Zenaide Providello Moysés

**N-acetilcisteína melhora os fenótipos renal e cardíaco
e reduz o peso corpóreo em camundongos
císticos deficientes em *Pkd1***

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2013**

Zenaide Providello Moysés

**N-acetilcisteína melhora os fenótipos renal e cardíaco
e reduz o peso corpóreo em camundongos
císticos deficientes em *Pkd1***

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada

Moysés, Zenaide Providello

N-acetilcisteína melhora os fenótipos renal e cardíaco e reduz o peso corpóreo em camundongos císticos deficientes em *Pkd1* / Zenaide Providello Moysés. -- São Paulo, 2013.

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

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante/patologia 2. Rim policístico autossômico dominante/ultrassonografia 3.Doenças renais císticas 4.Acetilcisteína/administração & dosagem 5.Camundongos 6.Modelos animais 7.Depuradores de radicais livres 8.Estresse oxidativo 9.Análise de sobrevivência 10.Peso corporal 11.Fibrose 12.Fenótipo

USP/FM/DBD-361/13

Dedicatória

Aos meus pais Geraldo e Zira e minha avó Anna (*in memorian*), que
continuam sempre presentes na minha vida, pelos ensinamentos e
amor eterno.

Ao meu esposo Flávio, pela compreensão e por estar sempre cuidando de mim. Por
ser meu grande amigo e atencioso, consolador nas horas que preciso, mas
também por me fazer rir. Muito obrigada por sempre me apoiar
nas minhas decisões e estar sempre ao meu lado.
Te amo muito!

Aos meus irmãos Cezira, Décio, Neusa, Deonisia e Elisangela, pelo
amor, amizade e união.

Aos meus sobrinhos William, Alessandra, Celso, Wattson, Priscila,
Eline, Felipe e Natasha, por todos os momentos de alegria e tristeza, de risos
e choros e...

Pelo apoio e compreensão sem eles nada disso seria possível.

Aos meus amigos Ana Paula Rocha e Janiel Glinke, pessoas
maravilhosas que posso contar sempre, pelo carinho,
momentos felizes e tristes.

Agradecimentos

A Deus por estar sempre presente em minha vida, por me dar força e discernimento, saúde e por colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao professor Luiz Fernando Onuchic, meu orientador, pela amizade, oportunidade, dedicação, comprometimento, postura ética, por passar o amor pela ciência que contagiava à todos. Disponível e sempre disposto a ensinar e a ouvir. Obrigada por todos os ensinamentos, aprendi muito com os elogios e os puxões de orelha.

Ao Dr. Antônio Carlos Seguro, pela amizade, obrigada pelo apoio, por sempre me recebeu de portas abertas para realizar experimentos em seu laboratório.

Ao meu amigo Bruno Eduardo Pedroso Balbo, pelo companheirismo, dedicação, por me ajudar sempre principalmente nos momentos que mais precisei. Muito Obrigada!

Ao Dr. Isac de Castro, pela amizade, por me ajudar com a estatística deste trabalho e estar sempre disponível.

A Dra. Vera Maria Cury Salemi, pela amizade, comprometimento, dedicação e por me ajudar com as ecocardiografias.

A minha amiga Rita, pelos conselhos, apoio, motivação e momentos de descontração. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida. Muito Obrigada!

Ao meu amigo Jonathan Mackowiak da Fonseca, pela amizade sincera que levarei para sempre em minha vida e por me ajudar em vários momentos.

A minha amiga Dra. Ana Paula Almeida Bastos, que mesmo distante estamos sempre em contato, pela amizade e por me ajudar sempre. Obrigada!

Ao Wagner do LIM16, meu anjo, por estar sempre a me ajudar sem pedir nada em troca. Obrigada!

A Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu, pela amizade, pela disponibilidade, por me ensinar a dosagens de uréia e TBARS.

A minha amiga Dra. Margoth, pelo carinho comigo e por estar sempre disposta a me ajudar. Obrigada!

A minha amiga Cleonice do LIM 29, por me ajudar sempre sem medir esforços. Obrigada!

A Profa. Maria Claudia Irigoyen que disponibilizou o seu laboratório e ao técnico Leandro Souza que com muita destreza realizou os experimentos de aferição da pressão arterial.

Ao Victor Debbas que ensinou e ajudou com os experimentos de GSH.

A Dra. Denise Malheiros, patologista experiente que me ajudou com a quantificação.

Ao Juliano, por me ajudar com o seus conhecimentos em patologia.

A Alda da patologia, por me ajudar com a padronização da técnica de imunohistoquímica.

Aos meus amigos Amanda e Felipe do Lim 29, pelos risos, conselhos e por me ajudar na realização de alguns experimentos.

Aos meus amigos Crys e Will do LIM 29, pela disponibilidade, apoio, confidencias e por momentos de descontração.

Aos meus colegas do LIM 29, Elieser, Dra. Ane, Fernanda, Michele, Diego, Anderson, Daniel, Andressa, Camila, Talita, Alexandre, Dra.Carina, Flavia, Dr. Rodrigo, Jessica, Leila, Pablo, Dr. Humberto, Andrea, Rafael, Pamela, Adriano, Fernando, Marciana e Mary, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do biotério Cida, Pedro e Leandro, pela amizade, pelo conhecimento e ensinamentos. Por sempre cuidar com muito carinhos dos camundongos.

A Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro, pela amizade, dedicação e por nunca ter me negado ajuda. Muito Obrigada!

Aos meus amigos Priscila Queiroz Gouveia e Elerson Costa do LIM 29, pelo apoio e por me ajudar sem pedir nada em troca. Obrigada!

As minhas amigas Tânia e Ludivila do programa de Fisiopatologia Experimental, por sempre estarem prontas a ajudar e tirar as minhas duvida. Obrigada!

Ao Dr. Rildo do LIM 12, pela amizade, desabafos e por ajudar liberando tão prontamente o microscópio.

A Dra.Talita do LIM 12, pela amizade e por me ajudar liberando os equipamentos.

A Joana e Amanda do almoxarifado, por estar sempre pronta a me ajudar.

Ao grupo do LIM 12, Dr. Magaldi, Ana Carolina, Denise, Eloa, Dra. Claudia, Daniele, Dra. Lucia, pela amizade e por me ajudar liberando os equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao grupo do LIM 16, em especial ao Prof. Roberto Zatz, Dra Luzia, Dra Luciene, Dra. Vanda, Camila, Denise, Dra. Clarice, pela amizade e por me ajudar sempre liberando os equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Frederico, pela amizade e por me ajudar a recuperar todos os dados quando quebrei o meu notebook.

A minha amiga Mirtes Candeo do LIM 29, pelo apoio, força nos momento em que precisei e por estar sempre disposta a me ajudar.

A Dona Jacira pela organização e limpeza do laboratório, por sempre estar disposta.

Ao meu amigo Nivaldo do LIM 12, por estar sempre pronto a ajudar. Obrigada!

A Ivone do LIM 16, pela amizade e por estar sempre disposta a me ajudar.

A Dra. Luzia do LIM 16, por me ajudar liberando sempre os equipamentos na hora que preciso.

Ao Prof. Dr. Gerhard Malnic, por me ajudar liberando o equipamento de seu laboratório.

Agradeço ao grupo do Dr. Sérgio Bydlowski (LIM 31), pela compreensão e pelo apoio nesta reta final, em especial a Dra. Débora Levi pela amizade e ajuda imensurável.

Apoio financeiro CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença renal policística autossômica dominante: Epidemiologia e manifestações clínicas	1
1.2 Genética de DRPAD e proteínas associadas à doença	2
1.3 Cílio apical primário	5
1.4 Mecanismo genético-molecular de formação focal de cistos na DRPAD	6
1.5 Expansão cística na DRPAD	8
1.6 Papel da inflamação e da fibrose na progressão da doença	9
1.7 Espécies reativas de oxigênio (ROS) na DRPAD	10
1.8 N-Acetilcisteína (NAC)	14
1.9 Hipótese	15
2. OBJETIVOS	17
3. MÉTODOS	19
3.1 Modelo animal e genotipagem	19
3.2 Grupos experimentais Grupos experimentais (Figura 5)	22
3.3 Administração de NAC	23
3.5 Determinações bioquímicas	24
3.6 Determinação de concentração renal de glutatona	25
3.7 Determinação de concentração renal das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)	25
3.8 Aferição Direta da Pressão Arterial Média (PAM)	26
3.9 Análise morfológica	26
3.10 Análise ultrassonográfica renal	27
3.11 Análise de ecocardiograma	28
3.12. Análise imunohistoquímica para quantificação da taxa de proliferação celular	29

3.12	Quantificação da taxa de apoptose	30
3.13	Análise histológica de fibrose	30
3.14	Análise estatística	31
4.	RESULTADOS	32
4.1	Análises das concentrações séricas de $S_{U} S_{Cr}$ e S_{Cr}/PC (peso corpóreo).....	32
4.2	Análises das frações de excreção de sódio e de potássio	39
4.5	Ultrassonografia renal	51
4.6	Ecocardiograma	54
4.7	Análise da Pressão Arterial Média (PAM)	64
4.8	Análise de proliferação celular e apoptose em rins císticos e não císticos	65
4.9	Análises de fibrose em rim e coração	70
4.10	Análise de sobrevida	73
4.11	Análise do metabolismo redox	74
4.12	Análises de peso corpóreo.....	77
4.13	Análises de pesos renal, hepático e cardíaco.....	82
5.	DISCUSSÃO	87
6.	CONCLUSÕES	93
7.	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE	107

LISTA DE ABREVIATURAS

a	tempo entre a abertura e o fechamento da válvula mitral
A'	índice que reflete função do AE
aa	aminoácidos
ADMA	dimetil-arginina
AE	diâmetro do átrio esquerdo na diástole
Akt	<i>protein kinase B</i>
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
Ao	medida do diâmetro da aorta
Ao/AE	relação entre a aorta e o átrio esquerdo
AP-1	<i>activator protein 1</i>
b	tempo de ejeção do fluxo da via de saída do ventrículo esquerdo
bpm	batimentos por minuto
CAT	enzima catalase
Cdk2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Ci-Co	cístico controle não tratado
Ci-NAC-Adult	cístico tratado com NAC a partir de oito semanas
Ci-NAC-Conc	cístico tratado com NAC desde a concepção
Ci-NAC-Desm	cístico tratado com NAC a partir do desmame
Ci-NAC-Nasc	cístico tratado com NAC desde o nascimento
cNOS	NOS constitutiva
cols	colaboradores
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DDAVp	desmopressina
DDVE	espessura do diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole
DEPC	dietil pirocarbonato
DP	desvio padrão
DPPVE	espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
DRCT	doença renal crônica terminal
DRP	doença renal policística
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante tipo 1,
DSVE	espessura do ventrículo esquerdo na sístole
E'	índice que reflete relaxamento ventricular
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	NOS endotelial
EU _{NO}	excreção urinária de óxido nítrico
FC	frequência cardíaca
FS	fração de encurtamento
FE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FE _K	fração de excreção de K ⁺
FE _{Na}	fração de excreção de Na ⁺

FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FRT	<i>flippase recognition target</i>
GPS	<i>G-protein-coupled receptor proteolytic site</i>
GPX	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HE	hematoxilina-eosina
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HODE	ácido 13-OH-octadecadienóico
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HVE	hipertrofia ventricular esquerda
ICR	índice cístico renal
ICRG	índice cístico renal global
IPM	índice de performance miocárdica
iNOS	indutível de NOS
IP	intraperitoneal
IP3R	<i>inositol 1,4,5-trisphosphate receptor</i>
IR	isquemia/reperfusão
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
<i>Kif3a</i>	<i>kinesin family member 3A</i>
MVE	massa do ventrículo esquerdo
Massa corrigido VE	massa do ventrículo esquerdo corrigido
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAC	N-Acetilcisteína
NADPH-oxidase	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NC-Co	não cístico controle não tratado
NC-NAC-Conc	não cístico tratado com NAC desde a concepção
Nes	nestina
NIC	nefropatia induzida por contraste
NOS	óxido nítrico sintase
NTA	necrose tubular aguda
onda A	medida de pico da onda A do fluxo mitral
onda E	medida do pico da onda E do fluxo mitral
P13 quinase	fosfatidilinositol 3-quinase na internet vários sites
PA	pressão arterial
PACS-1	<i>phosphofurin acidic cluster sorting protein 1</i>
PACS-2	<i>phosphofurin acidic cluster sorting protein 2</i>
PAM	pressão arterial média
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	peso corporal
PC1	policistina-1
PC2	policistina-2
PCa	pesos cardíacos
PH	pesos hepáticos
PKD	<i>Polycystic Kidney Disease</i>
PKD1	<i>Polycystic Kidney Disease 1</i>
<i>Pkd1</i>	<i>polycystic kidney disease1</i>

<i>Pkd2</i>	<i>polycystic kidney disease2</i>
PKD2	<i>Polycystic Kidney Disease 2</i>
PRD	peso de rim direito
PRE	peso do rim esquerdo
PRT	peso renal total
qPCR	tempo real
RE	retículo endoplasmático
REJ	<i>receptor egg jelly domain</i>
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
ROS	espécies reativas de oxigênio
RT	<i>transcriptase reversa</i>
S _{Cr}	creatinina sérica
sem	semana
SIVd	espessura do septo interventricular durante a diástole em mm
S _K	concentração sérica de K ⁺
S _{Na}	concentração sérica de sódio
SOD	superóxido dismutase
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
S _U	concentração sérica de uréia
TBARS	concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TDM	tempo de desaceleração da onda E
TFG	taxa de filtração glomerular
TGF-β	fator de transformação de crescimento β
TM	transmembrânicos
TNF-α	fator de necrose tumoral- α
TRIVE	tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo
TRP	receptor de potencial transiente
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
TUNEL	<i>terminal deoxymucleotidyl transferase-mediated digoxigenindeoxyuridine nick-end labeling</i>
UA	unidades arbitrárias
U _{Cr}	creatinina urinária
U _{osm} Max	osmolalidade urinária máxima
VolD VE	volume diastólico do ventrículo esquerdo
VolS VE	volume sistólico do ventrículo esquerdo
Wnt	<i>wingless-int</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
> e <	maior e menor
±	mais ou menos
≤	menor que ou igual
μg	micrograma
μg/g	micrograma/grama
μg/kg	micrograma/quilograma
μl/mL	microlitro/mililitro
μL	microlitro
μm	micrometro
μm ²	micrometro quadrado
μM	micromolar
μM/μg	micromolar/micrograma
μg/mL	micrograma/mililitro
α Erro	alfa (tipo I)
β Erro	beta (tipo II)
Ca ⁺⁺	cálcio
cm	centímetro
dL	decilitro
g	grama
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
K ⁺	potássio
m	metro
M	molar
m/s	metro/segundo
mEq/L	miliequivalente/litro
mg	miligrama
mg/dL	miligrama/decilitro
mg/g	miligrama/grama
mg/mL	miligrama/mililitro
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mHz	mili-hertz
min	minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
mm/s	milímetro/segundo
mm ³	milímetro cubico
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol/g	milimol por grama
n	número de uma amostra
Na ⁺	sódio
ng	nanogramas
nm	nanometro
NO	óxido nítrico

NO ₂	dióxido de nitrogênio
O ₂ ⁻	superóxido
°C	graus Celsius
OH ⁻	hidroxila
P	coeficiente de significância estatística
pb	par de base
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	segundo
UI/mL	unidade internacional/mililitro
x	vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas da policistina 1 e da policistina 2, os produtos dos genes *PKD1* e *PKD2* e seus domínios.

Figura 2. Mecanismo molecular da cistogenese focal na DRPAD.

Figura 3. Esquema ilustrativo das substâncias reativas com oxigênio.

Figura 4. Genotipagem de camundongos para a presença do alelo condicional (A) e para a presença de Cre-recombinase (B). A) Os animais F8, F10, M1 e M2 apresentam o genótipo *Pkd1*^{cond/+}, ao passo que F5, F6, F7, F9, F11, F12, M3, M4, M5 e M6 apresentam *Pkd1*^{cond/cond}; CN representa o controle negativo; M é o marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb). B) Os animais F5, F7, F9, F11, M1, M3, M5 e M6 apresentam o genótipo *Pkd1:Nestin*^{cre}, enquanto F6, F8, F10, F12, M2 e M4 não apresentam a presença deste transgene; CN representa o controle negativo; M é o marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb). Genótipos finais: M1 - *Pkd1*^{cond/+}:*Nestin*^{cre}; F6, F12 e M4 - *Pkd1*^{cond/cond}, F5, F7, F9, F11, M5 e M6 - *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre} e F8, F10 e M2 - *Pkd1*^{cond/++}

Figura 5. Organograma dos grupos experimentais utilizados.

Figura 6. Fluxograma do estudo.

Figura 7. Análise ultrassonográfica renal. (A) câmara fechada, ventilada com mistura titulável de oxigênio e isoflurano. (B) O animal está em decúbito dorsal na placa aquecida a 40° C, as patas estão fixadas em eletrodos para a medida da frequência cardíaca e em seguida é feita a tricotomia. (C) Aplicação de gel para a aquisição das imagens ultrassonográficas através do transdutor de 40 mHz. (D) Aquisição das imagens bidimensionais dos rins.

Figura 8 (A e B). Análises comparativas da concentração S_U nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ††p<0,01 versus NC-Co. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus Ci-Co.

Figura 9 (A e B). Análises comparativas da concentração S_{Cr} nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Foram comparados usando teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. *p<0,05 versus Ci-Co

Figura 10 (A e B). Análises comparativas da S_{Cr}/PC nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e

não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Foram comparados usando teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

Figura 11 (A e B). Análises comparativas da FE_{Na} nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

Figura 12 (A e B). Análises comparativas da fração de excreção sérica de K^+ (FE_K) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupo cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. $**p < 0,01$ versus Ci-Co; $^c p < 0,05$ versus Ci-NAC-Desm

Figura 13 (A e B). O S_{Na} nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil. $\dagger p < 0,05$; $\dagger\dagger p < 0,01$; $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$ versus NC-Co; $\ddagger p < 0,05$; $\ddagger\ddagger p < 0,01$ versus NC-NAC-Conc. $^a p < 0,05$ versus Ci-NAC-Conc. $^{bb} p < 0,01$ versus Ci-NAC-Nasc

Figura 14 (A e B). Análises S_K nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupo cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. $**p < 0,01$ versus Ci-Co; $^c p < 0,05$ versus Ci-NAC-Desm

Figura 15 (A e B). Análises comparativas da osmolalidade urinária máxima (U_{osm}^{Max}) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupo cístico e não cístico tratado com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil. $\dagger p < 0,05$ versus NC-Co

Figura 16 (A, B, C, D, E, F e G). Análise de ultrassonográfica renal de camundongos $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc. **(A)** Imagem da ultrassonografia renal, (a) Ci-Co e (b) Ci-NAC-Conc. **(B)** Volume renal **(C)**, Volume renal/PC **(D)**, Volume císticos **(E)**, Volume císticos/PC **(F)**, Número de cistos **(G)** e Índice císticos **(G)**. Teste de Mann Whitney, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste t de student não pareado, com resultados expressos em média $\pm$ DP. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ versus Ci-Co

Figura 17. Análises comparativas da frequência cardíaca em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil

Figura 18. Análises comparativas da DD VE (A) e do DD VE/PC (B), VolD VE (C) e do VolD VE/PC (D) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. † $p < 0,05$ versus NC-Co. * $p < 0,05$ versus Ci-Co

Figura 19. Análises comparativas da DSVE (A) e do DSVE/PC (B), VolS VE (C) e VolS/PC (D) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. † $p < 0,05$ versus NC-Co. * $p < 0,05$ versus Ci-Co

Figura 20. Análises comparativas da MVE (A) e do MVE normalizado pelo PC (B) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. † $p < 0,05$ versus NC-Co. * $p < 0,05$ versus Ci-Co

Figura 21. Análises comparativas da FSVE (A) e da FEVE (B) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP † $p < 0,05$ versus NC-Co. * $p < 0,05$ versus Ci-Co

Figura 22. Imagens obtidas por ecocardiografia para medidas do diâmetro diastólico e sistólico. (a) NC-Co, (b) NC-NAC-Conc, (c) Ci-Co e (d) Ci-NAC-Conc

Figura 23. Análises comparativas da Ao (A), AE (B), AE normalizado pelo PC (C) e relação Ao/AE (D) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. † $p < 0,05$ versus NC-Co. * $p < 0,05$ versus Ci-Co

Figura 24. Imagens obtidas por ecocardiografia para medidas Ao e AE. (a) NC-Co, (b) NC-NAC-Conc, (c) Ci-Co e (d) Ci-NAC-Conc

Figura 25. Análise da PAM em camundongos $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$. Teste t de student não pareado, resultados expressos como média $\pm$ DP

Figura 26. Análises comparativas da taxa de proliferação celular entre camundongos $Pkd1^{cond/cond}$ e $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil

Figura 27. Imagem representativa da marcação para Ki-67 em rins de camundongos NC-Co (a), NC-NAC-Conc (b), Ci-Co (c) Ci-NAC-Conc (d). Aumento original de 400x

Figura 28. Análises comparativas da taxa de apoptose entre camundongos $Pkd1^{cond/cond}$ e $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$. Teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil

Figura 29. Imagem representativa da marcação para TUNEL em rins de camundongos NC-Co (a), NC-NAC-Conc (b), Ci-Co (c) Ci-NAC-Conc (d). Aumento original de 400x

Figura 30. Análises comparativas da área de fibrose renal entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond} e *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil. ††p< 0,01 *versus* NC-Co; ‡‡‡p<0,001 *versus* NC-NAC-Conc; *p<0,05 *versus* Ci-Co

Figura 31. Imagem representativa histológica da área de fibrose renal em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}, Ci-Co (A) e Ci-NAC-Conc (B) e em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}, NC-Co (C) e NC-NAC-Conc (D). Aumento original, 400x

Figura 32. Análises comparativas da área de fibrose cardíaca entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond} e *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil. †p< 0,05 *versus* NC-Co; ‡‡p<0,01 *versus* NC-NAC-Conc; ***p<0,001 *versus* Ci-Co

Figura 33. Imagem representativa histológica da área de fibrose cardíaca em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}, Ci-Co (A) e Ci-NAC-Conc (B) e em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}, NC-Co (C) e NC-NAC-Conc (D). Aumento original, 400x

Figura 34. Curva de sobrevida acumulada para os grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Log-rank

Figura 35 (A e B). Análises comparativas de TBARS (A) e GSH (B) renal entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}, entre os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc. Teste Mann Whitney, com dados expressos como mediana e intervalo interquartil. *p<0,05; **p<0,01 *vs* Ci-Co.

Figura 36. Análises comparativas da excreção urinária de NO entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil. **p< 0,01 *versus* Ci-Co

Figura 37 (A e B). Análises comparativas do peso corpóreo (PC) nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil. ANOVA, resultados expressos em média ± DP. ††p< 0,01; ‡‡‡p<0,001 *versus* NC-Co. *p<0,05; ***p<0,001 *versus* Ci-Co. ‡p< 0,05 *versus* NC-NAC-Conc. ^ap<0,05; ^{aa}p<0,01 *versus* Ci-NAC-Conc. ^bp<0,05 *versus* Ci-NAC-Nasc.

Figura 38 (A e B). Análises comparativas de ganho de peso corpóreo nos diferentes tempos de seguimento entre os grupos não cístico não tratado e tratado e entre os grupos cístico não tratado e tratado com NAC durante diferentes períodos da vida. Análises da porcentagem de ganho corpóreo. Dados expressos em mediana intervalo interquartil, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn

Figura 39. Análises comparativas das razões PRT/PC, PRD/PC, PRE/PC, PH/PC e PCa/PC nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste

de Müller-Dunn; dados expressos em mediana e intervalo interquartil † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ *versus* NC-Co; ‡ $p < 0,05$; ‡‡ $p < 0,01$ *versus* NC-NAC-Conc

Figura 40. Análises comparativas das razões PRT/PC, PRD/PC, PRE/PC, PH/PC e PCa/PC nos diferentes tempos e no grupo adicional (Ci-Co) que foram manipulados somente com 22 semanas. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn; dados expressos em mediana e intervalo interquartil. ** $p < 0,01$ *versus* Ci-Co; † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ *versus* NC-Co; ‡ $p < 0,05$; ‡‡‡ $p < 0,001$ *versus* NC-NAC-Conc

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações S_U nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 2. Concentrações S_{Cr} nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 3. S_{Cr}/PC nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 4. Fração de excreção de Na^+ (FE_{Na}) nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 5. Fração de excreção de K^+ (FE_K) nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 6. S_{Na} nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 7. S_K nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 8. Osmolalidade urinária máxima ($U_{osm}Max$) nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 9. Análise comparativa de ultrassonográfica renal em camundongos $Pkd1^{cond/cond}$; $Nestin^{cre}$, entre os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc.

Tabela 10. Análises comparativa de ecocardiograma da FC e dos índices morfológicos em camundongos $Pkd1^{cond/cond}$ e $Pkd1^{cond/cond}$; $Nestin^{cre}$ na idade de 22 semanas.

Tabela 11. Análise comparativa entre a PAM em camundongos $Pkd1^{cond/cond}$; $Nestin^{cre}$

Tabela.12. Análises comparativas de GSH e TBARS renal entre camundongos $Pkd1^{cond/cond}$; $Nestin^{cre}$, entre os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc.

Tabela 13. Valor de EU_{NO} em camundongos $Pkd1^{cond/cond}$; $Nestin^{cre}$

Tabela 14. Peso corpóreo (PC) nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 15. Ganho de peso corpóreo nos diferentes tempos de seguimento para os grupos não cístico não tratados e tratados e para os grupos cístico não tratado e tratado com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 16 (A e B). Razão entre os pesos renais, hepático e cardíaco e o peso corpóreo nos diferentes tempos de seguimento. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

Tabela 17 (A e B). Razão entre os pesos renais, hepático e cardíaco e o peso corpóreo nos animais manipulados em diferentes tempos e no grupo adicional (Ci-Co) que foram manipulados somente com 22 semanas. (A) grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

RESUMO

Moysés ZP. N-acetilcisteína melhora os fenótipos renal e cardíaco e reduz o peso corpóreo em camundongos císticos deficientes em *Pkd1* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Estudos experimentais e clínicos amparam a participação do estresse oxidativo na progressão da doença renal na doença renal policística autossômica dominante (DRPAD). A administração do agente antioxidante N-acetilcisteína (NAC), por sua vez, apresenta efeitos benéficos em vários modelos animais de injúria renal. Neste estudo, utilizamos um camundongo cístico gerado por meio do cruzamento de uma linhagem portadora de um alelo *floxed Pkd1* com outra que expressa nestin-Cre para avaliar os efeitos da NAC sobre um modelo ortólogo à DRPAD humana. O tratamento de longo prazo com NAC foi iniciado na concepção, nascimento, desmame ou oito semanas de idade, de modo a permitir a avaliação de seus efeitos em diferentes fases da vida. Nossas análises revelaram que a administração de NAC reduziu o nível de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico e aumentou o de glutathione nos rins de camundongos císticos tratados com NAC desde a concepção (Ci-NAC-Conc) comparados a animais císticos não tratados (Ci-Co). A excreção urinária de óxido nítrico também foi maior em camundongos císticos tratados com NAC. Animais Ci-NAC-Conc apresentaram ureia sérica, número de cistos renais, índice cístico e fibrose intersticial renal mais baixos que os camundongos Ci-Co. Animais Ci-NAC-Conc apresentaram, além disso, fração de ejeção e fração de encurtamento de ventrículo esquerdo maiores que camundongos Ci-Co, assim como menor fibrose cardíaca. O tratamento com NAC iniciado na concepção aumentou a sobrevivência dos animais císticos. Notavelmente, o peso corpóreo mostrou-se significativamente menor em camundongos Ci-NAC-Conc que nos animais Ci-Co em todas as idades avaliadas, uma diferença não observada entre animais não císticos tratados e não tratados com NAC. Ainda é incerto se todas as ações observadas da NAC são causadas por suas propriedades antioxidantes. Esses resultados apóiam efeitos benéficos de tratamento precoce com NAC em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*, determinados pela melhora de seus fenótipos renal, cardíaco e sistêmico. Nossos achados também revelam uma redução não deletéria no crescimento corpóreo, induzida pela administração de longo prazo de NAC no *background* deficiente em *Pkd1* avaliado. Nossos dados abrem uma linha de pesquisa significativa e provavelmente robusta para se intervir nos fenótipos renal, cardíaco e sistêmico da DRPAD.

Descritores: Rim policístico autossômico dominante/patologia; Rim policístico autossômico dominante/ultrassonografia; Doenças renais císticas; Acetilcisteína/administração & dosagem; Camundongos; Modelos animais; Depuradores de radicais livres; Estresse oxidativo; Análise de sobrevivência; Peso corporal; Fibrose; Fenótipo.

SUMMARY

Moysés ZP. N-acetylcysteine improves renal and cardiac phenotypes and reduces body weight in *Pkd1*-deficient cystic mice [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Oxidative stress has been postulated to participate in the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). The antioxidant N-acetylcysteine (NAC), in turn, has been shown to determined beneficial effects on several animal models of renal injury. In the current study, a cystic mouse generated by breeding a *Pkd1* floxed allele with a nestin Cre expressing line was used to evaluate the potential therapeutic effects of NAC on a model orthologous to human ADPKD. Long-term NAC treatment was initiated at conception, birth, weaning or 8 weeks of life, to allow the evaluation of its effects on different phases of life. Our analyses revealed that NAC decreased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and increased glutathione levels in the kidneys of mice treated with NAC since conception (CY-NAC-Con) compared with non-treated cystic animals (CY-Ctl). Nitric oxide urinary excretion was also higher in NAC-treated cystic mice. These animals showed lower serum urea nitrogen (SUN), number of renal cysts, cystic index and renal interstitial fibrosis than CY-Ctl mice. CY-NAC-Con animals displayed, in addition, higher left ventricle ejection fraction and fractional shortening compared with CY-Ctl mice, as well as decreased cardiac fibrosis. NAC treatment started at conception increased the survival of cystic mice, demonstrating beneficial systemic effects. Interestingly, body weight was significantly lower in CY-NAC-Con than CY-Ctl mice at all evaluated times, a difference not observed between non-cystic animals treated and not treated with NAC. Whether all observed NAC actions are caused by its antioxidant properties is yet not clear. These results support beneficial effects of early treatment with NAC on *Pkd1*-deficient cystic mice, by determining improvement in their renal, heart and systemic phenotypes. Our findings also reveal a non-deleterious reduction in body growth induced by long-term NAC administration in the evaluated *Pkd1*-deficient background. Our data open a likely significant and robust research track to intervene in renal, extra-renal and systemic ADPKD phenotypes.

