Jonathan Mackowiak da Fonseca

**O crescimento cístico renal é o principal determinante
para o desenvolvimento de hipertensão e déficit de
concentração em camundongos com
deficiência do gene *Pkd1***

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, Jonathan Mackowiak da

O crescimento cístico renal é o principal determinante para o desenvolvimento de hipertensão e déficit de concentração em camundongos com deficiência do gene *Pkd1* / Jonathan Mackowiak da Fonseca. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante 2.Doenças renais císticas 3.Mutação 4.Hipertensão 5.Sistema renina-angiotensina 6.Capacidade de concentração renal 7.Óxido nítrico

USP/FM/DBD-334/12

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular, LIM 29, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílios 2009/10748-7 (bolsa de mestrado) e 2010/17424-0 (auxílio regular).

À minha mãe, Ivone Izabel Mackowiak da Fonseca, pelo amor, zelo, por ter me apresentado o fascinante mundo da pesquisa e pela abnegação de seus sonhos em favor de seus filhos.

Ao meu pai, Pedro Paulo da Fonseca, que dedicou sua vida aos filhos, ensinando-nos a ter dignidade, respeito e esperança. Todas as minhas conquistas tem sua participação devido ao apoio incondicional que me concedeu.

Ao meu irmão, David Mackowiak da Fonseca, por ser o meu grande e verdadeiro amigo em todos os momentos e pela vibração em minhas conquistas.

À minha companheira, Marina Pellini Silva, pela compreensão nos momentos difíceis, risadas nos fáceis e apoio incondicional em todas as minhas decisões. A sua companhia me deu forças para continuar em busca dos meus ideais. Amo você!

"Aprendi que o amor chega na hora exata. Que a maturidade vem aos poucos. Que família é tudo. Que amigos bons e sinceros são poucos. Que cuidar da sua vida é sempre a melhor opção. Que dias melhores sempre virão. Que na vida, nem tudo vale a pena. E principalmente que minha felicidade depende das escolhas que eu faço. Nesta vida nada se leva, só se deixa."
Autor desconhecido

*Ao meu orientador Professor **Luiz Fernando Onuchic**, responsável pela minha formação científica, que esteve presente em todos os momentos com ensinamentos, críticas sempre muito enriquecedoras e motivação nos momentos difíceis. Sempre muito zeloso, indagador, com uma postura ética exemplar, guiou meus passos em todas as atividades. Um grande profissional e pessoa que eu tenho profunda admiração. Obrigado pela confiança e apoio!*

*À minha grande amiga **Ana Paula Almeida Bastos**, pelos ensinamentos, conselhos, apoio, motivação, e principalmente pelos momentos de alegria e descontração que compartilhamos. Serei eternamente grato por tudo!*

*À minha grande amiga **Zenaide Providello Moysés**, pelo companheirismo, paciência, apoio, risos e experiências compartilhadas. Uma verdadeira amizade! Muito obrigado!*

*Aos amigos, **Andressa, Crysthiane, Willian, Bruno, Elieser, Fernanda, Diego, Frederico, Michele, Ane Cláudia**, pelo apoio, confiança, paciência, e pelos muitos momentos de descontração em todo esse período.*

Aos colegas do LIM-29, Dra. Irene, Cléo, Rodrigo, Humberto, Filipe, Alexandre, Luciana, Pamela, Carina e Amanda, pela amizade, apoio e compartilhamento de momentos muito agradáveis.

À Profa. Maria Cláudia Irigoyen, que disponibilizou o seu laboratório e equipamentos para a realização dos experimentos de aferição da pressão arterial e ao técnico Leandro Souza que realizou estes experimentos.

Aos Profs. Gregory Germino e Terry Watnick, pela intensa colaboração nas discussões, sugestões e esclarecimentos em torno deste trabalho.

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

À Dra. Denise Malheiros, médica patologista, pelo auxílio nas análises morfológicas deste trabalho.

Às Prof^{as}. Dulce Elena Casarini e Mirian Boim, da Escola Paulista de Medicina, pela generosa ajuda concedendo reagentes para os ensaios imunoistoquímicos.

Ao Dr. Isac de Castro pelas críticas pertinentes a respeito desse trabalho e pelo apoio na realização das análises estatísticas.

Aos funcionários do Centro de Bioterismo da FMUSP pela colaboração, pelo fornecimento dos animais e pelo espaço concedido.

*Aos **ANIMAIS** utilizados neste estudo, que permitiram a elucidação de uma importante fisiopatologia relacionada à DRPAD, doença com grande impacto na sociedade.*

*A **Deus**, pela sua graça, bondade, que estão sempre presentes, sustentando-me e guiando-me em todos momentos.*

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Siglas.....	ix
Lista de Símbolos.....	xv
Resumo.....	xviii
Summary.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Epidemiologia.....	02
1.2 Manifestações clínicas.....	03
1.3 Genética e Bases Moleculares da DRPAD.....	06
1.4 Mecanismo da Formação Focal de Cistos na DRPAD.....	10
1.5 Vias de Sinalização Envolvidas na Patogênese da DRPAD.....	12
1.6 Papel da Secreção de Fluido na Formação Cística.....	17
1.7 O Cílio Apical Primário na DRPAD.....	19
1.8 Hipertensão Arterial Sistêmica Associada à DRPAD.....	20
1.9 Déficit de Concentração Renal Associado à DRPAD.....	27
2 OBJETIVOS.....	29

3	MÉTODOS.....	32
3.1	Modelos de Camundongos.....	33
3.2	Grupos Experimentais.....	39
3.3	Análises de Formação Cística e Histologia.....	40
3.4	Aferição Direta da Pressão Arterial Média.....	41
3.5	Determinações Bioquímicas.....	43
3.5.1	<i>Análises Indiretas da TFG</i>	43
3.5.2	<i>Análises de Função Tubular</i>	43
3.5.3	<i>Análise da Capacidade de Concentração Renal</i>	44
3.5.4	<i>Análise da Excreção Urinária de Metabólitos de Óxido Nítrico</i>	44
3.6	Determinação das Concentrações Plasmáticas de Renina e Vasopressina e Sérica de Aldosterona.....	44
3.7	RT-PCR em Tempo Real.....	46
3.8	Análises Imunoistoquímicas.....	47
3.8.1	<i>Análise Imunoistoquímica da Expressão Renal de ECA e AT1R</i>	47
3.8.2	<i>Análise Imunoistoquímica de Proliferação Celular</i>	49
3.8.3	<i>Análise Imunoistoquímica de Apoptose Celular</i>	50
3.9	Análise Estatística.....	51

4	RESULTADOS.....	52
4.1	Camundongos <i>Pkd1</i> ^{cond/cond} :Bal ^{cre} e <i>Pkd1</i> ^{+/-} : Fenótipos Renais.....	53
4.2	Análises da Pressão Arterial Média.....	58
4.3	Análises Indiretas da TFG.....	60
4.4	Análises de Função Tubular.....	63
4.5	Concentrações Plasmáticas de Renina e Vasopressina e Sérica de Aldosterona	67
4.6	Expressão Gênica de Angiotensinogênio, Renina e ECA em Rins Císticos e Não Císticos.....	70
4.7	Expressão de ECA e do Receptor AT1 por Imunoistoquímica em Rins Císticos e Não Císticos.....	71
4.8	Excreção Urinária de Metabólitos de Óxido Nítrico.....	74
4.9	Análises da Capacidade de Concentração Renal.....	77
4.10	Proliferação Celular em Rins Císticos e Não Císticos.....	79
4.11	Apoptose em Rins Císticos e Não Císticos.....	81
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO.....	92

7 ANEXOS.....	94
----------------------	-----------

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
--	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas da policistina-1 e da policistina-2, os produtos dos genes <i>PKD1</i> e <i>PKD2</i>	07
Figura 2.	Mecanismo molecular da cistogênese na DRPAD, baseado no modelo de dois eventos.....	12
Figura 3.	Esquema do funcionamento do sistema renina-angiotensina.....	22
Figura 4.	Modelo proposto para a patogênese da hipertensão na DRPAD.....	26
Figura 5.	Estratégia para criação do alelo <i>floxed Pkd1</i> , utilizado para a geração de camundongos císticos <i>Pkd1^{cond/cond}:Bal^{cre}</i>	34
Figura 6.	Genotipagem dos camundongos para a presença dos alelos condicional e selvagem e para a presença ou ausência de Cre recombinase.....	36
Figura 7.	Estratégia para criação do alelo <i>Pkd1</i> nulo utilizado na geração de camundongos 129Sv haploinsuficientes para este gene.....	37
Figura 8.	Genotipagem dos camundongos 129 Sv, incluindo a identificação dos alelos selvagem e mutante.....	38
Figura 9.	Organograma do estudo.....	39
Figura 10.	Imagens do método de aferição da pressão arterial direta.....	42
Figura 11.	Análises comparativas entre as razões pesos renal/peso corpóreo para rins esquerdos e direitos entre camundongos machos NC e CI....	55
Figura 12.	Análises comparativas entre os índices de dilatação tubular, formação de microcistos e formação de cistos em rins de camundongos machos NC e CI.....	56
Figura 13.	Imagens representativas da quantificação de dilatação tubular, microcistos e cistos em rins de camundongos machos NC e CI.....	57
Figura 14.	Análises comparativas da PAM entre camundongos machos NC e CI e entre SV e HT.....	58
Figura 15.	Análises comparativas da concentração sérica de creatinina e da concentração sérica de uréia entre camundongos machos NC e CI, e	

	entre SV e HT.....	61
Figura 16.	Análises comparativas da FE_{Na} e FE_K entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	64
Figura 17.	Análises comparativas da S_{Na} e S_K entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	65
Figura 18.	Análises comparativas de renina plasmática, aldosterona sérica e vasopressina plasmática entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	68
Figura 19.	Análises comparativas da expressão renal de RNAm de angiotensinogênio, renina e ECA em camundongos machos NC e CI com 18 semanas de idade.....	70
Figura 20.	Imagens representativas da análise de expressão da ECA por imunoistoquímica em rins de camundongos machos NC e CI.....	72
Figura 21.	Imagens representativas da análise de expressão de AT1R por imunoistoquímica em rins de camundongos machos NC e CI.....	73
Figura 22.	Análises comparativas da excreção urinária de NO_2 e NO_3 entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	75
Figura 23.	Análises comparativas da osmolalidade urinária máxima entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	77
Figura 24.	Análises comparativas da taxa de proliferação celular entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	79
Figura 25.	Imagens representativas da marcação para Ki-67 em rins de camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	80
Figura 26.	Análises comparativas da taxa de apoptose celular entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT.....	81
Figura 27.	Imagens representativas da marcação para TUNEL em rins de camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Valores de peso corpóreo em camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	55
Tabela 2.	Pressão arterial média em camundongos machos NC, CI, SV e HT....	59
Tabela 3.	Valores de S_{Cr} e S_U em camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	62
Tabela 4.	Valores de FE_{Na} , FE_K , S_{Na} e S_K em camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	66
Tabela 5.	Valores das concentrações plasmáticas de renina e vasopressina e sérica de aldosterona em camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	69
Tabela 6.	Valores de EU_{NO_2} e EU_{NO_3} em camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	76
Tabela 7.	Valores de $U_{osm}Max$ em camundongos machos NC, CI, SV e HT.....	78

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SIGLAS

aa	aminoácidos
ABC	<i>avidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex</i>
AIC	aneurisma intracraniano
Akt	<i>protein kinases B</i>
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AT1R	receptor AT1 de angiotensina II
B-Raf	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
C	cistos
Cdk2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CI	camundongos císticos
DAB	diaminobenzidina
DEPC	dietilpirocarbonato
DDAVp	desmopressina
DHPAD	doença hepática policística autossômica dominante
DRCt	doença renal crônica terminal
DRP	doença renal policística
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante tipo 1
DRPAD2	doença renal policística autossômica dominante tipo 2

DTI	dilatação tubular I
DTII	dilatação tubular II
ECA	enzima conversora de angiotensina
ENAC	canal de sódio epitelial
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
EU _{NO2}	excreção urinária de nitrito
EU _{NO3}	excreção urinária de nitrato
FE _K	fração de excreção de K ⁺
FE _{Na}	fração de excreção de Na ⁺
<i>floxed</i>	<i>flanked by loxP</i>
FRT	<i>flippase recognition target</i>
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPS	<i>G-protein-coupled receptor proteolytic site</i>
HALT-PKI	<i>HALT progression of polycystic kidney disease</i>
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HE	hematoxilina-eosina
HVE	hipertrofia ventricular esquerda
HT	heterozigoto
IECA	inibidor da enzima conversora de angiotensina
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
KIF3A	<i>kinesin family member 3A</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	microcistos
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NC	camundongos não císticos
NO	óxido nítrico
NO ₂	nitrito
NO ₃	nitrato
NOS	óxido nítrico sintase
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 corpóreo
PC1	policistina-1
PC2	policistina- 2
PCK	<i>polycystic kidney</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>pcy</i>	<i>polycystic</i>
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinase
<i>PKD1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>PKD2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
PKG	<i>cGMP-dependent protein kinase</i>
PP2A	proteína fosfatase 2A
<i>PRKCSH</i>	<i>protein kinase C substrate 80K-H</i>
qRT-PCR	transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase em tempo real
RD/PC	rim direito e o peso corpóreo

RE/PC	rim esquerdo e o peso corpóreo
REJ	<i>receptor for egg jelly</i>
Rheb	<i>ras homolog enriched in brain</i>
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
RV2VP	sistema vasopressina-receptor V2
S _{Cr}	concentração de creatinina sérica
<i>SEC63</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S _K	concentrações séricas de K ⁺
S _{Na}	concentrações séricas de Na ⁺
SRA	sistema renina-angiotensina
sst2	somatostatina sobre receptores subtipo 2
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
SV	selvagem
TFG	taxa de filtração glomerular
TRPC1	<i>transient receptor potential channel 1</i>
TRPV4	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
<i>TSC2</i>	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidil transferase uracil nick end labeling</i>
UA	unidades arbitrárias
U _{Cr}	concentrações urinárias de creatinina
U _K	concentrações urinárias de K ⁺

U_{Na}	concentrações urinárias de Na^+
$U_{osm}Max$	osmolalidade urinária máxima
Wnt	<i>wingless-int</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
Ca ⁺⁺	cálcio
Cl ⁻	cloreto
dL	decilitros
DP	desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
°C	graus Celsius
h	hora
¹²⁵ I	iodo-125
kb	kilobase
kg	kilogramas
L	litro
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
µg	micrograma
µm	micrômetro
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol	milimolar
mOsm	miliosmois

min	minutos
mol	molar
ng	nanograma
p	coeficiente de significância estatística
pb	par de base
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
%	porcentagem
K ⁺	potássio
sem	semanas
s	segundos
Na ⁺	sódio
UA	unidades arbitrárias
UI/ml	unidades por mililitros
X	vezes

