med 2008; 358: 1963-1964.

Datta A, Bryant DM, Mostov KE. Molecular Regulation of Lumen Morphogenesis Review. Current Biology 2011; 21: R126–R136.

Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. Cell. 2002; 111(1):29-40.

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): 1-14.

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

Dietrich C, Scherwat J, Faust D, Oesch F. Subcellular localization of beta-catenin is regulated by cell density. Biochem Biophys Res Commun 2002; 292: 195–199.

Distefano G, Boca M, Rowe I, Wodarczyk C, Ma L, Piontek KB et al. 2009 Polycystin-1 Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase-DependentPhosphorylation of Tuberin To

Control Cell Size through mTOR and Its Downstream Effectors S6K and 4EBP1. Mol Cell Biol 29: 2359-71.

Devuyst O, Burrow CR, Smith BL, Agre P, Knepper MA,Wilson PD. Expression of aquaporin-1 and -2 during nephrogenesis and in autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Physiol 1996;271:F169 –F183.

Dixon BP, Hulbert JC, Bissler JJ. Tuberous sclerosis complex renal disease. Nephron Exp Nephrol 2011; 118: e15-20.

Eker R. Familial renal adenomas in Wistar rats. Acta Pathol Microbiol Scand 1954; 34: 554-562.

European Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Cell 1993; 75:1305- 1315.

European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. Cell. ,1994; 77:881–94.

Ewalt DH, Sheffield E, Sparagana SP, Delgado MR, Roach ES. Renal lesion growth in children with tuberous sclerosis complex. J Urol 1998; 160:141–145.

Ewalt DH, Diamond N, Rees C, et al. Longterm outcome of transcatheter embolization of renal angiomyolipomas due to tuberous sclerosis complex. J Urol 2005; 174: 1764–1766.

Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, Torres V, Yaniv M, Pontoglio M. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. Nat Genet 2006; 38: 21-23.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev 2002; 16:1472 1487.

Gabow P. Autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis 1993; 22(4): 511-512.

Gao X, Zhang Y, Arrazola P, et al. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signaling. Nat Cell Biol ,2002; 4(9):699-704.

Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominat polycystic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis, 2010. 17(2):118-130. Garami A,

Zwartkruis FJ, Nobukuni T, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. Mol Cell 2003; 6:1457-66.

Garcia JA, Danielpour D. Mammalian target of rapamycin inhibition as a therapeutic strategy in the management of urologic malignancies. Mol Cancer Ther 2008; 7(6): 1347-1354.

Germino GG. Linking cilia to Wnts. Nat Genet , 2005; 37(5): 455-457.

Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F, et al. 1996. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. J Clin Invest 1996; 98: 2674–2682.

Giles RH, Sang L, Jackson PK. Functional analysis of renal ciliopaty disease alleles in 3D spheroid culture. J Am Soc Nephrol 2011; 22: 806A.

Goberdhan DC, Boyd CA. mTOR: dissecting regulation and mechanism of action to understand human disease. Biochem Soc Trans 2009; 37:213-216.

Green AJ, Smith M, Yates JRW. Loss of heterozygosity on chromosome 16p13.3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients. Nature Genetics.1994.

Grimm AH, Karihaloo A, Cai Y, Cantley LG, Caplan MJ. Polycystin-2 regulates proliferation and branching morphogenesis in kidney epithelial cells. J Biol Chem 2006; 281: 137-144.

Guay-Woodford LM, Desmond RA. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. Pediatrics. 2003; 111: 1072-1080.

Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. Curr Opin Cell Biol 1995; 7: 634-40.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 1996; 84:345–357.

Habbib S. Tuberous sclerosis complex and DNA repair. Adv Exp Med Biol 2010; 685:84-94.

Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C et al. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. J Biol Chem 2002; 277(46):44180-6.

Harding M. Immunophilins, mTOR, and pharmacodynamic strategies for a targeted cancer therapy. Clin Cancer Res 2003; 9(8):2882-2886.

Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular analysis. Hum Mol Genet 1995; 4:1745–1749.

Harris TE, Lawrence JC Jr. TOR signaling. Sci STKE 2003; 212:1-17.

Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. Annu Rev Med 2009; 60: 321-337.

Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morpho¬genesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11:502–514.

Hartman TR, Liu D, Zilfou JT, Robb V, Morrison T, Watnick T, Henske EP. The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. Hum Mol Genet 2009; 18: 151-163.

Hateboer N, Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggar-Malik AK et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney dis ease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. Lancet 1999; 353:103-7.

Henske E.P. Metastasis of benig tumor cells in tuberous sclerosis complex. Genes, Chromosomes & Cancer , 2003; 38:376 – 81.

Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, et al. Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. Am J Hum Genet 1996; 59(2):400-6.

Henske EP. Tuberous sclerosis and the kidney: from mesenchyme to epithelium, and beyond. Pediatric nephrology (Berlin, Germany) 2005; 20(7):854-7.

Huang J, Manning BD. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. J Biochem. 2008; 412:179–190.

Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. Mol Cell Biol 2002; 22:7004-7014.

Hyman M H, Whittemore V H. National Institutes of Health Consensus Conference. Tuberous Sclerosis Complex. Arch Neurol 2000; 57.

Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2002;13:2384-2398.

Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, et al: Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmstead County, Minnesota:1935-1980. Am J Kidney Dis 1983;2: 630-639.

Ilgren EB, Westmoreland D. Tuberous sclerosis: unusual associations in four cases. J Clin Pathol 1984; 37: 272-278.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. Genes Dev 2003; 17:1829-34.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell 2003; 115: 577-590.

Jacinto, A. Woolner S, Martin P. et al. Dynamic analysis of dorsal closure in Drosophila: from genetics to cell biology. Dev. Cell 2002; 3:9–19

Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Marrs JA. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin–catenin complex. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:5067–5071.

Jozwiak S, Migone N, Ruggieri M. The tuberous sclerosis complex. Phakomatoses and hamartoneoplastic syndromes. In: Ruggieri M, Pascual Castroviejo I, Di Rocco C. Neurocutaneous Disorders. Vienna: Springer 2008; 181–227.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Karihaloo A, Nickel C, Cantley LG. Signals Which Build a Tubule. Nephron Exp Nephrol 2005; 100:40-45.

Karihaloo A, O'Rouke DA, Nickel C, Spokes K, Cantley LG. Differential MAPK pathways utilized for HGF and EGF dependent renal epithelial morphogenesis. J Biol Chem 2001; 276:9166 -9173.

Kenerson H, Dundon TA, Yeung RS. Effects of rapamycin in the Eker rat model of tuberous sclerosis complex. Pediatr Res 2005; 57:67–75.

Kenerson HL, Aicher LD, True LD, Yeung RS. Activated Mammalian Target of Rapamycin Pathway in the Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex Renal Tumors. Cancer Research 2002; 62:5645-5650.

Kernelly MJ, Grossman HB, Cho KJ. Outcome analysis of 42 cases of renal angiomyolipoma.J Urol , 1994; 152:1988–1991.

Kleymenova E, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Kugoh H, Everitt J, Xu H, Kiguchi K ET AL. Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. Mol Cell 2001; 7: 823-832.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68:820-823.

Kobayashi T, Minowa O, Kuno J, Mitani H, Hino O, Noda T. Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomatosis, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. Cancer Res 1999; 59: 1206-1211.

Kobayashi T, Minowa O, Sugitani Y, Takai S, Mitani H, Kobayashi E, Noda T, Hino O. A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 8762-8767.

Kokubo T, Kakinuma S, Kobayashi T, Watanabe F, Iritani R, Tateno K, Nishimura M, Nishikawa T, Hino O, Shimada Y. Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model. Cancer Sci , 2010; 101:616-623.

Kwiatkowski DJ, Zhang H, Bandura JL, Heiberger KM, Glogauer M, el-Hashemite N, Onda H. A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. Hum Mol Genet 2002; 11: 525-534.