Descriptors: Polycystic kidney, autosomal dominant/pathology; Polycystic kidney, autosomal dominant/ultrasonography; Kidney diseases, cystic; Acetylcysteine/administration & dosage; Mice; Models, animal; Free radical scavengers; Oxidative stress; Survival analysis; Body weight; Fibrosis; Phenotype.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal policística autossômica dominante: Epidemiologia e manifestações clínicas

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é a doença renal cística hereditária mais frequente, com uma prevalência populacional de 1:400-1:1000 em populações de origem europeia ¹. Embora seja diagnosticada tipicamente em adultos, a DRPAD pode se manifestar antes dos 18 anos em 1 a 2% dos casos. Os cistos renais podem se originar do epitélio de diferentes segmentos do néfron, principalmente dos ductos coletores. Essas estruturas são revestidas por uma camada de células epiteliais menos diferenciadas e associadas a altas taxas de proliferação e apoptose ². Ao considerar as glomerulopatias como um conjunto de diferentes entidades etiológicas, a DRPAD constitui-se na terceira causa mais comum de doença renal crônica terminal (DRCT), responsabilizando-se por 4,4 a 10% dos pacientes que atingem essa condição clínica ^{3, 4}. Um estudo realizado no sul do Brasil com 1326 pacientes em hemodiálise revelou que cerca de 7,5% desses pacientes apresentavam rins policísticos como causa primária para tal desfecho ⁵. Outro estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP mostrou que 8,4% dos pacientes em terapia renal substitutiva apresentavam DRPAD ⁶. De fato, cerca da metade dos pacientes necessitam de terapia renal substitutiva até o final da sexta década de vida, evidenciando um grande impacto médico, social e econômico.

O fenótipo renal da DRPAD caracteriza-se pelo desenvolvimento de cistos bilateralmente, aumento progressivo do volume do órgão, distorção de sua arquitetura e perda progressiva da função renal. Entre as complicações renais, destacam-se dor abdominal ou em flanco secundária ao aumento do rim, hematúria, nefrolitíase, infecção ou hemorragia em cisto e infecção de trato urinária de outra natureza ⁷.

Dada sua natureza sistêmica, a DRPAD também se associa a várias manifestações extrarrenais ⁸. Cistos também podem surgir em outros órgãos epiteliais, incluindo fígado, pâncreas, membrana aracnoide, meninge e vesículas seminais. Dentre as manifestações extrarrenais, destacam-se os cistos hepáticos, que acometem a grande maior parte dos pacientes com DRPAD ⁹. Complicações associadas incluem infecção e hemorragia cística ². A expansão cística hepática pode também causar compressão de

outros órgãos e estruturas e causar sintomas em alguns pacientes com DRPAD. Cistos pancreáticos são quase sempre assintomáticos, com raras ocorrências de pancreatite ¹⁰. Aneurismas intracranianos, por sua vez, são cinco vezes mais frequentes em pacientes com DRPAD que na população geral, associando-se a morbidade e mortalidade significativas ¹¹. Anormalidades cardiovasculares são muito comuns em pacientes com DRPAD, constituindo-se na principal causa de morbidade e mortalidade nesta doença na era pós-diálise ^{12, 13}. Hipertensão arterial também é comum nessa população, ocorrendo na maior parte dos pacientes antes de perda significativa da função renal. Nesse contexto, deve-se destacar que a hipertensão arterial sistêmica constitui-se num determinante maior da morbi-mortalidade cardiovascular associada à DRPAD ¹⁴. Hipertrofia ventricular esquerda e valvopatias cardíacas são também muito comuns na DRPAD ¹⁵. Entre as valvopatias, merecem ser mencionadas prolapso da válvula mitral, regurgitação mitral e regurgitação aórtica ². Eventos cardiovasculares prevalentes compreendem ainda arritmias, doença vascular periférica e infarto agudo do miocárdio (IAM) ¹³.

1.2 Genética de DRPAD e proteínas associadas à doença

A DRPAD é geneticamente heterogênea. Em aproximadamente 85% dos casos a doença é causada por mutações no gene *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*), mapeado à região cromossômica 16p13.3, enquanto em cerca de 15% dos pacientes deve-se a mutações no gene *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*), localizado em 4q21. Quando associada a mutações em *PKD1*, a enfermidade tende a apresentar um curso mais grave, fenômeno aparentemente relacionado ao desenvolvimento de um maior número de cistos ¹⁶. O gene *PKD1* estende-se por um segmento genômico de 52 kb, compreende 46 éxons e dá origem a um transcrito de 14,2 kb, relacionado a um quadro de leitura aberta de aproximadamente 12,9 kb. Tal gene codifica uma glicoproteína integral de membrana de mais de 4.300 aminoácidos (aa), denominada policistina-1 (PC1), enquanto *PKD2* se entende por um segmento genômico de aproximadamente 68 kb, abrange 15 éxons e dá origem a um transcrito de aproximadamente 5,4 kb, associado a um quadro de leitura aberta de 2,9 kb. *PKD2* codifica, por sua vez, policistina-2 (PC2), também uma proteína de membrana, neste caso com 968 aa.

PC1 possui uma porção extracelular N-terminal com mais de 3.000 aa, 11 domínios transmembrânicos (TM) e uma cauda C-terminal intracitosólica curta com 197 aa (Figura 1). Seus domínios extracelulares estão frequentemente envolvidos em interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato, incluindo domínios ricos em leucina, domínios PKD semelhantes a sequências encontradas em imunoglobulinas, o domínio REJ (*receptor egg jelly domain*) e o domínio GPS (*G-protein-coupled receptor cleavage site*)¹. O domínio GPS é responsável pela clivagem da porção N-terminal da PC1 próxima ao primeiro domínio TM, processo associado a importantes consequências estruturais e funcionais sobre o néfron distal¹⁷. A porção C-terminal de PC1 apresenta, por outro lado, vários sítios de fosforilação e um domínio helicoidal essencial para a interação física entre as porções C-terminais de PC1 e PC2. Esta proteína, por sua vez, contém seis domínios transmembrânicos e ambas as terminações N- e C- terminais intracitosólicas (Figura 1).

Figura 1. Estruturas da policistina 1 e da policistina 2, os produtos dos genes *PKD1* e *PKD2* e seus domínios

PC2 constitui-se em um canal de cátions não seletivo permeável a Ca^{++} pertencente a uma subfamília TRP (*transient receptor potential*) de canais de cátions TRPP. Em sua extremidade C-terminal, a PC2 contém um domínio *EF hand*, capaz de ligar Ca^{++} ¹⁸, e um domínio helicoidal responsável por sua interação com um grande número de ligantes ¹. Destaca-se, ainda, o eixo de sinalização envolvendo PC2 e o IP3R (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*) por meio da modulação do Ca^{++} intracelular ¹⁹. Perturbações dessa interação levam a alterações na homeostase do Ca^{++} intracelular, podendo contribuir para o desenvolvimento da DRPAD ²⁰.

PC1 pode funcionar como um receptor de superfície celular acoplado a proteína G, regulando proliferação, diferenciação celular, apoptose e secreção de fluido. Sua ativação, seguindo um processo dependente da PC2, pode também ativar JAK2 (*Janus kinase 2*), o que induz a fosforilação e a formação de homodímeros STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) ²¹. Tais dímeros, por sua vez, translocam-se ao núcleo e se ligam ao promotor do gene *p21*, promovendo sua supra-regulação e consequente inibição da atividade de Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*) ²¹. Este efeito determina parada celular em G0/G1, podendo explicar, ao menos parcialmente, a ação antiproliferativa de PC1 ²¹. A extremidade C-terminal da PC1 pode também interagir com a tuberina, o produto do gene *TSC2* (*Tuberous Sclerosis 2*), aparentemente regulando a atividade de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ²².

PC1 é expressa na membrana plasmática e, aparentemente, no retículo endoplasmático. Estudos recentes reportam que seu domínio C-terminal é clivado e migra para o núcleo, onde se propõe que influencie a transcrição gênica ²³. O domínio C-terminal da PC-1, agindo de forma independente da ligada, desencadeia vias exclusivas de sinalização para a morfogênese, e provavelmente desempenha um papel central na função PC-1 ²⁴. PC2, por sua vez, é encontrada predominantemente no retículo endoplasmático e, em menor quantidade, na membrana plasmática. As policistinas se colocizam no cílio apical primário de celulares tubulares renais. PC2 interage, ainda, com o citoesqueleto ^{25, 26} enquanto PC1 se associa à desmoplaquina no desmossomo, o que caracteriza seu papel na adesão celular ²⁷. Interessantemente, PC1 apresenta níveis elevados de expressão no rim em desenvolvimento, porém sua expressão encontra-se mais restrita no rim adulto, enquanto PC2 se acompanha de níveis significativos de expressão durante o desenvolvimento e no rim maduro.

PC2 se localiza no retículo endoplasmático (RE) na maioria das células, sugerindo que seu transporte represente um importante mecanismo de controle da atividade do canal ²⁸. A fosforilação por caseína quinase 2 favorece seu acoplamento a duas proteínas, mediando seu tráfego celular: PACS-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 1*), para o complexo de Golgi/transGolgi, e PACS-2 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*), para o retículo endoplasmático. A desfosforilação da PC2 pela proteína fosfatase A2, por sua vez, promovendo seu desacoplamento dessas interações e translocação para a membrana plasmática. A interação de PC2 com PC1 também se constitui em estímulo para sua translocação à membrana plasmática ^{29,30}.

1.3 Cílio apical primário

Os cílios primários, formados por axonema ciliar e corpo basal/centríolo, são organelas sensoriais que se projetam a partir da superfície de quase todas as células do corpo. Anormalidades do cílio apical primário estão associadas à patogênese de várias doenças renais císticas, incluindo a DRPAD. De fato, proteínas codificadas por genes mutados em várias dessas doenças se localizam no cílio primário de células epiteliais de túbulos renais. O cílio primário parece ser sensível a estímulos extracelulares mecânicos e/ou químicos, particularmente ao fluxo de fluido intratubular, convertendo-os em transientes intracelulares de Ca^{++} ¹. A ligação do cílio primário com DRPAD foi sugerida a partir da descoberta de que PC2 regula vias de sinalização durante o desenvolvimento embrionário. De fato, camundongos *Pkd2*^{-/-} apresentam defeitos na formação do eixo embrionário associados à lateralização de sinal de cálcio ³¹. Outro estudo mostrou o envolvimento do cílio primário em modelo murino com inativação *Kif3a*, uma subunidade essencial para a formação do cílio no epitélio renal. Esses camundongos exibiram aumento de proliferação e apoptose, localização apical inapropriada de EGF (*epidermal growth factor*), aumento da expressão de beta-catenina e c-Myc e inibição de p21, alterações associadas ao desenvolvimento de cistos renais com cinco dias de vida e insuficiência renal na idade de 21 dias ³².

O complexo PC1/PC2 desempenha um papel central nesse processo, atuando como um mecanossensor localizado na superfície ciliar. O influxo de Ca^{++} via PC2, por sua vez, induz uma marcada liberação desse cátion a partir de estoques intracelulares, modulando atividades subcelulares como proliferação, diferenciação celular, apoptose e

expressão gênica. A mecanossensação ciliar está aparentemente também associada a variações de expressão gênica dependentes de STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*), mediadas por sua interação com a cauda citoplasmática da PC1³³. Outro mecanismo através do qual esta extremidade da PC1 parece ser importante é a sinalização dependente Wnt, capaz de modular os processo de desenvolvimento e cistogenese³⁴.

1.4 Mecanismo genético-molecular de formação focal de cistos na DRPAD

Embora todas as células tubulares renais de um dado paciente com DRPAD carreguem um dos alelos *PKD1* ou *PKD2* com a mesma mutação germinativa, a formação focal de cistos renais atinge apenas células pertencentes a aproximadamente 1% dos néfrons. Tal observação fundamenta-se no modelo de patogênese molecular de dois eventos, amparado por estudos conduzidos na década de 90³⁵. Este modelo propõe que a mutação germinativa constitua o primeiro evento, enquanto o segundo golpe seja representado por uma mutação somática no alelo previamente normal (Figura 2). De acordo com esse mecanismo, a inativação ou intensa redução da atividade de ambos os alelos de uma dada célula tubular renal, é necessária para a formação clonal do cisto. De fato, a deleção homozigótica germinativa de *Pkd1* em camundongos resulta no desenvolvimento embrionário de rins e pâncreas maciçamente císticos e mortalidade pré-natal³⁶.

Figura 2. Mecanismo molecular da cistogenese focal na DRPAD

Estudos realizados nos seis últimos anos, contudo, vêm aprimorando este modelo. Piontek et al mostraram que a inativação de *Pkd1* em camundongos antes do 13º dia de vida pós-natal resultou em doença renal cística severa em três semanas, enquanto sua inativação induzida após este momento acompanhou-se de desenvolvimento cístico bastante tardio ³⁷. Tais achados mostraram que o curso da doença renal cística depende do momento em que o alelo previamente normal de *Pkd1* é inativado (Figura 2). Um estudo subsequente sugeriu que a inativação do gene *Pkd1* não fosse suficiente para a indução de cistogênese no rim maduro por não ser capaz de iniciar a proliferação celular necessária à formação de cistos renais ³⁸. Takakura et al, por sua vez, confirmaram a incapacidade da inativação de *Pkd1* em determinar doença cística renal rápida e significativa em camundongos na idade adulta, relatando apenas formação focal de cistos quando ambas as mutações somáticas foram induzidas no rim adulto, e doença cística regional em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* submetidos à inativação do alelo previamente normal na idade adulta ³⁹. Neste caso, o efeito diferencial da haploinsuficiência gênica residiria, aparentemente, em um efeito de natureza parácrina. Nesse cenário, tais investigadores sugeriram que a cistogênese rápida e difusa em rim maduro requeresse um terceiro evento. Tal conceito foi confirmado por meio de outros dois estudos. Enquanto Takakura et al mostraram que a indução de isquemia/reperfusão associou-se a importante cistogênese renal em camundongos submetidos a inativação de ambos os alelos de *Pkd1* em idade madura ⁴⁰, em nosso laboratório demonstramos que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* desenvolveram microcistos renais seis semanas após insulto IR ⁴¹, fenótipo não observado em camundongos selvagens submetidos ao mesmo procedimento. Mostramos, ainda, que tais animais cursaram com fibrose renal aumentada após o insulto, comparado a seus controles selvagens. Neste cenário, Gallagher et al propuseram recentemente um modelo mais completo de cistogênese na DRPAD ⁴². Segundo esse modelo, quando uma dada célula apresenta a atividade combinada de ambos os alelos de *PKD1* ou de *PKD2* abaixo de um limiar crítico, desenvolve-se o cisto. Este limiar, contudo, depende de uma série de fatores como variantes genéticas de *loci* modificadores, fase de desenvolvimento renal, efeitos ambientais e demandas fisiológicas como em resposta a lesão renal. Existem ainda outros mecanismos de cistogênese, mas sua relevância à doença humana permanece indeterminada.

A cascata MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) regula vários processos celulares dependentes das mudanças no perfil de expressão gênica. Um estudo recente sugere que a interação Mekk1-p53 reduza a expressão de *PKD1*, podendo contribuir para a cistogênese ⁴³. Além disso, a inativação específica renal de miR-17~92 em um modelo do camundongo de DRP retarda o crescimento cístico, melhora a função renal e prolonga a sobrevivência, demonstrando um papel patogênico para miRNAs em um modelo animal de DRP ⁴⁴. A inibição da chaperona HSP90, por fim, lentificou o crescimento cístico em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1 humana ⁴⁵.

1.5 Expansão cística na DRPAD

A consequência macroscópica da progressão da DRPAD é a formação de cistos repletos de fluido. Estudos morfológicos indicam que os cistos se desenvolvem nos néfrons e nos ductos coletores em associação com hiperplasia das células epiteliais presentes em sua parede. No nível celular, essa transformação baseia-se em duas alterações: as células devem se organizar para formar estruturas esféricas e os lúmens dessas estruturas devem ser preenchidos com o fluido de modo a promover a expansão dos cistos. Os cistos aumentam sua área de superfície fundamentalmente através do aumento do número de células que circundam o lúmen do cisto, em vez de alongar esta camada epitelial ⁴⁶. Assim, o modelo de mudança tubular para a morfologia esférica se acompanha de alterações de polarização celular planar e orientação mitótica, anormalidades observadas em modelos animais ortólogos às DRPs humanas. Tais resultados sugerem que a divisão celular orientada dita a manutenção do diâmetro tubular constante durante o alongamento tubular e que os defeitos nesse processo desencadeiam alargamento tubular renal e formação de cistos ⁴⁷. Assim, é provável que defeitos de polaridade celular planar desempenhem um papel relevante na formação de cistos, porém um estudo recente sugere que não se constitua no fator inicial de indução da cistogênese ⁴⁸.

Outro aspecto celular chave da DRPAD consiste na conversão do epitélio cístico de um fenótipo reabsortivo para um padrão secretor, de forma a promover o acúmulo intracístico de fluido. A secreção iônica para o lúmen impulsiona o movimento da água por via paracelular ou transcelular para o interior do cisto, obedecendo ao gradiente osmótico estabelecido. O componente primário desta secreção é o transporte de Cl⁻

estimulado por AMPc ⁴⁹, envolvendo a presença apical do canal de Cl⁻ CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) e a expressão basolateral do cotransportador Na-K-2Cl ⁵⁰⁻⁵². PC1 pode afetar a expressão, localização e atividade do canal de Cl⁻. De fato, sua desregulação é capaz de aumentar a expressão de CFTR na membrana plasmática, promovendo secreção elevada de Cl⁻ para dentro do lúmen do cisto ⁵³. Além disso, a disfunção do complexo policistínico favorece o acúmulo intracelular de AMPc por inibir fosfodiesterases, alteração que também contribui para o aumento da secreção transepitelial de fluido ⁵⁴.

1.6 Papel da inflamação e da fibrose na progressão da doença

Estudos realizados ao longo das últimas duas décadas demonstram que a progressão da DRPAD se associa com a expressão de proto-oncogenes, como *myc*, *ras* e *erb*; de fatores de crescimento, como EGF (*epidermal growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) e FGF (*fibroblast growth factor*); de quimiocinas, como MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) e osteopontina; de metaloproteinasas; de marcadores de apoptose; e com o aumento de colágeno tipo I e tipo IV, laminina, fibronectina, macrófagos e fibroblastos no interstício renal ⁵⁵. Tais processos, por sua vez, se intensificam com a idade e com o curso da doença renal. Um estudo clínico revelou, de fato, que pacientes com DRPAD apresentam o sistema pró-inflamatório mais ativado e o sistema anti-inflamatório menos ativo que seus respectivos controles ⁵⁶.

É interessante notar que a excreção urinária de MCP-1 encontra-se aumentada na maior parte dos pacientes com DRPAD, podendo se elevar mesmo antes de um declínio significativo da função renal ⁵⁷. Nesta linha, Okada et al mostraram que camundongos DBA/2-*pcy*, um outro modelo de DRP não ortólogo à doença humana, evoluíram com fibrose renal progressiva ⁵⁸. Li et al descreveram, ainda, conexão entre sinalização por TNF- α (*tumor necrosis factor α*) e cistogênese, onde a ativação desta via parece reduzir os níveis de policistina-2 funcional abaixo de um limiar crítico, precipitando o desenvolvimento do fenótipo celular relacionado à DRPAD ⁵⁹. TGF- β (Fator de transformação de crescimento β), por fim, apresenta expressão aumentada no epitélio cístico em rim humano DRPAD ⁶⁰.

Intervenções experimentais em modelos animais de DRP também apóiam o papel importante da inflamação e da fibrose renal sobre a evolução da doença renal

associada à DRPAD. Células inflamatórias foram observadas nos rins DRPAD frequentemente associadas à expansão cística. Além disso, o perfil de expressão gênica em rim DRPAD em DRCT mostrou um padrão relacionado à resposta imune e/ou inflamatória ⁶⁰.

Na mesma linha, o tratamento com metilprednisolona reduziu a fibrose intersticial, limitou o aumento do tamanho dos rins e preservou a função renal em ratos Han:SPRD cy/+ e camundongos DBA/FG pcy/pcy, modelos animais císticos não ortólogos às doenças humanas ⁶¹. A inibição seletiva de COX-2, por sua vez, também reduziu a inflamação, a taxa de proliferação celular e a fibrose intersticial renais, acompanhando-se de diminuição da taxa de expansão cística no rato Han:SPRD-cy, embora não tenha sido detectada mudança na função renal ⁶². Neste mesmo modelo animal mostrou-se que a administração de óleo de linhaça reduziu a fibrose renal, a infiltração por macrófagos, a proliferação epitelial e a taxa de crescimento cístico, além de ter se associado a uma creatinina sérica mais baixa ⁶³. Efeitos similares sobre a inflamação e a fibrose renal também foram obtidos neste modelo com a administração dietética de ácido linoleico conjugado ⁶⁴. Os macrófagos M2-like constituem-se em fatores atuantes na DRP, promovendo proliferação de células císticas, crescimento cístico e fibrose ⁶⁵. É importante notar que pacientes que evoluem para DRCT apresentam perda de parênquima renal não cístico, acompanhada de substituição por cistos renais preenchidos por fluido e fibrose intersticial. Nesse cenário, e diante das várias evidências experimentais mencionadas, admite-se que o desenvolvimento de inflamação intersticial, seguida de fibrose intersticial, desempenhe um papel fundamental no processo de declínio progressivo da função renal na DRPAD ⁵⁷.

1.7 Espécies reativas de oxigênio (ROS) na DRPAD

Estudos conduzidos nos últimos 13 anos sugerem que anormalidades no metabolismo redox possam participar da patogênese e afetar a evolução da DRPAD, acelerando a doença renal. As principais consequências da geração exagerada de ROS incluem apoptose, ampliação da resposta inflamatória, peroxidação lipídica e dano do DNA ⁶⁷, condição denominada “estresse oxidativo”. O estresse oxidativo, portanto, consiste em um estado de desbalanço, caracterizado por uma excessiva geração de compostos oxidantes e insuficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes. É

importante enfatizar que a relação oxidantes/antioxidantes exerce um impacto definido sobre o perfil de expressão gênica ^{68, 69}.

A cadeia respiratória mitocondrial representa a principal fonte de oxidantes no organismo, em função da fosforilação oxidativa.

A primeira substância reativa com oxigênio formada pelo organismo é o superóxido (O_2^-). A enzima NADPH-oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) reduz O_2 em O_2^- , um ânion altamente instável que é convertido pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). H_2O_2 , por sua vez, é reduzido em água e oxigênio pela enzima catalase (CAT) ou pela glutathiona peroxidase (GPX), a qual utiliza glutathiona (GSH) como doador de hidrogênio (Figura 3). Entretanto, na presença de excesso de O_2^- ou na presença de metais de transição (cobre ou ferro), H_2O_2 é convertido no radical hidroxila (OH^-), reconhecidamente o radical mais citotóxico ⁷⁰ (Figura 3).

Figura 3. Esquema ilustrativo das substâncias reativas com oxigênio

Torres et al reportaram que ratos Han:SPRD cy/+ apresentam níveis renais de glutathiona oxidada mais elevados que seus controles +/+, ao passo que os níveis de glutathiona reduzida não diferiram entre os grupos ⁷¹. A indução de depleção de glutathiona pelo tratamento com butionina sulfoximina, um inibidor específico da γ -glutamylcisteína sintetase, por sua vez, determinou um agravamento importante da doença renal cística nos ratos cy/+, traduzido por aumento do peso renal, elevação da uréia plasmática e maior lesão histológica.

É importante mencionar que a glutathione constitui-se no mais importante tiol celular, atuando como um depurador de ROS. Vale notar que a atividade da glutathione peroxidase encontra-se diminuída em pacientes portadores de DRPAD ⁷².

Em concordância com tais observações, ratos Han:SPRD-cy e camundongos cpk, este um modelo não ortólogo à doença renal policística autossômica recessiva humana, apresentam expressão aumentada do gene heme-oxigenase-1, um marcador de estresse oxidativo. Além disso, durante a progressão da doença apresentam redução da expressão gênica correspondente às enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase ⁷³. Os níveis plasmáticos e císticos de glutathione peroxidase acompanham esses achados, encontrando-se reduzidos em ambos os modelos, enquanto os produtos de peroxidação lipídica malondialdeído e 4-OH-2(E)-nonenal mostraram-se elevados nos rins e no plasma dos camundongos císticos. Seguindo esta linha conceitual, o tratamento com probucol, uma droga anti-lipidêmica e antioxidante, reduziu o tamanho renal, uréia plasmática, índice cístico e fibrose renal em camundongos BDF1-psy submetidos a dieta hiperprotéica, um modelo de DRP de progressão lenta não ortólogo à doença humana ⁷⁴. Em conjunto, tais achados sugerem que a lesão renal funcional e cística da DRPAD possa ser potencializada por ROS, efeito que parece traduzir-se em uma progressão mais rápida da doença.

Estudos realizados ao longo dos últimos 13 anos sugerem que alterações na produção endógena de óxido nítrico (NO) presentes na DRPAD contribuam para a patogênese e evolução da doença renal nesses pacientes. O NO constitui-se num radical livre com grande ação vasodilatadora, sendo sintetizado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir do substrato L-arginina. Wang et al mostraram que a expressão e a atividade de NOS diminuem com o desenvolvimento de cistos renais no rato Han:SPRD cy/+, sugerindo que a sub-regulação de NO esteja envolvida na patogênese da doença renal policística ⁷⁵. De fato, na DRPAD o relaxamento de vasos de resistência dependente do endotélio é prejudicado, mesmo na ausência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou DRCT ⁷⁶. Tal alteração coexiste com um defeito de geração de NO secundário a uma redução da atividade de NOS constitutiva (cNOS). Nesse cenário, admite-se que esta disfunção endotelial/comprometimento da atividade de cNOS possa contribuir para o desenvolvimento de HAS na DRPAD ⁷⁷.

Interessantemente, o uso de sinvastatina, um fármaco com efeitos pleiotrópicos capaz de aumentar a atividade da NOS endotelial (eNOS), melhorou apreciavelmente a disfunção endotelial na DRPAD ⁷⁸. Um estudo adicional realizado em ratos Han:SPRD císticos sugere que uma super-regulação de endotelina-1 e disfunção do sistema NO envolvendo a eNOS também possam contribuir para esse estado de vasoconstrição ⁷⁹. Vale notar que recentemente Wang et al analisaram os níveis de dimetil-arginina (ADMA), como marcador de um inibidor de NOS, e do produto de peroxidação lipídica ácido 13-OH-octadecadienóico (HODE), como marcador de estresse oxidativo, em pacientes com DRPAD em fase inicial. Tal estudo mostrou que os níveis plasmáticos de ambos se mostraram elevados nesses pacientes, caracterizando um estado associado a estresse oxidativo ⁸⁰. É fundamental observar, por fim, que estudos muito recentes vinculam PC1 e PC2 ao sistema NO. Nauli et al demonstraram que PC1 consiste em uma molécula ciliar mecanossensora em células endoteliais, modulando sinalização por Ca^{++} e síntese de NO ⁸¹. AbouAlaiwi et al, por fim, mostraram que células endoteliais de camundongo *knockout* ou *knockdown* para *Pkd2* perdem a capacidade de gerar NO ⁸².

É importante mencionar que o NO é capaz de reagir rapidamente com o oxigênio tanto na fase gasosa como em solução aquosa, formando o gás dióxido de nitrogênio. A forma indutível de NOS (iNOS), ativada por elevação do Ca^{++} intracelular, acetilcolina e bradicinina, é sintetizada na vigência de um processo inflamatório. As substâncias reativas com o oxigênio inativam o NO por meio dos superóxidos, promovendo sua deficiência e formação de produtos citotóxicos, como peroxinitrito. Este se constitui em um gatilho para a peroxidação lipídica, podendo causar danos no DNA e nitração de proteínas.

Para evitar a ação potencialmente lesiva das ROS, é essencial que se estabeleça um controle fino entre sua produção e consumo dentro das células, capaz de promover um balanço eficiente de suas concentrações intra e extracelular. Esse equilíbrio é atingido graças à atividade de substâncias antioxidantes que, removendo as espécies reativas, as mantêm em baixas concentrações ⁸³.

As substâncias antioxidantes responsáveis pela proteção contra as ROS podem ser enzimáticas (glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase), ou não enzimáticas (flavonóides, vitaminas C e E) ⁷³. O antioxidante endógeno mais ativo e importante é a glutathione na forma reduzida que, ao reagir com os radicais, forma

glutathione oxidada e água. A glutathione peroxidase atua tanto sobre peróxidos de lipídios como sobre H_2O_2 , reduzindo-os na presença de glutathione. Vale notar que a hidroxila ($OH^\cdot$) se constitui no radical mais reativo, sendo capaz de iniciar a peroxidação lipídica.