RESUMO

RESUMO

Fonseca J. M. **O crescimento cístico renal é o principal determinante para o desenvolvimento de hipertensão e déficit de concentração em camundongos com deficiência do gene *Pkd1*.** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O desenvolvimento de hipertensão arterial (HAS) ocorre dez anos mais cedo em pacientes com doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) comparados à população geral, estando presente em ~60% dos indivíduos afetados antes da perda de função renal. Déficit de concentração renal também se constitui em um achado precoce nesses pacientes. Atualmente se propõe que o sistema renina-angiotensina desempenhe um papel central na HAS relacionada à DRPAD, enquanto diferentes explicações têm sido levantadas para justificar o defeito de concentração. Realizamos um cruzamento envolvendo um alelo *floxed* de *Pkd1* com uma linhagem com expressão de nestina-Cre, de modo a gerar camundongos machos císticos viáveis (*Pkd1*^{cond/cond}.Bal^{cre}, CI) com TFG preservada. Estes animais foram avaliados sistematicamente para uma série de parâmetros renais funcionais, morfológicos, celulares e moleculares. Análises paralelas foram conduzidas em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}, HT), os quais não desenvolvem cistos renais visíveis. Camundongos CI mostraram-se significativamente hipertensos na idade de 10-13 semanas, um fenótipo não observado em controles não císticos (*Pkd1*^{cond/cond}, NC) e em animais haploinsuficientes para *Pkd1*. As frações de excreção de Na⁺ e K⁺ mostraram-se reduzidas e a concentração sérica de uréia discretamente elevada em camundongos CI, sugerindo reabsorção tubular de solutos aumentada. A expressão gênica de angiotensinogênio foi significativamente maior em rins CI que NC, enquanto análises imunoistoquímicas revelaram expressão da enzima conversora de angiotensina e do receptor AT1 em epitélio cístico renal. A excreção urinária de NO₂ também se mostrou diminuída em camundongos CI, acompanhando-se de taxas aumentadas de proliferação celular e apoptose renais. A osmolalidade urinária máxima foi mais baixa em animais CI, um déficit não encontrado nos controles HT e NC. Interessantemente, uma tendência de níveis plasmáticos mais elevados de vasopressina foi observada em camundongos CI. Tomados em conjunto, esses resultados apoiam a hipótese de que a formação e o crescimento de cistos desempenham um papel importante no desenvolvimento de HAS na DRPAD e de que a ativação do sistema renina-angiotensina intrarrenal constitui-se em um mecanismo fundamental nesse processo. Nossos achados também sugerem fortemente que a expansão cística seja essencial para o desenvolvimento do déficit de concentração renal nessa doença, e são consistentes com a existência de áreas focais de compressão vascular e perfusão diminuída em rins com DRPAD.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico dominante 2.Doenças renais císticas 3.Mutação 4.Hipertensão 5. Sistema renina-angiotensina 6. Capacidade de concentração renal 7. Óxido Nítrico

SUMMARY

SUMMARY

Fonseca J. M. **Renal cyst growth is the main determinant for the development of hypertension and concentration deficit in *Pkd1*-deficient mice** [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Hypertension (SAH) develops ten years earlier in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) patients compared with the general population, being present in ~60% of affected individuals before the loss of renal function. Renal concentrating deficit is also an early finding in these patients. It has been proposed that the renin-angiotensin system plays a central role in ADPKD-related SAH, while different explanations have been raised to justify the concentrating impairment. We bred a floxed allele of *Pkd1* with a nestin Cre expressing line to generate viable, adult male cystic mice (*Pkd1*^{cond/cond}:Bal^{cre}, CY) with preserved GFR. These animals were systematically evaluated for a series of renal functional, morphological, cellular and molecular parameters. Parallel analyses were carried out in *Pkd1*-haploinsufficient mice (*Pkd1*^{+/-}, HT), which do not develop visible renal cysts. CY mice were significantly hypertensive by 10-13 weeks of age, a phenotype not seen in non-cystic controls (*Pkd1*^{cond/cond}, NC) and *Pkd1*-haploinsufficient animals. The fractional excretion of Na⁺ and K⁺ were reduced and SUN slightly elevated in the CY mice, suggesting increased tubular solute reabsorption. Angiotensinogen gene expression was significantly higher in CY than NC kidneys, whereas immunohistochemical analyses revealed angiotensin-converting enzyme and AT1 receptor expression in renal cyst epithelia. Urine excretion of NO₂ was also diminished in CY mice, along with increased rates of renal cell proliferation and apoptosis. Maximum urine osmolality was decreased in CY animals, a deficit not found in HT and NC controls. Interestingly, a trend toward increased serum vasopressin levels was observed in the CY mice. Taken together these results support the hypothesis that cyst formation and growth play an important role in the development of SAH in ADPKD and that activation of the intrarenal renin-angiotensin system is a fundamental mechanism in this process. Our findings also strongly suggest that renal cyst expansion is essential for the development of renal concentrating deficit in this disease, and are consistent with the existence of focal areas of vascular compression and reduced perfusion in ADPKD kidneys.

Descriptors: 1. Autosomal dominant polycystic kidney disease 2. Cystic kidney diseases 3. Mutation 4. Hypertension 5. Renin-angiotensin system 6. Renal concentration deficit 7. Nitric oxide

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma das principais doenças humanas hereditárias e constitui-se na doença renal monogênica mais comum, com uma prevalência de 1:400 a 1:1000 em populações de descendência européia ¹. Esta enfermidade é 10 vezes mais comum que a anemia falciforme, 15 vezes mais comum que a fibrose cística e 20 vezes mais comum que a doença de Huntington ². Embora sua expressão clínica ocorra tipicamente no período adulto, a DRPAD pode se manifestar antes dos 18 anos de idade em 1 a 2% dos casos ³.

A DRPAD responde por 4,4% dos pacientes em diálise crônica ou transplantados renais nos EUA ⁴. Um estudo anterior mostrou que esta doença se responsabiliza por aproximadamente 7,5% dos casos de doença renal crônica terminal (DRCt) no sul do Brasil ⁵, enquanto no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP 8,9% dos pacientes em DRCt encaminhados a terapia renal substitutiva eram portadores dessa moléstia ⁶. Estes dados indicam o grande impacto médico e socioeconômico dessa desordem. Vale dizer que a DRPAD apresenta penetrância virtualmente completa e que apenas cerca da metade dos pacientes atingem os 58 anos de idade sem evoluir para DRCt ^{3,7}. Estudos mostram, ainda, que as taxas anuais de incidência de DRCt sugerem uma progressão mais rápida da doença em homens que em mulheres ⁸.

1.2. Manifestações Clínicas

A DRPAD associa-se a um fenótipo predominantemente renal, caracterizado pela formação de cistos renais múltiplos e bilaterais, seguindo um processo de aumento progressivo do volume renal, comprometimento da arquitetura do órgão e perda gradual da função renal. Constitui-se, contudo, em uma doença sistêmica, associando-se também a manifestações extrarrenais representadas por cistos hepáticos, aneurismas intracranianos e alterações valvares cardíacas, além de outros fenótipos menos frequentes ³. Os cistos renais na DRPAD podem se originar do epitélio de diferentes segmentos do néfron, embora estudos anteriores sugiram que os derivados dos ductos coletores sejam mais numerosos e maiores ⁹. Tais cistos são revestidos por uma camada única de células epiteliais, menos diferenciadas e associadas a taxas elevadas de proliferação e apoptose ¹.

Os cistos hepáticos constituem a manifestação extrarrenal mais comum na DRPAD, sendo geralmente observados cerca de 10 anos após o aparecimento dos primeiros cistos renais. Um estudo recente utilizando ressonância magnética demonstrou a presença de cistos hepáticos em 58, 85 e 94% dos pacientes nas faixas de idade de 15-24, 25-34 e 35-46 anos de idade, respectivamente ¹⁰. A doença cística hepática é mais severa em pacientes com doença renal cística mais intensa e com função renal mais comprometida, acometendo 60 a 75% dos pacientes com DRPAD em DRCt ¹¹. Disfunção hepática e hipertensão portal, contudo, são raras nesta desordem, mesmo na presença de envolvimento cístico hepático intenso. Deve-se notar, contudo, que pacientes portadores da doença hepática policística autossômica dominante (DHPAD) apresentam um fenótipo hepático policístico similar, sem a

presença de cistos renais. Mutações nos genes *PRKCSH* (*protein kinase C substrate 80K-H*) e *SEC63* responsabilizam-se por cerca de um terço desses casos ¹².

Outra manifestação clínica importante da DRPAD são os aneurismas intracranianos (AICs), encontrados em 8% dos pacientes, uma frequência três a quatro vezes maior que a da população geral ^{13, 14}. Na população de pacientes com DRPAD, essa frequência aumenta mais de duas vezes em indivíduos com história familiar de AIC ou hemorragia subaracnóide, comparados àqueles sem esse antecedente ¹⁴. Os AICs podem produzir sintomas através da compressão de estruturas adjacentes, isquemia cerebral focal causada por embolia e hemorragia subaracnóidea consequente a sua ruptura. A ruptura de aneurisma intracraniano consiste na complicação mais séria da DRPAD, com mortalidade de cerca de 50% e morbidade devastadora em aproximadamente a metade dos sobreviventes ¹¹. Além disso, a ruptura de AIC tende a ocorrer mais precocemente em pacientes com DRPAD que na população geral. Sua ampla maioria, de 64% a 80% dos casos, ocorre antes dos 50 anos de idade, ao passo que em pacientes sem DRPAD apenas 40% a 45% das rupturas ocorrem antes dessa idade ¹⁵. A maior parte dos AICs associados à DRPAD apresenta, contudo, diâmetro inferior a 6,0 mm e acomete a circulação cerebral anterior.

Cerca de 25% dos pacientes com DRPAD apresentam prolapso de valva mitral ^{16, 17}. Além disso, podem ocorrer também insuficiência aórtica e dilatação da raiz da aorta. Indivíduos com essa enfermidade também apresentam um risco elevado de derrame pericárdico, provavelmente em virtude de uma maior complacência do pericárdio parietal. Essas alterações, entretanto, são geralmente bem toleradas e não associadas a manifestações clínicas significativas ¹⁷.

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

A patogênese de fenótipos críticos e complexos na DRPAD, contudo, ainda não é bem compreendida. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) constitui-se na complicação mais comum nesta doença ^{3, 18, 19}, ocorrendo em mais de 60% dos pacientes antes de redução significativa da taxa de filtração glomerular (TFG). Vale notar que a HAS ocorre mais precocemente em pacientes com esta enfermidade, sendo frequentemente detectada cerca de 10 anos antes que na população geral ²⁰.

A redução da TFG e déficit de concentração renal também são manifestações clássicas da DRPAD, a última precedendo a primeira em vários anos ²¹. Embora a redução da capacidade de concentração renal seja relativamente leve na DRPAD, geralmente não acompanhada por poliúria ou polidipsia, ela pode ser detectada já na infância ²². Da mesma forma, adultos acometidos pela doença com função renal normal apresentam osmolalidade urinária máxima ($U_{osm}Max$) mais baixa que os respectivos membros da família não afetados ²³.

1.3. Genética e Bases Moleculares da DRPAD

A DRPAD é uma doença geneticamente heterogênea, sendo decorrente de mutações no gene *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) ou no gene *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*). Mutações em *PKD1* são responsáveis por cerca de 85% dos casos da moléstia, enquanto aproximadamente 15% dos mesmos devem-se a mutações em *PKD2*^{1, 24}. O gene *PKD1* está localizado na região cromossômica 16p13.3 e, quando mutado, a doença é denominada DRPAD tipo 1 (DRPAD1), enquanto que o gene *PKD2*, mapeado a 4q21, quando mutado, dá origem à DRPAD tipo 2 (DRPAD2). Famílias com DRPAD não ligadas a *PKD1* e *PKD2* foram descritas, porém análise posterior de uma delas mostrou heterozigose composta para *PKD1* e *PKD2*; além disso, faltam confirmações dos resultados iniciais para as demais²⁵. A existência de *loci* adicionais associados à doença, portanto, é questionada. Embora mutações em *PKD1* e *PKD2* determinem as mesmas manifestações renais e extrarrenais, pacientes com DRPAD1 apresentam uma forma mais grave da doença quando comparados a pacientes com DRPAD2^{26, 27}. De fato, a idade média para DRCt é de 54 anos na DRPAD1 e de 74 anos na DRPAD2. Além disso, a DRPAD1 apresenta uma maior propensão à hipertensão arterial, história de infecção do trato urinário e hematúria que a DRPAD2²⁷.

O gene *PKD1* distribui-se por um segmento genômico de cerca de 52 kb, compreende 46 éxons e dá origem a um transcrito de 14,2 kb, associado a um quadro de leitura aberta de aproximadamente 12,9 kb. Este gene codifica policistina-1 (PC1), uma glicoproteína integral de membrana^{28, 29} com 4.303 aminoácidos (aa) e massa molecular de aproximadamente 460 kDa (Figura 1). PC1 apresenta a estrutura de um receptor de membrana, mas também parece atuar como uma molécula da adesão^{30, 31}.

Esta molécula possui uma porção extracelular de 3.074 aa, 11 domínios transmembrânicos e uma terminação carboxi intracelular de 197 aa, que contém diversos sítios de fosforilação e um domínio helicoidal denominado *coiled-coil* ^{29, 30}. Este domínio, tipicamente envolvido em interações proteína-proteína e capaz de mediar transdução de sinais para o meio intracelular, é responsável pela interação física da PC1 com a cauda carboxi-terminal intracitosólica da policistina-2 (PC2), o produto do gene *PKD2* (Figura 1) ²⁶. A região amino-terminal compreende domínios frequentemente envolvidos em interações proteína-proteína e proteína-carboidrato, mediando interações potenciais célula-célula e/ou célula-matriz. Este conjunto de domínios inclui 16 repetições de 80 aa semelhantes a regiões da imunoglobulina, denominadas domínios PKD, um grande módulo REJ (*receptor for egg jelly*) e um domínio GPS (*G-protein-coupled receptor proteolytic site*), localizado antes do primeiro domínio transmembrânico (Figura 1) ²⁹.

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

O módulo REJ está associado a um papel regulatório aparentemente importante, tendo sido originalmente descrito em uma proteína envolvida na reação acrossômica do ouriço do mar ³². Uma propriedade fundamental da PC1 consiste no fato de que pode ser clivada no domínio GPS, resultando em dois fragmentos, amino-terminal ³⁵ e carboxi-terminal residual, este ancorado à membrana ³⁴. Tais fragmentos permanecem ligados após a clivagem, porém podem se separar dependendo do estímulo. A capacidade de clivagem e consequente geração de um fragmento amino-terminal se traduz em repercussões estruturais e funcionais renais significativas ^{33, 35}. Enquanto camundongos nulos para *Pkd1*, ortólogo ao gene *PKD1* humano, morrem *in utero* e apresentam cistos renais e pancreáticos, malformações cardíacas, vasculares e esqueléticas, camundongos homozigotos para uma mutação que impede a clivagem de PC1 desenvolvem cistogênese pronunciada envolvendo o néfron distal no período pós-natal e sobrevivem até 2-6 semanas de vida. Esses resultados sugerem que a forma não clivada de PC1 seja crítica na embriogênese, ao passo que a forma clivada da molécula seja essencial para a manutenção da integridade tubular do néfron distal ³⁵.