Kwiatkowski DJ, Manning BD V. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. Human Molecular Genetics 2005; 14:251-258.

Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, et al. The *TSC1* tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and GTPase Rho. Nat Cell Biol 2000; 2:281-7.

Langman's Medical Embriology. Thomas W Sadler. Wolters Kluwer / Lippincott Wiliams & Wilkins.9 ed. 2009.

Larsen WJ. Human Embryology. 2ed.1997. Churchill Livingstone

Laucks SP Jr, McLachlan MSF. Aging and simple renal cysts of the kidney. Br J Radiol 1981; 54:12–15.

Legallicier B, Trugnan G, Murphy G, et al. Expression of the type IV collagenase system during mouse kidney development and tubule segmentation. J Am Soc Nephrol 2001; 12:2358-2369.

Leroy P, Mostov KE. Slug is required for cell survival during partial epithelial–mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. Mol Biol Cell 2007; 18:1943–1952.

Longa L, Scolari F, Brusco A, Carbonara C, Polidoro S, Valzorio B, Riegler P, Migone N, Maiorca R. A large TSC2 and PDK1 gene deletion is associated with renal and extrarenal signs of autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrol Dial Transplant 1997; 12:1900–7.

Luyten A, Su X, Gondela S. Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol 2010; 9: 1521-1532.

Lubarsky B, MA Krasnow. Tube Morphogenesis: Making and Shaping Biological Tubes. Cell 2003; 112:19-28.

Mai W, Chen D, Ding T, Kim I, Park S, Cho SY et al. Inhibition of Pkhd1 impairs tubulomorphogenesis of cultured IMCD cells. Mol Biol Cell 2005; 16: 4398-4409.

Mak B.C., Takemaru K., Kenerson H.L., et al. The tuberin-hamartin complex negatively regulates beta-catenin signaling activity. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278(8):5947-51.

Mak BC, Yeung RS. The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. Cancer Invest 2004; 22(4):588-603.

Marcotte L, Crino PB. The Neurobiology of the Tuberous Sclerosis Complex. NeuroMolecular Medicine 2006; 8:531-546.

Martignoni G, Bonetti F, Pea M, Tardanico R, Brunelli M, Eble JN. Renal Disease in Adults With TSC2/PKD1 Contiguous Gene Syndrome. Surgical Pathology 2002; 26(2):198-205.

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

Mellman I, Nelson WJ. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9(11):833-845.

Mochizuki T, Wu G, Hayashy T, Xenophontos SL, Veldhuisen B,Saris JJ, Reynolds DM, Cai et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. Science 1996; 272:1339–42.

Montesano R, Matsumoto K, NakamuraT, Orci L. Identification of a fibroblast- derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. Cell 1991; 67:901-908.

Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzenberger RA, Bechtle J, Brooks PG et al. Prevalence and clinical characteristics of lymphangioleiomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164:669.

Menezes LF, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal recessive polycystic kidney disease. Braz J Med Biol Res 2006; 39: 1537-1548.

Menezes LF, Cai Y, Nagasawa Y, Silva AM, Watkins ML, Da Silva AM et al. Polyductin, the *PKHD1* gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. Kidney Int 2004; 66: 1345-1355.

Murthy V, Haddad L A, Smith N, Pinney D, Tyszkoswski R, Brown D, Ramesh V. Similarities and differences in the subcellular localization of hamartin and tuberin in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278:F737–F746.

Murthy V, Han S, Beauchamp RL, Smith N, Haddad LA, Ito N, Ramesh V. Pam and its ortholog highwire interact with and may negatively regulate the TSC1.TSC2 complex. J Biol Chem 2004; 279(2):1351-8.

Murthy V, Stemmer-Rachamimov AO, Haddad LA, Roy JE, Cutone AN, Beauchamp RL, Smith N, Louis DN, Ramesh V. Developmental expression of the tuberous sclerosis proteins tuberin and hamartin. : Acta Neuropathol , 2001; 101(3):202-10.