1.8 N-Acetilcisteína (NAC)

Entre os agentes exógenos com ação antioxidante, destaca-se a N-Acetilcisteína, um tiol precursor da L-cisteína e glutathione reduzida, associado a um efeito mucolítico e a propriedades antiinflamatórias⁸⁴. A NAC constitui-se, portanto, numa fonte de grupos sulfidrilos capaz de aumentar a síntese de glutathione e remover ROS, como $OH^\cdot$ e H_2O_2 , e, conseqüentemente, reduzir a disfunção endotelial, inflamação e fibrose⁸⁷. Este agente também apresenta uma ação anti-apoptótica. Em ratos submetidos a IR, mostrou-se que o tratamento com NAC se acompanhou de um menor comprometimento da função renal e reduziu a inflamação intersticial, além de se associar a um aumento dos níveis de glutathione renal e a uma redução da concentração plasmática de ascorbilo⁸⁸; e atenuou a necrose em túbulo proximal, melhorou a microcirculação por promover vasodilatação e melhorou a hipoperfusão medular⁸⁹. Shimizu et al, por fim, relataram que a administração de NAC atenuou a progressão da doença renal crônica em ratos submetidos à nefrectomia 5/6, efeito que se acompanhou de uma redução dos níveis plasmáticos de aldosterona e níveis mais baixos de TBARS⁹⁰.

Outros investigadores mostraram, ainda, que NAC reduz a síntese glomerular de NO_2 e a expressão de gênica de iNOS em modelo de glomerulonefrite em ratos⁹¹. Este efeito se traduz na diminuição do infiltrado de neutrófilos, macrófagos e mesangiolise, atenuando a lesão renal. Em apoio a tais achados, a administração de NAC se seguiu de um efeito protetor contra a lesão renal induzida por obstrução ureteral bilateral em ratos⁹². O pré-tratamento com NAC foi eficaz na redução da incidência e da gravidade da lesão renal aguda, assim como no aumento da sobrevivência. Em modelo de camundongo *knockout* para *Nrf2*, fator de transcrição redox-sensível capaz de regular a expressão vários genes antioxidantes e citoprotetores, o tratamento com NAC ou glutathione melhorou a função renal⁹³. A NAC também se associa a potenciais efeitos protetores do miocárdio^{94, 95}. Em modelo porcino de IAM, este agente antioxidante reduziu a

reatividade plaquetária e houve uma tendência de melhora na função cardíaca em 24 h, porém não houve diferença no tamanho da área de infarto ⁹⁶.

A inflamação e o estresse oxidativo estão presentes na DRPAD mesmo na vigência de função renal preservada. Nesta doença, a inflamação exibe uma relação graduada com os níveis da função renal, enquanto que o estresse oxidativo demonstra um efeito limiar. Essas vias, portanto, podem ser alvos terapêuticos para mitigar o risco na doença cardiovascular ⁹⁷. O tratamento com NAC repõe a glutathione cardíaca e, embora sem efeito sobre a pressão arterial, reduz a disfunção e o remodelamento do ventrículo esquerdo em um modelo de hipertensão em rato, normalizando o nível sérico de TNF- α e restringindo o depósito de colágeno no ventrículo esquerdo ⁹⁸. Vale atentar, por fim, que o tratamento com NAC interrompeu o ciclo vicioso TNF- α /TNF-R1/esfingomielinase após IAM em ratos ⁹⁹, enquanto suplementação com esse agente preveniu a hipertrofia ventricular em camundongos sujeitos a constrição aórtica ¹⁰⁰.

1.9 Hipótese

Face aos resultados e evidências apresentados, formulamos a hipótese de que a administração de NAC por longo prazo pudesse influenciar positivamente a evolução da doença renal e cardíaca em modelos animais ortólogo à DRPAD humana e em pacientes com DRPAD, lentificando sua progressão. Para testar esta hipótese, decidimos conduzir este estudo em um modelo animal de DRP ortólogo à forma de DRPAD mais frequente em seres humanos, a DRPAD tipo 1. Este animal foi manipulado geneticamente de forma a apresentar mutações inativadoras somáticas em ambos os alelos *Pkd1* em uma fração minoritária de células tubulares renais (*Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}) ¹⁰¹. Este modelo reproduz fenotipicamente a doença renal cística humana, caracterizando-se pela formação de cistos renais difusos decorrentes de mutações em ambas as cópias do gene numa dada célula. Tais animais constituem-se, portanto, num excelente modelo de avaliação de nossa hipótese, uma vez que permitem analisar questões associadas à cistogênese e à expansão cística. Entretanto, o momento de inativação gênica, a frequência de inativação somática do mesmo, o *background* genético, a concomitância com outros insultos renais potenciais e variações biológicas específicas moleculares e celulares podem interferir no curso temporal e quantitativo da doença renal.

Felizmente o modelo escolhido nos permitiu e permitirá controlar vários desses parâmetros, porém não nos permite uma homogeneidade temporal e quantitativa de inativação gênica, uma vez que o perfil de expressão de Cre recombinase não é completamente homogêneo entre os animais. Além disso, é difícil prever o momento ideal (ou capaz) de interferir no metabolismo redox de forma a alterar a evolução da doença renal cística. Nesse cenário, trabalhamos com quatro janelas terapêuticas potenciais para a administração de NAC. Tais períodos compreenderam grupos de animais tratados com NAC a partir dos seguintes momentos da vida: a) desde sua concepção; b) desde o nascimento; c) desde desmame (três semanas); e d) oito semanas de idade. A comprovação em camundongos de que NAC passa através da placenta nos permitiu conduzir o grupo experimental correspondente à primeira janela proposta,¹⁰². O fato de NAC passar através da placenta nos levou a postular que também poderia passar para o leite materno. Esta consideração nos levou a constituir um grupo de animais submetidos a aleitamento de mães que recebiam NAC, portanto provavelmente tratados com este agente antioxidante.

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste estudo foi analisar e caracterizar o efeito do agente antioxidante N-acetilcisteína sobre a progressão da doença renal e das alterações cardíacas associadas à doença renal policística autossômica dominante, utilizando camundongos machos *Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}*. Este modelo é ortólogo à DRPAD e reproduz o fenótipo cístico renal humano. Os efeitos da NAC foram avaliados em animais císticos tratados por diferentes períodos de vida, assim como em camundongos controles não-císticos tratados e não tratados com NAC. Para tanto, os objetivos específicos deste estudo compreenderam:

1. Análise de parâmetros renais funcionais nos grupos de camundongos císticos tratados com NAC desde a concepção (Ci-NAC-Conc), desde o nascimento (Ci-NAC-Nasc), desde o desmame (Ci-NAC-Desm) e a partir de oito semanas (sem) de idade (Ci-NAC-Adult); camundongos císticos controle não tratados com NAC (Ci-Co); animais não císticos tratados com NAC desde a concepção (NC-NAC-Conc) e animais não císticos controle não tratados com NAC (NC-Co), nos tempos de seguimento de 10, 15 e 21 sem.
2. Análise de alterações morfológicas, proliferação celular, apoptose e fibrose intersticial em rins de camundongos Ci-NAC-Conc e Ci-Co, NC-NAC-Conc e NC-Co de 22 semanas de idade.
3. Análise de fibrose em corações de camundongos Ci-NAC-Conc e Ci-Co, NC-NAC-Conc e NC-Co de 22 semanas de idade.
4. Análises do metabolismo redox e ultrassonográfica de rins de camundongos Ci-NAC-Conc e Ci-Co de 22 semanas de idade.
5. Análise da excreção urinária de óxido nítrico em camundongos Ci-Co, Ci-NAC-Conc, Ci-NAC-Nasc, Ci-NAC-Desm e Ci-NAC-Adult de 21 semanas de idade.
6. Análise ecocardiográfica de corações de camundongos Ci-NAC-Conc, Ci-Co, NC-NAC-Conc e NC-Co de 22 semanas de idade.

7. Análise de sobrevivência nos grupos de camundongos Ci-Co, Ci-NAC-Conc, Ci-NAC-Nasc, Ci-NAC-Desm, Ci-NAC-Adult, NC-Co e NC-NAC-Conc.
8. Análises de peso corpóreo e dos pesos renal, hepático e cardíaco nos camundongos Ci-Co, Ci-NAC-Conc, Ci-NAC-Nasc, Ci-NAC-Desm, Ci-NAC-Adult, NC-Co e NC-NAC-Conc de 22 semanas de idade.

3. MÉTODOS

3.1 Modelo animal e genotipagem

Os procedimentos experimentais deste projeto foram realizados em concordância com as normas de cuidados e uso de animais de laboratório, com aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CAPpesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Brasil (058/10).

O modelo de camundongo com alelo *floxed* do gene *Pkd1* (*Pkd1^{cond}*) que foram utilizados em nosso trabalho foi gerado por Piontek et al, na *Johns Hopkins University School of Medicine*¹⁰³. Este alelo se baseou numa construção que apresentava uma inserção de um cassete de neomicina flanqueado por sítios FRT (*Flippase Recognition Target*) no íntron 1 e inserção de sítios lox P nos íntrons 1 e 4. Os sítios lox P podem ser induzidos a recombinar via Cre recombinase, de forma a produzir um novo alelo, *Pkd1^{del2-4}*, um alelo inativo. Em camundongos TgN(balancer2)3Cgn, a expressão de Cre recombinase é controlada pelo promotor do gene de rato nestina (*Nes*) e por seqüências *enhancer* localizadas no segundo íntron¹⁰⁴. Este promotor resulta em inativação em mosaico do alelo *floxed* por todo o organismo. A linhagem *Pkd1^{cond}* foi cruzada com a linhagem balancer Cre de forma a produzir animais com um fenótipo renal que mimetiza a doença humana (*Pkd1^{cond/cond}·Nestin^{cre}*). Esse processo gerou um alelo que é funcionalmente normal no estado de não deleção e um alelo nulo após deleção mediada por Cre. O passo inicial do processo de genotipagem consiste na extração de DNA a partir de amostras de cauda, a depender das condições experimentais. Segue-se, então, um protocolo de duas etapas. Na primeira, identifica-se a presença ou a ausência de Cre recombinase, enquanto na segunda verifica-se se o alelo *Pkd1^{cond}* encontra-se presente, em homozigose ou heterozigose. Na primeira reação utilizamos dois *primers* específicos para o gene codificador da Cre recombinase: CreF (5'-ATTGCTGTCACTTGGTCGTGGC-3') e CreR (5'-GGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC-3'). A segunda reação, por sua vez, envolve o emprego dos seguintes *primers*: F4 (5'-CCTGCCTTGCTCTACTTTCC-3') e R5 (5'-AGGGCTTTTCTTGCTGGTCT-3'). A reação de PCR foi desenhada para um volume final de 25 µL, incluindo tampão específico, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 µM, *primers* numa concentração de 0,4 µM cada, Taq DNA polimerase 1,25 unidades/reação, água deionizada estéril e DNA

genômico 300 ng/reação. O programa utilizado no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 para a primeira reação compreende um ciclo simples inicial de 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 20 s, 59,5°C por 35 s e 72°C por 35 s; e uma extensão final de 72°C por 10 min. Na segunda reação o programa utilizado inclui um ciclo simples inicial de 94°C por 30 s; 35 ciclos de 94°C por 20 s, 55°C por 25 s e 72°C por 30 s; e uma extensão final de 72°C por 7 min. Na primeira reação a identificação de um produto de 200 pb indica a presença do gene Cre recombinase, enquanto a ausência dessa banda indica que o animal não contém esse transgene (Figura 4). Na segunda reação, por sua vez, o alelo *Pkd1*^{cond} é identificado por um produto de 250 pb enquanto o alelo selvagem associa-se um produto de 180 pb (Figura 4). Dessa forma, a presença de uma única banda de 250 pb identifica um animal de genótipo *Pkd1*^{cond/cond}, a presença de uma única banda de 180 pb define um animal *Pkd1*^{+/+} e a presença de ambas as bandas, de 180 e 250 pb, estabelece o genótipo do animal *Pkd1*^{cond/+}. Os animais utilizados neste trabalho, portanto, referentes a este modelo, foram *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre}, que na primeira PCR apresentaram um produto de 200 pb, indicando a presença do gene Cre recombinase, e na segunda reação uma banda de 250 pb. Estes camundongos desenvolveram um fenótipo cístico renal similar ao da DRPAD humana. Seus respectivos controles (*Pkd1*^{cond/cond}), sem o fenótipo cístico renal, apresentaram uma banda de 250 pb na segunda PCR, porém ausência de produto na primeira reação

Figura 4. Genotipagem de camundongos para a presença do alelo condicional (A) e para a presença de Cre-recombinase (B). A) Os animais F8, F10, M1 e M2 apresentam o genótipo *Pkd1*^{cond/+}, ao passo que F5, F6, F7, F9, F11, F12, M3, M4, M5 e M6 apresentam *Pkd1*^{cond/cond}; CN representa o controle negativo; M é o marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb). B) Os animais F5, F7, F9, F11, M1, M3, M5 e M6 apresentam o genótipo *Pkd1:Nestin*^{cre}, enquanto F6, F8, F10, F12, M2 e M4 não apresentam a presença deste transgene; CN representa o controle negativo; M é o marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb). Genótipos finais: M1 - *Pkd1*^{cond/+}:*Nestin*^{cre}; F6, F12 e M4 - *Pkd1*^{cond/cond}; F5, F7, F9, F11, M5 e M6 - *Pkd1*^{cond/cond}:*Nestin*^{cre} e F8, F10 e M2 - *Pkd1*^{cond/+}

3.2 Grupos experimentais Grupos experimentais (Figura 5)

Os grupos experimentais foram assim constituídos (Figura 5):

Grupos controle não tratados

1. $PkdI^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$ (Cístico; Ci-Co): n= 23
2. $PkdI^{\text{cond/cond}}$ (Não cístico; NC-Co): n= 12

Grupos tratados com NAC desde a concepção

3. $PkdI^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$ (Cístico; Ci-NAC-Conc): n= 16
4. $PkdI^{\text{cond/cond}}$ (Não-cístico; NC-NAC-Conc): n= 11

Grupo tratado com NAC desde o nascimento

5. $PkdI^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$ (Cístico; Ci-NAC-Nasc): n= 10

Grupo tratado com NAC desde o desmame (3 semanas)

6. $PkdI^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$ (Cístico; Ci-NAC-Desm): n= 16

Grupo tratado com NAC a partir de 8 semanas de idade

7. $PkdI^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$ (Cístico; Ci-NAC-Adult): n= 16

Grupo controle adicional manipulado somente com 22 semanas (utilizado apenas para confirmação dos pesos dos órgãos)

8. $PkdI^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$ (Cístico; Ci-Co): n= 15

Figura 5. Organograma dos grupos experimentais utilizados

3.3 Administração de NAC

Os camundongos foram alojados em gaiolas de plástico e mantidos em ambiente controlado a ~22 °C, 50-60% de umidade relativa e ciclo claro/escuro de 12 h, com ração padrão e água potável ou solução de NAC *ad libitum*, durante todo o período experimental. Nos grupos Ci-NAC-Conc, NC-NAC-Conc e Ci-NAC-Nasc, NAC foi inicialmente administrada por via oral para a mãe na concentração de 12 mg/mL até o desmame dos filhotes (3 sem); após esse período, a NAC foi diretamente administrada na água de beber na concentração de 10 mg/mL. Nos grupos Ci-NAC-Desm e Ci-NAC-Adult, NAC foi administrada na água de beber na concentração de 10 mg/mL durante todo o período experimental. Ao completarem 22 sem de idade, os animais foram eutanasiados sob anestesia com tiopental (80 µg/g de peso corporal) e os rins, fígado e coração coletados para análises posteriores.

3.4 Desenho experimental

Os sete grupos experimentais foram submetidos a análises bioquímicas voltadas à função renal nas idades de 10, 15 e 21 sem. Tais análises incluíram determinações das concentrações séricas de uréia (S_U), creatinina (S_{Cr}), Na^+ (S_{Na}) e K^+ (S_K), das frações de excreção de Na^+ (FE_{Na}) e K^+ (FE_K), e da osmolalidade urinária máxima (U_{OSMMax}). Análises de sobrevivência também foram realizadas nos sete grupos experimentais. Nestes grupos, foram ainda conduzidas avaliação dos pesos corpóreos e análise macroscópica e dos pesos dos rins, do fígado e do coração na idade de 22 sem.

Camundongos Ci-Co, Ci-NAC-Conc, NC-Co e NC-NAC-Conc foram estudados quanto às taxas de proliferação e apoptose e à área de fibrose intersticial em rins de 22 sem, e à área de fibrose cardíaca em corações de 22 sem. Esses quatro grupos também foram submetidos a análise ecocardiográfica na idade de 22 sem, para avaliação de função cardíaca. Os cinco grupos tratados com NAC foram analisados quanto à excreção urinária de óxido nítrico (NO) na idade de 21 sem.

Os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc, por fim, foram submetidos às seguintes análises suplementares: 1) ultrassonografia renal na idade de 22 sem, para avaliação do número de cistos, índice cístico e volume renal; 2) quantificação dos níveis renais de glutathiona e TBARS na idade de 22 sem, para análise do metabolismo redox. 3) Aferição da Pressão Arterial.Média (PAM).

3.5 Determinações bioquímicas

Os animais foram submetidos a coleta de sangue por acesso retroocular. Após coagulação, as amostras foram centrifugadas de modo a obter o soro. A mensuração da S_U foi realizada pelo método de Crocker modificado (Celm, Brasil) e a S_{Cr} e a creatinina urinária (U_{Cr}) foram determinadas pelo método quantitativo colorimétrico (Labtest, Brasil).

As mensurações da S_{Na} e S_K foram realizadas em espectrofotômetro de chama, modelo FC280 (Celm, Brasil). As determinações das concentrações urinárias de Na^+ (U_{Na}) e K^+ (U_K) foram realizadas utilizando a mesma metodologia. As frações de excreção de Na^+ (FE_{Na}) e de K^+ (FE_K) foram obtidas a partir das seguintes equações: $FE_{Na} = (U_{Na} \times S_{Cr}) / (S_{Na} \times U_{Cr}) \times 100$ e $FE_K = (U_K \times S_{Cr}) / (S_K \times U_{Cr}) \times 100$.

A capacidade de concentração renal foi determinada através da osmolalidade urinária máxima (U_{OSMMax}). Inicialmente os animais foram pesados e, em seguida, mantidos em jejum hídrico e alimentar por 24 h em gaiolas metabólicas, em seguida os animais foram mantidos com acesso apenas à ração por mais 8 h. Imediatamente após esse período, os animais receberam desmopressina (DDAVp) por via subcutânea na dose de $1\mu g/kg$ de peso corpóreo (PC) e, logo após, devolvidos à gaiola metabólica. Após 10 h, os camundongos foram pesados e a urina coletada, aferindo-se subsequentemente o volume urinário e a U_{OSMMax} por meio de um osmômetro por pressão de vapor *Vapro 5500* (Wescor, Logan, UT).

A determinação de excreção urinária do óxido nítrico (NO) foi realizada somente nos animais císticos através do método de quimioluminescência, usando um analisador de NO (NOA280; Stevers Instruments, Boulder, CO). As concentrações encontradas foram normalizadas para a respectiva excreção urinária de creatinina.

O fluxograma do estudo encontra-se representado na Figura 6.

Figura 6. Fluxograma do estudo

3.6 Determinação de concentração renal de glutathiona

Após sua remoção, o tecido renal foi lavado repetidamente com solução de fosfato de potássio 100 mM gelada, pH 7,0. O tecido foi pesado, macerado e submetido a *blot* em papel de filtro. Em seguida, adicionou-se ácido 5-sulfosalicílico dihidratado 5% na proporção de 250 μ L/10 mg de tecido, o papel de filtro foi removido e a amostra homogeneizada. O homogenato foi centrifugado a 16.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante clarificado foi separado e mantido em gelo. A quantificação da glutathiona foi determinada por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (*Glutathione Fluorescent Detection kit*; Arbor Assays, Michigan, USA).

3.7 Determinação de concentração renal das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Após sua remoção, o tecido renal foi lavado repetidamente com solução 20mM de fosfato de potássio 20 mM gelada, pH 7,4. O tecido foi pesado, homogeneizado e separado para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Para cada 1 mL de homogenato, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17,5%, seguido da adição de 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6%, pH 2,0. As amostras foram incubadas a 100 °C por 15 min e imediatamente mantidas em gelo. Por fim, adicionou-se 1 mL de

TCA 70% à mistura. As amostras foram então incubadas a temperatura ambiente por 20 min e centrifugadas a 400 g por 15 min. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 534 nm. A quantificação dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar equivalente ao de malondialdeído (MDA-equivalente; $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), empregado para o complexo malondialdeído/ácido tiobarbitúrico, e normalizada para o conteúdo de proteína ¹⁰⁵.

3.8 Aferição Direta da Pressão Arterial Média (PAM)

Os animais foram anestesiados com isoflurano 1,5% e submetidos a procedimento cirúrgico para a inserção catéteres de 4,0 cm de comprimento, 0,4 mm de diâmetro externo e 0,25 mm de diâmetro interno (Micro-Renathane, Braintree Science Inc, USA) na artéria carótida direita, com a finalidade de registrar a PAM. Antes de serem implantados, os catéteres foram preenchidos com solução de NaCl 0,9% heparinizada (50 UI/mL) e ocluídos com pinos de metal. Os catéteres foram exteriorizados na nuca dos animais com auxílio de um trocáter. As incisões foram suturadas e o catéter foi acoplado a um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA) para aferição da pressão arterial média (PAM) em mmHg. A aferição da PAM foi realizada 24 h após a cirurgia, para que os animais se recuperassem e voltassem a seu estado basal. Em seguida os animais foram eutanasiados.

3.9 Análise morfológica

Ao final do período experimental, os órgãos foram removidos, pesados, avaliados macroscopicamente e preparados para análises histológicas e imunohistoquímicas. Assim, os animais foram anestesiados com pentobarbital 80 µg/g PC, administrado por via IP e submetidos a toracotomia, seguida da inserção de uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Minipuls3, Gilson, Middletown, USA) no ventrículo esquerdo e de um corte no átrio direito para drenar o sangue. Dessa forma, os órgãos foram perfundidos com solução salina 2,5 mL/min até a sangria completa, seguido da perfusão com formalina de Millonig, modificada por Carlson ¹⁰⁶. Amostras

de tecido renal esquerdo, cardíaco e hepático foram preparadas para histologia, com fixação em formaldeído 4%, desidratação em uma série graduada de etanol, inclusão em parafina e corte em secções de 3 µm de espessura para, em seguida, serem coradas com hematoxilina-eosina (HE) e *Sirius red*.

3.10 Análise ultrassonográfica renal

A análise ultrassonográfica renal foi realizada pelo aparelho Vevo 2100®, da empresa Visual Sonics®, com transdutor de 40 mHz, em animais com 22 sem (Figura 7). O animal foi previamente anestesiado com isoflurano e colocado em decúbito dorsal em placa aquecida a 40 °C, com a extremidade cranial inserida na extremidade de um tubo com aporte contínuo de isoflurano. As patas foram fixadas em eletrodos para a monitorização da frequência cardíaca durante o procedimento (Figura 7). O ajuste da anestesia foi feito com base na frequência cardíaca, com alvo em torno de 350 batimentos por minuto (bpm). Já em estado de analgesia, o animal foi submetido a tricotomia na região dorsal, seguido da aplicação de gel de contato para a aquisição das imagens ultrassonográficas (Figura 7). A partir dessa etapa, imagens bidimensionais foram adquiridas em cada rim e as medidas dos três eixos foram calculadas - comprimento, largura e altura renais - permitindo o cálculo de volume renal. Em seguida, realizou-se em cada rim uma varredura, onde 100 imagens foram adquiridas em corte axial em períodos de 3 s, iniciando-se imediatamente antes do pólo renal superior e terminando imediatamente após o pólo renal inferior. Essas imagens foram utilizadas para o cálculo do número de cistos de cada rim, tal como para a medida do diâmetro cístico. Após o procedimento, o fluxo de isoflurano foi interrompido, permitindo ao animal o despertar com oxigênio. Após recuperação anestésica, o animal foi transferido de volta à gaiola e o procedimento foi encerrado.

A análise das imagens ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, calculou-se o volume renal utilizando a fórmula de volume elipsoide¹⁰⁷ a partir das medidas dos três eixos renais. Na segunda etapa, cada cisto detectável pelo *scan* teve seu diâmetro medido em software do próprio US Vevo 2100®. A partir desse diâmetro, o volume de cada cisto foi calculado, assumindo-se configuração esférica para os mesmos. A partir desses valores, obtivemos o índice cístico renal (ICR), que conceitualmente é a razão

entre a soma dos volumes de todos os cistos de um rim e o volume total do mesmo órgão (referida em percentagem).

Figura 7. Análise ultrassonográfica renal. (A) câmara fechada, ventilada com mistura titulável de oxigênio e isoflurano. (B) O animal está em decúbito dorsal na placa aquecida a 40° C, as patas estão fixadas em eletrodos para a medida da frequência cardíaca e em seguida é feita a tricotomia. (C) Aplicação de gel para a aquisição das imagens ultrassonográficas através do transdutor de 40 mHz. (D) Aquisição das imagens bidimensionais dos rins

3.11 Análise de ecocardiograma

O estudo ecocardiográfico foi realizado no mesmo aparelho utilizado para a ultrassonografia renal (Vevo 2100®, Visual Sonics®, transdutor de 40 mHz) e seguiu os mesmos procedimentos básicos já descritos (Figura 7). No entanto, a posição do animal na placa aquecida foi o decúbito dorsal e o tórax foi submetido á tricotomia. As imagens adquiridas permitiram a obtenção dos seguintes parâmetros e índices: 1) frequência cardíaca (FC); 2) índices estruturais: medida do diâmetro da aorta (Ao, em

mm), diâmetro do átrio esquerdo na diástole (AE, em mm) e massa do ventrículo esquerdo (MVE, em mg); e 3) índices de função ventricular esquerda: fração de encurtamento (FS, em %), fração de ejeção (FE, em %), tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (TRIV, em m/s), tempo de desaceleração da onda E (TD, em m/s) e relação entre as ondas E e A (E/A).⁽¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁾

A aquisição e análise das imagens ecocardiográficas foram realizadas pela Dra. Vera Maria Cury Salemi, profissional de grande experiência neste método aplicado a pequenos animais. Todo o procedimento foi realizado de modo duplo-cego.

3.12. Análise imunohistoquímica para quantificação da taxa de proliferação celular

A análise de proliferação celular foi realizada por imunohistoquímica para o marcador Ki-67. O rim esquerdo foi fixado em formalina e embebido em parafina. Após desparafinização e reidratação com uma bateria de xilol-álcool, as secções do tecido foram submersas em tampão citrato 10mM, pH 6,0 (Target Retrieval Solution, S1699, Dako, Carpinteria, EUA), previamente aquecido a 95 °C. A exposição antigênica seguiu-se por 40 min em panela a vapor. Os tecidos foram arrefecidos à temperatura ambiente, lavados em água destilada e imersos em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂ 3%). Em seguida, as lâminas foram incubadas com leite desnatado 6% em PBS (*Phosphate Buffered Saline*; 0,01 M, pH 7,4), durante 30 min a 37° C. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário anti-Ki-67 (rabbit Monoclonal, ab16667, ABCAM, Cambridge, USA) na diluição de 1/100. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS, enquanto para o controle positivo utilizamos uma secção com tecido de baço. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS durante 5 min e incubadas com o polímero EnVision + Dual Link System-HRP (Dako, Carpinteria, EUA) durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram novamente lavados com PBS e revelados com o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, EUA) 0,06% por 5 min. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris.

Para a quantificação de proliferação celular, foram contados núcleos positivos e núcleos totais em dez campos diferentes, sendo oito corticais e dois medulares em cada secção, no aumento de 400x. Os índices de proliferação celular foram expressos como a

relação entre o número de núcleos positivos para Ki-67 e o número total de núcleos observados.

3.12 Quantificação da taxa de apoptose

A análise qualitativa e quantitativa de apoptose celular foi realizada pela técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenindeoxyuridine nick-end labeling*) com o kit *ApopTag Plus Peroxidase in Situ Detection* (Chemicon, Billerica, USA). Após desparafinização e reidratação com uma bateria de xilol-álcool, as secções foram pré-tratadas com proteinase K (Dako) diluída em PBS 0,01 M durante 15 min à temperatura ambiente. Seguindo lavagens com água destilada, foi realizado bloqueio de peroxidase endógena com H₂O₂ 3% por 10 min e, a seguir, bloqueio com leite em pó desnatado 6% diluído em PBS, por 30 min a 37 °C. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com tampão de equilíbrio do kit, por no mínimo 10 s. Para marcar o DNA clivado, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C com a enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT), diluída 1:12 no tampão de reação, o qual contém nucleotídeos marcados com digoxigenina. Após esse período, as lâminas foram incubadas com o tampão de parada da reação por 10 min à temperatura ambiente. Imediatamente após, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidase por 30 min, à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram reveladas com o cromógeno DAB por aproximadamente 30 s e, a seguir, contra-coradas com hematoxilina de Harris. Utilizou-se como controle negativo secções de rim incubada sem a enzima TdT e como controle positivo secções de baço de camundongo, tecido com alto índice apoptótico.

Para a quantificação de apoptose foram contados, no aumento de 400x, núcleos positivos e núcleos totais em dez campos diferentes, sendo oito corticais e dois medulares em cada secção. Os índices de apoptose foram expressos como a relação entre o número de núcleos positivos e o número total de núcleos observados.

3.13 Análise histológica de fibrose

Cortes histológicos de rim e coração foram corados com 0,2% Sirius Red (Direct Red 80, Milwaukee, EUA) e analisadas em microscópio óptico equipado com um

polarizador de luz. O sistema consistiu em uma câmara fotográfica acoplada a um microscópio Olympus BX-51, do qual foram obtidas imagens em monitor. Em cada lâmina, seja de tecido renal ou cardíaco, foram digitalizadas aleatoriamente 20 campos com aumento de 400x. A seguir essas imagens foram processadas no *software* Image ProPlus 6.0, permitindo a quantificação do colágeno através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas, alaranjadas ou esverdeadas. O resultado final foi obtido, por fim, pela razão entre a área do conteúdo de colágeno e a área total ^{110, 111}.