O gene *PKD2*, por sua vez, estende-se por um segmento genômico de aproximadamente 68 kb, compreende 15 éxons e expressa um ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de 5,4 kb, relacionado a um quadro de leitura aberta de 2,9 kb ²⁶. O produto de *PKD2*, PC2, também se constitui em uma glicoproteína integral de membrana, com 968 aa e cerca de 110 kDa, formada por seis domínios transmembrânicos e ambas as extremidades intracitosólicas. A PC2 contém um domínio *EF hand* em sua extremidade carboxi-terminal, capaz de ligar Ca^{++} ²⁶. Esta proteína funciona como um canal de cátions não seletivo permeável a Ca^{++} , cuja

atividade é regulada pela PC1²⁶. A interação física entre a PC1 e a PC2 desempenha, portanto, um papel fundamental na homeostase do Ca⁺⁺ intracelular³⁶.

PC1 se expressa no cílio apical primário, na membrana plasmática, em vesículas citoplasmáticas e, possivelmente, no retículo endoplasmático; um fragmento carboxi-terminal, por fim, pode migrar para o núcleo da célula³⁴. PC2, por outro lado, é encontrada predominantemente no retículo endoplasmático e em menor intensidade no cílio primário, na membrana plasmática, no centróssomo e nos eixos mitóticos de células em divisão. PC1 e PC2 se co-localizam nos cílios apicais primários de células epiteliais tubulares ou ductais renais, mas também apresentam efeitos extraciliares associados à mediação de adesão celular e interação com o citoesqueleto^{31, 37, 38}. Em túbulos maduros, PC1 se expressa na membrana basolateral, em sítios de interação célula-célula e célula-matriz extracelular, estruturas identificadas como desmossomos, adesões e junções aderentes³⁹. Enquanto PC1 apresenta seus níveis mais altos de expressão no rim em desenvolvimento, associando-se a níveis baixos no rim adulto, PC2 tem expressão significativa durante o desenvolvimento e mantém níveis elevados no rim maduro. De forma similar à PC1, PC2 se expressa aparentemente em todos os segmentos tubulares do néfron, exceto nas porções finas da alça de Henle⁴⁰.

O tráfego e a localização subcelular da PC2 são regulados por fosforilação e interações com proteínas adaptadoras^{41, 42}. Sua fosforilação por caseína quinase 2 media sua interação com PACS-2 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*)/COPI ou com PACS-1/AP-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 1/activator protein 1*), determinando seu trânsito para o retículo endoplasmático ou Golgi/Transgolgi. A desfosforilação da PC2 por PP2A (proteína fosfatase 2A)

promove seu desacoplamento de PACS-1 ou PACS-2, resultando em sua translocação para a membrana plasmática ⁴³. Essa translocação para a membrana plasmática também parece ocorrer de sua interação com PC1 ⁴². É interessante notar, ainda, que PC1 e PC2 foram também localizadas em exossomos que parecem interagir preferencialmente com o cílio apical primário de células renais e das células epiteliais biliares ⁴⁴. Vale mencionar que uma subpopulação de exossomos com grandes quantidades de PC1 e PC2 é encontrada na urina.

1.4. Mecanismo da Formação Focal de Cistos na DRPAD

A formação cística constitui-se em um processo focal na DRPAD, acometendo segmentos de menos de 1% dos néfrons. Estudos demonstraram através de análises de amostras de DNA do epitélio de cistos renais individuais que na DRPAD os cistos são monoclonais. Mostrou-se, portanto, que embora a transmissão genética desta entidade clínica obedeça a um padrão dominante, no nível celular/molecular o mecanismo de formação dos cistos é recessivo ⁴⁵. Esse modelo estabelece, assim, um padrão *knudsoniano* para a cistogênese na DRPAD, incluindo dois eventos, onde o primeiro é representado pela mutação germinativa, enquanto o segundo constitui-se em uma mutação somática no alelo previamente normal (Figura 2). Vale dizer que este modelo se aplica tanto à DRPAD1 como à DRPAD2, assim como a cistos renais e hepáticos.

De fato, camundongos homozigotos para mutação nula em *Pkd1* apresentam letalidade pré ou perinatal, com intensa formação de cistos renais ⁴⁶. É importante notar, contudo, que os estágios mais tardios da tubulogênese e a manutenção tubular requerem, aparentemente, níveis baixos de PC1 ⁴⁷. Este conceito é apoiado por um

modelo animal geneticamente modificado, que demonstra viabilidade perinatal em camundongos que expressam níveis reduzidos de PC1⁴⁸. O processo de tubulogênese normal, portanto, está aparentemente associado a um baixo limiar funcional de PC1, de modo que a haploinsuficiência de *PKD1* não seria suficiente para deflagrar a formação cística. Na mesma linha desses resultados, outro estudo analisou aspectos moleculares e celulares da DRPAD, onde células tronco embrionárias *Pkd1*^{-/-} foram agregadas a mórulas de camundongos *Pkd1*^{+/+} LacZ⁺ Rosa26, gerando um animal quimérico que sobreviveu mais que um mês após o nascimento⁴⁹. Este modelo animal apresentou cistos compostos inicialmente por uma população mista de células *Pkd1*^{-/-} e *Pkd1*^{+/+}, sendo progressivamente substituída por células predominantemente *Pkd1*^{-/-}.

Um estudo conduzido por Piontek *et al* ampliou conceitualmente o modelo de dois eventos, mostrando que quando a inativação do gene *Pkd1* ocorreu antes do 13º dia de vida, os camundongos cursaram com formação cística intensa e rápida, ao passo que a inativação estabelecida após esta fase acompanhou-se de formação bem mais tardia de cistos renais⁵⁰. Esses resultados demonstram que a resposta renal à inativação de *Pkd1* é dependente do momento em que ocorre. Outro trabalho propôs que, no rim maduro, a inativação de *Pkd1* não seja suficiente para deflagrar a formação rápida de cistos, requerendo um terceiro evento para tal⁵¹. Outro estudo mais recente, por fim, mostrou que o insulto por isquemia/reperfusão pode se comportar como um terceiro evento, aparentemente por induzir a reativação de programas de desenvolvimento renal e/ou o aumento da taxa de proliferação celular⁵².

Diante das informações mais recentes, Gallagher *et al* propuseram um modelo de cistogênese focal atualizado para a DRPAD. Segundo este modelo, a formação e a

manutenção da estrutura tubular requerem um nível crítico de atividade funcional de *PKD1* e *PKD2* ⁵². Quando a atividade combinada de ambos os alelos cai abaixo desse limiar em uma dada célula, ocorre a expansão clonal e formação do cisto. Este nível crítico, contudo, pode variar em função de vários fatores, incluindo variantes genéticas em *loci* modificadores, efeitos ambientais, fase de desenvolvimento renal e demandas fisiológicas como resposta a lesão renal ⁵². A importância de mecanismos alternativos de cistogênese na doença humana, por sua vez, permanece indeterminada.

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

1.5. Vias de Sinalizao Envolvidas na Patognese da DRPAD

Os cistos renais de pacientes com DRPAD so caracterizados por ndices aumentados de proliferao celular e apoptose, bem como por desdiferenciao

celular. Estudos mostram que as policistinas são essenciais para o controle da proliferação celular e para a manutenção do fenótipo diferenciado do epitélio tubular renal^{47, 54}. Os mecanismos moleculares responsáveis por esse fenótipo alterado, contudo, ainda não são bem compreendidos, mas a descrição de vias alteradas na doença sugere algumas hipóteses. A geração de modelos animais ortólogos e não-ortólogos de doença renal policística, por sua vez, tornou possível a análise dessas vias e a avaliação de intervenções terapêuticas potenciais^{55, 56, 57}.

O complexo PC1-PC2 parece funcionar como um sensor de superfície ciliar que, uma vez ativado por estímulos mecânicos ou químicos, promoveria influxo de Ca^{++} através de PC2^{36, 37}. A entrada deste cátion induziria liberação de Ca^{++} a partir de estoques intracelulares, modulando proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e expressão gênica. Nesse cenário, células DRPAD apresentam homeostase defeituosa do Ca^{++} intracelular, traduzidas em anormalidades da sinalização^{36, 37}.

Vários estudos recentes indicam um papel importante de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) na cistogênese, por meio da promoção de secreção transepitelial de Cl^- /fluido e proliferação celular, um processo aparentemente decorrente da homeostase defeituosa do Ca^{++} intracelular⁵⁸. Observou-se que AMPc ativa a via MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase*) e aumenta a taxa de proliferação e secreção transepitelial de fluido nas células DRPAD, o que não se verifica em células renais epiteliais normais⁵⁹. De fato, a transfecção de células principais com um construto dominante negativo da cauda carboxi-terminal da PC1 induziu ativação de B-Raf (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) e ERK, através de um processo dependente de AMPc e inibível por um ionóforo de Ca^{++} ⁶⁰. Ao contrário, o aumento dos níveis

citossólicos de Ca^{++} em células DRPAD determinou a correção do fenótipo hiperproliferativo. A redução da $[\text{Ca}^{++}]_i$ secundária à perturbação da via policistínica, por fim, poderia estimular a adenil ciclase 6 e inibir a fosfodiesterase 1 dependente de cálcio/calmodulina, favorecendo o aumento dos níveis intracelulares de AMPc ^{61, 62}.

Outra via bastante estudada é a ação da somatostatina sobre receptores subtipo 2 (sst2), localizados em rim e fígado, capaz de modular negativamente os níveis celulares de AMPc. Um estudo em pacientes com DRPAD utilizando a octreotida, um análogo da somatostatina, mostrou que esta droga lentificou a expansão do volume renal ⁵⁷. A octreotida também limitou a progressão da doença cística renal e hepática no rato PCK (*polycystic kidney*), um modelo animal ortólogo à DRPAR humana, apoiando o conceito de inibição do crescimento cístico ⁶³.

O principal sistema agonista de geração de AMPc nas células principais dos ductos coletores, região onde aparentemente se originam a maioria dos cistos na DRPAD, é o sistema vasopressina-receptor V2 (RV2VP). Estudos mostraram que a utilização de um antagonista do RV2VP determinou inibição do desenvolvimento ou da progressão da doença renal cística em ratos PCK e em camundongos *pcy* (*polycystic*), um modelo ortólogo à nefronoftise do adolescente ⁵⁵. Em outro modelo de camundongo geneticamente modificado, ortólogo à DRPAD2 humana, o tratamento com este antagonista também se acompanhou de inibição da cystogênese e do aumento renal ⁶⁴. Um estudo clínico recente, por fim, mostrou que pacientes com DRPAD tratados por três anos com tolvaptan, um antagonista potente e seletivo do RV2VP humano, apresentaram menor taxa de crescimento do volume renal total e menor taxa de declínio da TFG que controles históricos com DRPAD. Embora tais resultados sejam bastante animadores, este estudo se acompanha de algumas críticas,

entre as quais o número limitado de pacientes tratados e o fato dos controles serem históricos, não concomitantes. O estudo clínico internacional e multicêntrico TEMPO 3/4, contudo, deverá resolver essas questões. Tal estudo avaliou os efeitos do tratamento com tolvaptan em pacientes com DRPAD e acaba de ser concluído, encontrando-se na fase de análise dos dados ⁶⁵. É importante mencionar, ainda, que a redução da liberação de vasopressina, obtida por meio de ingesta muito elevada de água, também teve um efeito protetor sobre a doença renal policística em ratos PCK ⁵⁶.

A PC1 possui um papel biológico essencial na tubulogênese renal. Um estudo prévio demonstrou que células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), transfectadas de forma estável com *PKD1* e cultivadas em meio gel de colágeno de três dimensões, formaram estruturas tubulares epiteliais bem desenvolvidas, ao passo que as mesmas células, submetidas à transfecção controle negativa e cultivadas nas mesmas condições, formaram estruturas císticas ⁴⁷. Além disso, a expressão de PC1 induziu redução na taxa de proliferação celular e resistência a apoptose neste modelo experimental. Outros estudos atribuíram a indução de resistência a apoptose pela PC1 à ativação de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e Akt (*protein kinases B*) via GiCPR. Modelos animais com DRP (doença renal policística), de fato, apresentaram aumento da taxa de apoptose e ativação de PI3K e de Akt ⁶⁶. O papel da PI3K e de Akt na DRPAD, entretanto, não está bem claro ⁶⁷.

Múltiplos trabalhos sugerem que PC1 possa funcionar como um receptor acoplado a proteína G ⁶⁸. A ativação de sinalização via proteína G regula proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e secreção de fluido ^{36, 69}. A ativação da PC 1, seguindo um processo dependente de PC 2, pode também ativar JAK2 (*Janus kinase 2*), determinando fosforilação, ativação e geração de homodímeros STAT1 (*signal*

transducer and activator of transcription 1)⁷⁰. Uma vez translocados ao núcleo, esses dímeros se ligam ao promotor de *p21*, promovendo sua regulação positiva, subsequente inibição da atividade de Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*) e inibição do ciclo celular com parada em G0/G1⁷¹. Esse processo parece contribuir para o efeito da PC1 na redução da taxa de proliferação celular.

Além das funções já mencionadas, as policistinas desempenham também um papel importante na adesão célula-célula. Isto se evidencia, como vimos, pela expressão de PC1 em pontos de junção e contato célula-célula³⁹. PC1 forma um complexo em junções de adesão com caderina-E e as cateninas- α , β , e γ . Em um ambiente celular com privação de Ca^{++} , PC1 e caderina-E são sequestradas em vesículas citoplasmáticas. A restauração do Ca^{++} , por sua vez, deflagra o recrutamento de ambas as proteínas para restabelecer sítios de contato célula-célula^{30, 72}. Além disso, um estudo propôs que a PC1 regule também a força mecânica de adesão entre as células, através do controle da formação de junções de adesão estabilizadas e associadas à actina⁶⁷. Interessantemente, os complexos PC1/caderina-E são desfeitos na DRPAD, seguindo-se o sequestro interno de caderina-E e sua substituição por caderina-N.