Napolioni V, Curatolo P. Genetics and Molecular Biology of Tuberous Sclerosis Complex.Current Genomics 2008; 9:475-487.

Napolioni V, Moavero R, Curatolo P. Recent advances in neurobiology of Tuberous Sclerosis Complex. Brain and Development 2009; 31:104-113.

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;117:1161–1171.

Nickel C, Benzing T, Sellin L, Gerke P, Karihaloo A, Liu ZX et al. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. J Clin Invest 2002; 109(4): 481-489.

Nunes AC, Milani V, Porsch DB, Rossato LB, Mattos CB, Roisenberg I, Barros EJ. Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. Ren Fail 200830(2):169-73.

O'Brien LE, Zegers MMP, Mostov KE. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. Nature Rev 2002; 3: 531-537.

O'Brien LE, Tang K, Kats ES, Schutz-Geschwender A, Lipschutz JH, Mostov KE. ERK and MMPs sequentially regulate distinct stages of epithelial tubule development. Dev Cell 2004; 7:21–32.

O' CallaghanTJ, Edwards JA, Tobin M, Mookerjee BK. Tuberous sclerosis with striking renal involvement in a family. Arch Intern Med 1975; 135:1082-1087

O'Callaghan FJ, Noakes MJ, Martyns CN. An epidemiological study of renal pathology in tuberous sclerosis complex. BJU Int 2004; 94:853-857.

Li S, Braverman R, Li H, Vass WC, Lowy DR, DeClue JE. Regulation of cell morphology and adhesion by the tuberous sclerosis complex (TSC1/2) gene products in human kidney epithelial cells through increasedE-cadherin/beta-catenin activity. Mol Carcinog 2003; 37: 98-109.

Oliver J, Al-Awqati Q. Development of vascular elements during renal organogenesis. Kidney Int 2000; 55:2167-2168.

Onda H, Lueck A, Marks PW, Warren HB, Kwiatkowski DJ. Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. J Clin Invest 1999; 104: 687-695.

Onuchic L, Furu L, Nagassawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z et al. PKHD1, the policystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple IPT domains and PbH1 repeats. Am J Human Genet 2002; 70: 1305-1317.

Park J-Y, Schutzer WE, Lindsley JN, Bagby SP, Oyama TT, Anderson S, Weiss RH. p21 is decreased in polycystic kidney disease and leads to increased epithelial cell cycle progression: roscovitine augments p21 levels. BMC Nephrology 2007; 8:12

Piscione TD, Rosenblum ND. The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights. Differentiation 2002; 70(6):227-46.

Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (*TSC1*) gene, inetracts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. Cancer Res 1998; 58:4766-4770.

Pirson Y, Chauveau D, Torres V. Management of cerebral aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol 2002;13(1):269-76.

Pohl M, Stuart RO, Sakurai H. Branching morphogenesis during kidney development. Annu Rev Physiol 2000; 62:595-620.

Pollack AL, Barth AIM, Altschuler Y, Nelson W J, Mostov KE. Dynamics of beta-catenin interactions with APC protein regulate epithelial tubulogenesis. J Cell Biol 1997; 137: 1651-1662.

Pollack AL, Runyan RB, Mostov KE. Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell–cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor–induced tubulogenesis. Dev Biol 1998; 204:64–79.

Potter et al. Normal and abnormal development of the kidney. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1972. p. 305.

Praetorius HA, Spring KR. The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003; 12: 517-520.

Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. J Membr Biol 2001; 184:71-79.

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; 87:979-98.

Rakowski SK, Winterkorn EB, Paul E, Steele DJ, Halpern EF, Thiele EA: Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: incidence, prognosis, and predictive factors. Kidney Int 2006; 70: 1777–1782.

Ramesh, V.Aspects of tuberous sclerosis complex (TSC) protein function in the brain. Biochemical Society Transactions 2003; 31(3):579-583.