3.14 Análise estatística

Os dados contínuos foram expressos como média±DP ou mediana (percentis 25-75) de acordo com distribuições normal ou não normal, respectivamente. Ao comparar dois grupos, os dados contínuos foram analisados usando o teste *t* de Student ou o teste de Mann-Whitney, conforme apropriado. Comparações entre mais de dois grupos foram realizadas utilizando Análise de Variância para amostras independentes com pós-teste de Student-Newman-Keuls, para variáveis com distribuição normal, ou o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dwass-Steel-Christchlow-Fligner, para parâmetros com distribuição não normal. Comparações entre mais de dois tempos foram realizadas usando Análise de Variância para amostras dependentes com pós-teste de Student-Newman-Keuls, para variáveis com distribuição normal, ou teste de Friedman seguido do pós-teste de Tukey, para parâmetros com distribuição não normal. ANOVA de duas vias foi aplicada em comparações envolvendo parâmetros de distribuição normal e uma abordagem dependente e independente. Comparações entre grupos envolvendo dados categóricos foram realizadas com o teste Qui-quadrado de Pearson, com os dados expressos como frequência absoluta e percentagem. A sobrevida foi analisada pelo método de Kaplan-Meier, com avaliação pelo teste de Log-Rank. A análise estatística foi realizada com o *software* SPSS 19.0 *software* (SPSS, Chicago, IL, USA). Significância foi estabelecida para valores de *p* associados a um risco $\alpha \leq 5\%$.

4. RESULTADOS

4.1 Análises das concentrações séricas de S_U , S_{Cr} e S_{Cr}/PC (peso corpóreo)

A S_U foi menor no grupo NC-NAC-Conc quando comparada com Ci-Co na idade de 10 sem [46,20 (40,51-63,92) *versus* 63,31 (56,54-70,68) mg/dL; $p < 0,01$] (**Figura 8A, Tabela 1A**). Detectamos uma S_U mais baixa em camundongos Ci-NAC-Conc que em animais Ci-Co e NC-Co nas idades de 10 sem [39,95 (35,60-53,38) *versus* 63,31 (56,54-70,68) mg/dL, $p < 0,001$; e *versus* 59,47 (52,49-67,43) mg/dL; $p < 0,01$, respectivamente). Na idade de 21 sem animais Ci-NAC-Conc apresentaram também redução da S_U em relação ao grupo Ci-Co [41,52 (32,87-59,13) *versus* 67,91 (49,89-75,86) mg/dL; $p < 0,01$]; uma tendência à redução não significativa de S_U também foi observada na idade de 15 sem (**Figuras 8A e B, Tabelas 1A e B**). Reduções significantes na S_U também foram observadas nos animais Ci-NAC-Desm no seguimento de 10 sem [45,68 (30,40-55,64) mg/dL; $p < 0,001$] e em camundongos Ci-NAC-Adult com 21 sem em comparação ao grupo Ci-Co [42,89 (38,53-48,96) mg/dL; $p < 0,05$] (**Figura 8B, Tabela 1B**). Deve-se destacar, entretanto, que a diferença na S_U entre os grupos Ci-Co e NC-Co não atingiu significância.

Camundongos Ci-NAC-Conc apresentaram S_{Cr} mais baixa comparados a animais Ci-Co apenas na idade de 15 sem [0,21 (0,17-0,26) *versus* 0,31 (0,25-0,40) mg/dL; $p < 0,05$]; mas nenhuma significância adicional para as diferenças de S_{Cr} foram observadas entre os grupos císticos tratados com NAC e seus respectivos grupos controle (**Figuras 9A e B, Tabela 2A e B**). Deve-se mencionar, ainda, que a diferença acima mencionada não é significativa quando a S_{Cr} é normalizada para o peso corpóreo (**Figuras 10A e B, Tabela 3A e B**).

Enquanto os resultados relativos à S_U sugerem um aparente efeito protetor renal da NAC, os dados de S_{Cr} sugerem que este parâmetro não apresente sensibilidade suficiente para detectar variações na taxa de filtração glomerular (TFG) no presente desenho experimental.

Figura 8 (A e B). Análises comparativas da concentração S_U nos diferentes tempos de seguimento. (A) Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. $\dagger\dagger p < 0,01$ versus NC-Co. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ versus Ci-Co.

Tabela 1. Concentrações S_U nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

S_U (mg/dL)				
semana	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	59,47 (52,49 - 67,43) (n=12)	46,20** (40,51 - 63,92) (n=11)	63,31 (56,54 - 70,68) (n=23)	39,95††*** (35,60 - 53,38) (n=16)
15	53,61 (50,25 - 64,83) (n=9)	59,47 (36,73 - 70,37) (n=9)	52,21 (46,93 - 68,10) (n=17)	39,77 (35,30 - 52,30) (n=16)
21	65,38 (42,89 - 72,57) (n=12)	45,96 (39,38 - 52,30) (n=11)	67,91 (49,89 - 75,86) (n=18)	41,52** (32,87 - 59,13) (n=16)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

††p<0,01 *versus* NC-Co;

p<0,01; *p<0,001 *versus* Ci-Co.

B

S_U (mg/dL)					
semana	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	63,31 (56,54 - 70,68) (n=23)	39,95*** (35,60 - 53,38) (n=16)	60,13 (33,86 - 69,66) (n=10)	45,68*** (30,40 - 55,64) (n=16)	53,43 (45,59 - 59,04) (n=16)
15	52,21 (46,93 - 68,10) (n=17)	39,77 (35,30 - 52,30) (n=16)	51,91 (28,04 - 59,84) (n=10)	46,08 (35,29 - 57,96) (n=15)	48,00 (39,99 - 55,92) (n=12)
21	67,91 (49,89 - 75,86) (n=18)	41,52** (32,87 - 59,13) (n=16)	42,66 (33,57 - 57,17) (n=8)	48,07 (39,68 - 59,03) (n=13)	42,89* (38,53 - 48,96) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *versus* Ci-Co.

Figura 9 (A e B). Análises comparativas das concentrações S_{Cr} nos diferentes tempos de seguimento. (A) Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Os grupos foram comparados usando teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. *p<0,05 *versus* Ci-Co

Tabela 2. Concentrações S_{Cr} nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

semana	S_{Cr} (mg/dL)			
	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	0,26 (0,22 - 0,32) (n=9)	0,25 (0,21 - 0,50) (n=11)	0,28 (0,21 - 0,35) (n=22)	0,29 (0,23 - 0,33) (n=14)
15	0,23 (0,22 - 0,30) (n=9)	0,25 (0,19 - 0,38) (n=8)	0,31 (0,25 - 0,40) (n=17)	0,21* (0,17 - 0,26) (n=14)
21	0,20 (0,18 - 0,27) (n=12)	0,29 (0,21 - 0,30) (n=11)	0,32 (0,27 - 0,34) (n=15)	0,25 (0,17 - 0,34) (n=15)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

* $p < 0,05$ versus Ci-Co.

B

semana	S_{Cr} (mg/dL)				
	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	0,28 (0,21 - 0,35) (n=22)	0,29 (0,23 - 0,33) (n=14)	0,34 (0,21 - 0,37) (n=10)	0,31 (0,22 - 0,38) (n=15)	0,28 (0,22 - 0,37) (n=16)
15	0,31 (0,25 - 0,40) (n=17)	0,21* (0,17 - 0,26) (n=14)	0,25 (0,22 - 0,29) (n=8)	0,29 (0,25 - 0,35) (n=14)	0,23 (0,18 - 0,29) (n=12)
21	0,32 (0,27 - 0,34) (n=15)	0,25 (0,17 - 0,34) (n=15)	0,21 (0,17 - 0,52) (n=8)	0,30 (0,27 - 0,37) (n=13)	0,29 (0,23 - 0,35) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

* $p < 0,05$ versus Ci-Co.

Figura 10 (A e B). Análises comparativas da S_{Cr}/PC nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Os grupos foram comparados usando teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Tabela 3. S_{Cr}/PC nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

semana	S_{Cr}/PC (mg/dL/g)			
	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	0,012 (0,010 - 0,018) (n=9)	0,014 (0,011 - 0,022) (n=11)	0,013 (0,010 - 0,018) (n=21)	0,018 (0,014 - 0,022) (n=14)
15	0,011 (0,010 - 0,012) (n=9)	0,012 (0,012 - 0,018) (n=8)	0,014 (0,011 - 0,018) (n=17)	0,012 (0,008 - 0,015) (n=14)
21	0,008 (0,007 - 0,010) (n=12)	0,011 (0,008 - 0,012) (n=11)	0,012 (0,010 - 0,014) (n=14)	0,012 (0,009 - 0,017) (n=15)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

B

semana	S_{Cr}/PC				
	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	0,013 (0,010 - 0,018) (n=21)	0,018 (0,014 - 0,022) (n=14)	0,018 (0,011 - 0,022) (n=10)	0,017 (0,012 - 0,020) (n=15)	0,017 (0,010 - 0,019) (n=16)
15	0,014 (0,011 - 0,018) (n=17)	0,012 (0,008 - 0,015) (n=14)	0,013 (0,011 - 0,015) (n=9)	0,013 (0,010 - 0,016) (n=14)	0,010 (0,008 - 0,012) (n=12)
21	0,012 (0,010 - 0,014) (n=14)	0,012 (0,009 - 0,017) (n=15)	0,010 (0,007 - 0,023) (n=8)	0,013 (0,011 - 0,016) (n=13)	0,013 (0,009 - 0,013) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

4.2 Análises das frações de excreção de sódio e de potássio

A seguir avaliamos a manipulação renal de sódio (Na^+) e potássio (K^+). A fração de excreção de Na^+ (FE_{Na}) não diferiu entre animais císticos tratados com NAC e não tratados para todos os protocolos de tratamento e em todas as idades analisadas (**Figuras 11A e B e Tabelas 4A e B**).

A análise de FE_{K} não revelou diferença entre os grupos NC-Co, NC-NAC-Conc e Ci-Co nas idades de 10 e 15 sem (**Figuras 12A e B, Tabelas 5A e B**). Todavia, observamos uma redução da FE_{K} no grupo Ci-NAC-Conc em comparação ao grupo Ci-Co [15,25 (8,90-19,08) *versus* 20,81 (15,77-23,88) %; $p < 0,05$) na idade de 21 sem. Também não detectamos diferenças de FE_{K} entre camundongos císticos tratados com NAC e não tratados nos seguimentos de 10 e 15 sem (**Figura 11B e Tabela 5B**). Na idade de 21 sem, contudo, verificamos diminuição deste parâmetro no grupo Ci-NAC-Adult em relação aos grupos Ci-Co e Ci-NAC-Desm [8,67 (6,71–13,05) *versus* 20,81 (15,77–23,88), $p < 0,01$; e 18,82 (13,48–23,86) %, $p < 0,05$; respectivamente).

Figura 11 (A e B). Análises comparativas da FE_{Na} nos diferentes tempos de seguimento. (A) Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e (B) grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Tabela 4. Fração de excreção de Na^+ (FE_{Na}) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

semana	FE_{Na} (%)			
	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	0,27 (0,24 - 0,32) (n=9)	0,37 (0,12 - 0,63) (n=11)	0,38 (0,21 - 0,48) (n=22)	0,33 (0,22 - 0,54) (n=14)
15	0,26 (0,23 - 0,40) (n=9)	0,42 (0,19 - 0,65) (n=8)	0,43 (0,22 - 0,62) (n=17)	0,31 (0,19 - 0,56) (n=14)
21	0,25 (0,18 - 0,31) (n=11)	0,38 (0,34 - 0,46) (n=11)	0,32 (0,25 - 0,46) (n=14)	0,37 (0,24 - 0,67) (n=15)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

B

semana	FE_{Na} (%)				
	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	0,38 (0,21 - 0,48) (n=22)	0,33 (0,22 - 0,54) (n=14)	0,48 (0,28 - 0,64) (n=10)	0,34 (0,15 - 0,61) (n=15)	0,33 (0,23 - 0,63) (n=16)
15	0,43 (0,22 - 0,62) (n=17)	0,31 (0,19 - 0,56) (n=14)	0,28 (0,14 - 0,35) (n=9)	0,30 (0,13 - 0,42) (n=14)	0,25 (0,19 - 0,28) (n=12)
21	0,32 (0,25 - 0,46) (n=14)	0,37 (0,24 - 0,67) (n=15)	0,24 (0,15 - 0,74) (n=8)	0,37 (0,29 - 0,48) (n=13)	0,30 (0,21 - 0,42) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 12 (A e B). Análises comparativas da fração de excreção sérica de K^+ (FE_K) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ** $p < 0,01$ versus Ci-Co; ^c $p < 0,05$ versus Ci-NAC-Desm.

Tabela 5. Fração de excreção de K^+ (FE_K) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

semana	FE_K (%)			
	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	16,90 (14,13 - 20,65) (n=9)	20,10 (7,84 - 31,27) (n=11)	19,62 (13,29 - 28,05) (n=22)	16,66 (12,56 - 17,95) (n=14)
15	15,00 (9,98 - 24,01) (n=9)	15,98 (9,51 - 24,06) (n=8)	21,28 (11,48 - 29,10) (n=17)	10,75 (8,15 - 20,02) (n=14)
21	16,89 (10,20 - 24,52) (n=10)	17,17 (14,24 - 22,81) (n=11)	20,81 (15,77 - 23,88) (n=14)	15,25* (8,90 - 19,08) (n=15)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ versus Ci-Co.

B

semana	FE_K (%)				
	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	19,62 (13,29 - 28,05) (n=22)	16,66 (12,56 - 17,95) (n=14)	18,97 (9,74 - 27,82) (n=10)	16,03 (11,79 - 22,23) (n=15)	18,66 (9,53 - 28,91) (n=16)
15	21,28 (11,48 - 29,10) (n=17)	10,75 (8,15 - 20,02) (n=14)	16,43 (14,38 - 18,58) (n=9)	13,70 (9,67 - 23,28) (n=14)	11,89 (7,42 - 16,12) (n=12)
21	20,81 (15,77 - 23,88) (n=14)	15,25 (8,90 - 19,08) (n=15)	12,67 (10,37 - 29,97) (n=8)	18,82 (13,48 - 23,86) (n=13)	8,67** ^c (6,71 - 13,05) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

** $p < 0,01$ versus Ci-Co;

^c $p < 0,05$ versus Ci-NAC-Desm.

4.3 Análises das concentrações séricas de sódio e de potássio

O sódio sérico (S_{Na}) foi maior nos grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc que no grupo NC-Co na idade de 10 semanas [140,0 (138,0-144,0), $p < 0,001$ e 140,0 (135,3-142,0), $p < 0,01$ *versus* 133,0 (130,3-134,8) mEq/L, respectivamente) (Figura 13A e Tabela 6A). Verificamos também aumento do S_{Na} na idade de 15 sem no grupo Ci-Co em relação aos não císticos NC-Co e NC-NAC-Conc [142,0 (137,5-146,0) *versus* 133,0 (130,3-134,8), $p < 0,001$; e 136,0 (135,5-137,0) mEq/L, $p < 0,05$]. Finalmente, na idade de 21 sem observamos um aumento do S_{Na} no grupo Ci-Co em relação aos grupos NC-Co e NC-NAC-Conc [141,0 (138,0-145,3) *versus* 137,0 (135,3-138,0), $p < 0,05$; e 135,0 (126,0-138,0) mEq/L; $p < 0,01$, respectivamente]. Também verificamos um aumento do S_{Na} no grupo Ci-NAC-Conc em relação ao NC-NAC [140,5 (137,3-143,5) mEq/L; $p < 0,05$] (**Figura 13A, Tabela 6A**).

Não observamos diferença no S_{Na} entre os grupos císticos tratados e não tratados nas idades de 10 e 15 sem (**Figura 13B, Tabela 6B**). Entretanto, no seguimento de 21 sem observamos um aumento do S_{Na} no grupo Ci-NAC-Nasc em relação ao Ci-NAC-Conc [147 (143-149) *versus* 141 (137-144) mEq/L, $p < 0,05$], assim como uma redução deste parâmetro no grupo Ci-NAC-Nasc quando comparado a Ci-NAC-Desm [141 (134-144) mEq/L, $p < 0,01$].

O grupo Ci-Co apresentou um elevação no K^+ sérico (S_K) em relação a NC-Co na idade de 10 sem [4,70 (4,40-5,10) *versus* 4,25 (3,93-4,48) mEq/L, $p < 0,01$], entretanto não verificamos diferença entre os grupos tratados com NAC na mesma idade avaliada. Não observamos diferença no S_K entre os grupos nas idades de 15 e 21 sem (**Figura 14A, Tabela 7A**).

A análise de K^+ sérico não revelou diferença entre os grupos tratados com NAC e seus controles não tratados nas idades de 10 e 21 sem (**Figura 14B, Tabela 7B**). Contudo, observamos uma redução do S_K no grupo Ci-NAC-Desm em comparação com Ci-Co na idade de 15 sem [4,20 (4,00-4,60) *versus* 4,70 (4,50-5,30) mEq/L; $p < 0,05$] (**Figura 14B, Tabela 7B**).

Figura 13 (A e B). O S_{Na} nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ versus NC-Co; ‡ $p < 0,05$; ‡‡ $p < 0,01$ versus NC-NAC-Conc. ^a $p < 0,05$ versus Ci-NAC-Conc. ^{bb} $p < 0,01$ versus Ci-NAC-Nasc.

Tabela 6. S_{Na} nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

S_{Na} (mEq/L)				
semana	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	133,0 (130,3 - 134,8) (n=12)	135,0 (133,5 - 142,3) (n=10)	140,0 ^{†††} (138,0 - 144,0) (n=23)	140,0 ^{††} (135,3 - 142,0) (n=16)
15	134,0 (127,0 - 137,0) (n=9)	136,0 (135,5 - 137,0) (n=9)	142,0 ^{†††‡} (137,5 - 146,0) (n=17)	140,0 (136,5 - 141,0) (n=16)
21	137,0 (135,3 - 138,0) (n=12)	135,0 (126,0 - 138,0) (n=11)	141,0 ^{†‡‡} (138,0 - 145,3) (n=18)	140,5 [‡] (137,3 - 143,5) (n=16)

ANOVA, resultado expresso em média $\pm$ DP. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

[†]p<0,05; ^{††}p<0,01; ^{†††}p<0,001 *versus* NC-Co;

[‡]p<0,05; ^{‡‡}p<0,01 *versus* NC-NAC-Conc.

B

S_{Na} (mEq/L)					
semana	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	140,0 (138,0 - 144,0) (n=23)	140,0 (135,3 - 142,0) (n=16)	139,5 (130,8 - 145,3) (n=10)	140,5 (139,0 - 141,0) (n=16)	143,0 (137,5 - 148,8) (n=16)
15	142,0 (137,5 - 146,0) (n=17)	140,0 (136,5 - 141,0) (n=16)	143,0 (141,5 - 145,3) (n=10)	140,0 (139,0 - 143,0) (n=15)	142,0 (139,3 - 146,5) (n=12)
21	141,0 (138,0 - 145,3) (n=18)	140,5 (137,3 - 143,5) (n=16)	147,0 ^a (142,5 - 149,0) (n=8)	141,0 ^{bb} (134,0 - 143,5) (n=13)	140,0 (135,8 - 144,5) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

^a p<0,05 *versus* Ci-NAC-Conc;

^{bb} p<0,01 *versus* Ci-NAC-Nasc.

Figura 14 (A e B). Análises S_K nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ** $p < 0,01$ versus Ci-Co; ^c $p < 0,05$ versus Ci-NAC-Desm.

Tabela 7. S_K nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

S_K (mEq/L)				
semana	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	4,25 (3,93 - 4,48) (n=12)	4,30 (4,10 - 4,70) (n=11)	4,70†† (4,40 - 5,10) (n=23)	4,45 (4,05 - 4,98) (n=16)
15	4,50 (4,20 - 4,70) (n=9)	4,20 (4,10 - 4,60) (n=9)	4,70 (4,50 - 5,30) (n=17)	4,90 (4,10 - 6,38) (n=16)
21	4,75 (4,55 - 5,55) (n=12)	4,70 (4,50 - 4,70) (n=11)	4,55 (4,30 - 4,90) (n=18)	5,45 (4,28 - 7,05) (n=16)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. †† $p < 0,01$ versus NC-Co

B

S_K (mEq/L)					
semana	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	4,70 (4,40 - 5,10) (n=23)	4,45 (4,05 - 4,98) (n=16)	4,35 (3,90 - 4,58) (n=10)	4,45 (4,05 - 4,70) (n=16)	4,45 (4,13 - 4,98) (n=16)
15	4,70 (4,50 - 5,30) (n=17)	4,90 (4,10 - 6,38) (n=16)	4,55 (4,25 - 4,73) (n=10)	4,20* (4,00 - 4,60) (n=15)	4,60 (3,98 - 4,88) (n=12)
21	4,55 (4,30 - 4,90) (n=18)	5,45 (4,28 - 7,05) (n=16)	4,95 (4,60 - 5,28) (n=8)	4,70 (4,20 - 4,80) (n=13)	5,00 (4,48 - 6,00) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ versus Ci-Co

Análises da osmolalidade urinária máxima ($U_{osm}Max$)

A $U_{osm}Max$ não foi estatisticamente diferente entre os grupos em todos os tempos analisados, exceto no grupo Ci-NAC-Conc em relação a NC-Co na idade de 21 sem [2693 mOsm/Kg H_2O (1736-3679) *versus* 3795 (2989–3900); $p < 0,05$] (**Figuras 15A e B, Tabelas 8A e B**).

Figura 15 (A e B). Análises comparativas da osmolalidade urinária máxima ($U_{osm}Max$) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratado com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. † $p < 0,05$ *versus* NC-Co.

Tabela 8. Osmolalidade urinária máxima ($U_{osm}Max$) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

$U_{OSM}MAX$ (mOsm/kg H_2O)				
semana	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	3850 (2980 - 4125) (n=11)	3040 (2030 - 3810) (n=9)	3280 (2895 - 3605) (n=23)	3368 (2475 - 3943) (n=16)
15	3755 (3433 - 3868) (n=9)	3708 (3409 - 3836) (n=8)	3303 (2873 - 3706) (n=18)	3763 (2494 - 4653) (n=16)
21	3795 (2989 - 3900) (n=12)	3535 (2940 - 3880) (n=11)	2939 (2485 - 3600) (n=14)	2693† (1736 - 3679) (n=16)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.. †p<0,05 *versus* NC-Co.

B

$U_{OSM}MAX$ (mOsm/kg H_2O)					
semana	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	3280 (2895 - 3605) (n=23)	3368 (2475 - 3943) (n=16)	3261 (2284 - 4160) (n=10)	3153 (2756 - 3613) (n=16)	3136 (2874 - 3823) (n=16)
15	3303 (2873 - 3706) (n=18)	3763 (2494 - 4653) (n=16)	3930 (3545 - 4290) (n=7)	3330 (2887 - 3793) (n=13)	3085 (2720 - 3559) (n=12)
21	2939 (2485 - 3600) (n=14)	2693 (1736 - 3679) (n=16)	3865 (3565 - 6100) (n=7)	3350 (2750 - 3968) (n=13)	3023 (2447 - 3146) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

4.4 Ultrassonografia renal

As análises de ultrassonografia renal foram realizadas nos grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc na idade de 21 sem (**Figuras 16A, Tabela 9**). O volume renal esquerdo (VRE) foi significativamente menor em camundongos Ci-NAC-Conc comparados a Ci-Co [286,24 mm³ (204,03-329,16) *versus* 348,84 (247,26-394,52); $p < 0,05$], mas a diferença da razão VRE/PC não foi significativa (**Figuras 16B e C, Tabela 9**). Tendências não significantes a um volume renal total (VRT) e a um volume renal direito (VRD) mais baixos também foram verificadas nos animais tratados com NAC, porém a mesma desapareceu quando esses parâmetros foram normalizados para PC.

Observamos uma redução significativa do número total de cistos renais detectáveis à ultrassonografia nos camundongos Ci-NAC-Conc comparados aos animais Ci-Co [60,5 (47,3-68,3) *versus* 75,0 (65,0-113,5); $p < 0,05$] (**Figuras 16D, Tabela 9**). Uma tendência não significativa de um menor número de cistos em rim esquerdo foi observada no grupo Ci-NAC-Conc. O índice cístico de rim direito também foi menor em camundongos císticos tratados com NAC que em seus controles císticos não tratados [11,07 % (8,38-12,62) *versus* 12,67 % (11,47-19,19), $p < 0,05$] (**Figuras 15E, e Tabela 9**). Embora o índice cístico total no grupo Ci-NAC-Conc tenha sido mais baixo que nos camundongos Ci-Co, as diferenças entre os dois grupos não atingiram significância.

Figura 16 (A, B, C, D e E). Análise de ultrassonográfica renal de camundongos *Pkd1^{cond/cond}:Nestin^{cre}*, grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc. (A) Imagem da ultrassonografia renal, (a) Ci-Co e (b) Ci-NAC-Conc. Volume renal (B), Volume renal/PC (C), Número de cistos (D) e Índice císticos (E). Teste de Mann Whitney, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste *t* de student não pareado, com resultados expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus Ci-Co.

Tabela 9. Análise comparativa de ultrassonográfica renal em camundongos *Pkd1^{cond/cond}-Nestin^{cre}*, entre os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc

Ultrassonografia Renal	Rim total		Rim direito		Rim esquerdo	
	Ci-Co (n=13)	Ci-NAC-Conc (n=12)	Ci-Co (n=13)	Ci-NAC-Conc (n=12)	Ci-Co (n=13)	Ci-NAC-Conc (n=12)
Volume renal (mm³)	620,02 (504,7 - 870,1)	519,90 (404,2 - 623,3)	298,22 (244,8 - 379,8)	273,46 (240,1 - 306,5)	348,84 (247,26 - 394,52)	286,24* (204,03 - 329,16)
Volume/PC (mm³/mg)	23,35 (18,85 - 29,39)	24,83 (19,74 - 27,79)	12,13 (10,14 - 14,75)	10,39 (9,31 - 14,39)	12,76 (9,10 - 15,61)	11,94 (8,90 - 14,12)
Volume cístico	59,16 (36,26 - 85,71)	38,96 (20,46 - 60,38)	28,43 (21,28 - 47,26)	19,97* (11,26 - 24,37)	25,43 (12,77 - 42,33)	19,08 (9,43 - 30,56)
Volume cístico/PC (mm³/g)	2,05 (1,32 - 2,75)	1,76 (1,00 - 2,27)	1,14 (0,75 - 1,53)	0,74 (0,55 - 0,95)	1,02 (0,45 - 1,50)	0,82 (0,40 - 1,38)
Número de cistos	75,0 (65,0 - 113,5)	60,5* (47,3 - 68,3)	40,0 (36,5 - 57,5)	31,0** (23,0 - 34,0)	35,0 (28,5 - 56,0)	28,5 (23,5 - 38,8)
Índice cístico (%)	8,59 (7,99 - 9,96)	6,31 (4,99 - 8,71)	12,67 (11,47 - 19,19)	11,07* (8,38 - 12,62)	12,90 (8,36 - 15,02)	13,70 (7,99 - 16,86)

Teste de Mann Whitney, com dados expresso em mediana e intervalo interquartil. Teste t de student não pareado, dados expressos em média $\pm$ DP.

*p<0,05, **p<0,01 vs Ci-Co

4.5 Ecocardiograma

As mensurações ecocardiográficas foram realizadas em camundongos Ci-Co, Ci-NAC-Conc, NC-Co, NC-NAC-Conc na idade de 22 semanas. Não observamos diferenças na frequência cardíaca atingida entre os grupos (**Figura 17, Tabela 10**).

A análise de função cardíaca pautou-se na avaliação de parâmetros de função sistólica e diastólica (**Figura 18 – 20, Tabela 10**). A função sistólica apresentou-se significativamente melhor no grupo Ci-NAC-Conc em relação ao Ci-Co (**Figura 19, Tabela 10**). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) mostrou-se maior no grupo Ci-NAC-Conc que no Ci-Co ($56,20 \pm 14,50\%$ *versus* $41,86 \pm 11,15\%$; $p < 0,05$) (**Figura 21 e 22, Tabela 10**). Este achado foi consistente com uma fração de encurtamento de ventrículo esquerdo (FSVE) igualmente aumentada nos animais Ci-NAC-Conc ($29,55 \pm 9,30\%$ *versus* $20,58 \pm 6,38\%$; $p < 0,05$) (**Figura 21 e 22, Tabela 10**). É importante observar, contudo, que tais parâmetros foram menores mas não significantes em camundongos Ci-Co que NC-Co, e que animais NC-NAC-Conc apresentaram uma tendência de melhora de FEVE e FSVE quando comparados ao grupo NC-Co. Esses achados revelam um efeito benéfico significativo de tratamento precoce de NAC sobre a função sistólica de camundongos císticos deficientes em *Pkd1*.

A análise dos parâmetros estruturais revelou uma tendência a menor massa ventricular esquerda (MVE) em animais Ci-NAC-Conc comparados a Ci-Co, o que não foi verificado quando este parâmetro foi normalizado para PC (**Figura 20, Tabela 10**). No entanto, a MVE corrigida foi menor nos grupos NC-NAC-Conc e Ci-NAC-Conc em relação ao NC-Co ($63,71 \pm 13,25$ mg; $p < 0,01$, e $68,54 \pm 10,55$ mg; $p < 0,05$, *versus* $90,34 \pm 18,69$ mg, respectivamente). A MVE quando normalizada pelo PC foi menor para os camundongos NC-NAC-Conc quando comparados com NC-Co ($2,38 \pm 0,68$ mg/g *versus* $3,36 \pm 0,69$ mg/g; $p < 0,01$) (**Figura 20, Tabela 10**). Esses resultados sugerem um efeito estrutural potencialmente benéfico de NAC, não relacionado à deficiência de *Pkd1*.