PC1 é capaz, ainda, de interagir com tuberina, o produto de *TSC2* (*tuberous sclerosis complex 2*), um dos genes mutados na esclerose tuberosa. O complexo tuberina/hamartina (o produto de *TSC1*, outro gene mutado na esclerose tuberosa) inibe Rheb (*ras homolog enriched in brain*), um ativador de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Esses achados sugerem que na ausência de PC1 não haveria inibição de Rheb, levando à ativação de mTOR e ao fenótipo cístico⁷³. Com o intuito de testar esta hipótese, esses autores utilizaram rapamicina, um inibidor da via

mTOR, em modelos animais de DRP, incluindo um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1. Os resultados mostraram melhora do fenótipo cístico e proteção da função renal ⁷³. Apesar de interessantes, esses achados devem ser interpretados com cautela, pois não está excluída a possibilidade de que tais efeitos se devam a uma inibição inespecífica de outras vias e/ou a um efeito anti-proliferativo não necessariamente relacionado à patogênese da doença. Estudos clínicos recentes com inibidores de mTOR, sirolimo ⁷⁴ e everolimo ⁷⁵, por sua vez, não mostraram benefícios significativos no volume renal total e/ou na TFG de pacientes com DRPAD.

Uma das principais características da DRPAD, por fim, é a perda da polaridade celular planar, podendo levar à conversão de estruturas tubulares em císticas. Essa alteração pode ser causada por disfunções centrossomais, amplificação ou ativação da via de sinalização Wnt (*wingless-int*) canônica dependente da catenina- β e inibição da via de sinalização Wnt não-canônica independente da catenina- β ⁷⁶. Um estudo recente de Nishio *et al*, entretanto, mostrou que a perda de divisão celular orientada não é suficiente para produzir cistos renais nem requerida para iniciar formação cística após mutações em *Pkd1* ou *Pkd2* ⁷⁷.

1.6. Papel da Secreção de Fluido na Formação Cística

Vários estudos apoiam o conceito de que a secreção de fluido para a luz do cisto participe ativamente do processo de expansão cística. Essa secreção deve-se a um transporte ativo secundário de cloreto. As células epiteliais renais têm a capacidade de secretar e reabsorver soluto e fluido, sendo o fluxo de absorção maior

que o fluxo secretório em células normais. Nas células principais do ducto coletor, aparentemente o principal segmento de origem dos cistos na DRPAD, a reabsorção de Na^+ é dirigida pela baixa concentração intracelular de Na^+ gerada pela Na-K-ATPase basolateral, acompanhada da entrada deste cátion através do canal ENaC (canal de sódio epitelial) e reabsorção de água pela membrana luminal através de canais aquaporina-2 sensíveis à vasopressina.

O comportamento das células epiteliais císticas, no entanto, é muito diferente do das células principais do ducto coletor cortical normal. O modelo proposto para este processo patológico sugere que o Cl^- entre através da membrana basolateral por co-transportadores Na-K-2Cl, seguindo o gradiente de Na^+ estabelecido pela Na-K-ATPase basolateral, e saia da célula pela membrana luminal através do canal de Cl^- CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Este canal seria ativado por AMPc e, portanto, responsivo à proteína quinase A apical ⁷⁸. Este acúmulo ativo de Cl^- dentro do lúmen cístico, por sua vez, determina a secreção de Na^+ e água, seguindo a diferença de potencial transepitelial e o gradiente osmótico. Nesse contexto, surgiu a hipótese de que a inibição de CFTR poderia reduzir a taxa de crescimento cístico. Seguindo essa linha, um estudo recente mostrou que inibidores de CFTR lentificaram o crescimento cístico e protegeram a função renal em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1 de rápida evolução ⁷⁹.

1.7. O Cílio Apical Primário na DRPAD

Um grande número de estudos apoia o envolvimento do cílio apical primário na patogênese das doenças renais policísticas ⁸⁰. Como vimos, o cílio primário/complexo policistínico parece ser sensível a estímulos ou variações mecânicas, como fluxo de fluido intratubular, transduzindo sinais do meio extracelular para o intracelular através de transientes intracelulares de Ca^{++} . Vale dizer que PC2 também interage com TRPC1 (*transient receptor potential channel 1*) TRPV4 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*), proteínas que podem potencialmente se constituir em componentes do aparelho mecano-sensorial do cílio primário. Nesse contexto, defeitos na formação, estrutura ou função ciliar poderiam resultar em desbalanço em favor de proliferação e alterações de polaridade celular e secreção transepitelial de Cl^- ³⁹. Por meio de modelos animais geneticamente manipulados, um estudo mostrou, de fato, conexão entre cílio primário e doença renal policística. Neste estudo, procedeu-se inativação tecido-específica de um componente motor anterógrado, KIF3A (*kinesin family member 3A*), comprometendo o transporte intraflagelar necessário ao tráfego ciliar de proteínas e à formação do cílio primário ⁸¹. Esses camundongos desenvolveram cistos renais a partir do 5º dia de vida e apresentaram insuficiência renal por volta dos 21 dias de idade. Estudos adicionais sugerem, ainda, que a sinalização via Ca^{++} e sua modulação possam envolver a ativação de receptores de rianodina ³⁷, a interação entre PC2 e o receptor de inositol 1, 4, 5 tri-fosfato do tipo I e a interação entre PC2 e syntaxina-5 ⁸².

Outros estudos sugerem que a porção carboxi-terminal da PC1 possa ser clivada e migrar para o núcleo da célula. O primeiro estudo mostrou que PC1 pode

sequestrar o fator de transcrição STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) no cílio, impedindo sua ativação. O bloqueio do fluxo de fluido luminal deflagraria a clivagem dos 112 aa finais. Este fragmento p112 interagiria com STAT6 e com o co-ativador P100, por sua vez, estimulando a atividade transcricional ⁸³. Em outro trabalho, propõe-se que o estímulo mecânico do cílio apical primário deflagre a clivagem e a liberação de toda a cauda carboxi-terminal (p200). Este fragmento se ligaria à catenina- β no núcleo e inibiria a sinalização Wnt canônica ⁷⁶.

1.8. Hipertensão Arterial Sistêmica Associada à DRPAD

A hipertensão arterial sistêmica constitui-se em uma complicação comum da DRPAD e pode ser importante para o diagnóstico precoce da doença ^{84, 85}. A presença de HAS nesta população de pacientes também está associada a uma progressão mais rápida para DRCt e a um aumento da taxa de complicações cardiovasculares ³. Outro fator importante de morte prematura por problema cardiovascular é a hipertrofia ventricular esquerda (HVE), frequentemente presente em pacientes com DRPAD associada à HAS ⁸⁶. Enquanto a média de idade em que a HAS é diagnosticada em pacientes com hipertensão essencial é de 45-55 anos, na DRPAD é de 32 anos para homens e 34 anos para mulheres. Estudos adicionais revelam, ainda, que a HAS atinge cerca de 20-30% das crianças com DRPAD ^{22, 87, 88, 89}.

Os mecanismos envolvidos na hipertensão associada à DRPAD, entretanto, não estão completamente esclarecidos, embora as anormalidades renais aparentemente influenciem seu desenvolvimento ⁹⁰. De fato, pacientes adultos com

DRPAD e HAS apresentam um volume renal significativamente maior que pacientes normotensos ⁹¹. Esta relação entre HAS e o envolvimento cístico também foi encontrado em crianças com DRPAD ²². Nesse cenário, admite-se atualmente que a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), em resposta à expansão cística e secundária à compressão vascular, desempenhe um papel central no desenvolvimento da hipertensão associada à DRPAD (Figura 3) ^{20, 90}. Tal modelo, entretanto, ainda não foi provado. Nesse contexto, sugere-se que o SRA ativado desempenhe um papel central no desenvolvimento e manutenção da HAS na DRPAD ⁹². Com o aumento do tamanho dos cistos e aparente ativação do SRA, a pressão arterial se eleva, desenvolve-se hipertensão arterial, o crescimento cístico progride e, a partir de um determinado ponto do processo, passa a ocorrer perda gradual da função renal ⁹⁰ (Figura 4). Vale mencionar que a angiotensina II constitui-se em um importante fator de crescimento do epitélio renal e fibroblastos intersticiais. Nesse cenário, o SRA parece desempenhar um papel relevante no crescimento/expansão cística e na fibrose renal em pacientes com DRPAD, independentemente dos níveis de pressão arterial.

Figura 3. Esquema do funcionamento do sistema renina-angiotensina.

Para testar esta hipótese, estudos clínicos analisaram o SRA na DRPAD. Um deles demonstrou que a atividade da renina plasmática e as concentrações de aldosterona nas posições supina e vertical eram maiores em hipertensos portadores de DRPAD que em hipertensos essenciais, mesmo após a administração de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA)⁹². Outros estudos revelaram que a administração de IECA promoveu maior redução da pressão arterial média, da resistência vascular renal e da fração de filtração em pacientes com DRPAD que em controles saudáveis com pressão arterial normal^{92, 93, 94}. Outros autores, entretanto, relataram que a pressão arterial e as respostas hormonais do SRA, após alta e baixa ingestão de sódio e após a administração de enalapril, um IECA, não foram diferentes entre pacientes hipertensos com DRPAD e controles com hipertensão essencial⁹⁵.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o SRA intrarenal possa ser mais importante que o SRA circulante no desenvolvimento da hipertensão arterial em pacientes com DRPAD. Esses dados sugerem, ainda, que a inibição do SRA intrarenal possa ser importante para atenuar a hipertensão na DRPAD, reduzir a taxa de crescimento cístico e o aumento renal e, conseqüentemente, lentificar a taxa de declínio da função renal ⁹⁰.

Com o intuito de investigar as anormalidades hemodinâmicas iniciais da DRPAD, conduziu-se um estudo em pacientes adultos jovens com função renal preservada. Os pacientes com DRPAD apresentaram atividade plasmática de renina, sódio trocável total, pressão arterial e níveis de aldosterona plasmática significativamente maiores que os membros da família não afetados, de mesma idade e sexo ⁹⁶. Outro estudo relatou, ainda, que durante a ingestão crônica de sódio, a atividade plasmática de renina foi maior em pacientes com DRPAD normotensos e com *clearance* de creatinina superior a 70 ml/min/1,73 m² que nos controles não afetados das mesmas famílias ⁹⁷. Esses achados sugerem que o SRA é ativado em um estágio inicial de DRPAD e que esta ativação preceda o surgimento de hipertensão arterial e as principais manifestações clínicas da doença.

Dados adicionais sugerem, ainda, que os níveis baixos de óxido nítrico (NO) relacionado com a disfunção endotelial encontrada nos pacientes DRPAD ⁹⁸ contribua para a elevação da geração de angiotensina II através de um aumento local do estresse oxidativo. Além disso, a diminuição do relaxamento cardíaco que é tipicamente associado com esta doença pode causar a redução no fluxo sanguíneo renal e o aumento da formação de angiotensina II ⁹⁰.

Embora a ativação do SRA pareça desempenhar um papel central na patogênese da hipertensão arterial na DRPAD, outros fatores também parecem estar envolvidos (Figura 4). Um estudo prévio demonstrou aumento da atividade simpática muscular em pacientes hipertensos com DRPAD, independentemente da função renal, sugerindo que a hiperatividade simpática possa contribuir para gênese e/ou manutenção da HAS nesta doença ⁹⁹. Vale notar que o SRA é estimulado pelo aumento da atividade simpática e que a angiotensina II estimula o sistema nervoso simpático.

Propõe-se que o aumento da vasopressina plasmática observada na DRPAD possa contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial associada à doença ^{100, 101, 102, 103}. De fato, os níveis plasmáticos de vasopressina se correlacionam com níveis de pressão arterial na hipertensão arterial humana e experimental ^{100, 104, 105}. Essa hipótese, contudo, ainda não foi comprovada.

PC1 e PC2 são expressas em células musculares lisas e endotélio da maioria dos vasos sanguíneos ^{90, 106, 107}. O relaxamento dependente do endotélio, por sua vez, está prejudicado em células de aortas de camundongos *knockout* para *Pkd1*, em decorrência de um defeito na liberação de NO pelo endotélio ¹⁰⁸. Essa diminuição está aparentemente relacionada a uma menor atividade da óxido nítrico sintase (NOS) dependente de Ca^{++} .

Interações entre PC1 e PC2 foram demonstradas na membrana sarcoplasmática de células musculares lisas vasculares, sugerindo um papel central das mesmas na regulação dos níveis citosólicos de Ca^{++} ¹⁰⁸. Além disso, alterações na homeostase intracelular de Ca^{++} foram observadas em camundongos *Pkd2*^{+/-}, com redução do Ca^{++} intracelular total e alteração em seus níveis no retículo

sarcoplasmático ¹⁰⁹. É importante notar que a redução dos níveis de PC2 em drosófila, ou seu estado de haploinsuficiência, resulta em alterações da contratilidade do músculo liso ¹¹⁰. Um estudo adicional revelou, ainda, que PC1 e PC2 se co-localizam nos cílios apicais primários de células endoteliais vasculares de ratos e humanos ¹¹¹. Interessantemente, o funcionamento normal de PC1 e PC2 é necessário para que o cílio apical primário das células endoteliais possa detectar o estresse de cisalhamento do fluido, através de uma complexa cascata bioquímica envolvendo Ca^{++} /calmodulina, Akt/PKG (*cGMP-dependent protein kinase*) e proteína quinase C ^{111,112,113}. Merece atenção o fato de que a imposição de estresse de cisalhamento por fluido em células endoteliais normais, por um período de horas, resulta em clivagem proteolítica da PC1. A função ciliar anormal da PC2, por sua vez, leva ao comprometimento da detecção do fluido, prejudicando a síntese de NO. Tal efeito se traduz, portanto, em disfunção da mediação de vias de sinalização envolvidas no relaxamento do músculo liso vascular. De fato, células endoteliais de camundongos *Pkd2*^{-/-} perdem a capacidade de gerar NO em resposta ao estresse de cisalhamento promovido por fluido. PC1 e PC2 parecem, portanto, desempenhar um papel específico e relevante na detecção de cisalhamento em cílios primários endoteliais ⁹⁰.

Observações anteriores revelaram que a resistência vascular está alterada na DRPAD ^{98, 114} e que a atividade da NOS endotelial encontra-se diminuída em pacientes com esta enfermidade. Esses achados sugerem a existência de disfunção endotelial secundária à liberação de NO prejudicada em pacientes com DRPAD. Estudos adicionais mostraram que secções de epitélio cístico de rins de pacientes com DRPAD exibiram expressão aumentada de endotelina-1 ¹¹⁵ e que tal molécula foi encontrada no fluido cístico desses pacientes ¹¹⁶. Outro estudo revelou, ainda, que

pacientes com DRPAD apresentaram níveis plasmáticos de endotelina-1 mais elevados que controles saudáveis e pacientes com hipertensão essencial ¹¹⁷. Um desequilíbrio entre endotelina-1 e NO pode, portanto, contribuir para a patogênese da hipertensão arterial na DRPAD ^{118, 119}.

Figura 4. Modelo proposto para a patogênese da hipertensão arterial na DRPAD ⁹⁰.