Reed BY, McFann K, Bekheirnia MR, Nobakhthaghighi N, Masoumi A, Johnson AM, Shamshirsaz AA, Kelleher CL, Schrier RW. Variation in age at ESRD in autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis 2008;51(2):173-83.

Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. J. Child Neurol 1998; 13:624–628.

Rosen EM, Nigam SK., Goldberg ID. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. J Cell Biol 1994; 127 (6 Pt 2):1783-1787.

Rosenblum ND. Developmental biology of the human kidney. Seminars in fetal & neonatal medicine 2008; 13:125-132.

Rosner M, Freilinger A, Hengstschläger M. Akt regulates nuclear/cytoplasmic localization of tuberin. Oncogene 2007(a) 26(4):521-31.

Rosner M, Freilinger A, Hanneder M, Fujita N, Lubec G, Tsuruo T, Hengstschläger M. p27Kip1 localization depends on the tumor suppressor protein tuberin. Hum Mol Genet. 2007 (b) 16(13):1541-56.

Rosner M, Hengstschläger M. Cytoplasmic/nuclear localization of tuberin in different cell lines. Amino Acids. 2007 (c) 33(4):575-9.

Ross DG, Travers H. Infantile presentation of adult-type polycystic kidney disease in a large kindred. J Pediatr. 1975; 87:760-763.

Rosser T, Panigrahy A, McClintock W. The diverse clinical manifestations of tuberous sclerosis complex: a review. Seminars in pediatric neurology. 2006; 13(1):27-36.

Sakurai H, Barros EJ, Tsukamoto T, Barashi J, Nigam SK. An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:6279–6284.

Sampson JR, Maheshwar M, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, Haan E, Bernstein J, Harris PC. Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. Am J Hum Genet 1997; 61(4):843-851.

Sampson JR, Maheshwar MM, Aspiwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D et al. Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. J Am Soc Nephrol 1997; 61(4):843-851.

Sampson JR. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease--a contiguous gene syndrome. Nat Genet 1994; 4:328-32.
Santos OF, Nigam SK. HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix and TGF-beta. Dev Biol 1993; 160: 293-302.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol Cell 2006; 22:159–168.

Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA,Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. Nat Cell Biol 2003; 6:566-71.

Saxe´n L: In Organogenesis of the Kidney. Edited by Barlow PW, Green PB, Wylie CC. Cambridge: Cambridge University Press;1987.

Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation,isolation and characterization. J Antibiot (Tokyo) 1975; 28:727-732.

Scheffers MS, van der Bent P, Prins F, Spruit L, Breuning MH, Litvinov SV, de Heer E, Peters DJ. Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. Hum Mol Genet 2000;9(18):2743-50.

Shepherd CW, Gomez MR. Mortality in the Mayo Clinic Tuberous Sclerosis Complex Study. Ann N Y Acad Sci 1991; 615:375-7.

Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. PNAS 2006; 14:5466-5471.

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 USA 2006; 103: 5466-5471.

Stapleton FB, Johnson D, Kaplan GW, Griswold W. The cystic renal lesion in tuberous sclerosis. J Pediatr 1980; 97:574-579.

Steiner MS, Goldman SM, Fishman EK, Marshall FF. The natural history of renal angiomyolipoma. J Urol 1993; 150:1782-1786

Stewart DB, Barth AI, Nelson WJ. Differential regulation of endoge¬nous cadherin expression in Madin-Darby canine kidney cells by cell–cell adhesion and activation of beta-catenin signaling. J Biol Chem 2000; 275:20707–20716.

Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong AC. Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. J Am Soc Nephrol 2003;14(7):1804-15.

Stuart RO, Barros E J G, Ribeiro E, Nigam S K. Epithelial Tubulogenesis Through Branching. J Am Soc Nephol. 1995; 6(4):1151-9.

Tee AR, Manning BD, Roux PP, et al. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. Curr Biol 2003; 13(15):1259-68.