Não detectamos diferenças quanto ao diâmetro do átrio esquerdo (AE), ao diâmetro da aorta (Ao) e na relação entre AE/Ao, e mesmo nos valores de AE e Ao corrigidos pelo peso corpóreo (**Figuras 23 e 24, Tabela 10**).

O tempo de desaceleração mitral embora não tenha apresentado diferença entre os grupos, sua correção pela frequência cardíaca revelou uma redução de seus valores no grupo Ci-NAC-Conc em relação ao grupo NC-Co [$0,11$ ($0,09-0,12$) *versus* $0,15$

(0,12-0,20); $p < 0,05$] (**Tabela 10**). O tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (TRIV), outro parâmetro de disfunção diastólica, não apresentou diferença entre os grupos, mesmo quando corrigido pelo intervalo RR (**Tabela 10**).

Figura 17. Análises comparativas da frequência cardíaca em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados, com idade de 22 semanas. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 18. Análises comparativas do DD VE (A), do DD VE/PC (B), do VoID VE (C) e do VoID VE/PC (D) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. †p<0,05 versus NC-Co. *p<0,05 versus Ci-Co.

Figura 19. Análises comparativas do DSVE (A), do DSVE/PC (B), do VolS VE (C) e do VolS/PC (D) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. † $p < 0,05$ versus NC-Co. * $p < 0,05$ versus Ci-Co.

Figura 20. Análises comparativas da MVE (**A**) e da MVE normalizada pelo PC (**B**) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e controles não tratados com 22 semanas. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP. † $p < 0,05$ *versus* NC-Co. * $p < 0,05$ *versus* Ci-Co.

A **B**

Figura 21. Análises comparativas da FSVE (A) e da FEVE (B) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. ANOVA, com resultados expressos em média $\pm$ DP † $p < 0,05$ *versus* NC-Co. * $p < 0,05$ *versus* Ci-Co.

Figura 22. Imagens obtidas por ecocardiografia para medidas do diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo. (a) NC-Co, (b) NC-NAC-Conc, (c) Ci-Co e (d) Ci-NAC-Conc.

Figura 23. Análises comparativas da Ao (**A**), AE (**B**), AE normalizado pelo PC (**C**) e relação Ao/AE (**D**) em grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados com 22 semanas. ANOVA, com resultados expressos em média±DP. †p<0,05 *versus* NC-Co. *p<0,05 *versus* Ci-Co.

Figura 24. Imagens obtidas por ecocardiografia para medidas de Ao e AE. (a) NC-Co, (b) NC-NAC-Conc, (c) Ci-Co e (d) Ci-NAC-Conc.

Tabela 10. Análise comparativa parâmetros estruturais e funcionais obtidos por ecocardiografia em camundongos *Pkd1*^{cond/cond} e *Pkd1*^{cond/cond}; *Nestin*^{cre} na idade de 22 semanas.

Análises de Ecocardiograma				
Parâmetros	NC-Co (n=10)	NC-NAC-Conc (n=8)	Ci-Co (n=10)	Ci-NAC-Conc (n=11)
FC (bpm)	389,50 (371,00 - 419,30)	390,00 (359,00 - 429,80)	413,50 (376,50 - 463,30)	397,00 (359,00 - 464,00)
Índice morfológico				
SIVd (mm)	0,68 ± 0,09	0,58 ± 0,15	0,65 ± 0,11	0,68 ± 0,12
SIVd/PC (mm/g)	0,025 ± 0,004	0,023 ± 0,007	0,025 ± 0,004	0,030 ± 0,005
DDVE (mm)	4,24 ± 0,31	3,93 ± 0,31	4,18 ± 0,43	3,77 ± 0,31†*
DDEV/PC (mm/g)	0,158 ± 0,016	0,154 ± 0,011	0,159 ± 0,030	0,171 ± 0,022
PPVEd (mm)	0,76 ± 0,11	0,58 ± 0,11†††	0,68 ± 0,07	0,68 ± 0,07
PPVEd/PC (mm/mg)	0,029 ± 0,004	0,023 ± 0,006†††	0,026 ± 0,004	0,030 ± 0,004
VolD VE (μL)	80,92 ± 13,28	67,68 ± 12,23	78,57 ± 18,56	61,63 ± 11,72†*
VolD VE/PC (μL/g)	3,01 ± 0,52	2,65 ± 0,41	2,98 ± 0,77	2,83 ± 0,57
DSVE (mm)	3,28 ± 0,35	2,90 ± 0,34	3,22 ± 0,55	2,68 ± 0,55†*
DSVE/PC (mm/g)	0,123 ± 0,020	0,114 ± 0,012	0,124 ± 0,034	0,124 ± 0,029
VolS VE (μL)	44,09 ± 11,23	32,86 ± 9,30	43,44 ± 16,90	28,32 ± 13,63†*
VolS VE/PC (μL/g)	1,66 ± 0,53	1,29 ± 0,34	1,73 ± 0,74	1,36 ± 0,66
MVE corrigido (mg)	90,34 ± 18,69	63,71 ± 13,25††*	80,82 ± 22,43	68,54 ± 10,55†
MVE corrigido (mg)/PC	3,36 ± 0,69	2,38 ± 0,68††	3,03 ± 0,70	3,08 ± 0,28
Ao (mm)	1,55 ± 0,21	1,55 ± 0,21	1,48 ± 0,16	1,45 ± 0,163
AE (mm)	1,95 ± 0,26	1,85 ± 0,54	2,06 ± 0,60	1,67 ± 0,50
AE/PC	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,02
Relação Ao/AE	0,81 ± 0,16	0,89 ± 0,26	0,78 ± 0,26	0,92 ± 0,21
Análise de Função Sistólica				
Parâmetros	NC-Co (n=10)	NC-NAC-Conc (n=8)	Ci-Co (n=10)	Ci-NAC-Conc (n=11)
FSVE (%)	22,77 ± 4,93	26,39 ± 3,72	20,58 ± 6,38	29,55 ± 9,30*
FEVE (%)	45,80 ± 8,70	52,15 ± 6,17	41,86 ± 11,15	56,20 ± 14,50*
Análise de Função Diastólica				
Parâmetros	NC-Co (n=10)	NC-NAC-Conc (n=8)	Ci-Co (n=10)	Ci-NAC-Conc (n=11)
TD (m/s)	23,60 (19,16 - 32,91)	19,86 (18,61 - 22,92)	19,45 (17,50 - 24,79)	21,67 (18,62 - 28,75)
TD/RR	0,15 (0,12 - 0,20)	0,11 (0,10 - 0,13)	0,12 (0,10 - 0,15)	0,11† (0,09 - 0,12)
TRIV (m/s)	20,83 (20,18 - 21,95)	21,81 (18,02 - 28,75)	19,03 (17,08 - 24,24)	23,61 (18,06 - 28,06)
TRIV/RR	0,070 (0,065 - 0,075)	0,066 (0,052 - 0,091)	0,053 (0,000 - 0,068)	0,081 (0,055 - 0,098)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Muller-Dunn, com resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste de ANOVA, resultados expressos em média±DP;

†p<0,05; ††p<0,01; †††p<0,001 versus NC-Co;

‡p<0,01 versus NC-NAC-Conc;

*p<0,05 versus Ci-Co.

4.6 Análise da Pressão Arterial Média (PAM)

A aferição da PAM por método invasivo direto realizado na idade de 22 sem não apresentou diferença entre o grupo Ci-NAC-Conc em comparação ao grupo Ci-Co ($120,40 \pm 17,90$ versus $128,00 \pm 15,65$) (**Figura 25 e Tabela 11**).

Figura 25. Análise da PAM em camundongos *Pkd1^{cond/cond}; Nestin^{cre}*. Teste *t* de student não pareado, resultados expressos como média±DP.

Tabela 11. Análise comparativa entre a PAM em camundongos *Pkd1^{cond/cond}; Nestin^{cre}*

Parâmetros		PAM (mmHg)
Ci-Co	(n = 6)	120,40 ± 17,90
Ci-NAC-Conc	(n = 5)	128,00 ± 15,65

Teste *t* de student não pareado, resultados expressos como média±DP.

4.7 Análise de proliferação celular e apoptose em rins císticos e não císticos

As policistinas modulam a proliferação celular, apoptose e diferenciação celular²⁰. As taxas de proliferação celular e de apoptose encontram-se, de fato, aumentadas em rins com DRPAD⁴². Uma vez que os níveis de ROS poderiam contribuir para este padrão celular anormal e, conseqüentemente, para a aceleração da doença renal em camundongos císticos e na DRPAD humana, avaliamos estes parâmetros neste modelo animal na idade de 22 sem. Enquanto as análises imunohistoquímicas para Ki-67 revelaram uma taxa de proliferação celular mais baixa mas não significativa em rins Ci-NAC-Conc que em Ci-Co [2,31 (0,68-4,76) *versus* 4,54 células positivas/1000 células (0,23-18,11)], os camundongos císticos tratados com NAC apresentaram um valor similar ao do grupo NC-Co [2,59 células positivas /1000 células (1,26-3,79)] (**Figura 26 e 27**).

A apoptose foi analisada utilizando o procedimento de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling*). Uma taxa apoptótica mais baixa, porém não significativa, foi detectada em rins Ci-NAC-Conc comparados aos órgãos Ci-Co [3,51 células positivas/10000 (0,00-22,30) *versus* 15,33 células positivas /10000 células (5,26-97,12)]. Camundongos císticos tratados com NAC apresentaram taxas próximas às de animais NC-Co [3,51 células positivas/10000 (0,00-22,30) *versus* 1,99 células positivas /10000 células (0,91-16,38)] (**Figura 28 e 29**).

Esses resultados sugerem que o tratamento precoce com NAC possa reduzir discretamente a proliferação celular e apoptose em rins de camundongos *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre}.

Figura 26. Análises comparativas da taxa de proliferação celular entre camundongos $Pkd1^{cond/cond}$ e $Pkd1^{cond/cond}; Nestin^{cre}$. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 27. Imagem representativa da marcação para Ki-67 em rins de camundongos NC-Co (a), NC-NAC-Conc (b), Ci-Co (c) Ci-NAC-Conc (d). Aumento original de 400x.

Figura 28. Análises comparativas da taxa de apoptose entre camundongos $Pkd1^{\text{cond/cond}}$ e $Pkd1^{\text{cond/cond}};Nestin^{\text{cre}}$. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 29. Imagem representativa da marcação para TUNEL em rins de camundongos NC-Co (a), NC-NAC-Conc (b), Ci-Co (c) Ci-NAC-Conc (d). Aumento original de 400x.

4.8 Análises de fibrose em rim e coração

Uma vez que a fibrose se constitui em um componente chave da DRPAD e se admite que ROS desempenhe um papel significativo em sua progressão, também quantificamos a área de fibrose em rins e coração de camundongos de 22 sem de idade. Animais Ci-NAC-Conc desenvolveram fibrose intersticial renal consideravelmente menor que seus controles Ci-Co [2,81% (2,03-9,13) *versus* 18,78% (12,08-48,23), $p < 0,05$], valores similares aos de animais NC-Co [2,55% (1,07 - 4,39)] (**Figura 30**).

Também observamos uma área de fibrose cardíaca significativamente menor em animais Ci-NAC-Conc comparados a camundongos Ci-Co [1,46% (0,73-3,14) *versus* 4,92% (2,75-19,31), $p < 0,05$] (**Figura 31**). O valor apresentado por animais tratados com NAC, por sua vez, foi muito próximo ao detectado em camundongos NC-Co [2,94% (1,43-3,51)] (**Figura 32**).

Nossos resultados apoiam fortemente efeitos anti-fibróticos do tratamento precoce com NAC sobre os rins e coração de camundongos císticos deficientes em *Pkd1*.

Figura 30. Análises comparativas da área de fibrose renal entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond} e *Pkd1*^{cond/cond}; *Nestin*^{cre}. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil. ††††*p* < 0,01 versus NC-Co; ††††*p* < 0,001 versus NC-NAC-Conc; **p* < 0,05 versus Ci-Co.

Figura 31. Imagem representativa histológica da área de fibrose renal em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}; *Nestin*^{cre}, Ci-Co (A) e Ci-NAC-Conc (B) e em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}, NC-Co (C) e NC-NAC-Conc (D). Aumento original, 400x.

Figura 32. Análises comparativas da área de fibrose cardíaca entre camundongos $Pkd1^{cond/cond}$ e $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil. †p < 0,05 versus NC-Co; ‡‡p < 0,01 versus NC-NAC-Conc; ***p < 0,001 versus Ci-Co

Figura 33. Imagem representativa histológica da área de fibrose cardíaca em camundongos $Pkd1^{cond/cond};Nestin^{cre}$, Ci-Co (A) e Ci-NAC-Conc (B) e em camundongos $Pkd1^{cond/cond}$, NC-Co (C) e NC-NAC-Conc (D). Aumento original, 400x.

4.9 Análise de sobrevida

Todos os animais pertencentes ao grupo Ci-NAC-Conc sobreviveram pelo período de 22 semanas, apresentando sobrevida significativamente mais longa que camundongos Ci-Co ($22,00 \pm 0,00$ versus $20,11 \pm 0,66$ sem; $p=0,014$) (**Figura 34**). Tendência similar, porém não significativa, foi observada para o grupo Ci-NAC-Nasc ($21,00 \pm 0,95$ sem). Animais Ci-NAC-Desm e Ci-NAC-Adult, entretanto, não diferiram do grupo Ci-Co e apresentaram sobrevidas mais baixas que camundongos Ci-NAC-Conc ($20,75 \pm 0,70$ sem; $p=0,005$; e $20,10 \pm 0,81$ sem, $p=0,008$; respectivamente) (**Figura 34B**). Os animais não císticos NC-Co e NC-NAC-Conc sobreviveram por todo o tempo avaliado (**Figura 34A**). Estes dados apoiam um efeito protetor sistêmico da administração de NAC precocemente em vida neste modelo de camundongo cístico deficiente em *Pkd1*.

A

B

Figura 34. Curva de sobrevida acumulada para os grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Log-rank.

4.10 Análise do metabolismo redox

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na idade de 22 sem foram mais baixos em rins Ci-NAC-Conc que em órgãos Ci-Co [51,8 (37,2-70,1) *versus* 79,4 (49,4-94,6) nmol MDA/mg proteína; $p < 0,05$] (**Figura 35 A, Tabela 12**).

Os níveis renais do antioxidante glutathiona (GSH), ao contrário, foram mais altos em camundongos Ci-NAC-Conc comparados a animais Ci-Co [129,9 (78,8-236,5) *versus* 80,9 (37,0-146,9) $\mu\text{mol/mg}$ proteína; $p < 0,05$] (**Figura 35 B, Tabela 12**).

O tratamento com NAC determinou, portanto, melhora do status redox em rins císticos deficientes em *Pkd1*.

Seguindo este mesmo padrão, a excreção urinária de óxido nítrico foi maior em camundongos Ci-NAC-Nasc que em animais Ci-Co [1,39 (0,93-1,99) *versus* 0,31 (0,16-0,90) mmol/g creatinina; $p < 0,01$] (**Figura 36, Tabela 13**). Tendências similares, porém não significantes, foram observadas para os grupos Ci-NAC-Conc, Ci-NAC-Nasc e Ci-NAC-Adult.

Figura 35 (A e B). Análises comparativas de TBARS (A) e GSH (B) renal entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond}; *Nestin*^{cre}, entre os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc. Teste Mann Whitney, com dados expressos como mediana e intervalo interquartil. *p<0,05; **p<0,01 vs Ci-Co.

Tabela 12. Análises comparativas de GSH e TBARS renal entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond}: *Nestin*^{cre}, entre os grupos Ci-Co e Ci-NAC-Conc.

Parâmetros	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
GSH Total (μmol/mg proteína)	80,88 (36,96 - 146,90) (n=18)	129,90** (78,82 - 236,50) (n=18)
TBARS (nmol MDA/mg proteína)	79,41 (49,38 - 94,57) (n=16)	51,79* (37,17 - 70,06) (n=16)

Teste Mann Whitney, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

*p<0,05 versus Ci-Co.

Figura 36. Análises comparativas da excreção urinária de NO entre camundongos *Pkd1*^{cond/cond}: *Nestin*^{cre}. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, dados expressos em mediana e intervalo interquartil. **p<0,01 versus Ci-Co.

Tabela 13. Valor de EU_{NO} em camundongos *Pkd1*^{cond/cond}: *Nestin*^{cre}

EU ON (mmol/g creat)				
Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
0,31	0,69	0,95	1,39**	0,72
(0,16 - 0,90)	(0,51 - 1,60)	(0,53 - 1,54)	(0,93 - 1,99)	(0,25 - 1,27)
(n=15)	(n=22)	(n=8)	(n=12)	(n=14)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. **p<0,01 versus Ci-Co.

4.11 Análises de peso corpóreo

Os efeitos da NAC sobre o crescimento corpóreo também foram avaliados. É importante notar que camundongos Ci-NAC-Conc apresentaram peso corpóreo menor que animais Ci-Co nas três idades analisadas [16,7 g (15,3-18,3) *versus* 19,5 g (18,4-21,4) em 10 sem, $p<0,001$; 19,1 g(18,0-20,6) *versus* 23,4 g(21,5-24,5) em 15 sem, $p<0,001$; e 21,2 g(19,0-22,9) *versus* 26,5 g(24,9-27,9) em 21 sem, $p<0,001$] (**Figuras 37A e B, e Tabelas 14A e B**).

Diferenças similares foram detectadas entre os grupos Ci-NAC-Conc e NC-Co em 10 sem [*versus* 19,6 g(17,6-21,8), $p<0,001$], 15 sem [*versus* 23,8 g(20,1-24,9), $p<0,001$] e 21 sem [*versus* 26,7 g (25,4-27,9), $p<0,001$] (**Figuras 37A e Tabela 14A**).

Diferenças significantes entre os grupos Ci-NAC-Conc e NC-NAC-Conc foram também detectadas em 10 sem [*versus* 19,3 g(17,7-20,2), $p<0,01$] e 21 sem [*versus* 25,1 g(22,8-27,6), $p<0,01$], sugerindo especificidade do efeito de NAC sobre o crescimento para os camundongos císticos.

Uma tendência de efeito mais intenso do NAC sobre o PC foi observada para tratamentos iniciados mais precocemente. Diferenças de PC significantes foram detectadas, de fato, entre camundongos Ci-NAC-Conc e Ci-NAC-Desm em 10 sem [*versus* 19,3 g (17,7-20,1), $p<0,05$], 15 sem [22,1 g (21,3-23,6), $p<0,01$] e 21 sem [*versus* 25,2 (23,0-26,0) g, $p<0,05$]; e entre animais Ci-NAC-Conc e Ci-NAC-Adult em 10 sem [*versus* 19,7g (17,8-21,9), $p<0,001$], 15 sem [*versus* 23,5 g (22,0-24,4), $p<0,01$] e 21 sem (*versus* 24,9 (23,9-26,5) g, $p<0,05$] (**Figura 37B, Tabela 14B**). Nossos dados também revelaram PC significativamente diminuído no grupo Ci-NAC-Nasc comparado a Ci-Co e Ci-NAC-Adult em 15 sem [19,3 g (18,2-22,0) *versus* 23,4 g (21,5-24,5), $p<0,01$; e *versus* 23,5 g (22,0-24,4), $p<0,01$; respectivamente] e comparado a Ci-Co em 21 sem [23,4 (20,6-24,4) *versus* 26,5 (27,0-27,9) g, $p<0,01$] (**Figura 37B, Tabela 14B**). O ganho de peso percentual, entretanto, não diferiu entre todos os grupos avaliados entre 10 e 15, e entre 15 a 21 semanas (**Figura 38 A e B, Tabela 15 A e B**).

Figura 37 (A e B). Análises comparativas do peso corpóreo (PC) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ versus NC-Co. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus Ci-Co. ‡ $p < 0,05$ versus NC-NAC-Conc. ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$ versus Ci-NAC-Conc. ^b $p < 0,05$ versus Ci-NAC-Nasc.

Tabela 14. Peso corpóreo (PC) nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

PC (g)				
semana	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10	19,6 (17,6 - 21,8) (n=12)	19,3 (17,7 - 20,0) (n=11)	19,5 (18,4 - 21,4) (n=23)	16,7†††††*** (15,3 - 18,3) (n=16)
15	23,8 (20,1 - 24,9) (n=9)	22,0 (20,1 - 22,4) (n=9)	23,4 (21,5 - 24,5) (n=17)	19,1†††*** (18,0 - 20,6) (n=16)
21	26,7 (25,4 - 27,9) (n=12)	25,1 (22,8 - 27,6) (n=11)	26,5 (24,9 - 27,9) (n=18)	21,2†††††*** (19,0 - 22,9) (n=16)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

†††p<0,001 *versus* NC-Co;

††p<0,01 *versus* NC-NAC-Conc;

***p<0,001 *versus* Ci-Co.

B

PC (g)					
semana	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10	19,5 (18,4 - 21,4) (n=23)	16,7*** (15,3 - 18,3) (n=16)	18,8 (16,4 - 20,0) (n=10)	19,3 ^a (17,7 - 20,1) (n=16)	19,7 ^{aaa} (17,8 - 21,9) (n=16)
15	23,4 (21,5 - 24,5) (n=17)	19,1*** (18,0 - 20,6) (n=16)	19,3** (18,2 - 22,0) (n=10)	22,1 ^{aa} (21,3 - 23,6) (n=15)	23,5 ^{aaabb} (22,0 - 24,4) (n=12)
21	26,5 (25,0 - 27,9) (n=18)	21,2*** (19,0 - 22,9) (n=16)	23,4** (20,6 - 24,4) (n=8)	25,2 ^a (23,0 - 26,0) (n=13)	24,9 ^a (23,9 - 26,5) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

p<0,01; *p<0,001 *versus* Ci-Co;

^ap<0,05; ^{aa}p<0,01; ^{aaa}p<0,001 *versus* Ci-NAC-Conc;

^{bb}p<0,01 *versus* Ci-NAC-Nasc.

Figura 38 (A e B). Análises comparativas de ganho de peso corpóreo nos diferentes tempos de seguimento entre os grupos não cístico não tratado e tratado e entre os grupos cístico não tratado e tratado com NAC durante diferentes períodos da vida. Análises da porcentagem de ganho corpóreo. Dados expressos em mediana intervalo interquartil, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn.

Tabela 15. Ganho de peso corpóreo nos diferentes tempos de seguimento para os grupos não císticos não tratados e tratados e para os grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

Ganho de peso corporeo (%)				
Semanas	NC-Co	NC-NAC-Conc	Ci-Co	Ci-NAC-Conc
10-15	2,08 (1,82 - 3,37) (n=9)	3,00 (2,30 - 3,09) (n=9)	2,90 (2,30 - 4,90) (n=17)	2,60 (2,13 - 3,28) (n=16)
15-21	5,20 (2,93 - 6,31) (n=9)	3,21 (0,94 - 5,55) (n=9)	3,10 (1,30 - 4,41) (n=16)	2,35 (0,58 - 3,19) (n=16)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

B

Ganho de peso corporeo (%)					
Semanas	Ci-Co	Ci-NAC-Conc	Ci-NAC-Nasc	Ci-NAC-Desm	Ci-NAC-Adult
10-15	2,90 (2,30 - 4,90) (n=17)	2,60 (2,13 - 3,28) (n=16)	2,26 (1,20 - 2,83) (n=8)	3,30 (2,10 - 3,90) (n=13)	2,50 (2,00 - 3,00) (n=12)
15-21	3,10 (1,30 - 4,41) (n=16)	2,35 (0,58 - 3,19) (n=16)	2,85 (1,30 - 4,25) (n=8)	2,60 (1,70 - 3,90) (n=13)	2,00 (1,63 - 2,51) (n=10)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

4.12 Análises de pesos renal, hepático e cardíaco

Conforme esperado, o peso renal total (PRT) e a razão PRT/PC foram significativamente maiores em camundongos Ci-Co que NC-Co [0,531 g (0,484-0,700) *versus* 0,415 g (0,375-0,497), $p < 0,05$; e 0,020 g/g (0,017-0,026) *versus* 0,016 (0,015-0,017), $p < 0,01$; respectivamente] (**Figuras 39 A e B, e Tabela 16**).

Os pesos hepático (PH), a razão PH/PC, o peso cardíaco (PCa), entretanto, não diferiram entre os dois grupos. Razão. Porém a razão PCa/PC foi significativamente maior no grupo Ci-Co que NC-Co [0,007g/g(0,006-0,008) *versus* 0,006 g/g(0,006-0,007), $p < 0,05$] (**Figura 39 A e Tabela 16 A**).

A administração de NAC se acompanhou de uma tendência de PRT menor em camundongos Ci-NAC-Conc e Ci-NAC-Nasc comparados a animais Ci-Co, porém, a mesma não foi verificada para PRT/PC (**Figuras 39 A e B, e Tabela 16**). Camundongos Ci-NAC-Conc e Ci-NAC-Nasc, contudo, apresentaram PH menor que animais Ci-Co, mas as diferenças relativas a PH/PC não atingiram significância (Figuras 26 e 27, e Tabela 16). Por outro lado, todos os grupo tratados com NAC não diferiram de camundongos Ci-Co com respeito ao PCa e a PCa/PC (**Figuras 39 A e B, e Tabela 16**).

Uma vez que uma taxa de mortalidade significativa foi observada entre animais Ci-Co, constituímos um grupo Ci-Co adicional não submetido a manipulações experimentais até 22 sem, para evitar um potencial viés de exclusão de fenótipos mais graves. Alterações significativas não foram observadas usando este grupo Ci-Co nas análises. Camundongos Ci-NAC-Conc apresentaram redução de PCa; contudo, essa diferença não permaneceu significativa após normalização para o PC (**Figuras 40 A e B, e Tabela 17**).

Figura 39. Análises comparativas das razões PRT/PC, PRD/PC, PRE/PC, PH/PC e PCa/PC nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn; dados expressos em mediana e intervalo interquartil.

† $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ versus NC-Co; ‡ $p < 0,05$; ‡‡ $p < 0,01$ versus NC-NAC-Conc

Tabela 16 (A e B). Razão entre os pesos renais, hepático e cardíaco e o peso corpóreo nos diferentes tempos de seguimento. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos cístico não tratado e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

Parâmetros	Peso dos órgãos/PC (g/g)			
	NC-Co (n=12)	NC-NAC-Conc (n=10)	Ci-Co (n=18)	Ci-NAC-Conc (n=15)
PRT/PC	0,016 (0,015 - 0,017)	0,016 (0,014 - 0,018)	0,020††† (0,017 - 0,026)	0,019††† (0,018 - 0,025)
PRD/PC	0,008 (0,007 - 0,009)	0,008 (0,007 - 0,009)	0,011††† (0,009 - 0,014)	0,010†† (0,008 - 0,013)
PRE/PC	0,007 (0,007 - 0,008)	0,008 (0,008 - 0,009)	0,010† (0,008 - 0,012)	0,010† (0,008 - 0,012)
PH/PC	0,044 (0,040 - 0,048)	0,047 (0,041 - 0,054)	0,050 (0,043 - 0,056)	0,046 (0,043 - 0,051)
PCa/PC	0,006 (0,006 - 0,007)	0,006 (0,005 - 0,007)	0,007† (0,006 - 0,008)	0,008†† (0,007 - 0,009)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

†p< 0,05; ††p< 0,01 *versus* NC-Co;

‡p< 0,05; ‡‡p< 0,01 *versus* NC-NAC-Conc.

B

Parâmetros	Peso do órgão/PC (mg/g)				
	Ci-Co (n=18)	Ci-NAC-Conc (n=15)	Ci-NAC-Nasc (n=8)	Ci-NAC-Desm (n=12)	Ci-NAC-Adult (n=10)
PRT/PC	0,020 (0,017 - 0,026)	0,019 (0,018 - 0,025)	0,020 (0,018 - 0,023)	0,019 (0,018 - 0,029)	0,020 (0,018 - 0,025)
PRD/PC	0,011 (0,009 - 0,014)	0,010 (0,008 - 0,013)	0,010 (0,009 - 0,012)	0,010 (0,009 - 0,015)	0,010 (0,009 - 0,013)
PRE/PC	0,010 (0,008 - 0,012)	0,010 (0,008 - 0,012)	0,009 (0,009 - 0,011)	0,010 (0,009 - 0,014)	0,010 (0,009 - 0,012)
PH/PC	0,050 (0,043 - 0,056)	0,046 (0,043 - 0,051)	0,044 (0,041 - 0,051)	0,048 (0,043 - 0,059)	0,043 (0,038 - 0,057)
PCa/PC	0,007 (0,006 - 0,007)	0,008 (0,007 - 0,009)	0,007 (0,006 - 0,008)	0,007 (0,006 - 0,008)	0,008 (0,006 - 0,008)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

Figura 40. Análises comparativas das razões PRT/PC, PRD/PC, PRE/PC, PH/PC e PCa/PC nos diferentes tempos e no grupo adicional (Ci-Co) que foram manipulados somente com 22 semanas. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn; dados expressos em mediana e intervalo interquartil. ** $p < 0,01$ versus Ci-Co; † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ versus NC-Co; ‡ $p < 0,05$; ‡‡‡ $p < 0,001$ versus NC-NAC-Conc

Tabela 17. Pesos renais, hepático e cardíaco absolutos nos diferentes tempos de seguimento e no grupo adicional (Ci-Co) que foram manipulados somente com 22 semanas. **(A)** Grupos císticos e não císticos tratados com NAC desde a concepção e não tratados; e **(B)** grupos císticos não tratados e tratados com NAC durante diferentes períodos da vida.