Vários estudos têm analisado os efeitos de bloqueadores do SRA sobre a pressão arterial, o curso da doença renal e as complicações cardiovasculares na DRPAD. A administração isolada de IECA ou de bloqueadores dos receptores da angiotensina II não suprimiram completamente os níveis de angiotensina II sistêmica ou sua expressão local. Constatou-se um aumento da atividade de quimase local em rins de pacientes com DRPAD, sugerindo que mecanismos não dependentes da enzima conversora de angiotensina (ECA) também participem da ativação do SRA renal nesta enfermidade ¹²⁰. Com base nessas observações e no papel determinante

que a angiotensina II apresenta na HAS associada à DRPAD, a terapia com combinação de IECA e antagonistas dos receptores da angiotensina II poderia, potencialmente, ser mais eficiente para atingir o bloqueio completo do SRA. Nesse cenário, encontra-se em andamento o estudo clínico HALT-PKD (*HALT progression of polycystic kidney disease*), iniciado em 2006, com previsão de término para 2013¹²¹. Este ensaio clínico está dividido em dois estudos prospectivos, randomizados, duplo-cegos, controlados por placebo e multicêntricos. Tais estudos foram desenhados para avaliar o impacto do bloqueio do SRA e do nível de controle da pressão arterial sobre a progressão da doença renal em estágios inicial e avançado da DRPAD. Para tanto, este ensaio clínico está testando os níveis de bloqueio do SRA usando um inibidor de ECA (Lisinopril) e um antagonista do receptor de angiotensina II (Telmisartan) combinados *versus* inibidor de ECA (Lisinopril + Placebo) em pacientes com TFG superior a 60 ml/min por 1,73 m² (Estudo A) e em pacientes com TFG entre 25 e 60 ml/min por 1,73 m² (Estudo B). Os resultados destes ensaios serão utilizados para orientação médica quanto à seleção de agentes anti-hipertensivos e alvos de níveis pressóricos na DRPAD, assim como quanto aos efeitos clínicos e prognósticos de tais medidas.

1.9. Déficit de Concentração Renal Associado à DRPAD

O déficit de concentração renal constitui-se em uma manifestação precoce da DRPAD. Sua patogênese, contudo, ainda não é bem conhecida, embora alterações da arquitetura córtico-medular renal devido ao crescimento cístico, um defeito nas células principais renais e/ou desenvolvimento de alterações túbulo-intersticiais

tenham sido propostos como possíveis causas. Estes mecanismos, no entanto, não são consistentes com trabalhos anteriores¹⁰⁰. Os dados prévios excluem o envolvimento do sistema nervoso central, uma vez que os níveis de vasopressina se mostraram elevados em pacientes com DRPAD¹⁰⁰. Interessantemente, um aumento da expressão de aquaporina-2 é observado em modelos animais de rins policísticos, em oposição ao que é visto nas formas centrais e na maioria das formas nefrogênicas de diabetes insipidus, sugerindo que esta anormalidade se posiciona distalmente à síntese dessa molécula^{55, 64}.

Com base na realidade clínica e conceitual apresentada, neste trabalho procuramos analisar aspectos fundamentais das bases patogenéticas da hipertensão arterial e do déficit de concentração renal associados à DRPAD, utilizando dois modelos estratégicos de camundongo geneticamente modificados, com diferentes perfis de deficiência do gene *Pkd1*. Tal investigação permitiu, também, abordar aspectos relevantes de disfunções tubulares, da disfunção do sistema NO e de anormalidades celulares associadas à DRPAD.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste estudo foi analisar aspectos fundamentais da patogênese de duas manifestações complexas da doença renal policística autossômica dominante, a hipertensão arterial sistêmica e o déficit de concentração renal, utilizando modelos de camundongo geneticamente modificados com perfis estratégicos de deficiência do gene *Pkd1*. Camundongos heterozigotos para uma mutação nula neste gene (*Pkd1*^{+/-}), um modelo não cístico na idade avaliada, constituíram um estado puro de haploinsuficiência para *Pkd1*, enquanto camundongos homozigotos para um alelo *Pkd1 knockout* condicional e portadores do transgene nestina-Cre (*Pkd1*^{cond/cond}:Bal^{cre}) reproduziram o fenótipo cístico renal da doença humana. Para tanto, nossos objetivos específicos compreenderam:

1. Avaliar a pressão arterial em camundongos císticos (*Pkd1*^{cond/cond}:Bal^{cre}, CI) e não císticos (*Pkd1*^{cond/cond}, NC) e em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}, HT) e selvagens (*Pkd1*^{+/+}, SV), através da medida direta da pressão arterial média na idade de 12-13 semanas.
2. Analisar a TFG em camundongos CI e NC e em HT e SV na idade de 10-13 semanas, através da determinação das concentrações séricas de creatinina e uréia.
3. Analisar o processamento tubular de Na⁺ e K⁺ em camundongos CI e NC e em camundongos HT e SV na idade de 10-13 semanas, por meio da determinação das frações de excreção de Na⁺ e K⁺ e das concentrações séricas de Na⁺ e K⁺.

4. Avaliar fatores sistêmicos associados à pressão arterial em camundongos CI e NC e em camundongos HT e SV, através da determinação da concentração de renina plasmática na idade de 13 semanas, de vasopressina plasmática com 14 semanas e da concentração de aldosterona sérica na idade de 15 semanas.
5. Analisar fatores locais renais potencialmente associados à hipertensão arterial em camundongos CI e NC, através da determinação da expressão gênica renal de angiotensinogênio, renina e ECA, e do padrão de expressão renal imunoistoquímico da ECA e do receptor AT1 nas idades de 15 ou 18 semanas.
6. Avaliar anormalidades potenciais do sistema NO em camundongos CI e NC e em camundongos HT e SV na idade de 10-13 semanas, por meio da determinação da excreção urinária de metabólitos do óxido nítrico.
7. Analisar a capacidade de concentração renal em camundongos CI e NC e em camundongos HT e SV na idade de 10-13 semanas, através da determinação da osmolalidade urinária máxima.
8. Analisar a taxa de proliferação celular e a taxa de apoptose em rins de camundongos CI e NC e de camundongos HT e SV na idade de 15 semanas, por meio de estudos imunoistoquímicos para Ki-67 e TUNEL.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Modelos de Camundongos

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. (#0887/09)

Neste estudo utilizamos dois modelos de camundongo geneticamente modificados. O primeiro foi criado por nossos colaboradores Klaus Piontek e Gregory Germino, na Johns Hopkins University School of Medicine, utilizando o background C57BL/6¹²². Este modelo possui alelos *floxed* (*flanked by loxP*) de *Pkd1* (*Pkd1*^{cond}) que contêm um cassete de neomicina flanqueado por sítios FRT (*flippase recognition target*), inserido no íntron 1, e sítios loxP inseridos nos íntrons 1 e 4 (Figura 5). Os sítios loxP podem ser induzidos a recombinar via enzima 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 sequências *enhancer* localizadas no segundo íntron¹²². A Cre recombinase, por sua vez, 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 fenótipo cístico renal que mimetiza a doença humana (*Pkd1*^{cond/cond};Bal^{cre}).

Figura 5. Estratégia para criação do alelo *floxed Pkd1*, utilizado para a geração de camundongos císticos $Pkd1^{\text{cond/cond}}; \text{Bal}^{\text{cre}}$.

A geração de camundongos císticos iniciou-se com o cruzamento entre uma fêmea $Pkd1^{\text{cond/cond}}$ com um macho $Pkd1^{\text{cond/+}}; \text{Bal}^{\text{cre}}$. Após o nascimento, os membros da prole foram genotipados, seguindo um processo que inclui dois passos. No primeiro, identifica-se a presença ou ausência de Cre recombinase, enquanto no segundo verifica-se se o alelo $Pkd1^{\text{cond}}$ encontra-se em homozigose ou heterozigose. Na primeira reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizamos dois *primers* específicos para a Cre recombinase: um *primer forward* (CreF, 5'-ATTGCTGTCACCTGGTCGTGGC-3') e um *primer reverse* (CreR, 5'-GGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC-3'). A segunda reação, por sua vez, envolve a utilização 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, MgCl_2 1 mM, DNTPs 200 μM , *primers* numa concentração de 0,5 μM cada, Taq DNA polimerase 1,5 unidades/reação, água deionizada estéril e 300 ng de DNA genômico/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 6). 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 6). 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 referentes a este modelo utilizados neste trabalho, portanto, foram *Pkd1*^{cond/cond}:Ba1^{cre} (CI), com um produto de 200 pb na primeira reação de PCR, indicando a presença do gene Cre recombinase, e com uma banda de 250 pb na segunda reação. Estes camundongos desenvolveram um fenótipo cístico renal similar ao da DRPAD humana. Seus respectivos controles (*Pkd1*^{cond/cond}, NC), sem o fenótipo cístico renal, apresentaram uma banda de 250 pb na segunda PCR, porém ausência de produto na primeira reação.

Figura 6. Genotipagem dos camundongos para a presença dos alelos condicional e selvagem (A) e para a presença ou ausência de Cre recombinase (B). A) Os animais M1, M2 e M3 apresentam o genótipo $Pkd1^{cond/+}$, ao passo que M4, M5, M6 e M7 apresentam o genótipo $Pkd1^{cond/cond}$; CN representa o controle negativo; M é o marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb). B) Os animais M1, M3 e M7 apresentam o genótipo $Pkd1:Bal^{cre}$, enquanto M2, M4, M5 e M6 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 e M3 - $Pkd1^{cond/+}:Bal^{cre}$; M4, M5 e M6 - $Pkd1^{cond/cond}$; M7 - $Pkd1^{cond/cond}:Bal^{cre}$ e M2 - $Pkd1^{cond/+}$.

Nosso segundo modelo animal consiste em uma linhagem de camundongo 129Sv com mutação nula em um dos alelos do gene *Pkd1*¹²². Este alelo se baseou numa construção que apresentava parte do éxon 2 e todo o éxon 3 substituídos por um gene repórter (*lacZ*) acoplado em fase com o restante do éxon 2 e seguido por um marcador positivo, o gene de resistência à neomicina (*neor*) (Figura 7). O segmento *lacZ-neor* inclui sequências de terminação transcricionais que impedem a expressão de éxons 3' de *Pkd1*, ao mesmo tempo em que o promotor PGK promove expressão do marcador selecionável *neor* de forma independente. A integração bem sucedida do construto resultou na inativação de *Pkd1*.

Figura 7. Estratégia para criação do alelo *Pkd1* nulo utilizado na geração de camundongos 129Sv haploinsuficientes para este gene.

A geração de animais haploinsuficientes para *Pkd1* e controles selvagens iniciou-se com o cruzamento de uma fêmea *Pkd1*^{+/+} com um macho *Pkd1*^{+/-}. Após o nascimento, os membros da prole foram submetidos ao processo de genotipagem, que começa com a extração de DNA a partir de amostras/fragmentos de orelha. Utilizamos, a seguir, a técnica de PCR, com um *primer* comum a ambos os alelos (KF1, 5'-ATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3') e de segundos *primers* reversos específicos para os alelos selvagem e *knockout*. Enquanto o *primer* reverso específico ao alelo selvagem posiciona-se na região do DNA substituído pela construção recombinante (KR1, 5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'), o *primer* específico ao alelo *knockout* localiza-se no segmento inserido (M3-2B, 5'-TACTCACACCTCCACCAGTGC-3'). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo 1 µg/mL e fotografados para documentação. Esta técnica permite a identificação de dois produtos de PCR de tamanhos distintos, cada qual relacionado a um dos alelos. Uma banda de 180 pb corresponde ao alelo selvagem, ao passo que uma banda de 220 pb corresponde ao alelo mutante (Figura 8). Dessa forma, os animais com banda única

de 180 pb são diagnosticados como selvagens, enquanto os animais com as duas bandas (180 e 220 pb) são classificados como heterozigotos.

Figura 8. Genotipagem dos camundongos 129 Sv, incluindo a identificação dos alelos selvagem e mutante. Os animais M1, M2, M3, M4, M6 e M7 apresentam o genótipo *Pkd1*^{+/+}, ao passo que M5, M8, M9 e M10 apresentam o genótipo *Pkd1*^{-/-}; CN representa o controle negativo; M é o marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb).

Camundongos heterozigotos para o alelo nulo de *Pkd1* virtualmente não apresentam cistos renais até 15 semanas de idade, de modo que na idade avaliada estes animais representam um modelo puro de haploinsuficiência de *Pkd1*. Seus companheiros de prole selvagens foram usados como seus controles experimentais. Uma vez que em outros modelos animais de doença renal policística os machos podem desenvolver uma doença renal mais grave, decidimos uniformizar nossos grupos e analisar as disfunções potenciais mencionadas em camundongos deste sexo. Por meio deste plano, também evitamos heterogeneidade experimental relacionada a gênero.

3.2. Grupos Experimentais

O estudo foi desenvolvido com quatro grupos experimentais, assim constituídos:

1. $Pkd1^{\text{cond/cond}}:\text{Bal}^{\text{cre}}$ (Cístico, CI); n= 9
2. $Pkd1^{\text{cond/cond}}$ (Não cístico, NC); n= 9; controle para CI
3. $Pkd1^{+/-}$ (Heterozigoto, HT); n= 8
4. $Pkd1^{+/+}$ (Selvagem, SV); n= 8; controle para HT

Grupos adicionais para cada genótipo foram utilizados para obtenção das medidas diretas de pressão arterial média. O organograma referente às várias análises às quais os animais foram submetidos, detalhadas na sequência de métodos, é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Organograma do estudo.

3.3. Análises de Formação Cística e Histologia

Ao final do protocolo experimental, os rins, o coração e o fígado foram removidos, pesados e preparados para análises histológicas e imunoistoquímicas. Para tanto, os animais foram anestesiados com pentobarbital 80 µg/g PC, administrado por via intraperitoneal. A seguir foram submetidos a toracotomia, seguida da inserção de um cateter no ventrículo esquerdo e de um corte no átrio direito para drenar o sangue. Os mesmos foram perfundidos com solução salina até a sangria completa. Perfusão com formalina de Millonig, modificada por Carlson, foi realizada imediatamente após. Os rins foram, então, extraídos. 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). O número de cistos presentes em cada rim esquerdo foi calculado por meio da avaliação de secções completas obtidas a intervalos de 70 µm. Análises dos cortes de rim esquerdo também permitiram a quantificação de cistos (C), microcistos (MC) e dilatação tubular I (DTI) e II (DTII), seguindo a metodologia descrita a seguir. Utilizamos uma tela com pontos equidistantes entre si por 13,625 µm. A categorização da alteração foi determinada pelo número de pontos dentro da luz tubular¹²³. Classificamos como DTI aquelas que comportaram apenas um ponto e apresentaram dilatação superior a 13,625 µm; DTII aquelas que comportaram dois pontos; MC aquelas que comportaram de 3 a 9 pontos; e cistos aqueles que apresentaram 10 ou mais pontos.