Tello R, Blickman JG, Buonomo C, Herrin J. Meta analysis of the relationship between tuberous sclerosis complex and renal cell carcinoma. European Journal of Radiology 1998; 27:131-138.

Tinkle CL, Pasolli HA, Stokes N, Fuchs E. New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:15405–15410.

Torra R, Badenas C, Darnell A, Camacho JA, Aspinwall R, Harris PC, Estivill X. Facilitated diagnosis of the contiguous gene syndrome: tuberous sclerosis and polycystic kidneys by means of haplotype studies. Am J Kidney Dis 1998; 31(6):1038-1043.

Torres VE, Rossetti S, Harris PC. Update on autosomal dominant polycystic kidney disease. Minerva Med , 2007; 98(6):669-691.

Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. Kidney Int 2009; 76: 149-168.

Traykova-Brauch M, Schönig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M ET AL. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. Nat Med 2008; 14: 979-984.

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

Van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. Science 1997; 277(5327):805-8.

Van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. Hum Mol Genet , 1998; 6:1053-7.

Virginie Mieulet, Richard F. Lamb. Tuberous sclerosis complex: linking cancer to metabolism. Trends Mol Med 2010; 16: 329-335.

Wang Z, Heino J, Ivaska J, Coffa S, Harris RC, Chen D et al. Differential expression of collagen- and laminin-binding integrins mediates ureteric bud and inner medullary collecting duct cell tubulogenesis. Am J Physiol Renal Physiol 2004 287:F602-F611.

Ward C, Hogan M, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X et al. The gene mutated in autossomal recessive polycystic disease encodes a large, receptor-like protein. Nat Genet 2002; 30: 259-269.

Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. Hum Mol Genet 2003; 12: 2703-2710.

Webb DW, Super M, Normand CS, Osborne JP.Tuberous sclerosis and polycystic kidney disease. BMJ 1993; 306:1258-1259.

Weber MA, Risdon RA, Malone M, Duffy PG, Sebire N J.Isolated unilateral tuberous sclerosis associated renal cystic disease in neonate. Fetal and Pediatric Pathology , 2005; 24:267-275.

Williams MJ, Clark P. Microscopic analysis of the cellular events during scatter factor/ hepatocyte growth factor- induced epithelial tubulogenesis. J. Anat , 2003; 203:483-503.

Wilson C, Bonnet C, Guy C, Idziaszczyk S, Colley J, Humphreys V, Maynard J, Sampson JR, Cheadle JP. Tsc1 haploinsufficiency without mammalian target of rapamycin activation is sufficient for renal cyst formation in Tsc1+/- mice. Cancer Res 2006; 66: 7934-7938.

Wilson C, Idziaszczyk S, Parry L, et al. A mouse model of tuberous sclerosis 1 showing background specific early post-natal mortality and metastatic renal cell carcinoma. Hum Mol Genet 2005; 14:1839–50.

Wilson PD. Epithelial cell polarity and disease. Am J Physiol 1997; 272:434-442

Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. Cell Res 2007; 17:666–81.

Zhang X Mernaugh G, Yang DH, Gewin L, Srichai MB, Harris RC et al. beta1 integrin is necessary for ureteric bud branching morphogenesis and maintenance of collecting duct structural integrity. Development 2009; 136:3357–3366.

Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, et al. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. Nat Cell Biol 2003; 6:578-81.

Zerres K, Mucher G, Becker J, Steinkamm C, Rudnik-Schoneborn et al. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD):molecular genetics, clinical experience and fetal morphology. Am J Med Genet 1998a; 7:137-144

Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Steinkamm C, Becker J, Mucher G. Autosomal recessive polycystic kidney disease. J Mol Med 1998b; 76:303-309

Zhou J, Brugarolas J, Parada LF. Loss of Tsc1, but not Pten, in renal tubular cells causes polycystic kidney disease by activating mTORC1. Hum Mol Genet 2009; 18: 4428-4441.

Zhou J. Polycystins and Primary Cilia: Primers for Cell Cycle Progression. Annu Rev Physiol 2009; 71: 83-113.