A

Parâmetros	Peso dos órgãos/PC (g/g)			
	NC-Co (n=12)	NC-NAC-Conc (n=10)	Ci-Co (n=13)	Ci-NAC-Conc (n=15)
PRT/PC	0,016 (0,015 - 0,017)	0,016 (0,014 - 0,018)	0,022† (0,016 - 0,025)	0,019††‡ (0,018 - 0,025)
PRD/PC	0,008 (0,007 - 0,009)	0,008 (0,007 - 0,009)	0,010 (0,008 - 0,012)	0,010†‡ (0,008 - 0,013)
PRE/PC	0,007 (0,007 - 0,008)	0,008 (0,008 - 0,009)	0,011† (0,008 - 0,014)	0,010† (0,008 - 0,012)
PH/PC	0,044 (0,040 - 0,048)	0,047 (0,041 - 0,054)	0,041 (0,038 - 0,047)	0,046 (0,043 - 0,051)
PCa/PC	0,006 (0,006 - 0,007)	0,007 (0,006 - 0,007)	0,007 (0,006 - 0,007)	0,008†††††** (0,007 - 0,009)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

†p< 0,05 *versus* NC-Co;

‡p< 0,05; ‡‡p< 0,01 *versus* NC-NAC-Conc;

*p< 0,05; **p<0,01 *versus* Ci-Co.

B

Parâmetros	Peso do órgão/PC (mg/g)				
	Ci-Co (n=13)	Ci-NAC-Conc (n=15)	Ci-NAC-Nasc (n=8)	Ci-NAC-Desm (n=12)	Ci-NAC-Adult (n=10)
PRT/PC	0,022 (0,016 - 0,025)	0,019 (0,018 - 0,025)	0,020 (0,018 - 0,023)	0,019 (0,018 - 0,029)	0,020 (0,018 - 0,025)
PRD/PC	0,010 (0,008 - 0,012)	0,010 (0,008 - 0,013)	0,010 (0,009 - 0,012)	0,010 (0,009 - 0,015)	0,010 (0,009 - 0,013)
PRE/PC	0,011 (0,008 - 0,014)	0,010 (0,008 - 0,012)	0,009 (0,009 - 0,011)	0,010 (0,009 - 0,014)	0,010 (0,009 - 0,012)
PH/PC	0,041 (0,038 - 0,047)	0,046 (0,043 - 0,051)	0,044 (0,041 - 0,051)	0,048 (0,043 - 0,059)	0,043 (0,038 - 0,057)
PCa/PC	0,007 (0,006 - 0,007)	0,008 (0,007 - 0,009)	0,007 (0,006 - 0,008)	0,007 (0,006 - 0,008)	0,008 (0,006 - 0,008)

Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn, resultados expressos em mediana intervalo interquartil.

*p< 0,05 *versus* Ci-Co;

^ap<0,05; ^{aa}p<0,01 *versus* Ci-NAC-Conc.

5. DISCUSSÃO

A DRPAD se constitui na doença humana monogênica associada a ameaça à vida mais comum. É importante notar que apenas a metade dos indivíduos acometidos por essa enfermidade atinge os 58 anos de idade sem evoluir para DRCT ¹¹², fato que demonstra seu alto impacto médico, econômico e social.

Os mecanismos envolvidos na progressão da doença renal associada à DRPAD têm sido largamente analisados por meio de estudos clínicos e experimentais desde a identificação e caracterização dos genes *PKD1* e *PKD2*. A inflamação consiste em um dos componentes chaves nesse processo. Há mais de uma década, um estudo clínico relatou que pacientes com DRPAD apresentam um sistema pró-inflamatório mais ativado e um sistema antiinflamatório menos ativado que seus controles correspondentes ⁵⁶. Além disso, mostrou-se que lípides inflamatórios presentes no fluido cístico de rins com DRPAD estimulam a secreção de fluido, a proliferação de células epiteliais renais e a quimiotaxia de monócitos ¹¹³. Em acordo com tais observações, um estudo posterior descreveu excreção urinária aumentada de proteína quimioatratora de monócitos-1 (MCP-1) em pacientes com DRPAD, um perfil que pode ser detectado mesmo antes de uma perda significativa de função renal ⁵⁷. A expressão de MCP-1 também se mostrou aumentada nos rins de ratos Han:SPRD-Cy ¹¹⁴. Mais recentemente, Karihaloo et al relataram que a depleção de macrófagos reduziu o fenótipo cístico e melhorou a função renal em um modelo de camundongo com mutação dirigida a *Pkd1* ¹¹⁶.

Este ambiente inflamatório, por sua vez, dá origem a fibrose intersticial, a qual gradualmente substitui o parênquima renal, levando a redução progressiva da função renal. Observações de Okada et al descrevem, de fato, fibrose renal progressiva em camundongos DBA/2-*pcy* ⁵⁸, enquanto o grau de fibrose foi associado a aceleração da DRPAD ¹¹⁶. Além disso, a expressão gênica de TGF- β (*transforming growth factor- β*) mostrou-se aumentada em rins humanos com DRPAD ⁶⁰ e a sinalização TGF- β /Smad foi elevada em modelos *Pkd1* ortólogos ¹¹⁷. Interessantemente, tratamento com metilprednisolona reduziu a fibrose intersticial, atenuou o crescimento renal e preservou a função renal em ratos Han:SPRD *cy/+* e camundongos DBA/FG *pcy/pcy* ⁶¹.

ROS funcionam como sinais moleculares fisiológicos gerados pela ativação de macrófagos e outros leucócitos. Entretanto, em doenças inflamatórias, câncer e

enfermidades degenerativas, assim como no envelhecimento, os níveis de ROS aumentam substancialmente; nessas condições, se os sistemas antioxidantes endógenos forem superados pelo fluxo oxidante, pode ocorrer injúria tecidual. Há muito se hipotetiza, portanto, que o estresse oxidativo poderia contribuir para a progressão da doença renal na DRPAD. Mostrou-se que o modelo de rato Han:SPRD cy/+ apresenta, de fato, níveis mais altos de glutatona oxidada que seus controles, desenvolve um fenótipo renal pior quando submetido a depleção de glutatona por butionina sulfoximina ⁷¹, e apresenta concentração urinária de glutatona S-transferase diminuída ⁷². Devemos notar que heme-oxigenase-1 encontra-se supra-regulado em rins de ratos Han:SPRD cy e camundongos cpk, enquanto glutatona peroxidase, superóxido dismutase, catalase e glutatona-S-transferase encontram-se infra-regulados ⁷³. Além disso, tratamento com probucol reduziu o índice cístico, a ureia plasmática e a fibrose renal no modelo de camundongo não ortólogo BDF1-pcy ⁷⁴. Um dado mecanístico elegante à contribuição das ROS para a progressão da doença renal na DRPAD foi sua inibição da atividade de canal da PC2 em sinciciotrofoblasto humano ¹¹⁸.

O antioxidante N-acetilcisteína (NAC) constitui-se em uma fonte de grupos sulfidríla, cujos efeitos incluem a atenuação de disfunção endotelial, inflamação e fibrose, ações que se traduzem em prevenção de apoptose e aumento da sobrevivência celular. Seus efeitos protetores renais incluem redução da lesão endotelial e tubular em camundongos ⁶⁶, atenuação da injúria renal induzida por isquemia/reperfusão em ratos ⁹⁰, proteção contra injúria renal decorrente de obstrução ureteral bilateral ⁹², melhora da função renal em camundongos knockout *Nrf2* ⁹³, e atenuação da DRC em ratos ¹¹⁹.

Todos os estudos mencionados previamente abordaram, contudo, os efeitos de tratamento com NAC por tempo limitado sobre diferentes tipos de agressão renal. Portanto, avaliações dos efeitos de tratamento precoce e de longo prazo com NAC não foram feitas nos níveis sistêmico ou renal em qualquer modelo animal de doença de duração por toda a vida. Nesse cenário, nosso trabalho representa não apenas o primeiro estudo a avaliar o efeito da NAC em um modelo animal cístico ortólogo à DRPAD humana, como também a primeira análise de administração de NAC por longo prazo no curso de uma moléstia que se estende por toda a vida. O tratamento com NAC se constituiu em uma fonte antioxidante efetiva em nossos camundongos císticos, reduzindo o nível de TBARS e aumentando o nível de GSH em seus rins. A DRPAD também se associa a uma diminuição da geração de NO, uma anormalidade que

compromete a vasodilatação dependente do endotélio ^{77,120}. Interessantemente, o tratamento com NAC aumentou a excreção urinária de NO em camundongos tratados desde o desmame e provavelmente nos outros grupos tratados. Em nosso modelo de camundongo cístico, portanto, a melhora do estado redox também inclui um aumento da geração de NO.

A redução da ureia sérica observada em diferentes tempos de seguimento em camundongos císticos tratados desde a concepção sugere um efeito benéfico da NAC sobre o curso da função renal neste modelo animal, o qual parece depender de sua administração em fase precoce da vida. Desnutrição aparente não foi observada nos animais Ci-NAC-Conc, excluindo este fator potencial como a causa para a S_U mais baixa. No entanto, como a ureia sérica não foi significativamente mais alta nos camundongos císticos comparados aos não císticos, um efeito direto da NAC sobre o metabolismo nitrogenado do animal cístico poderia contribuir para esse achado.

De modo geral, não foram detectados efeitos significativos no nível da função tubular, incluindo capacidade de concentração renal. Reduções da FE_K foram verificadas para dois grupos císticos tratados na idade de 21 sem, porém seu significado é incerto no momento. Possíveis razões para não havermos detectado diferenças funcionais tubulares e diferenças mais claras de S_U , particularmente para os grupos iniciados no tratamento mais tardiamente, são os fenótipos cístico e funcional relativamente leves e variáveis observados neste modelo. A expressão em mosaico da nestin-Cre recombinase constitui-se numa causa provável de tal variação fenotípica ¹²¹. Vale mencionar, também, que o modelo animal empregado em nosso estudo apresentou um fenótipo mais brando que o verificado em outro centro de pesquisa ¹⁰¹. A razão dessa diferença, contudo, é ainda desconhecida.

A análise das ações da NAC sobre a morfologia do rim cístico incluíram avaliação ultrassonográfica na idade de 22 sem. Os camundongos Ci-NAC-Conc desenvolveram um número menor de cistos renais que seus controles císticos não tratados e apresentaram um índice cístico de rim direito menor. Embora um efeito benéfico potencial tenha sido visto sobre o volume renal absoluto, não podemos tirar conclusões positivas uma vez que os achados não foram confirmados quando normalizados para o peso corpóreo do animal. Deve-se notar que o peso renal também não diferiu entre camundongos tratados com NAC e não tratados quando normalizado pelo peso corpóreo. Os achados ultrassonográficos renais sugerem, portanto, um efeito

significativamente benéfico da NAC sobre a cistogenese renal e um provável efeito positivo discreto sobre o crescimento dos cistos. É importante considerar, contudo, que o fenótipo renal apresentado pelos camundongos *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} também pode ter limitado a magnitude potencial das ações do tratamento com NAC e impedido um efeito significativo sobre o peso/volume renal.

Nosso modelo animal reproduziu a fibrose intersticial renal observada na DRPAD humana. Deve-se notar que os camundongos císticos tratados com NAC desde a concepção apresentaram fibrose renal consideravelmente menor que os animais císticos não tratados, atingindo níveis equivalentes aos dos camundongos não císticos. Em apoio a esses achados, o tratamento com NAC também levou as taxas de proliferação celular e apoptose a níveis similares aos de animais controle não císticos. Esses dados revelam um efeito anti-fibrótico potente da NAC em camundongos deficientes em *Pkd1* quando o tratamento é iniciado precocemente em vida, um efeito acompanhado por uma provável redução da proliferação celular e apoptose no parênquima renal.

Anormalidades e eventos cardiovasculares constituem a principal causa de mortalidade na DRPAD^{13,14}. Deve-se destacar que mutações nos genes *PKD*, particularmente em *PKD2*, foram associadas ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca¹²². A administração de NAC, por sua vez, mostrou ser capaz de repor a glutathione cardíaca e reduzir a disfunção e o remodelamento do ventrículo esquerdo em um modelo de hipertensão em ratos⁹⁸, enquanto sua suplementação evitou hipertrofia ventricular esquerda em camundongos submetidos a constrição aórtica¹⁰⁰. Nossas análises ecocardiográficas revelaram uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma fração de encurtamento do ventrículo esquerdo aumentadas nos camundongos Ci-NAC-Conc quando comparados a seus controles Ci-Co, indicando um efeito benéfico da NAC sobre a função sistólica em camundongos císticos deficientes de *Pkd1*. O fato de animais não císticos tratados com NAC terem apresentado uma tendência a valores mais altos de tais parâmetros quando comparados a seus controles não císticos não tratados sugere, por sua vez, que seja possível que este efeito da NAC possa ocorrer mesmo no contexto de ausência de doença. Não foram detectados, contudo, efeitos sobre a razão peso cardíaco/peso corpóreo em camundongos Ci-NAC-Conc. Os resultados ecocardiográficos obtidos em camundongos císticos mostraram-se em concordância com a redução significativa de fibrose cardíaca observada nos

camundongos tratados com NAC, em comparação com os animais císticos não tratados. É fundamental notar que este efeito foi capaz de retornar esse parâmetro para níveis similares aos dos camundongos não císticos. Esses dados apoiam um efeito anti-fibrótico intenso do tratamento precoce com NAC sobre o coração de camundongos císticos.

Também avaliamos efeitos sistêmicos da NAC sobre os camundongos císticos. Surpreendentemente, o tratamento iniciado na concepção aumentou significativamente a sobrevida dos camundongos císticos, uma tendência também observada quando esses animais foram tratados desde o nascimento. Esses achados sugerem um efeito benéfico da NAC sobre o fenótipo amplo associado à deficiência de *Pkd1*. Esse efeito protetor sistêmico constitui-se provavelmente na tradução das ações da NAC em diferentes níveis, incluindo coração e rins, e é provavelmente relacionado causativamente ao aumento crônico da atividade antioxidante e à remoção de radicais livres. No entanto, outros efeitos potenciais previamente descritos da NAC também poderiam contribuir para a melhora sistêmica do animal, tais como aumento da geração de NO, aumento da expressão de Klotho e diminuição da inflamação ¹²³.

Outro achado sistêmico notável de nosso estudo foi a redução no crescimento/peso corporal determinada pelo tratamento precoce e de longo prazo com NAC em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*. Esse efeito não se seguiu de consequências deletérias, uma vez que tais animais apresentaram maior sobrevida que os controles císticos não tratados, cursaram com melhora dos fenótipos renal e cardíaco e não apresentaram sinais aparentes de desnutrição. Interessantemente, o mesmo efeito não foi detectado em camundongos não císticos e nenhum estudo prévio reportou achados similares em qualquer outro modelo animal de doença ou sem enfermidade. O efeito observado parece, portanto, apresentar especificidade para o *background* deficiente em *Pkd1*. A conexão potencial entre a deficiência de *Pkd1* e NAC, contudo, não é clara no momento. Possíveis ligações poderiam incluir desorganizações endócrinas e de proliferação celular induzidas por inibição muito precoce da formação de ROS no cenário de deficiência de *Pkd1*. Efeitos potenciais sobre a ingestão alimentar ou sobre a taxa metabólica também precisam ser investigados. Para analisar essa questão, é importante avaliar os efeitos do tratamento precoce e de longo prazo com NAC sobre modelos animais com outros perfis de deficiência de *Pkd1*.

Nossos dados apoiam, portanto, que tratamento precoce e crônico com NAC determina aumento da sobrevida e melhora dos fenótipos renal e cardíaco em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*. Nossos achados também demonstram um efeito não deletério da NAC em reduzir o crescimento corporal no modelo animal analisado. No momento não sabemos, entretanto, se todos os efeitos da NAC descritos neste estudo são determinados pela redução do estresse oxidativo. Nossos resultados abrem, portanto, uma linha de investigação robusta e relevante para intervir nos fenótipos renal, extra-renal e sistêmico associados à DRPAD.

6. CONCLUSÕES

1. O tratamento precoce e de longo prazo com NAC se constituiu em uma fonte antioxidante efetiva em camundongos císticos *Pkd1^{cond/cond}:Nestin^{cre}*, reduzindo o nível de TBARS e aumentando o nível de GSH em seus rins.
2. O tratamento com NAC desde o desmame aumentou a excreção urinária de NO em camundongos *Pkd1^{cond/cond}:Nestin^{cre}*.
3. A redução da ureia sérica observada em diferentes tempos de seguimento em camundongos císticos tratados desde a concepção sugere um efeito benéfico da NAC sobre o curso da função renal em camundongos císticos.
4. O tratamento com NAC desde a concepção diminuiu o número de cistos renais e o índice cístico de rim direito em camundongos *Pkd1^{cond/cond}:Nestin^{cre}*, sugerindo um efeito benéfico da NAC sobre a cystogênese renal e um provável efeito positivo sobre o crescimento dos cistos.
5. Camundongos císticos tratados com NAC desde a concepção apresentaram fibrose renal consideravelmente menor que os animais císticos não tratados, revelando um efeito anti-fibrótico potente da NAC em camundongos deficientes em *Pkd1*, acompanhado de uma provável redução de proliferação celular e apoptose.
6. Camundongos císticos tratados com NAC desde a concepção apresentaram aumento da fração de ejeção e da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, indicando um efeito benéfico da NAC sobre a função sistólica em camundongos císticos deficientes de *Pkd1*.
7. O tratamento com NAC desde a concepção reduziu a área de fibrose cardíaca em camundongos *Pkd1^{cond/cond}:Nestin^{cre}*, apoiando um efeito anti-fibrótico intenso deste agente sobre o coração de camundongos císticos.

8. O tratamento com NAC iniciado na concepção aumentou a sobrevivência dos animais císticos, sugerindo um efeito protetor sistêmico sobre os camundongos deficientes em *Pkd1*.

9. O tratamento precoce e de longo prazo com NAC reduziu o crescimento/peso corporal em camundongos císticos deficientes em *Pkd1*.

7. REFERÊNCIAS

1. Torres VE, Harris P. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int.* 2009;76(2):149-68.
2. Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(9):2384-98.
3. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med.* 2009;60:321-37.
4. Perrone RD, Ruthazer R, Terrin NC. Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(4):777-84.
5. Nunes AC, Milani V, Porsch DB, Rossato LB, Mattos CB, Roisenberg I, Barros EJ. Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. *Ren Fail.* 2008;30 (2):169-73.
6. Balbo BEP, Cavalcante RM, Romão JrJE, Barros RT, Zatz R, Abensur H. . Profile of patients with end-stage renal disease before starting renal replacement therapy, derived from a tertiary nephrology center. *J Bras Nefrol.* 2007;29:203-8.
7. Igarashi P, Somlo S. Polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(5):1371-3.
8. Pirson Y. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(2):173-80.
9. Qian. Q. Isolated polycystic liver disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(2):181-9.
10. Yazdanpanah K, Hosseinzadeh E, Emami MH, Karami M, Sarrami AH. Recurrent acute pancreatitis and cholangitis in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Int J Prev Med.* 2013;4(2):233-6.
11. Torres VE, Harris P, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet.* 2007;369:1287-301.
12. Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(2):153-63.
13. Helal I, Reed B, Mettler P, Mc Fann K, Tkachenko O, Yan XD, Schrier RW. Prevalence of cardiovascular events in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2012;36(4):362-70.

14. Ecdar T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2009;5(4):221-8.
15. Perrone RD, Abede K, Schrier RW, Chapman AB, Torres VE, Bost J, Kaya D, Miskulin DC, Steinman TI, Braun W, Winklhofer FT, Hogan MC, Rahbari-Oskoui F, Kelleher C, Masoumi A, Glockner J, Halin NJ, Martin D, Remer E, Patel N, Pedrosa I, Wetzel LH, Thompson PA, Miller JP, Bae KT; HALT PKD Study Group, Meyers CM. Cardiac Magnetic Resonance Assessment of Left Ventricular Mass in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(10):2508-15.
16. Harris PC, Bae K, Rossetti S, Torres VE, Grantham JJ, Chapman AB, Guay-Woodford LM, King BF, Wetzel LH, Baumgarten DA, Kenney PJ, Consugar M, Klahr S, Bennett WM, Meyers CM, Zhang QJ, Thompson PA, Zhu F, Miller JP. Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17 (11):3013-9.
17. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García-González MA, Menezes LF, Xu H, Germino GG, Zuo J, Qian F. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(47):18688-93.
18. Celić A, Petri E, Demeler B, Ehrlich BE, Boggon TJ. Domain mapping of the polycystin-2 C-terminal tail using de novo molecular modeling and biophysical analysis. *J Biol Chem.* 2008;283:28305-12.
19. Li Y, Wright J, Qian F, Germino GG, Guggino WB. Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(50):41298-306.
20. Sammels E, Devogelaere B, Mekahli D, Bultynck G, Missiaen L, Parys JB, Cai Y, Somlo S, De Smedt H. Polycystin-2 activation by inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release requires its direct association with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in a signaling microdomain. *J Biol Chem.* 2010;285 (24):18794-805.
21. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell.* 2002;109(2):157-68.

22. Shillingford JM, Murcia N, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(14):5466-71.
23. Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang T, Hiesberger T, Igarashi P, Bennett AM, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Somlo S, Caplan MJ. Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1433-43.
24. Nickel C, Benzing T, Sellin L, Gerke P, Karihaloo A, Liu ZX, Cantley LG, Walz G. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest*. 2002;109(4):481-9.
25. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13 (10):2508-16.
26. Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R. The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97 (8):4017-22.
27. 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.
28. Fu X, Wang Y, Schetle N, Gao H, Pütz M, von Gersdorff G, Walz G, Kramer-Zucker AG. The Subcellular Localization of TRPP2 Modulates Its Function. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19 (7):1342-51.
29. Köttgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber TB, Schermer B, Kramer-Zucker A, Höpker K, Simmen KC, Tschucke CC, Sandford R, Kim E, Thomas G, Walz G. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *Embo J*. 2005;24 (4):705-16.
30. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*. 2000;408(6815):990-4.

31. Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol*. 2002;12 (11):938-43.
32. Lin F, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, Igarashi P. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 (9):5286-91.
33. Low SH, Vasanth S, Larson CH, Mukherjee S, Sharma N, Kinter MT, Kane ME, Obara T, Weimbs T. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell*. 2006;10(1):57-69.
34. Lal M, Song X, Pluznick JL, Di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND, Chauvet V, Gottardi CJ, Pei Y, Caplan MJ. Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum Mol Genet*. 2008;17(20):3105-17.
35. Qian F, Watnick T, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell*. 1996;87(6):979-87.
36. Lu W, Shen X, Pavlova A, Lakkis M, Ward CJ, Pritchard L, Harris PC, Genest DR, Perez-Atayde AR, Zhou J. Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Hum Mol Genet*. 2001;10(21):2385-96.
37. Piontek K, Menezes L, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med*. 2007;13(12):1490-5.
38. Lantinga-van Leeuwen IS, Leonhard W, van der Wal A, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet*. 2007;16(24):3188-96.
39. Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J. Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(12):2351-63.
40. Takakura A, Contrino L, Zhou X, Bonventre JV, Sun Y, Humphreys BD, Zhou J. Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*. 2009;18(14):2523-31.

41. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, Fonseca II, Germino GG, Onuchic LF. Pkd1 haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(11):2389-402.
42. Gallagher AR, Germino G, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2010;17:118-30.
43. Islam MR, Jimenez T, Pelham C, Rodova M, Puri S, Magenheimer BS, Maser RL, Widmann C, Calvet JP. MAP/ERK kinase kinase 1 (MEKK1) mediates transcriptional repression by interacting with polycystic kidney disease-1 (PKD1) promoter-bound p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 2010;285 (50):38818-31.
44. Patel V, Williams D, Hajarnis S, Hunter R, Pontoglio M, Somlo S, Igarashi P. miR-17~92 miRNA cluster promotes kidney cyst growth in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10765-70.
45. Seeger-Nukpezah T, Proia D, Egleston BL, Nikonova AS, Kent T, Cai KQ, Hensley HH, Ying W, Chimmanamada D, Serebriiskii IG, Golemis EA. PMID: 23858461. Inhibiting the HSP90 chaperone slows cyst growth in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(31):12786-91.
46. Grantham JJ, Geiser J, Evan AP. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 1987;31:1145-52.
47. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, Torres V, Yaniv M, Pontoglio M. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet*. 2006;38 (1):21-3.
48. Nishio S, Tian X, Gallagher AR, Yu Z, Patel V, Igarashi P, Somlo S. Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(2):295-302.
49. Grantham JJ. The etiology, pathogenesis, and treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances. *Am J Kidney Dis*. 1996;28 (6):788-803.
50. Davidow CJ, Maser R, Rome LA, Calvet JP, Grantham JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro. *Kidney Int*. 1996;50 (1):208-18.

51. Magenheimer BS, St John P, Isom KS, Abrahamson DR, De Lisle RC, Wallace DP, Maser RL, Grantham JJ, Calvet JP. Early embryonic renal tubules of wild-type and polycystic kidney disease kidneys respond to cAMP stimulation with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator/Na(+),K(+),2Cl(-) Co-transporter-dependent cystic dilation. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:3424-37.
52. Montesano R, Ghzili H, Carrozzino F, Rossier BC, Féraille E. cAMP-dependent chloride secretion mediates tubule enlargement and cyst formation by cultured mammalian collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296:F446-F57.
53. Ikeda M, Fong P, Cheng J, Boletta A, Qian F, Zhang XM, Cai H, Germino GG, Guggino WB. A regulatory role of polycystin-1 on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator plasma membrane expression. *Cell Physiol Biochem*. 2006;18 (1-3):9-20.
54. Wang X, Ward C, Harris PC, Torres VE. Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77:129-40.
55. Grantham JJ. Mechanisms of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 1997;63:S93-7.
56. Merta M, Tesar V, Zima T, Jirsa M, Rysava R, Zabka J. Cytokine profile in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;41(3):619-24.
57. Zheng D, Wolfe M, Cowley BDJr, Wallace DP, Yamaguchi T, Grantham JJ. Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2588-95.
58. Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG. Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int*. 2000;58(2):587-97.
59. Li X, Magenheimer B, Xia S, Johnson T, Wallace DP, Calvet JP, Li R. A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med*. 2008;14(8):863-8.
60. Song X, Di Giovanni V, He N, Wang K, Ingram A, Rosenblum ND, Pei Y. Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks. *Hum Mol Genet*. 2009;18 (13):2328-43.

61. Gattone VH, Cowley BD, Barash BD, Nagao S, Takahashi H, Yamaguchi T, Grantham JJ. Methylprednisolone retards the progression of inherited polycystic kidney disease in rodents. *Am J Kidney Dis.* 1995;25(2):302-13.
62. Sankaran D, Bankovic-CN, Ogborn MR, Crow G, Aukema HM. Selective COX-2 inhibition markedly slows disease progression and attenuates altered prostanoid production in Han:SPRD-cy rats with inherited kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(3):F821-30.
63. Ogborn MR, Nitschmann E, Bankovic-Calic N, Weiler HA, Aukema H. Dietary flax oil reduces renal injury, oxidized LDL content, and tissue n-6/n-3 FA ratio in experimental polycystic kidney disease. *Lipids.* 2002;37(11):1059-65.
64. Ogborn MR, Nitschmann E, Bankovic-Calic N, Weiler HA, Fitzpatrick-Wong S, Aukema HM. Dietary conjugated linoleic acid reduces PGE2 release and interstitial injury in rat polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2003;64(4):1214-21.
65. Swenson-Fields KI, Vivian C, Salah SM, Peda JD, Davis BM, van Rooijen N, Wallace DP, Fields TA. Macrophages promote polycystic kidney disease progression. *Kidney Int.* 2013;83(5):855-64.
66. Di Giorno C, Pinheiro H, Heinke T, Franco MF, Galante NZ, Pacheco-Silva A, Camara NO. Beneficial effect of N-acetyl-cysteine on renal injury triggered by ischemia and reperfusion. *Transplant Proc.* 2006;38(9):2774-6.
67. Yurumez Y, Cemek M, Yavuz Y, Birdane YO, Buyukokuroglu ME. Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(3):490-4.
68. Pahl HL Baeuerle PA. Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays.* 1994;16(7):497-502.
69. Arrigo PA. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(9-10):936-44.
70. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(7):1272-80.
71. Torres VE, Bengal R, Litwiller RD, Wilson DM. Aggravation of polycystic kidney disease in Han:SPRD rats by buthionine sulfoximine. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8(8):1283-91.

72. Zima T, Crkovská J, Merta M, Stípek S, Němec K, Tesar V. Activity of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, on autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Biochem Mol Biol Int*. 1995;35(4):699-704.
73. Maser RL, Vassmer D, Magenheimer BS, Calvet JP. Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(4):991-9.
74. Nagao S, Yamaguchi T, Kasahara M, Kusaka M, Matsuda J, Ogiso N, Takahashi H, Grantham JJ. Effect of probucol in a murine model of slowly progressive polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2000;35(2):221-6.
75. Wang D, Braendstrup O, Larsen S, Horn T, Strandgaard S. The expression and activity of renal nitric oxide synthase and circulating nitric oxide in polycystic kidney disease rats. *Apmis*. 2004;112(6):358-68.
76. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Endothelium-dependent relaxation of small resistance vessels is impaired in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(8):1371-6.
77. Wang D, Iversen J, Wilcox CS, Strandgaard S. Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2003;64(4):1381-8.
78. Namli S, Oflaz H, Turgut F, Alisir S, Tufan F, Ucar A, Mercanoglu F, Ecder T. Improvement of endothelial dysfunction with simvastatin in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Ren Fail*. 2007;29(1):55-9.
79. Al-Nimri MA, Komers R, Oyama TT, Subramanya AR, Lindsley JN, Anderson S. Endothelial-derived vasoactive mediators in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2003;63(5):1776-84.
80. Wang D, Strandgaard S, Borresen ML, Luo Z, Connors SG, Yan Q, Wilcox CS. Asymmetric dimethylarginine and lipid peroxidation products in early autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2008;51(2):184-91.
81. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation*. 2008;117(9):1161-71.
82. AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, Nauli SM. Ciliary polycystin-2 is a mechanosensitive calcium channel involved in nitric oxide signaling cascades. *Circ Res*. 2009;104(7):860-9.