3.4. Aferição Direta da Pressão Arterial Média

Os animais foram inicialmente anestesiados com o anestésico inalatório isoflurano 1,5%. Um cateter de 4,0 cm de comprimento (Micro-Renathane, Braintree Science Inc, USA), 0,4 mm de diâmetro externo e 0,25 mm de diâmetro interno foi inserido na artéria carótida direita para registro de pressão arterial média (PAM) (Figura 10) ¹²⁴. Previamente ao implante, os cateteres foram preenchidos com solução de NaCl 0,9% heparinizada (50 UI/mL) e ocluídos com pinos de metal. Os cateteres foram exteriorizados na nuca dos animais com auxílio de um trocáter. As incisões foram suturadas e o cateter foi acoplado a um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA) para aferição da 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.

Figura 10. Imagens do método de aferição direta da pressão arterial média (A-F). (A) Inserção do catéter na artéria carótida; (B) Catéter exteriorizado na nuca do camundongo; (C) Catéter acoplado ao sistema de aferição da PAM; (D) Sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems); (E e F) Imagens da variação dos picos de pressão arterial.

3.5. Determinações Bioquímicas

3.5.1. Análises Indiretas da TFG

Os animais foram submetidos à coleta de sangue por acesso ocular. Após coagulação, as amostras foram centrifugadas, de modo a obter o soro. A mensuração da concentração sérica de uréia (S_U) foi realizada pelo método de Crocker modificado (Celm, Brasil) e da concentração de creatinina sérica (S_{Cr}) e urinária (U_{Cr}) pelo método quantitativo colorimétrico (Labtest, Brasil). Animais com concentrações séricas basais de creatinina $> 0,6$ mg/dL e/ou uréia > 70 mg/dL foram excluídos do estudo.

3.5.2. Análises de Função Tubular

As mensurações das concentrações séricas de Na^+ (S_{Na}) e K^+ (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 $FE_K = (U_K \times S_{Cr}) / (S_K \times U_{Cr}) \times 100$.

3.5.3. Análise da Capacidade de Concentração Renal

A capacidade de concentração renal foi determinada por meio da osmolalidade urinária máxima (U_{osmMax}). Inicialmente os animais foram pesados e, em seguida, mantidos em jejum hídrico e alimentar por 32 h em gaiolas metabólicas. Imediatamente após esse período, os animais receberam desmopressina (DDAVp) por via subcutânea na dose de $1\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo (PC) e, logo após, foram devolvidos à gaiola metabólica. Após 10 h, os camundongos foram novamente 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).

3.5.4. Análise da Excreção Urinária de Metabólitos de Óxido Nítrico

As determinações urinárias dos metabólitos do NO, nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3), foram realizadas através do método de quimioluminescência, usando um analisador de NO (NOA280; Stevers Instruments, Boulder, CO). As concentrações encontradas foram normalizadas para a respectiva U_{Cr} .

3.6. Determinação das Concentrações Plasmáticas de Renina e Vasopressina e Sérica de Aldosterona

A concentração sérica de aldosterona foi aferida por radioimunoensaio, com o uso de um *kit* comercial (Coat-A-Count Aldosterone, Siemens). Este método, de fase

sólida, baseia-se em anticorpos específicos para a aldosterona imobilizados na parede de um tubo de polipropileno. A aldosterona marcada com ^{125}I compete durante um período de tempo fixo com a aldosterona da amostra analisada por locais de fixação de anticorpos. O tubo é então decantado, de modo a separar a aldosterona livre, sendo em seguida colocado em um contador gama. A quantidade de aldosterona presente na amostra é determinada a partir de uma curva de calibração.

A mensuração da concentração plasmática de renina foi realizada com um *kit* comercial de ensaio imunoradiométrico (Active Renin IRMA, Diagnostic Systems Laboratories) de dois sítios de ligação, não competitivo, no qual a substância analisada é interposta entre dois anticorpos na forma de sanduíche. O primeiro anticorpo é imobilizado no interior de tubos plásticos, enquanto o outro é marcado radiotivamente. O analito presente nos padrões, controles e testes, se liga a ambos os anticorpos formando um sanduíche. Os reagentes não ligados são removidos por meio da lavagem dos tubos, enquanto a quantidade de renina ligada aos tubos é diretamente proporcional à quantidade de renina presente nas amostras.

A determinação da concentração plasmática de vasopressina foi feita por meio de um *kit* comercial de radioimunoensaio (RK-065-07, Phoenix Pharmaceuticals), com base na competição do peptídeo-referência ligado a ^{125}I com o peptídeo padrão ou desconhecido. À medida que a concentração do peptídeo padrão ou desconhecido aumenta na amostra, e portanto na reação, a quantidade de peptídeo contendo ^{125}I capaz de se ligar ao anticorpo diminui. Dessa forma, por meio da quantificação do peptídeo associado a ^{125}I ligado, constrói-se uma "curva normal", a partir da qual a concentração do peptídeo de interesse na amostra analisada pode ser determinada.

3.7. RT-PCR em Tempo Real

No processo de retirada dos rins, os rins direitos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C até o procedimento de extração de RNA. Neste processo, um fragmento de aproximadamente 100 mg do tecido renal foi dissolvido em 750 µl de TrizolTM (Invitrogen, Carsbad, CA) e 250 µl de água livre de RNase, obtida por tratamento com dietil pirocarbonato (DEPC). Esse material foi incubado à temperatura ambiente por 5 min e, em seguida, centrifugado a 12000 g por 15 min a 4 °C. Adicionamos, então, clorofórmio na proporção de 200 µl/mL de TrizolTM, seguido de nova centrifugação a 12000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo limpo com isopropanol para a precipitação do RNA. O sobrenadante foi então descartado, enquanto o precipitado foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7500 g por 10 min a 4 °C. Após a secagem, o RNA foi ressuscitado em 60 µL de água tratada com DEPC. A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro modelo Spectronic 20 Genesys (Spectronic Instruments).

A síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi realizada a partir de 3 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do *kit* ImProm II reverse transcriptase (Promega, Madison, USA). A reação quantitativa de transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real (qRT-PCR) foi realizada com o *kit* TaqMan (Applied Biosystems, Warrington, UK), utilizando ensaios específicos para renina (Mm02342889_g1), angiotensinogênio (Mm00599662_m1), ECA (Mm00802048_m1) e GAPDH (Glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase) (Mm99999915_g1), este usado como controle quantitativo das reações. O programa utilizado para as amplificações relacionadas aos ensaios de renina, angiotensinogênio, ECA e GAPDH incluiu 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min; e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os resultados foram obtidos com a metodologia de $\Delta\Delta C_t$ e expressos em unidades arbitrárias (UA), baseadas na normalização em relação ao sinal para GAPDH.

3.8. Análises Imunoistoquímicas

3.8.1. Análise Imunoistoquímica da Expressão Renal de ECA e AT1R

A análise imunoistoquímica da expressão renal de ECA foi realizada com um anticorpo monoclonal anti-ECA de camundongo (clone 2E2, cod. MAB3502, Chemicon International, Inc), enquanto a da expressão renal do receptor AT1 da angiotensina II (AT1R) foi conduzida com um anticorpo policlonal anti-AT1R de coelho (cod. Angio2RNAABR, RDI Division of Fitzgerald Industries).

A análise imunoistoquímica para ECA se iniciou com a desparafinização e reidratação dos tecidos com uma bateria de xilol-álcool. Após esse procedimento, as secções do tecido foram submersas em tampão citrato (10mM, pH 6,0), previamente aquecido, e ficaram 17 min no microondas. Em seguida, os tecidos foram imersos em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol. Após essa passagem, as secções foram incubadas com solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,01 M, pH 7,4, e leite desnatado 6% (Molico, Nestlé, Brasil) durante 30 min à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas

foram incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário anti-ECA. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS durante 5 min e incubadas com anticorpo secundário envision (Dako, Carpinteria, EUA) durante 30 min a temperatura ambiente. Por fim, os tecidos foram revelados com o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, EUA). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayers.

A análise imunoistoquímica para AT1R, por sua vez, se iniciou com a desparafinização e reidratação dos tecidos com uma bateria de xilol-álcool e, em seguida, foi realizada a recuperação antigênica utilizando um tampão citrato (10mM, pH 6,0) durante 15 min no microondas. O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol durante 30 min. Logo após, as secções foram incubadas com solução PBS (0,01 M, pH 7,4) e leite desnatado 6% (Molico, Nestlé, Brasil) durante 30 min à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário anti-AT1R. Foi utilizado PBS no lugar do anticorpo primário para os controles negativos. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS durante 5 min e incubadas com anticorpo secundário envision (Dako, Carpinteria, EUA) durante 30 min a temperatura ambiente. Por fim, os tecidos foram revelados com o substrato cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, EUA) e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayers.

3.8.2. Análise Imunoistoquímica de Proliferação Celular

A análise de proliferação celular foi realizada por imunoistoquímica 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), previamente aquecido, e ficaram 30 min na panela a vapor. Os tecidos foram arrefecidos à temperatura ambiente e depois imersos em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% em metanol. Em seguida, as secções foram incubadas com avidina e biotina, 15 min cada, para bloqueio da biotina endógena. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com solução PBS 0,01 M, pH 7,4, e leite desnatado 2% (Molico, Nestlé, Brasil) durante 30 min à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário anti-Ki-67 (Monoclonal rat anti-mouse Ki-67 antigen, cod. M7249, clone TEC-3, Dako, Carpinteria, EUA). 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 anticorpo secundário biotinilado (rabbit anti-rat, Dako, Carpinteria, EUA) durante 45 min a 25 °C. As secções foram incubadas a seguir, com o complexo avidina-biotina peroxidase ABC (*Avidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex*, Vector, Burlingame, EUA) durante 30 min e, em seguida, novamente lavadas com PBS. Por fim, os tecidos foram revelados com o substrato cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, EUA). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayers.

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.

3.8.3. Análise Imunoistoquímica de Apoptose Celular

A análise qualitativa e quantitativa de apoptose celular foi realizada por imunoistoquímica através da técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin deoxyuridine nick-end labeling*) com o kit *ApopTag Plus Peroxidase in Situ Detection* (Cód. S7101, Chemicon, Billerica, EUA). Após desparafinização e reidratação com uma bateria de xilol-álcool, as secções foram pré-tratadas com proteinase K (20 mg/mL, Dako) diluída em PBS 0,01 M durante 15 min à temperatura ambiente. Depois de algumas lavagens com água destilada, as lâminas foram colocadas em um bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂ 3%) por 10 min. Em seguida, as secções passaram por outro bloqueio, este com leite desnatado 6% em PBS (0,01 M, pH 7,4) por 30 min a 37 °C. As lâminas foram então expostas ao tampão de equilíbrio do *kit* por 10 s e, em seguida, incubadas com a enzima *working strenght TdT* do *kit* na câmara úmida por 1 h a 37 °C. Após esse período, as lâminas foram incubadas com tampão de parada por 10 min à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, lavadas com PBS e incubadas com o conjugado anti-digoxigenina por 30 min, à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas receberam o cromógeno DAB por 30 s e, a seguir, foram contra-coradas com hematoxilina de

Mayers. Uma secção renal foi incubada com 1,0 U/mL de DNase para controle negativo, ao passo que para o controle positivo utilizamos uma secção com tecido de baço.

Para a quantificação de apoptose, também 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 apoptose foram expressos como a relação entre o número de núcleos positivos e o número total de núcleos observados.

3.9. Análise Estatística

Os dados contínuos foram inicialmente comparados com a curva de Gauss através do teste de distância K-S. Quando paramétricos, foram representados através da média e desvio padrão. Na comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de *Student* não pareado. Quando não-paramétricos, os dados foram representados através de mediana e quartis. Na comparação de dois grupos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Quando necessário, os dados foram ajustados a curva normal através de conversão em dados em recíproco ($1/x$) para aumentar a eficiência do teste estatístico (β). Para análise dos dados foram utilizados os programas SPSS 19.0 (IBM ® Corporation), Sigma Plot 9.0 (Jandel ® Corporation) e GraphPad 5.0 (Prism ® Software). Neste estudo aceitamos risco alfa menor ou igual a 5% e risco beta menor ou igual a 20%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Camundongos $Pkd1^{\text{cond/cond}};\text{Bal}^{\text{cre}}$ e $Pkd1^{+/-}$: Fenótipos Renais

Como vimos, usando um alelo *floxed Pkd1* e um transgene nestina-Cre geramos camundongos homozigotos para este alelo condicional com um padrão de inativação gênica em mosaico, por meio da excisão dos éxons 2-4 ($Pkd1^{\text{cond/cond}};\text{Bal}^{\text{cre}}$; CI) ¹²². Também trabalhamos com camundongos heterozigotos para uma mutação nula de *Pkd1* ($Pkd1^{+/-}$; HT) ¹²². Os animais CI apresentam rins císticos sem *background* celular de haploinsuficiência para *Pkd1*, enquanto os camundongos HT cursam com rins não císticos em um contexto celular de haploinsuficiência para *Pkd1* ¹²².

Secções seriadas de rins esquerdos CI e NC ($Pkd1^{\text{cond/cond}}$) confirmaram a presença de cistos e microcistos apenas em camundongos CI (dados não mostrados). O número médio de cistos presentes nos rins esquerdos CI foi 22 ± 6 ; conforme esperado, não foram observados cistos nos rins esquerdos NC. A razão entre o peso do rim direito e o peso corpóreo (RD/PC) foi significativamente maior nos camundongos CI ($0,0098 \pm 0,0016$) que nos animais NC ($0,0081 \pm 0,0008$; $p < 0,01$, Figura 11A), enquanto que a razão entre o peso do rim esquerdo e o peso corpóreo (RE/PC) foi numericamente maior nos animais CI mas não diferiu estatisticamente entre os dois grupos (Figura 11A). Vale dizer que não detectamos diferença significativa de PC entre os animais NC e CI nem entre os grupos SV e HT (Tabela 1). Compressão ocasional de vasos sanguíneos, exercida por cisto renal, pôde ser observada em rins CI, conforme mostrada na Figura 11B.

As análises de quantificação de dilatação tubular/formação cística revelaram que os camundongos CI apresentaram um maior número de DTI [23 (8,5 - 33,5)], comparados a camundongos NC [8,0 (2,5 - 13,5); $p < 0,05$, Figura 12/13]. Similarmente, foi observado um maior número de DTII no grupo CI [14 (10 - 24,5)] em relação ao grupo NC [1,0 (1,0 - 8,0); $p < 0,05$, Figura 12/13]. Os camundongos CI também apresentaram um maior número de MC [5,0 (4,0 - 7,0)] que os camundongos NC [0,0 (0,0 - 0,0); $p < 0,001$, Figura 12/13]. Por fim, naturalmente, somente os camundongos CI apresentaram cistos renais [6,0 (4,5 - 11) *versus* 0,0 (0,0 - 0,0) para o grupo NC; $p < 0,001$, Figura 12/13].

Estes modelos animais representam, portanto, os dois ambientes celulares/genéticos encontrados nos rins humanos com DRPAD: os camundongos HT apresentam quase exclusivamente células renais *Pkd1*^{+/-} mas não têm cistos, reproduzindo o *background* de ambiente celular encontrado em pacientes com DRPAD1, enquanto camundongos CI apresentam cistos presumivelmente formados por células *Pkd1*^{-/-} em um *background* predominantemente constituído por células *Pkd1*^{+/+}, reproduzindo o fenótipo cístico DRPAD1 e as consequências esperadas em um *background* celular essencialmente selvagem.

Figura 11. (A) Análises comparativas entre as razões pesos renal/peso corpóreo para rins esquerdos e direitos entre camundongos machos NC e CI. (B) Compressão vascular determinada por um cisto no rim de um camundongo CI. Aumento original, x400. ** $p < 0,01$ versus NC. RD/PC e RE/PC foram comparadas usando o teste t de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Tabela 1. Valores de peso corpóreo em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		PC [g; Mediana (intervalo interquartil)]
NC	(n = 9)	19,2 (18,5 - 19,7)
CI	(n = 9)	19,5 (18,8 - 20,3)
SV	(n = 8)	19,3 (18,7 - 19,9)
HT	(n = 8)	19,6 (19,2 - 20,1)

Peso corpóreo foi comparado entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste t de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Figura 12. Análises comparativas entre os índices de dilatação tubular, formação de microcistos e formação de cistos em rins de camundongos machos NC e CI. * $p < 0,05$ versus NC. ** $p < 0,001$ versus NC. Os índices de dilatação tubular, formação de microcistos e formação de cistos foram comparados usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Figura 13. Imagens representativas da quantificação de dilatação tubular, microcistos e cistos em rins de camundongos machos NC e CI. (a) Tecido renal normal de camundongo; NC (b) DTI e DTII em rim de animal NC; (c) Microcisto e DTI em rim de camundongo CI; (d) DTI e DTII em rim CI; (e) Cisto em rim CI; (f) Microcisto com cilindro e fibrose em rim CI. Aumento original, 400X.

4.2. Análise da Pressão Arterial Média

A aferição invasiva direta da PAM, realizada entre 12 e 13 semanas de idade, revelou níveis mais elevados em camundongos CI comparados a animais NC ($150,34 \pm 3,90$ *versus* $136,10 \pm 3,44$ mmHg; $p < 0,01$, Figura 14A, Tabela 2).

Não observamos diferença na PAM, entretanto, entre camundongos HT e SV ($131,03 \pm 4,36$ e $127,54 \pm 2,99$ mmHg, respectivamente, Figura 14B, Tabela 2).

Figura 14. Análises comparativas da PAM entre camundongos machos NC e CI (A) e entre SV e HT (B). ** $p < 0,01$ *versus* NC. PAM foi comparada usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Tabela 2. Pressão arterial média em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		PAM (mmHg, Média $\pm$ DP)
NC	(n = 6)	136,10 $\pm$ 3,44
CI	(n = 6)	150,34 $\pm$ 3,90 ^a
SV	(n = 8)	127,54 $\pm$ 2,99
HT	(n = 6)	131,03 $\pm$ 4,36

PAM foi comparada entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

^ap < 0,01 *versus* NC.

4.3. Análises Indiretas da Taxa de Filtração Glomerular

Mostramos que camundongos CI apresentaram concentração sérica de creatinina discretamente mais baixa que animais NC [0,32 (0,30 - 0,34) *versus* 0,36 mg/dL (0,35 - 0,38); $p < 0,01$, Figura 15A, Tabela 3]. Em contraste, a concentração sérica de uréia foi ligeiramente, mas significativamente, mais alta nos camundongos CI [56,3 mg/dL (55,9 - 59,7)] que em seus controles NC [52,9 mg/dL (52,4 – 53,6); $p < 0,01$, Figura 15C, Tabela 3].

Não foi observada diferença significativa para S_{Cr} , entretanto, entre animais CI e NC [Figura 15B, Tabela 3]. Também não detectamos diferença para S_U entre os grupos HT e SV [Figura 15D, Tabela 3].

Figura 15. Análises comparativas da concentração sérica de creatinina (A e B) e da concentração sérica de uréia (C e D) entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT. ** $p < 0,01$ *versus* NC. S_{Cr} e S_U foram comparadas usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Tabela 3. Valores de S_{Cr} e S_U em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		S_{Cr} [mg/dL; Mediana (intervalo interquartil)]	S_U [mg/dL; Mediana (intervalo interquartil)]
NC	(n = 9)	0,36 (0,35 - 0,38)	52,95 (52,43 - 53,93)
CI	(n = 9)	0,32 (0,30 - 0,34) ^a	56,34 (55,96 - 59,74) ^a
SV	(n = 8)	0,38 (0,36 - 0,39)	54,20 (53,13 - 54,65)
HT	(n = 8)	0,36 (0,34 - 0,36)	54,30 (52,16 - 56,29)

S_{Cr} e S_U foram comparadas entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

^ap < 0,01 *versus* NC.

4.4. Análises de Função Tubular

Verificamos que camundongos CI apresentaram FE_{Na} significativamente mais baixa que animais NC ($0,60 \pm 0,06\%$ *versus* $0,74 \pm 0,09\%$; $p < 0,001$, Figura 16A, Tabela 4). De modo similar, a FE_K também foi menor nos camundongos CI ($19,93 \pm 3,71\%$ em CI *versus* $23,64 \pm 2,59\%$ em animais NC; $p < 0,05$, Figura 16C, Tabela 4). A análise de S_{Na} revelou, por outro lado, um valor mais baixo para os animais CI [137 mEq/L (136 - 138)] que para os camundongos NC [143 mEq/L (141 - 143), $p < 0,01$, Figura 17A, Tabela 4], enquanto os níveis de S_K não diferiram entre os grupos (Figura 17C, Tabela 4).

Interessantemente, camundongos HT exibiram FE_{Na} mais baixa que animais SV, embora a diferença tenha sido menos pronunciada que a observada entre animais CI e NC ($0,72 \pm 0,07\%$ em $Pkd1^{+/-}$ *versus* $0,80 \pm 0,06\%$ em $Pkd1^{+/+}$; $p < 0,05$, Figura 16B, Tabela 4). Não detectamos, contudo, diferença significativa para FE_K , S_{Na} e S_K entre os grupos HT e SV (Figura 16D/17B e D, Tabela 4).

Figura 16. Análises comparativas da FE_{Na} (A e B) e FE_K (C e D) entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT. * $p < 0,05$ versus NC; *** $p < 0,001$ versus NC; # $p < 0,05$ versus SV. FE_{Na} e FE_K foram comparadas usando o teste t de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Figura 17. Análises comparativas da S_{Na} (A e B) e S_K (C e D) entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT. ** $p < 0,01$ *versus* NC. S_{Na} e S_K foram comparados usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Tabela 4. Valores de FE_{Na} , FE_K , S_{Na} e S_K em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		FE_{Na} (%, Média $\pm$ DP)	FE_K (%, Média $\pm$ DP)	S_{Na} [mEq/L; Mediana (intervalo interquartil)]	S_K [mEq/L; Mediana (intervalo interquartil)]
NC	(n = 9)	0,74 $\pm$ 0,09	23,64 $\pm$ 2,59	143 (141 - 143)	4,9 (4,7 - 4,9)
CI	(n = 9)	0,60 $\pm$ 0,06 ^a	19,93 $\pm$ 3,71 ^b	137 (136 - 138) ^c	4,8 (4,7 - 4,9)
SV	(n = 8)	0,80 $\pm$ 0,06	22,98 $\pm$ 3,65	143 (142 - 144)	4,8 (4,7 - 4,9)
HT	(n = 8)	0,72 $\pm$ 0,07 ^d	20,64 $\pm$ 1,60	142 (140 - 144)	4,8 (4,6 - 4,9)

FE_{Na} e FE_K foram comparadas entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP. S_{Na} e S_K foram comparadas entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

^ap < 0,001 *versus* NC.

^bp < 0,05 *versus* NC.

^cp < 0,01 *versus* NC.

^dp < 0,05 *versus* SV.

4.5. Concentrações Plasmáticas de Renina e Vasopressina e Sérica de Aldosterona

Uma vez que o sistema renina-angiotensina-aldosterona tem sido implicado na patogênese da hipertensão arterial associada à DRPAD, avaliamos este sistema em nossos modelos animais de deficiência de *Pkd1*. Não detectamos diferença significativa para a concentração de renina plasmática (avaliada na idade de 13 semanas), vasopressina plasmática (14 semanas) e aldosterona sérica entre camundongos CI e NC (Tabela 5). Entretanto, apesar da grande variabilidade observada, observamos uma tendência a níveis mais altos de vasopressina plasmática em animais CI ($711,6 \pm 647,3$ versus $263,0 \pm 373,4$ pg/mL; $p=0,11$, Figura 18E, Tabela 5).

Verificamos, também, que os níveis plasmáticos de renina, séricos de aldosterona e plasmáticos de vasopressina não diferiram entre camundongos HT e SV (Figura 18B/18D e 18F, Tabela 5).

Figura 18. Análises comparativas das concentrações de renina plasmática (A e B), aldosterona sérica (C e D) e vasopressina plasmática (E e F) entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT. Renina plasmática, aldosterona sérica e vasopressina plasmática foram comparadas usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Tabela 5. Valores das concentrações plasmáticas de renina e vasopressina e sérica de aldosterona em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		Renina Plasmática (pg/ml, Média $\pm$ DP)	Aldosterona Sérica (ng/dl, Média $\pm$ DP)	Vasopressina Plasmática (pg/ml, Média $\pm$ DP)
NC	(n = 8)	3,61 $\pm$ 3,96	30,51 $\pm$ 18,90	263,04 $\pm$ 373,48
CI	(n = 9)	2,62 $\pm$ 2,42	39,58 $\pm$ 17,19	711,59 $\pm$ 647,30
SV	(n = 8)	6,86 $\pm$ 9,34	27,11 $\pm$ 7,88	177,67 $\pm$ 260,15
HT	(n = 8)	9,15 $\pm$ 19,02	26,81 $\pm$ 6,80	80,50 $\pm$ 68,65

Renina plasmática, aldosterona sérica e vasopressina plasmática foram comparadas entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

4.6. Expressão Gênica de Angiotensinogênio, Renina e Enzima Conversora de Angiotensina em Rins Císticos e Não Císticos

Além de sua síntese primária e secreção por células hepáticas, o angiotensinogênio também pode ser produzido localmente nos rins e constitui um componente do sistema renina-angiotensina intrarrenal ¹²⁵. O nível de expressão de RNAm de angiotensinogênio mostrou-se elevado em rins de camundongos CI comparados aos órgãos controle NC, diferença que se tornou estatisticamente significativa na idade de 18 semanas ($1,76 \pm 0,65$ UA *versus* $1,06 \pm 0,39$ UA; $p < 0,05$, Figura 19A). Não detectamos diferença significativa de expressão gênica para renina e ECA entre rins CI e NC, contudo, tanto na idade de 15 semanas como de 18 semanas (Figuras 19B e 19C).

Figura 19. Análises comparativas da expressão renal de RNAm de angiotensinogênio (A), renina (B) e ECA (C) em camundongos machos NC e CI com 18 semanas de idade. * $p < 0,05$ *versus* NC. As expressões de RNAm de angiotensinogênio, renina e ECA foram comparadas usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

4.7. Expressão de ECA e do Receptor AT1 por Imunoistoquímica em Rins

Císticos e Não Císticos

Em seguida, analisamos a expressão de ECA e do receptor AT1 em rins de camundongos com 15 semanas de idade. Nesta fase, os rins CI mostraram marcação imunoistoquímica para ECA heterogênea em epitélio cístico (Figura 20c/d), assim como sinal positivo ocasional em segmentos tubulares (Figura 20f). Não observamos marcação para ECA na vasculatura de rins CI (Figura 20e). Rins de camundongos NC, por sua vez, não mostraram marcação para ECA em nenhum desses compartimentos renais (Figura 20a/b).

Vasos sanguíneos de rins de ambos os grupos NC e CI exibiram marcação positiva para AT1R (Figura 21b/d). Além disso, o epitélio cístico de rins CI também apresentou marcação para AT1R (Figura 21c). Não foi detectado sinal positivo para AT1R, contudo, em glomérulos ou em túbulos de aparência normal tanto em rins CI como em órgãos NC (Figura 21a/b/c/d).

Figura 20. Imagens representativas da análise de expressão da ECA por imunohistoquímica em rins de camundongos machos NC (a, b) e CI (c, d, e, f). Rim NC: não se detecta sinal em túbulos e em glomerulos (a), assim como em vasos sanguíneos (b). Rim CI: detecta-se sinal positivo em epitélio cístico (c, d); ausência de marcação em vaso sanguíneo (e); e sinal positivo em túbulos (f). Aumento original, 400X.

Figura 21. Imagens representativas da análise de expressão de AT1R por imunohistoquímica em rins de camundongos machos NC (a, b) e CI (c, d). Rim NC: não se detecta sinal em túbulos e glomérulos (a), mas se observa marcação positiva em estruturas vasculares (b). Rim CI: detecta-se sinal positivo em epitélio cístico (c) e em estruturas vasculares (d). Aumento original, 400X.

4.8. Excreção Urinária de Metabólitos do Óxido Nítrico

A excreção urinária de nitrito (EU_{NO_2}) foi menor nos camundongos CI ($0,007 \pm 0,004$ mmol/g de creatinina) que nos animais NC ($0,014 \pm 0,005$ mmol/g de creatinina; $p < 0,01$, Figura 22A, Tabela 6). A excreção urinária de nitrato (EU_{NO_3}), entretanto, não diferiu entre camundongos CI e NC (Figura 22C, Tabela 6).

Camundongos HT e SV, por sua vez, não apresentaram diferença quanto à excreção urinária de ambos os metabólitos do óxido nítrico (Figura 22B/D, Tabela 6).

Figura 22. Análises comparativas da excreção urinária de NO₂ (A e B) e NO₃ (C e D) entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT. ** $p < 0,01$ *versus* NC. EU_{NO₂} e EU_{NO₃} foram comparadas usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Tabela 6. Valores de EU_{NO2} e EU_{NO3} em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		EU _{NO2} (mmol/g creat, Média ± DP)	EU _{NO3} (mmol/g creat, Média ± DP)
NC	(n = 8)	0,014 ± 0,005	12,30 ± 3,06
CI	(n = 9)	0,007 ± 0,004 ^a	8,21 ± 5,62
SV	(n = 8)	0,014 ± 0,013	5,67 ± 3,82
HT	(n = 8)	0,016 ± 0,011	7,88 ± 3,76

EU_{NO2} e EU_{NO3} foram comparadas entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média ± DP.

^ap < 0,01 *versus* NC.