83. Reilly PM, Schiller H, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991;161(4):488-503.
84. Zafarullah M, Li W, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20.
85. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7.
86. Pocernich CB, Cardin A, Racine CL, Lauderback CM, Butterfield DA. Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochemistry International.* 2001;39: 141-9.
87. Trimarchi H, Mongitore M, Baglioni P, Forrester M, Freixas EA, Schropp M, Pereyra H, Alonso M. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients--a pilot study. *Clin Nephrol.* 2003;59(6):441-6.
88. Nitescu N, Ricksten S, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S, Guron G. N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(5):1240-7.
89. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol.* 2003;16(1):75-80.
90. Shimizu MH, Coimbra T, de Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int.* 2005;68(5):2208-17.
91. Mosley K, Waddington S, Ebrahim H, Cook T, Cattell V. Inducible nitric oxide synthase induction in Thy 1 glomerulonephritis is complement and reactive oxygen species dependent. *Exp Nephrol.* 1999;7(1):26-34.
92. Shimizu MH, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TR, Seguro AC. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(10):3067-73.
93. Liu M, Grigoryev D, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H. Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int.* 2009;76 (3):277-85.

94. Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD. N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects. *Circulation*. 1995;92(10):2855-62.
95. Sochman J, Vrbská J, Musilová B, Rocek M. Infarct Size Limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients. *Clin Cardiol*. 1996;19(2):94-100.
96. Meyer M, Bell S, Chen Z, Nyotowidjojo I, Lachapelle RR, Christian TF, Gibson PC, Keating FF, Dauerman HL, Lewinter MM. High dose intracoronary N-acetylcysteine in a porcine model of ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis*. 2013;36(4):433-41.
97. Menon V, RRudym D, Chandra P, Miskulin D, Perrone R, Sarnak M. Inflammation, oxidative stress, and insulin resistance in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6 (1):7-13.
98. Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, Cailleret M, Bourin MC, Badoual T, Su JB, Adubeiro S, Roudot-Thoraval F, Dubois-Rande JL, Hittinger L, Pecker F. N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats. *Circulation*. 2004;110 (14):2003-9.
99. Adamy C, Mulder P, Khouzami L, Andrieu-abadie N, Defer N, Candiani G, Pavoine C, Caramelle P, Souktani R, Le Corvoisier P, Perier M, Kirsch M, Damy T, Berdeaux A, Levade T, Thuillez C, Hittinger L, Pecker F. Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43 (3):344-53.
100. Byrne JA, Grieve D, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2003;93 (9):802-5.
101. Shillingford JM, Piontek K, Germino GG, Weimbs T. Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21(3):489-97.
102. Buhimschi IA, Buhimschi C, Weiner CP. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(1):203-8.

103. Piontek KB, Huso D, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG. A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3035-43.
104. Betz UA, Vosschenrich C, Rajewsky K, Muller W. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol*. 1996;6(10):1307-16.
105. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
106. Carlson GL. Interaction of polyanions with basic fuchsin and formaldehyde. *J Histochem Cytochem*. 1977;25(1):42-5.
107. Nishiura JL, Eloi SR, Cintra SM, Ajzen SA, Heilberg IP. Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(4):838-44.
108. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr* 2005;6:41-46.
109. Ramires FJ, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, Martins DG, Billate A, Neto EC, Mady C. Aldosterone antagonism in an inflammatory state: evidence for myocardial protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7:162-167.
110. Whittaker P, Kloner R, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994;89(5):397-410.
111. Farris AB, Adams C, Brousaides N, Della Pelle PA, Collins AB, Moradi E, Smith RN, Grimm PC, Colvin RB. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(1):176-86.
112. Gabow PA, Johnson ZA, Kaehny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, Jones RH. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 1992;41(5):1311-9.
113. Grantham JJ, Schreiner G, Rome L, Grenz L, Joly A. Evidence for inflammatory and secretagogue lipids in cyst fluids from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997; Jul;109(4):397-408.

114. Cowley BD Jr, Ricardo S, Nagao S, Diamond JR. Increased renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 and osteopontin in ADPKD in rats. *Kidney Int.* 2001; Dec;60(6):2087-96.
115. Karihaloo A, Koraihy F, Huen SC, Lee Y, Merrick D, Caplan MJ, Somlo S, Cantley LG. Macrophages Promote Cyst Growth in Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1809-14.
116. Norman J. Fibrosis and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(10):1327-36.
117. Hassane S, Leonhard W, van der Wal A, Hawinkels LJ, Lantinga-van Leeuwen IS, ten Dijke P, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Elevated TGF beta-Smad signalling in experimental Pkd1 models and human patients with polycystic kidney disease. *J Pathol.* 2010; 222 (1):21-31.
118. Montalbetti N, Canteo M, Dalghi MG, Cantiello HF. Reactive oxygen species inhibit polycystin-2 (TRPP2) cation channel activity in term human syncytiotrophoblast. *Placenta.* 2008; Jun;29(6):510-8.
119. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoglu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol.* 1993;16:75-80.
120. Kocaman O, Oflaz H, Yekeler E, Dursun M, Erdogan D, Demirel S, Alisir S, Turgut F, Mercanoglu F, Ecder T. Endothelial dysfunction and increased carotid intima-media thickness in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2004;43(5):854-60.
121. Chen J, Boyle S, Zhao M, Su W, Takahashi K, Davis L, Decaestecker M, Takahashi T, Breyer MD, Hao CM. Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(5):1283-91.
122. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IY, Yuan S, Sun Z, Harris PC, Torres VE, Ehrlich BE. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;58:199-208.
123. Shimizu MH, Volpini R, de Bragança AC, Campos R, Canale D, Sanches TR, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. *Exp Gerontol.* 2013;48(2):298-303.

APÊNDICE

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.04.10, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 058/10 intitulado: **"EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL EM CAMUNDONGOS CÍSTICOS POR INATIVAÇÃO DO GENE *Pkd1*"** apresentado pela Área de Fisiopatologia Experimental.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

Pesquisador (a) Executante: Zenaide Providello Moysés

CEP-FMUSP, 14 de abril de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados

A Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU em 14.04.04** para o Nível de Biossegurança (NB-1) o Protocolo de Pesquisa nº **058/10** intitulado: **"EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL EM CAMUNDONGOS CÍSTICOS POR INATIVAÇÃO DO GENE Pkd1"**, apresentado pela Área de Fisiopatologia Experimental.

CQB concedido: 0217/06.

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

Pesquisador (a) Executante: Zenaide Providello Mousés

CIBio em OGM's, 14 de abril de 2010

Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho
Coordenador
Comissão de Biossegurança em OGM's

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

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

N-Acetylcysteine Improves Renal and Cardiac Phenotypes and Reduces Body Weight in *Pkd1*-Deficient Cystic Mice.

Zenaide P. Moysés¹, Ana P. Bastos¹, Bruno E. Balbo¹, Vera M. Cury Salemi², Charles Mady², Luiz F. Onuchic^{1,*}.

¹Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, 01246-903, Brazil; ²Cardiomyopathies Unit, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, 05403-903, Brazil.

Running title: N-Acetylcysteine in *Pkd1*-Deficient Cystic Mice

*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

Oxidative stress has been postulated to participate in the progression of ADPKD renal disease. The antioxidant N-acetylcysteine (NAC), in turn, has determined beneficial effects on animal models of renal injury. In this study, a cystic mouse generated by breeding a *Pkd1* floxed allele with a nestin Cre expressing line was used to evaluate NAC effects on a model orthologous to human ADPKD. Long-term NAC treatment was initiated at conception, birth, weaning or 8 weeks of life, to allow its evaluation for different life-time periods. Our analyses revealed that NAC decreased thiobarbituric acid reactive substances and increased glutathione levels in the kidneys of mice treated

with NAC since conception (CY-NAC-Con) compared with non-treated cystic animals (CY-Ctl). Nitric oxide urinary excretion was also higher in NAC-treated mice. These animals showed lower SUN, renal cyst number, cystic index and renal interstitial fibrosis than CY-Ctl mice, as well as increased survival. CY-NAC-Con animals displayed higher left ventricle ejection fraction and fractional shortening compared with CY-Ctl mice, and decreased cardiac fibrosis. Notably, body weight was lower in CY-NAC-Con than CY-Ctl mice at all evaluated times, a difference not observed between NAC-treated and non-treated non-cystic animals. These results support beneficial effects of early treatment with NAC on *Pkd1*-deficient cystic mice, by improving renal, heart and systemic phenotypes. Our findings also reveal a non-deleterious reduction in body growth induced by long-term NAC administration in the evaluated *Pkd1*-deficient background. These data open a likely significant and robust research track to intervene in renal, extrarenal and systemic ADPKD phenotypes.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most frequent monogenic renal disease, affecting 1:400-1000 individuals¹ and accounting for 4.4-10.0% of patients in renal replacement therapy worldwide.^{2,3} Its renal phenotype, characterized by the development of multiple bilateral renal cysts, disruption of kidney architecture and progressive loss of renal function, is responsible for most of the clinical manifestations; however, the systemic nature of this disease also comprises extrarenal manifestations, such as liver cysts, intracranial aneurysms and heart valve abnormalities.⁴

ADPKD is caused by mutations in one of two genes: *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) or *PKD2*.⁵ These genes encode integral membrane glycoproteins, respectively named polycystin-1 (PC1) and polycystin-2 (PC2). PC2 is a non-selective cation channel, while PC1 is thought to function as a membrane receptor and as an adhesion molecule.¹ It must be noted, however, that ~85% of the cases occur due to *PKD1* pathogenic mutations.²

In the past decade, a number of studies revealed that inflammation plays a significant role in ADPKD pathogenesis, leading to renal fibrosis and late but gradual decline in renal function.^{6,7} Along the same line, abnormalities in redox metabolism appear to participate in the inflammatory process, contributing to the acceleration of ADPKD

renal phenotype.⁸ Glutathione peroxidase and superoxide dismutase are in fact reduced in ADPKD patients.^{9,10} In support to this concept, the glutathione peroxidase plasmatic and renal levels were found reduced in Han:SPRD-Cy rats and cpk mice, cystic models non-orthologous to ADPKD, while the lipid peroxidation products malondialdehyde and 4-OH-2(E)-nonenal were increased in cpk kidneys and plasma.¹¹

N-Acetylcysteine (NAC) is a thiol, precursor of L-cysteine and reduced glutathione, associated with anti-inflammatory¹² and mucolytic properties. As an exogenous antioxidant agent, it increases the synthesis of glutathione peroxidase and removes reactive oxygen species (ROS) such as OH⁻ and H₂O₂.^{13,14} Improvement in endothelial dysfunction and decrease in fibrotic response were also described.¹⁵ Several beneficial effects have been reported for NAC administration at the renal level. It attenuated the progression of chronic kidney disease (CKD) in rats subjected to 5/6 nephrectomy¹⁶ and reduced the degree of acute tubular necrosis (ATN) following ischemia/reperfusion (I/R) in mice.¹⁷

In the provided scenario, we hypothesized that treatment with primary antioxidant agents could ameliorate and slow the progression of ADPKD renal disease. The effects of long-term treatment with such agents, however, had not been assessed in animal models orthologous to human ADPKD. In the present study, therefore, we analyzed the renal, hepatic, cardiac and systemic effects of NAC administration in a *Pkd1*-deficient mouse model that closely reproduces the human ADPKD cystic phenotype.¹⁸ Treatment was started at different moments in life, including the embryonic period, to evaluate NAC effects at different phases of disease progression. Notably, NAC therapy started at conception improved renal fibrosis and survival, reduced the number of kidney cysts and apparently increased glomerular filtration. Amelioration in systolic function and heart fibrosis was also observed, as well as beneficial effects on oxidative stress. Interestingly, such animals displayed a significant decrease in body weight.

RESULTS

Glomerular filtration and tubular function analyses

Based on the construction of a *Pkd1* floxed allele and a nestin-Cre transgene, we have generated homozygous mice for the conditional allele¹⁹ with a mosaic pattern of *Pkd1* inactivation. While this gene inactivation profile, obtained by excision of exons 2-4,

closely reproduced the ADPKD renal cystic phenotype, the *Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre} (CY) animals do not display the cell background with one inactive *Pkd1* allele observed in human affected kidneys. *Pkd1*^{cond/cond} non-cystic littermates (NC) were employed as controls.

The effects of NAC on CY mice were analyzed at three time points - 10, 15 and 21-22 weeks (wk) of age - and for four distinct treatment periods: starting at conception, birth, weaning and beginning of adulthood (eight wk of age). This experimental design led to four CY test groups - CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu -; the CY non-treated control group CY-Ctl; and the NC control groups NC-NAC-Con and NC-Ctl.

Serum urea nitrogen (SUN) was lower in CY-NAC-Con than CY-Ctl mice at the ages of 10 wk (20.8±5.9 mg/dL vs 30.0±5.5 mg/dL, $p < 0.01$) and 21 wk (20.9±7.6 mg/dL vs 32.2±12.0 mg/dL, $p < 0.001$); a trend to non-significant decreased SUN was also observed at the age of 15 wk (Figures 1A and B, Table 1). Significant reductions in SUN were also detected in CY-NAC-Wea animals at 10 wk of follow up (20.7±8.0 mg/dL vs 30.0±5.5 mg/dL, $p < 0.01$) and in CY-NAC-Adu mice at 21 wk (19.9±3.0 vs 32.2±12.0 mg/dL, $p < 0.05$), CY-NAC-Bir (20.8±6.1 mg/dL, $p < 0.01$) and CY-NAC-Wea (22.8±6.0, $p < 0.01$) (Figure 1B, Table 1). It must be pointed out, however, that the SUN difference between the CY-Ctl and NC-Ctl groups did not reach significance. CY-NAC-Con mice displayed lower serum creatinine (S_{Cr}) compared to CY-Ctl only at 15 wk [0.21 (0.17-0.26) vs 0.31 (0.25-0.40) mg/dL, $p < 0.05$] but no additional significant S_{Cr} difference was observed between CY NAC-treated and control groups (data not shown). While the SUN results suggest an apparent renal protective effect of NAC, the S_{Cr} data suggest that this parameter was not sensitive enough to detect variations in glomerular filtration rate (GFR) in the current experimental setting.

We next evaluated the Na^+ renal handling. The fractional excretion of sodium (FE_{Na}) did not differ between CY NAC-treated and non-treated animals for all treatment protocols and at all analyzed times (data not shown). NAC potential effects on renal concentrating capacity have been also analyzed. U_{OSMMax} , however, did not differ between CY NAC-treated and non-treated mice for all treatment periods and evaluated ages (data not shown).

Renal ultrasonographic analyses

Renal ultrasonographic evaluation was carried out in CY-NAC-Con and CY-Ctl groups at 22 wk of age. The CY NAC-treated mice displayed smaller numbers of total kidney cysts and right kidney cysts than non-treated cystic animals [60.5 (47.3-68.3) vs 75.0 (65.0-113.5), $p < 0.05$; and 31.0 (23.0-34.0) vs 40.0 (36.5-57.5), $p < 0.01$; respectively], while a non-significant trend of lower number of left kidney cysts was observed in the CY-NAC-Con animals (Figures 2A and C). The right kidney cystic index was also lower in CY NAC-treated than cystic control animals [11.07% (8.38-12.62) vs 12.67% (11.47-19.19), $p < 0.05$] (Figure 2B and C). Though lower total kidney and left kidney cystic indexes were also found in CY-NAC-Con mice, the differences between the two groups did not reach significance. These findings suggest significant but mild protective effects of NAC on renal cystogenesis and cyst growth.

The left kidney volume (LKV) was significantly lower in CY-NAC-Con compared to CY-Ctl mice but the LKV/body weight (BW) difference was not significant (data not shown). Non-significant trends to lower total kidney volume (TKV) and right kidney volume (RKV) were also seen in the NAC-treated animals, however they also disappeared when these parameters were normalized to BW.

Cell proliferation and apoptosis in cystic and non-cystic kidneys

Polycystins modulate cell proliferation, apoptosis and differentiation.²⁰ Cell proliferation and apoptotic rates are, in fact, increased in ADPKD kidneys.⁵ Since elevated levels of ROS might contribute to this abnormal pattern and, consequently, to acceleration of the CY mouse and human ADPKD renal disease, we evaluated such cellular parameters in this animal model at the age of 22 wk. While the Ki-67 immunohistochemical analyses revealed a lower but non-significant cellular proliferation rate in CY-NAC-Con than CY-Ctl kidneys [2.31 (0.68-4.76) vs 4.54 (0.23-18.11) positive cells/1000 cells], the NAC-treated cystic mice presented a similar value to the NC-Ctl animals [2.59 positive cells/1000 cells (1.26-3.79)] (Figure 3A). A lower but again non-significant apoptotic rate was detected in CY-NAC-Con compared to CY-Ctl kidneys [3.51 (0.00-22.30) vs 15.33 (5.26-97.12) positive cells/10000 cells], and the NAC-treated cystic mice displayed rates close to the NC-Ctl animals [3.51 (0.00-22.30) vs 1.99 (0.91-16.38) positive cells/10000 cells] (Figure 3B). Early NAC treatment may therefore mildly reduce proliferation and apoptosis in *Pkd1*^{cond/cond}; *Nestin*^{cre} mouse

kidneys.

Echocardiographic analyses

Echocardiographic measurements were performed in CY-NAC-Con, CY-Ctl, NC-NAC-Con and NC-Ctl mice at the age of 22 wk. The two cystic groups did not differ with respect to heart rate. Interestingly, an increased left ventricle ejection fraction (LVEF) was detected in the CY-NAC-Con group when compared to the CY-Ctl mice ($56.20 \pm 14.50\%$ vs $41.86 \pm 11.15\%$, $p < 0.05$) (Figure 4A and C). This finding was consistent with an equally increased left ventricle fractional shortening (LVFS) in the CY-NAC-Con animals ($29.55 \pm 9.30\%$ vs $20.58 \pm 6.38\%$, $p < 0.05$) (Figures 4B and C). These data reveal a significant beneficial effect of NAC early treatment on the systolic function of *Pkd1*-deficient cystic mice. It is important to observe, however, that such parameters were lower but not significant in CY-Ctl than NC-Ctl mice, and that NC-NAC-Con had a trend to LVEF and LVFS improvement when compared with NC-Ctl animals.

CY-NAC-Con animals showed a trend to lower ventricular mass (LVM) compared to CY-Ctl mice, which was not verified when normalized to BW (data not shown).

Fibrosis analyses in kidney and heart

Since fibrosis is a key component of ADPKD and ROS are thought to play a significant role in its progression, we also quantified the fibrotic area in kidneys and heart of 22-wk-old mice. CY-NAC-Con animals developed considerably lower renal fibrosis than their CY-Ctl counterparts [2.81% (2.03-9.13) vs 18.78% (12.08-48.23), $p < 0.05$] and similar values to NC-Ctl mice [2.55% (1.07 - 4.39)] (Figures 5A and C).

A significantly reduced area of heart fibrosis was also observed in CY-NAC-Con compared with CY-Ctl mice [0.99% (0.46-3.21) vs 15.30% (11.46-38.59), $p < 0.001$]. The reached value in the NAC-treated animals, in turn, was very close to the one detected in NC-Ctl mice [2.93% (1.66-3.93)] (Figures 5B and C). Our results strongly support anti-fibrotic effects of NAC early treatment upon kidneys and heart of *Pkd1*-deficient cystic mice.

Survival analysis

All CY-NAC-Con animals survived for the entire 22-wk period, displaying a significantly longer survival than the CY-Ctl mice (22.00 ± 0.00 vs 20.11 ± 0.66 wk,

$p=0.014$) (Figures 6A and B). A similar but non-significant trend was observed for the CY-NAC-Bir group (21.00 ± 0.95 wk). CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu animals, however, did not differ from the CY-Ctl group and presented lower survivals than the CY-NAC-Con mice (20.75 ± 0.70 wk, $p=0.005$; and 20.10 ± 0.81 wk, $p=0.008$; respectively) (Figure 6B). The non-cystic NC-Ctl and NC-NAC-Con animals survived the entire evaluated time (Figure 6A). These data suggest a systemic protective effect for early-life NAC administration in this *Pkd1*-deficient cystic mouse model.

Redox metabolism analyses

The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) at 22 wk was lower in CY-NAC-Con kidneys than in CY-Ctl organs [51.8 ($37.2-70.1$) vs 79.4 ($49.4-94.6$) nmol MDA/mg protein, $p<0.05$] (Figure 7A). The renal level of the antioxidant glutathione (GSH), in contrary, was higher in CY-NAC-Con mice compared with CY-Ctl animals [129.9 ($78.8-236.5$) vs 80.9 ($37.0-146.9$) $\mu\text{mol/mg}$ protein, $p<0.01$] (Figure 7B). NAC treatment determined, therefore, overall improvement of the redox status in the cystic *Pkd1*-deficient kidneys. Following the same pattern, the urinary excretion of nitric oxide (EU_{NO}) was higher in CY-NAC-Wea mice than in CY-Ctl animals [1.39 ($0.93-1.99$) vs 0.31 ($0.16-0.90$) mmol/g creatinine, $p<0.01$], and non-significant similar trends were observed for the CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir and CY-NAC-Adu groups (Figure 7C).

Body weight analysis

NAC effects on body growth were also evaluated. Notably, CY-NAC-Con mice showed lower BW than CY-Ctl animals at the three analyzed ages [16.7 g ($15.3-18.3$) vs 19.5 g ($18.4-21.4$) at 10 wk, $p<0.001$; 19.1 g ($18.0-20.6$) vs 23.4 g ($21.5-24.5$) at 15 wk, $p<0.001$; and 21.2 ($19.0-22.9$) vs 26.5 ($24.9-27.9$) g at 21 wk, $p<0.001$] (Figure 8A, Table 2). Similar differences were detected between CY-NAC-Con and NC-Ctl at 10 wk [vs 19.6 g ($17.6-21.8$), $p<0.001$], 15 wk [vs 23.8 g ($20.1-24.9$), $p<0.001$] and 21 wk [vs 26.7 g ($25.4-27.9$), $p<0.001$] (Figure 8A, Table 2). Significant differences between CY-NAC-Con and NC-NAC-Con were also detected at 10 wk [vs 19.3 g ($17.7-20.0$), $p<0.01$ and 21 wk vs 25.1 g ($22.8-27.6$), $p<0.01$], suggesting specificity of NAC effect on growth to CY mice.

A trend of a more intense effect of NAC on BW was observed for earlier initiated treatments. Significant BW difference was detected, in fact, between CY-NAC-Con and

CY-NAC-Wea mice at 10 wk [vs 19.3 g (17.7-20.1), $p<0.05$], 15 wk 22.1 g (21.3-23.6), $p<0.01$) and 21 wk vs 25.2 (23.0-26.0) g, $p<0.05$]; and between CY-NAC-Con and CY-NAC-Adu animals at 10 wk [vs 19.7 g (17.8-21.9), $p<0.001$, 15 wk vs 23.5 g (22.0-24.4), $p<0.001$ and 21 wk vs 24.9 (23.9-26.5) g, $p<0.05$] (Figure 8B, Table 2). Our data also revealed significantly reduced BW in the CY-NAC-Bir group compared with CY-Ctl and CY-NAC-Adu at 15 wk [19.3 g (18.2-22.0) vs 23.4 (21.5-24.5), $p<0.01$; and vs 23.5 g (22.0-24.4), $p<0.01$; respectively] and compared with CY-Ctl at 21 wk [23.4 (20.6-24.4) vs 26.5 (27.0-27.9) g, $p<0.01$] (Figure 8B, Table 2). The percentage gain weight, however, did not differ between all evaluated groups between 10-15 and 15-21 wk (data not shown).

Kidney, liver and heart weight analyses

Kidneys, liver and heart were removed at the age of 22 wk immediately after euthanasia. As expected, the total kidney weight (TKW) and the TKW/BW ratio were significantly higher in CY-Ctl than NC-Ctl mice [531.4 (483.5-699.5) vs 415.3 mg (374.9-497.2), $p<0.05$; and 0.019 (0.017-0.026) vs 0.015 g/g (0.014-0.016), $p<0.01$; respectively] (TKW/BW in Figure 9A). Liver weight (LW), LW/BW, heart weight (HW) and HW/BW, however, did not differ between the two groups.

NAC administration was followed by a trend of lower TKW in CY-NAC-Con and CY-NAC-Bir mice compared to CY-Ctl animals but it was not verified for TKW/BW (Figure 9B). CY-NAC-Con and CY-NAC-Bir mice, however, displayed lower LW than CY-Ctl animals, but the LW/BW differences did not reach significance (Figures 9B). All NAC-treated groups, on the other hand, did not differ from CY-Ctl mice with respect to HW or HW/BW (Figure 9B). Since a significant mortality rate was observed among the CY-Ctl animals, we constituted an additional CY-Ctl group not submitted to experimental manipulations up to 22 wk to avoid a potential bias of more severe phenotype exclusion. No relevant changes, however, were observed using this new CY-Ctl group in the analyses; CY-NAC-Con mice showed a lower HW compared to this new group, but such a difference did not remain significant after normalization to BW.

DISCUSSION

The mechanisms involved in ADPKD renal disease progression have been broadly analyzed in clinical and experimental studies since the identification of the *PKD1* and

PKD2 genes. Inflammation has been recognized as one of the key players in this process. More than a decade ago, a clinical study reported that ADPKD patients display a more activated pro-inflammatory system and a less activated anti-inflammatory system than matching controls.²¹ Inflammatory lipids present in the cyst fluid of human ADPKD kidneys, in addition, were shown to stimulate fluid secretion, renal epithelial cell proliferation and monocyte chemotaxis.²² In line with such observations, a later report described increased urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in ADPKD patients, a profile that can be detected even prior to a significant loss of renal function.²³ MCP-1 expression was also found to be increased in Han:SPRD-Cy rat kidneys.²⁴ More recently, Karihaloo et al showed that macrophage depletion reduced the cystic phenotype and improved renal function in a *Pkd1*-targeted mouse model.²⁵

This inflammatory environment, in turn, gives rise to interstitial fibrosis that gradually replaces the renal parenchyma, leading to progressive reduction in renal function. Early observations by Okada et al describe, in fact, progressive renal fibrosis in DBA/2-*pcy* mice,⁶ while the degree of fibrosis has been associated with ADPKD acceleration.²⁶ Moreover, the expression of the transforming growth factor- β (TGF- β) gene was found increased in human ADPKD kidneys⁷ and the TGF- β /Smad signaling elevated in *Pkd1* ortholog models.²⁷ Interestingly, treatment with methylprednisolone reduced interstitial fibrosis, attenuated kidney growth and preserved renal function in Han:SPRD *cy/+* rats and DBA/FG *pcy/pcy* mice.²⁸

ROS function as physiological molecular signals generated by the activation of macrophages and other leucocytes. However, in inflammatory, cancer and degenerative disorders, as well as in aging, the ROS levels significantly increase; in such conditions, if the endogenous antioxidant systems are overcome by the oxidant flow, tissue injury may occur. It has been long hypothesized, therefore, that oxidative stress might contribute to the progression of the renal disease in ADPKD. The rat model Han:SPRD *cy/+* was shown, in fact, to display higher levels of oxidized glutathione than their controls, to develop a worse kidney phenotype when submitted to glutathione depletion induced by buthionine sulfoximine,²⁹ and to present a decreased glutathione S-transferase urinary concentration.³⁰ Notably, heme-oxygenase-1 is up-regulated in Han:SPRD *cy* rat and *cpk* mouse kidneys, while glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase are down-regulated.¹¹ Treatment with probucol, moreover, reduced the cystic index, BUN and renal fibrosis in the non-orthologous mouse model BDF1-*pcy*.³¹ An elegant mechanistic insight to ROS

contribution to the progression of renal disease in ADPKD was its inhibition of PC2 channel activity in human syncytiotrophoblast.³²

The antioxidant N-acetylcysteine (NAC) is a source of sulfhydryl groups whose effects include the attenuation of endothelial dysfunction, inflammation and fibrosis, actions that translate into apoptosis prevention and increase in cell survival. Its renal protective effects include reduction in endothelial and tubular injury in mice,¹⁷ attenuation of kidney injury in rats induced by ischemia/reperfusion,³³ protection against renal injury following bilateral ureteral obstruction,³⁴ improvement of renal function in *Nrf2* knockout mice,³⁵ and attenuation of CKD in rats.¹⁶

All previously mentioned studies have addressed, however, the effects of limited time of NAC treatment upon different types of kidney aggression. No assessment of early, long-term treatment with NAC, therefore, had been performed on a systemic or renal level in any animal model of life-lasting disorders. In this scenario, the current work represents not only the first study to evaluate the effect of NAC on an animal cystic model orthologous to human ADPKD but also the first analysis of long-term NAC administration on the course of an animal model of life-lasting illness. Treatment with NAC was an effective antioxidant source in our cystic mice, decreasing the level of TBARS and increasing the level of GSH in their kidneys. ADPKD is also associated with reduced nitric oxide (NO) generation, an abnormality that hampers endothelium-dependent vasodilation.^{36,37} Interestingly, NAC treatment increased the urinary NO excretion in mice treated since weaning and likely in the other treated groups. In our mouse cystic model, therefore, the NAC-associated improvement in redox status also included increased NO generation.

The SUN reduction observed at different follow-up times in cystic mice treated since conception suggests a beneficial NAC effect on the course of renal function in this mouse model, which appears to depend on an early-life administration. Malnourishment was apparently not observed in CY-NAC-Con animals, ruling out this potential factor as the cause for lower SUN. However, since SUN was not significantly higher in cystic compared to non-cystic mice, a direct effect of NAC on the CY mouse nitrogen metabolism could contribute to this finding. No significant effects, however, were detected at the tubular function level, including renal concentrating capacity. Possible reasons for not having detected tubular functional differences and more clear SUN differences, particularly for the later NAC-starting groups, are the relatively mild and variable renal cystic and functional phenotypes

observed in this mouse line. The mosaic expression of nestin-Cre recombinase is a likely cause of such a phenotypic variation.³⁸

Analysis of the NAC actions on cystic kidney morphology included ultrasonographic evaluation at 22 wk of age. The CY-NAC-Con mice developed less renal cysts than their controls and showed a lower right kidney cystic index. Although a potential beneficial effect was seen on absolute kidney volume, no positive conclusion can be drawn since the findings were not confirmed when normalized by the animal body weight. It must be noted that the kidney weight also did not differ between NAC-treated and non-treated mice when normalized to the body weight. The renal ultrasonographic findings suggest, therefore, a significantly beneficial NAC effect on renal cystogenesis and a likely mildly positive effect on cyst growth. It is important to consider, however, that the mild and relatively variable kidney phenotype presented by the *Pkd1*^{cond/cond};*Nestin*^{cre} mice may have also limited the potential magnitude of NAC treatment actions and prevented a significant effect on kidney weight/volume.

Our mouse model reproduced the renal interstitial fibrosis observed in human ADPKD. Notably, cystic mice treated with NAC since conception displayed remarkably lower renal fibrosis, reaching levels equivalent to non-cystic animals. In support to these findings, NAC treatment has also led the kidney cell proliferation and apoptotic rates to levels similar to non-cystic control mice. These data reveal a potent anti-fibrotic effect of NAC in *Pkd1*-deficient cystic mice when treatment is initiated early in life, an effect that is accompanied by a likely reduction in renal parenchyma cell proliferation and apoptosis.

Cardiovascular disorders constitute the main cause of mortality in ADPKD.^{39,40} Notably, *PKD* mutations, particularly *PKD2* mutations, have been associated with the development of heart failure.⁴¹ NAC, in turn, has been previously shown to replace cardiac glutathione and to reduce left ventricle dysfunction and remodeling in a rat model of hypertension,⁴² while its supplementation prevented left ventricle hypertrophy in mice subjected to aortic constriction.⁴³ Our echocardiographic analyses revealed increased left ventricle ejection fraction and left ventricle fractional shortening in CY-NAC-Con mice compared with their appropriate controls, indicating a NAC beneficial effect on systolic function in *Pkd1*-deficient cystic mice. The fact that non-cystic animals treated with NAC showed a trend of higher values of such parameters compared with their non-treated NC controls suggests, in turn, that it is possible that this NAC effect may occur even in a non-disease setting. No effect on CY-NAC-Con

heart weight/body weight, however, was detected. The results obtained in the cystic mice are in line with the significant decrease in heart fibrosis observed in NAC-treated compared to non-treated cystic mice, an effect that was able to return this parameter to levels similar to non-cystic animals. These data support a dramatic anti-fibrotic effect of NAC early treatment on the heart of cystic mice.

Systemic effects of NAC on cystic mice were evaluated. Surprisingly, treatment initiated at conception significantly increased survival of cystic mice, a trend also observed when such animals were treated from the birth. These findings suggest a NAC beneficial effect on the comprehensive *Pkd1*-deficient phenotype. This systemic protective effect is likely the translation of NAC actions at different levels, including heart and kidneys, and is probably causatively related to the long-term increase in antioxidant activity and scavenging of free radicals. Other potential effects of NAC previously described, however, may also contribute to the animal systemic improvement, such as increased NO generation, increased Klotho expression and decreased inflammation.⁴⁴

Another remarkable systemic finding of our study was the reduction in body growth/weight imposed by early, long-term NAC treatment in *Pkd1*-deficient cystic mice. This effect was not followed by deleterious consequences, since such animals survived longer than the non-treated cystic controls, presented improvement in renal and cardiac phenotypes and showed no signs of malnourishment. Interestingly, the same effect was not detected in non-cystic mice and no previous study has reported similar findings in any other disease or healthy animal model. The observed effect appears, therefore, to show specificity to the *Pkd1*-deficient background. The potential connection between *Pkd1* deficiency and NAC, however, is unclear at the moment. Possible links could include endocrine and cell proliferation disorganization induced by too early inhibition of ROS formation in the setting of *Pkd1* deficiency. Potential effects on food intake or metabolic rate also need to be investigated. To address this issue, it is important to evaluate the effects of early, long-term NAC treatment on animal models with other profiles of *Pkd1* deficiency.

Our data support, therefore, that early and chronic treatment with NAC leads to increased survival and improvement of renal and cardiac phenotypes in *Pkd1*-deficient cystic mice. Our findings also demonstrate a non-deleterious NAC effect on reducing body growth in this animal model. Whether all of these described NAC effects are determined by decreased oxidative stress, however, is currently unknown. Our results

open, therefore, a potentially meaningful and robust line of investigation to intervene in renal, extrarenal and systemic phenotypes associated with ADPKD.

CONCISE METHODS

Mouse model and treatment with N-acetylcysteine

By breeding a *Pkd1* floxed allele and a nestin-Cre transgene mouse lines, we have generated animals homozygous for this conditional allele and hemizygous for the referred transgene (*Pkd1*^{cond/cond}.*Nestin*^{cre}; CY). These mice displayed a mosaic pattern of *Pkd1* gene inactivation, via the excision of the exons 2-4,¹⁹ and reproduced the renal and hepatic cystic phenotypes observed in human ADPKD. Non-cystic *Pkd1*^{cond/cond} littermates (NC) were used as controls. This study was performed in accordance with international standards of animal care and experimentation.

The mice were housed in plastic cages and kept at ~22°C, 50-60% relative humidity and a 12-h light/dark cycle, and were provided with standard lab chow and drinking water or NAC-containing solution *ad libitum*, during the entire experimental period. Four CY animal groups and one NC control group were constituted according to the moment of NAC treatment initiation: at conception (CY-NAC-Con and NC-NAC-Con); at birth (CY-NAC-Bir); at weaning (CY-NAC-Wea); and at eight wk of age (CY-NAC-Adu). Two additional non-treated control groups were formed: cystic mice (CY-Ctl) and non-cystic animals (NC-Ctl). In the CY-NAC-Con, NC-NAC-Con and CY-NAC-Bir groups, NAC was orally administered to the mother at 12 mg/mL until puppy weaning (3 wk); after this period, NAC was directly supplemented in drinking water at 10 mg/mL. In the CY-NAC-Wea, and the CY-NAC-Adu groups, NAC was administered in drinking water at 10 mg/mL for the entire treatment period. At 22-wk old, animals were euthanized under thiopental anesthesia (80 µg/g BW) and the kidneys, heart and liver were collected for further analysis.

Biochemical determinations

Blood samples were drawn by retro-orbital bleeding. Four hours (h) after this procedure the animals were weighted and housed for 24 h for urine collection, without food and water. The samples were allowed to clot and centrifuged to obtain serum. SUN was determined according to Crocker's protocol (Celm, Barueri, Brazil) whereas S_{Cr} and

urine creatinine (U_{Cr}) were measured using a colorimetric assay (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). FE_{Na} was calculated following the equation $FE_{Na} = (U_{Na} \times S_{Cr}) / (S_{Na} \times U_{Cr}) \times 100$, where U_{Na} is urine Na^+ and S_{Na} serum Na^+ . Renal concentrating capacity was analyzed by determining U_{osmMax} . The animals were kept in the metabolic cage for additional 8 h (with food but no water) following the previous 24-h urine collection time, totalizing 32 h. This period was followed by a subcutaneous injection of desmopressin (DDAVp; 1.0 μ g/kg BW) and return to the metabolic cage. After 10 h the mice were weighed and urine was collected to measure U_{osm} using a Vapro 5500 vapor osmometer (Wescor, Logan, USA). Determinations were performed at 10, 15 and 21 wk of age.

Redox metabolism evaluation

Renal concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS): Immediately after its removal, half of the right kidney was repeatedly washed in a 20 mM potassium phosphate, pH 7.4 cold solution. The renal tissue was weighed and homogenized, a procedure followed by determination of protein concentration using the Bradford method. One mL of 17.5% trichloroacetic (TCA) acid was added to 1.0 mL of homogenate containing 1.0-1.8 mg of protein and set on ice. One mL of 0.6% thiobarbituric acid, pH 2.0 was added, the homogenate was set at 100°C for 15 min, and immediately returned to ice. One mL of 70% TCA was then added to this mixture, followed by incubation at room temperature for 20 min and centrifugation at 400 g for 15 min. The supernatant optical density was determined thereafter using a spectrophotometer at a 534-nm wavelength. The quantification of lipid peroxidation products was calculated using the molar extinction coefficient equivalent to malondialdehyde, utilized for the malonaldehyde/ thiobarbituric acid complex, and normalized to protein content.⁴⁵

Renal concentration of glutathione: Following its removal, renal tissue was repeatedly washed in a 100 mM sodium phosphate, pH 7.0 cold solution. The tissue was weighted, macerated and blotted on filter paper. Five percent dihydrated 5-sulphosalicylic acid was then added in a 250 μ L/10 mg of tissue proportion, the paper was removed and the sample was homogenized. The homogenate was centrifuged for 10 min at 16000 g and 4°C, and the cleared supernatant set apart and kept on ice. The glutathione

quantification was then performed using an ELISA assay, according to the manufacturer's instructions (*Glutathione Fluorescent Detection kit*; Arbor Assays, Michigan, USA).

U_{ENO} was determined by chemiluminescence using an NO analyzer (NOA280; Stevers Instruments, Boulder, USA).

Renal ultrasonographic evaluation

Renal ultrasonographic analysis was performed using the Vevo 2100® device (Visual Sonics® company) with a 40 mHz transducer, in 22-wk old mice. Anesthesia was performed by placing the animal in a closed chamber ventilated with a titratable mixture of oxygen and isoflurane. The mouse was then placed on a 40°C-heated plate at ventral decubitus, with its cranial end inserted in a tube with continuous provision of isoflurane. During the procedure, heart rate and electrocardiographic curve were continuously monitored aiming a target around 350 beats per minute. Once initiated anesthesia maintenance, the animal was subjected to trichotomy at the dorsal region. From this stage, bidimensional images were acquired in each kidney and the measures of the three axis were calculated. A scan was performed in each kidney thereafter, including 200 images acquired in axial cut within 3-s periods, starting just before the kidney superior pole and ending just after the inferior renal pole. Such images served as the basis to the calculation of cyst number in each kidney, as well as to cyst diameter measurement.

The analysis of the acquired images comprised two phases. The first one aimed to obtain the renal volume, a task that employed the measures of the three kidney axis and the application of a modified ellipsoid volume.⁴⁶ The second phase was based on individual analyses of the cysts detected by each kidney's axial scan. Each of the detected cysts was submitted to diameter measurement. Assuming that the cysts present a spherical configuration, their volumes were calculated. For each kidney, the total number of cysts and cyst's individual volumes were obtained. The renal cystic index was then calculated, as the ratio between the sum of all cyst volumes of a given kidney (or both kidneys) and the total volume of the same organ/organs (expressed as percentage).

Echocardiographyc evaluation

The echocardiographic analyses were performed using the same ultrasound equipment applied to renal evaluation. This analysis followed the same basic procedures previously described, but in echocardiography the animal position is supine on the hot plate and the mouse is submitted to chest trichotomy. M-mode echocardiographic images were obtained from parasternal short-axis view and the following parameters were studied: heart rate (HR), septum in diastole (IVSD, mm), LV internal diameter in diastole (LVDD, mm) and in systole (LVSD, mm), and posterior wall in diastole (LVPWD, mm). All morphological indices were corrected by BW. The following parameters were calculated thereafter: LV ejection fraction (LVEF, %), LV fractional shortening (LVFS, %) and LV mass/BW, as previously described.^{47,48}

Histological preparation and organ weight quantification

At the age of 22 wk, mice were anesthetized with intraperitoneal sodium pentobarbital (80 µg/g BW) and submitted to thoracotomy, insertion of a needle in the left ventricle, and a right atrial cut to drain the blood. This procedure was followed by whole-body perfusion with saline solution using the Minipuls3 pump (Gilson, Middletown, USA) at 2.5 mL/min until complete exsanguination and immediate perfusion with Millonig formalin, modified by Carlson. Organs were immediately removed and weighed. The left kidney, liver and heart were fixed *in situ* with 4% buffered paraformaldehyde, paraffin embedded, and sectioned at 3 µm. Tissue sections were mounted on slides and stained using hematoxylin-eosin (HE) and Sirius red.

Immunohistochemistry

Incubation with the primary antibodies was carried out overnight at 4°C in serial sections. A monoclonal antibody to Ki-67 (ab16667, ABCAM, Cambridge, USA) was used. A control section was incubated with PBS instead of the respective primary antibodies, showing negative or negligible staining in proximal tubules. Ki-67 analyses included the evaluation of eight fields representing renal cortex and two located in the renal medulla for each mouse. The quantification of Ki-67 positiveness was performed under light microscopy at x400 magnification and the results expressed as number of positive cells/1000 cells ratios.

Analyses of apoptosis were performed using the Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore Temecula/CA,USA). Positive controls were carried out in spleen tissue sections, while negative controls were incubated without TdT. Ten different fields were evaluated for each section. The quantification of TUNEL-positive nuclei followed the same protocol applied for Ki-67.

Renal fibrosis evaluation

Kidney and heart sections were submitted to 0.2% Sirius red (Direct Red 80, Milwaukee, EUA). The stained slides were analyzed in an optical microscope equipped with a light polarizer coupled to an image analyzer. The system consisted in a photographic camera coupled with an Olympus BX-51 microscope, which provided images on a monitor. Twenty x400-magnification fields were randomly digitized in each kidney or heart slide. Such images were processed thereafter using the Image ProPlus 6.0 software, allowing collagen quantification by the selection of red, orange or green birefringent tonalities. The results are provided as collagen content area/total area ratios.⁴⁹

Statistical analyses

Continuous data are expressed as mean±SD or median (25th-75th percentiles) according to normal or non-normal distribution, respectively. When comparing two groups, continuous data were analyzed using Student *t* test or Mann-Whitney test as appropriate. Comparisons among more than two groups were performed using Analysis of Variance for independent samples with Student-Newman-Keuls post-test, for normally distributed variables, or Kruskal-Wallis with Dwass-Steel-Christchlow-Fligner post-test, for

parameters that were not normally distributed. Comparisons among more than two times were performed using Analysis of Variance for dependent samples with Student-Newman-Keuls post-test, for normally distributed variables, or Friedman's test followed by Tukey's post-test, for parameters not normally distributed. Two-way ANOVA was applied in comparisons involving normal distribution parameters and a dependent and independent approach. Comparisons between groups involving categorical data were performed with Pearson's Chi-square test, with data expressed as absolute frequency and percentage. Survival was analyzed by the Kaplan-Meier method, with Log-Rank evaluation. Statistical analysis was performed with the SPSS 19.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Significance was applied for p values associated with an α risk $\leq$ 5%.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Torres VE, Harris PC: Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 76: 149-168, 2009
2. Harris PC, Torres VE: Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 60: 321-337, 2009
3. Perrone RD, Ruthazer R, Terrin NC: Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis* 38: 777-784, 2001
4. Pirson Y: Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 173-180, 2010
5. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S: Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 118-130, 2010
6. Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG: Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* 58: 587-597, 2000
7. Song X, Di Giovanni V, He N, Wang K, Ingram A, Rosenblum ND, Pei Y: Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational

identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks. *Hum Mol Genet* 18: 2328-2343, 2009

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

9. Merta M, Zima T, Stípek S, Crkovská J, Pláteník J: Lipid peroxidation and activity of superoxide dismutase in ADPKD. *Contrib Nephrol* 115: 109-112, 1995

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

11. Maser RL, Vassmer D, Magenheimer BS, Calvet JP: Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 991-999, 2002

12. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M: Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6-20, 2003

13. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J: The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6: 593-597, 1989

14. Pocernich CB, Cardin AL, Racine CL, Lauderback CM, Butterfield DA: Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochem Int* 39: 141-149, 2001

15. Trimarchi H, Mongitore MR, Baglioni P, Forrester M, Freixas EA, Schropp M, Pereyra H, Alonso M: N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients--a pilot study. *Clin Nephrol* 59: 441-446, 2003

16. Shimizu MH, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LF, Seguro AC: N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int* 68: 2208-2217, 2005

17. Di Giorno C, Pinheiro HS, Heinke T, Franco MF, Galante NZ, Pacheco-Silva A, Camara NO: Beneficial effect of N-acetyl-cysteine on renal injury triggered by ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 38: 2774-2776, 2006

18. Shillingford JM, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T: Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol* 21: 489-497, 2010

19. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG: A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* 15: 3035-3043, 2004
20. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K, Guggino W, Monaco L, Germino GG: Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 6: 1267-1273, 2000
21. Merta M, Tesar V, Zima T, Jirsa M, Rysavá R, Zabka J: Cytokine profile in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochem Mol Biol Int* 41: 619-624, 1997
22. Grantham JJ, Schreiner GF, Rome L, Grenz L, Joly A: Evidence for inflammatory and secretagogue lipids in cyst fluids from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Proc Assoc Am Physicians* 109: 397-408, 1997
23. Zheng D, Wolfe M, Cowley BD Jr, Wallace DP, Yamaguchi T, Grantham JJ: Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 14: 2588-2595, 2003
24. Cowley BD Jr, Ricardo SD, Nagao S, Diamond JR: Increased renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 and osteopontin in ADPKD in rats. *Kidney Int* 60: 2087-2096, 2001
25. Karihaloo A, Koraihy F, Huen SC, Lee Y, Merrick D, Caplan MJ, Somlo S, Cantley LG: Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 1809-1814, 2011
26. Norman J: Fibrosis and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Biochim Biophys Acta* 1812: 1327-1336, 2011
27. Hassane S, Leonhard WN, van der Wal A, Hawinkels LJ, Lantinga-van Leeuwen IS, ten Dijke P, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ: Elevated TGFbeta-Smad signalling in experimental Pkd1 models and human patients with polycystic kidney disease. *J Pathol* 222: 21-31, 2010
28. Gattone VH 2nd, Cowley BD Jr, Barash BD, Nagao S, Takahashi H, Yamaguchi T, Grantham JJ: Methylprednisolone retards the progression of inherited polycystic kidney disease in rodents. *Am J Kidney Dis* 25: 302-313, 1995
29. Torres VE, Bengal RJ, Litwiller RD, Wilson DM: Aggravation of polycystic kidney disease in Han:SPRD rats by buthionine sulfoximine. *J Am Soc Nephrol* 8: 1283-1291, 1997

30. Wiedmeyer CE, Royal AB: Urinary biomarkers for monitoring disease progression in the Han:SPRD-cy rat model of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Comp Med* 60: 448-454, 2010
31. Nagao S, Yamaguchi T, Kasahara M, Kusaka M, Matsuda J, Ogiso N, Takahashi H, Grantham JJ: Effect of probucol in a murine model of slowly progressive polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 35: 221-226, 2000
32. Montalbetti N, Cantero MR, Dalghi MG, Cantiello HF: Reactive oxygen species inhibit polycystin-2 (TRPP2) cation channel activity in term human syncytiotrophoblast. *Placenta* 29: 510-518, 2008
33. Nitescu N, Ricksten SE, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S, Guron G: N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1240-1247, 2006
34. Shimizu MH, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TR, Seguro AC: N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 23: 3067-3073, 2008
35. Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H: Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int* 76: 277-285, 2009
36. Wang D, Iversen J, Wilcox CS, et al. Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 64: 1381-1388, 2003
37. Kocaman O, Oflaz H, Yekeler E, et al. Endothelial dysfunction and increased carotid intima-media thickness in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 43: 854-860, 2004
38. Chen J, Boyle S, Zhao M, Su W, Takahashi K, Davis L, Decaestecker M, Takahashi T, Breyer MD, Hao CM: Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol* 17: 1283-1291, 2006
39. Ecker T, Schrier RW: Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5: 221-228, 2009
40. Helal I, Reed B, Mettler P, Mc Fann K, Tkachenko O, Yan XD, Schrier RW: Prevalence of cardiovascular events in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Nephrol* 36: 362-370, 2012
41. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IY, Yuan S, Sun Z, Harris PC, Torres VE,

- Ehrlich BE: Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 58: 199-208, 2013
42. Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, Cailleret M, Bourin MC, Badoual T, Su JB, Adubeiro S, Roudot-Thoraval F, Dubois-Rande JL, Hittinger L, Pecker F: N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats. *Circulation* 110: 2003-2009, 2004
43. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM: Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 93: 802-805, 2003
44. Shimizu MH, Volpini RA, de Bragança AC, Campos R, Canale D, Sanches TR, Andrade L, Seguro AC: N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. *Exp Gerontol* 48: 298-303, 2013
45. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979
46. Nishiura JL, Neves RF, Elo SR, Cintra SM, Ajzen SA, Heilberg IP: Evaluation of nephrolithiasis in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 838-844, 2009
47. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C: Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr* 6: 41-46, 2005
48. Ramires FJ, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, Martins DG, Billate A, Neto EC, Mady C: Aldosterone antagonism in an inflammatory state: evidence for myocardial protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 162-167, 2006
49. Farris AB, Adams CD, Brousaides N, Della Pelle PA, Collins AB, Moradi E, Smith RN, Grimm PC, Colvin RB: Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol* 22: 176-186, 2011

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isac de Castro, Ph.D., for his valuable help in the statistical analyses, and Walcy P. Teodoro, Ph.D., for technical help. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 2010/17424-0 to LFO), Coordenação de Aprimoramento de Pessoal de Nível Superior (grant to ZPM), and Laboratórios de

Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. This study utilized resources provided by the NIDDK sponsored Johns Hopkins Polycystic Kidney Disease Research and Clinical Core Center (grant P30DK090868).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Comparative SUN analysis in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con mice, at 10, 15 and 21 weeks of age. (B) Comparative SUN analysis in CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu animals, at 10, 15 and 21 weeks of age. ‡‡p<0.01 *versus* NC-NAC-Con. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 *versus* CY-Ctl. The groups were compared using the ANOVA test, and data were presented as mean±SD (Table 1).

Figure 2. (A) Number of kidney cysts by ultrasound examination in both kidneys (TK), right kidney (RK) and left kidney (LK), in CY-Ctl and CY-NAC-Con mice. (B) Kidney cystic index (%) in both kidneys, right kidney and left kidney, in CY-Ctl and CY-NAC-Con animals. (C) Representative ultrasonographic images of CY-Ctl (a) and CY-NAC-Con (b) kidneys on longitudinal section. *p<0.05; **p<0.01 *versus* CY-Ctl. A and B comparisons were carried out using the Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test, with data presented as median and interquartile range.

Figure 3. (A) Comparative analysis of Ki-67 staining (n/1,000 cells) in the NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con groups at 22 weeks of age. (B) Comparative analysis of TUNEL staining (n/10,000 cells) in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con mice at 22 weeks of age. The comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test, with data presented as median and interquartile range.

Figure 4. Echocardiographic analyses. (A) Comparative analysis of left ventricle ejection fraction (%) in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con mice at 22 weeks of age. (B) Comparative analysis of left ventricle shortening fraction (%) in the NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con groups at 22 weeks of age. (C) Representative M-mode echocardiograms assessing left ventricle function in the

groups NC-Ctl (a), NC-NAC-Con (b), CY-Ctl (c) and CY-NAC-Con (d). * $p < 0.05$ *versus* CY-Ctl. Comparisons in A and B have been conducted with ANOVA, with data expressed as mean $\pm$ SD.

Figure 5. (A) Comparative analysis of area of interstitial fibrosis assessed by Sirius red staining (%) in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con kidneys at the age of 22 weeks. (B) Comparative analysis of area of fibrosis assessed by Sirius red staining (%) in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con hearts at 22 weeks of age. (C) Representative photomicrographs of kidney (a-d) and heart tissues (e-h) showing different degrees of fibrosis, assessed by Sirius red staining, in NC-Ctl (a, e), NC-NAC-Con (b, f), CY-Ctl (c, g) and CY-NAC-Con (d, h) mice. Original magnification $\times 400$. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ *versus* CY-Ctl; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$ *versus* NC-Ctl; ‡‡ $p < 0.01$; ‡‡‡ $p < 0.001$ *versus* NC-NAC-Con. The groups were compared using the Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test, with data expressed as median and interquartile range.

Figure 6. Survival curve analysis. (A) Cumulated survival for the NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con groups. (B) Cumulated survival for the CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu groups. Comparisons between groups were performed using Log-rank test.

Figure 7. Oxidative stress analyses. (A) Lipid peroxidation (TBARS) levels in CY-Ctl and CY-NAC-Con kidneys, at the age of 22 weeks. (B) Glutathione (GSH) levels in CY-Ctl and CY-NAC-Con kidneys, at 22 weeks of age. (C) Urinary excretion of nitric oxide (EU_{NO}) in the CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu groups, at 22 weeks of age. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *versus* CY-Ctl. Groups in A and B were compared using the Mann Whitney test, with data expressed as median and interquartile range. Groups in C were compared using the Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test, with data presented as median and interquartile range.

Figure 8. Body weight analyses. (A) Comparative analysis of body weight in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con mice, at 10, 15 and 21 weeks of age. (B) Comparative analysis of body weight in CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu groups, at 10, 15 and 21 weeks of age. * $p < 0.05$;

p<0.01; *p<0.001 *versus* CY-Ctl; †p<0.05; ††p<0.01, †††p<0.001 *versus* NC-Ctl; ‡p<0.05; ‡‡p<0.01 *versus* NC-NAC-Con; ^ap<0.05; ^{aa}p<0.01, ^{aaa}p<0.001 *versus* CY-NAC-Con; ^{bb}p<0,01 *versus* CY-NAC-Bir. The comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test, with data expressed as median and interquartile range (Table 2).

Figure 9. Organ weight analyses. (A) Comparative analysis of total kidney weight, liver weight and heart weight, normalized to body weight (TKW/BW, LW/BW, HW/BW, respectively) in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl and CY-NAC-Con groups at 22 weeks of age. (B) Comparative analysis of total kidney weight, liver weight and heart weight, normalized to body weight (TKW/BW, LW/BW, HW/BW, respectively) in CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu groups at 22 weeks of age. †p<0.05; ††p<0.01 *versus* NC-Ctl; ‡p<0.05; ‡‡p<0.01 *versus* NC-NAC-Con. The groups were compared using the Kruskal-Wallis Test with Muller-Dunn post-test, with data expressed as median and interquartile range.

Table 1: SUN in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu animals, at 10, 15 and 21 weeks of age

SUN (mg/dL)							
Week	NC-Ctl	NY-NAC-Con	CY-Ctl	CY-NAC-Con	CY-NAC-Bir	CY-NAC-Wea	CY-NAC-Adu
10	27.4 ± 4.1 (n=12)	23.2 ± 6.6 (n=11)	30.0 ± 5.5 (n=18)	20.8 ± 5.9** (n=16)	25.8 ± 10.3 (n=10)	20.7 ± 8.0** (n=16)	24.6 ± 6.2 (n=16)
15	26.2 ± 3.5 (n=9)	25.7 ± 8.1 (n=9)	26.9 ± 7.4 (n=17)	21.6 ± 9.1 (n=16)	21.8 ± 8.8 (n=10)	22.2 ± 6.1 (n=15)	22.4 ± 4.2 (n=12)
21	28.5 ± 7.0 (n=12)	22.5 ± 7.2 (n=11)	32.2 ± 12.0 ‡‡ (n=18)	20.9 ± 7.6*** (n=16)	20.8 ± 6.1** (n=8)	22.8 ± 6.0** (n=13)	19.9 ± 3.0*** (n=10)

SUN was compared using the AQNOVA test
‡‡ p<0.01 *versus* NC-Ctl
*p<0.05 *versus* CY-Ctl;
**p<0.01 *versus* CY-Ctl;
***p<0.001 *versus* CY-Ctl.

Table 2: Body weight in NC-Ctl, NC-NAC-Con, CY-Ctl, CY-NAC-Con, CY-NAC-Bir, CY-NAC-Wea and CY-NAC-Adu animals, at 10, 15 and 21 weeks of age

Week	NC-Ctl	NY-NAC-Con	BW (g)				
			CY-Ctl	CY-NAC-Con	CY-NAC-Bir	CY-NAC-Wea	CY-NAC-Adu
10	19.6 (17.6 to 21.8) (n=12)	19.3 (17.7 to 20.0) (n=11)	19.5 (18.4 to 21.4) (n=23)	16.7†††††*** (15.3 to 18.3) (n=16)	18.8 (16.4 to 20.0) (n=10)	19.3 ^a (17.7 to 20.1) (n=16)	19.7 ^{aaa} (17.8 to 21.9) (n=16)
15	23.8 (20.1 to 24.9) (n=9)	22.0 (20.1 to 22.4) (n=9)	23.4 (21.5 to 24.5) (n=17)	19.1†††††*** (18.0 to 20.6) (n=16)	19.3** (18.2 to 22.0) (n=10)	22.1 ^{aa} (21.3 to 23.6) (n=15)	23.5 ^{aaabb} (22.0 to 24.4) (n=12)
21	26.7 (25.4 to 27.9) (n=12)	25.1 (22.8 to 27.6) (n=11)	26.5 (24.9 to 27.9) (n=18)	22.1†††††*** (19.0 to 22.9) (n=16)	23.4** (20.6 to 24.4) (n=8)	25.2 ^a (23 to 26) (n=13)	24.9 ^a (23.9 to 26.5) (n=10)

The comparisons were performed using the Kruskal-

Wallis test with Dwass-Steel-Christchlow-Fligner post-test

†††p<0.001 *versus* NC-Ctl;

*p<0.05 *versus* CY-Ctl;

**p<0.01 *versus* CY-Ctl;

***p<0.001 *versus* CY-Ctl;

††p<0.01 *versus* NC-NAC-Con;

^ap<0.05 *versus* CY-NAC-Con;

^{aa}p<0.01 *versus* CY-NAC-Con;

^{aaa}p<0.01 *versus* CY-NAC-Con;

^{bb}p<0,01 *versus* CY-NAC

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

A

B

FIGURE 7

A

B

C

FIGURE 8

A

B

FIGURE 9

A

B

Mechanisms of progression in autosomal dominant polycystic kidney