4.9. Análises da Capacidade de Concentração Renal

Observamos que a capacidade de concentração renal, mensurada por meio da osmolalidade urinária máxima ($U_{osm}Max$), foi significativamente mais baixa em camundongos CI (2733 ± 195 mOsm/kg) comparados a animais NC (3199 ± 288 mOsm/kg H_2O ; $p < 0,001$, Figura 23A, Tabela 7). A $U_{osm}Max$ não diferiu, entretanto, entre camundongos HT e SV (Figura 23B, Tabela 7).

Figura 23. Análises comparativas da osmolalidade urinária máxima entre camundongos machos NC e CI (A), e entre SV e HT (B). *** $p < 0,001$ *versus* NC. $U_{osm}Max$ foi comparada usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

Tabela 7. Valores de $U_{osm}Max$ em camundongos machos NC, CI, SV e HT.

Parâmetros		$U_{osm}Max$ (mOsm/kg H ₂ O, Média $\pm$ DP)
NC	(n = 9)	3199 $\pm$ 288
CI	(n = 9)	2733 $\pm$ 195 ^a
SV	(n = 8)	3067 $\pm$ 176
HT	(n = 8)	3158 $\pm$ 123

$U_{osm}Max$ foi comparada entre camundongos machos NC e CI, e entre SV e HT, usando o teste *t* de student não pareado, com dados expressos como média $\pm$ DP.

^ap < 0,001 *versus* NC.

4.10. Proliferação Celular em Rins Císticos e Não Císticos

As análises imunoistoquímicas para Ki-67 revelaram uma taxa de proliferação celular elevada em rins CI [17% (9 - 35)] comparada à de rins NC [5% (1 - 9)]; $p < 0,05$, Figuras 24A e 25a/b] na idade de 15 semanas.

Conforme esperado, taxas de proliferação celular similares foram detectadas entre rins HT e SV (Figuras 24B e 25c/d).

Figura 24. Análises comparativas da taxa de proliferação celular entre camundongos machos NC e CI (A), e entre SV e HT (B). * $p < 0,05$ *versus* NC. A marcação para Ki-67 foi comparada usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Figura 25. Imagens representativas da marcação para Ki-67 em rins de camundongos machos NC (a), CI (b), SV (c) e HT (d). Aumento original, 400X.

4.11. Apoptose em Rins Císticos e Não Císticos

Empregamos a técnica de TUNEL para estudar apoptose em rins de animais de 15 semanas de idade. Rins CI apresentaram uma taxa apoptótica significativamente mais alta [16,6% (14,0 - 30,2)] que rins NC [0,0% (0,0 - 4,6), $p < 0,001$; Figuras 26A e 27a/b]. Não encontramos diferença nas taxas de apoptose, entretanto, entre rins HT e SV (Figuras 26B e 27c/d).

Figura 26. Análises comparativas da taxa de apoptose celular entre camundongos machos NC e CI (A), e entre SV e HT (B). *** $p < 0,001$ *versus* NC. A marcação para TUNEL foi comparada usando o teste de proporção do Qui-quadrado, com dados representados como mediana (intervalo interquartil).

Figura 27. Imagens representativas da marcação para TUNEL em rins de camundongos machos NC (a), CI(b), SV (c) e HT (d). Aumento original, 400X.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A identificação dos genes *PKD1* e *PKD2* e a caracterização progressiva de seus produtos trouxeram contribuições sucessivas à compreensão da patogênese da DRPAD e das funções das policistinas 1 e 2. Múltiplos estudos apoiam o conceito de que o mecanismo de formação de cistos renais e hepáticos, na DRPAD1 e DRPAD2, seja recessivo no nível molecular, requerendo as presenças da mutação de linhagem germinativa e de uma mutação somática no alelo previamente normal^{47, 54, 126}. As bases patogênicas das manifestações não císticas da doença, contudo, tais como hipertensão arterial e déficit de concentração renal, permanecem substancialmente desconhecidas.

A hipertensão arterial afeta a maior parte dos pacientes com DRPAD antes de uma perda significativa de função renal e se constitui no principal fator de risco para eventos cardiovasculares, responsabilizando-se por morbidade e mortalidade consideráveis nessa população¹²⁷. Os complexos mecanismos envolvidos na patogênese da HAS associada à DRPAD, entretanto, são entendidos apenas de forma incompleta⁹⁰. Atualmente se discute se a hipertensão arterial relacionada à DRPAD é primariamente causada por anormalidades vasculares/endoteliais ou se é dependente da formação e expansão dos cistos renais.

Analizamos esta questão usando dois modelos de camundongo ortólogos à DRPAD humana, com perfis diferentes de inativação do gene *Pkd1*. Camundongos HT não desenvolvem cistos renais nas idades estudadas, representando, portanto, um modelo puro de haploinsuficiência de *Pkd1*⁵². Camundongos CI, por sua vez, são císticos mas apresentam TFG preservada nas idades avaliadas. Este modelo reproduz

o fenótipo observado em humanos em estágio precoce da DRPAD. Utilizando aferição direta da pressão arterial, neste estudo mostramos que camundongos CI exibem hipertensão arterial significativa, ao passo que animais HT não apresentam elevação da pressão arterial média em relação a seus controles.

Observamos, interessante, que camundongos CI apresentam S_{Cr} discretamente mais baixa que animais NC na idade de 10-13 semanas. Embora não tenhamos uma explicação clara para este achado no momento, é possível que a formação cística precoce esteja associada à hiperfiltração por parte do conjunto de néfrons remanescentes. Tomados conjuntamente, os resultados obtidos para camundongos CI e HT são consistentes com o conceito de que a patogênese da hipertensão associada à DRPAD seja primariamente decorrente da formação e do crescimento cístico, em vez de um defeito vascular primário ou dos resultados da haploinsuficiência gênica. Concluimos, ainda, que ao menos em nosso modelo de camundongo cístico, a disfunção renal por si não participa da gênese da hipertensão arterial.

Atualmente se propõe que na DRPAD a hipertensão seja causada pela compressão de vasos sanguíneos intrarrenais por cistos, com consequente isquemia e ativação do eixo renina-angiotensina^{19, 90}. Nossos estudos apoiam este modelo. Interessantemente, os camundongos CI apresentaram FE_{Na} diminuída, acompanhada por um discreto mas uniforme aumento da S_U quando comparados a seus controles NC. Estes achados são consistentes com uma reabsorção tubular aumentada de uréia/solutos/ Na^+ , um processo também consistente com compressão vascular renal, perfusão renal reduzida induzida por expansão cística e ativação do SRA. As

imagens de compressão vascular observadas em rins CI, por sua vez, apoiam fortemente este mecanismo.

Investigamos o SRA usando uma série de abordagens e encontramos evidências significativas de ativação aumentada deste sistema em animais CI. Nossos experimentos de RT-PCR em tempo real demonstraram níveis aumentados de RNAm de angiotensinogênio em rins CI em comparação a rins NC na idade de 18 semanas. Estes achados apoiam a importância do envolvimento do SRA intrarrenal na patogênese da HAS na DRPAD, corroborando estudos prévios que propõem que o sistema intrarrenal desempenhe um papel significativo em sua gênese^{128, 129}. Não fomos capazes, entretanto, de detectar diferenças na expressão de RNAm de renina e ECA entre rins de camundongos CI e NC.

Detectamos marcação para ECA em epitélio cístico e em alguns segmentos tubulares de rins CI, mas tal marcação foi ausente em estruturas vasculares. Rins NC não mostraram sinal tubular ou vascular. Marcação positiva para AT1R também foi observada em epitélio cístico renal CI, assim como em vasos sanguíneos. Em tecido renal NC, entretanto, o sinal para AT1R se restringiu a estruturas vasculares. Tais dados são similares aos reportados por Loghman-Adham *et al*, que encontraram expressão de ECA e AT1R em epitélio cístico e túbulos dilatados de rins humanos com ADPKD¹³⁰. Estes autores também descreveram marcação para angiotensina II em epitélio cístico e túbulos proximais. Estudos adicionais relataram concentração de renina aumentada no aparelho juxtaglomerular, em arteríolas e em células do tecido conjuntivo circunjacente aos cistos em rins com DRPAD¹³¹, assim como em tecido fibroso localizado à distância de estruturas vasculares¹³². Nossos achados, portanto,

provem apoio adicional ao papel do SRA intrarrenal na gênese e na manutenção da hipertensão arterial relacionada à DRPAD.

A importância do SRA circulante na hipertensão relacionada à DRPAD permanece controversa^{92, 95, 128, 129}. Em nossos modelos animais não encontramos diferença estatisticamente significativa para a concentração plasmática de renina entre camundongos CI e NC nem entre animais HT e SV. Esses resultados, contudo, devem ser interpretados sob a ótica de que a análise por radioimunoensaio utilizada consiste num procedimento sujeito a variações experimentais apreciáveis. Também não foi observada diferença significativa para a concentração sérica de aldosterona entre camundongos CI e NC. Ao contrário do observado entre animais SV e HT, porém, observamos uma tendência a valores numéricos mais elevados para os animais CI. Considerando a elevada variabilidade encontrada na determinação desses valores, os resultados relativos à análise da concentração sérica de aldosterona não devem ser desconsiderados, particularmente porque a variabilidade de cistogênese renal no modelo avaliado é grande. Tal variabilidade é explicada em função da variação do perfil de inativação do gene *Pkd1*, um processo dependente do padrão de expressão de Cre recombinase e controlado pelo promotor do gene da nestina. Nesse contexto, alguns animais possuem um número menor de cistos renais e menor volume deste órgão, uma realidade que pode interferir na análise de alguns parâmetros chave, como os componentes do SRA. As ausências de diferenças mencionadas, entretanto, são consistentes com um estudo anterior, que mostrou ausência de diferença da atividade plasmática de renina entre pacientes com DRPAD hipertensos e normotensos¹³³.

A DRPAD se associa a uma vasodilatação dependente do endotélio anormal, a qual tem sido atribuída a uma geração reduzida de óxido nítrico ^{98, 114, 134}. Em acordo com tal observação, os animais CI apresentaram uma excreção urinária de NO₂ menor que a dos camundongos NC, porém ausência de diferença para a excreção urinária de NO₃. Nossos achados sugerem que a produção reduzida de NO, previamente associada à DRPAD humana, esteja relacionada com a doença renal cística e poderia provavelmente contribuir para a piora da hipertensão arterial. Não detectamos, entretanto, diferenças significantes de UE_{NO2} e UE_{NO3} entre camundongos HT e SV, o que difere de achados relatados por outro grupo ¹³⁵. Esta diferença de observações pode ter ocorrido devido à idade dos animais desse estudo ou, alternativamente, devido a diferenças de *background* genético.

A ocorrência de um déficit de concentração renal constitui-se em uma das manifestações mais precoces da DRPAD, porém seu mecanismo patogênético permanece incerto ²¹. Uma hipótese proposta invoca uma anormalidade primária nas células principais do túbulo coletor. O fato de que a poliúria se desenvolve somente após a detecção de cistos, entretanto, a torna improvável ¹⁰⁰. A apresentação precoce do defeito de concentração urinária, por sua vez, argumenta contra um papel primário de alterações túbulo-intersticiais ou do comprometimento da arquitetura córtico-medular dependente dos cistos na determinação desse fenótipo ¹³⁶. Nossos resultados não revelam diferença de osmolalidade urinária máxima entre camundongos HT e SV, sugerindo que a haploinsuficiência de *Pkd1* não resulte no defeito de concentração relacionado à DRPAD. Em contraste, camundongos CI apresentam uma redução significativa da U_{osm}Max em comparação a animais NC, o que nos leva a inferir que o desenvolvimento de cistos e o comprometimento

estrutural da arquitetura renal desempenhem um papel central na gênese da deterioração da capacidade de concentração renal. Estes achados são consistentes com as observações de Gabow *et al* em crianças, onde um déficit de concentração urinária significativo foi detectado apenas em crianças com mais de 10 cistos¹⁸, e de Seeman *et al*, que mostraram que este defeito se correlaciona com o número de cistos¹³⁶.

Estudos mostraram que os níveis de vasopressina encontra-se mais altos em pacientes com DRPAD^{102, 103}, uma observação que pode ser interpretada como uma tentativa do organismo de compensar o defeito de concentração renal. Níveis elevados de vasopressina também podem contribuir para a hipertensão, através de efeitos sobre os receptores V1 ou V2. O receptor V1 tem efeito direto sobre o músculo vascular liso diminuindo o fluxo sanguíneo medular renal¹³⁷, enquanto a ativação do receptor V2 aumenta a expressão das subunidades β e γ do canal ENaC¹³⁸. No estudo atual, encontramos uma tendência a níveis mais elevados de vasopressina plasmática nos camundongos CI comparados a NC, mas tal diferença não alcançou significância estatística. A não detecção de uma diferença mais dramática pode se dever à variabilidade do fenótipo cístico renal observada nesta linhagem. A expressão em mosaico de nestina-Cre recombinase constitui-se em uma das prováveis razões para tal variação fenotípica¹³⁹. A observação de uma concentração sérica de Na^+ mais baixa nos camundongos CI sugere, além disso, um efeito de vasopressina elevada nesses animais.

Estudos anteriores demonstraram que as policistinas constituem-se em moduladores da proliferação celular e são essenciais à manutenção do fenótipo diferenciado do epitélio tubular renal^{47, 54}. De fato, a redução dos níveis de PC1 ou

PC2 para abaixo de um ponto crítico segue-se de um fenótipo celular anômalo, caracterizado por taxas aumentadas de proliferação celular e de apoptose, perda da polaridade planar celular e remodelação da matriz extracelular ¹²⁸. Nosso estudo revelou taxas de proliferação celular e de apoptose mais elevadas em rins CI que em órgãos NC, incluindo áreas próximas e distantes dos cistos. Este padrão de proliferação difere do de um estudo prévio, no qual os investigadores não detectaram proliferação celular aumentada em epitélio tubular ou em células intersticiais localizadas em áreas normais distantes de cistos, em camundongos submetidos à inativação de *Pkd1* na idade de cinco semanas ⁵¹. A diferença de perfis observada entre os dois modelos é provavelmente explicado pelo fato de em nosso modelo a inativação de *Pkd1* não ser sincrônica. Nossos resultados sugerem, portanto, que células submetidas à inativação completa de *Pkd1* durante o desenvolvimento renal possam apresentar fenótipos proliferativo e/ou apoptótico não necessariamente associados a cistogênese. Nossos resultados não revelaram, entretanto, diferenças nas taxas de proliferação celular e apoptose renais entre camundongos HT e SV. Esses resultados reproduziram resultados prévios de nosso grupo ⁵² e são consistentes com o fato de camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* possuírem células renais com apenas um alelo mutado.

Nossos resultados, portanto, não apenas apoiam o modelo de expansão cística/hipoperfusão local para o desenvolvimento de hipertensão arterial em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD, como também implicam fortemente a ativação do sistema renina-angiotensina como um componente crítico em sua patogênese. Nossos dados também apoiam a geração diminuída de NO como um fator contributivo para a hipertensão arterial associada à DRPAD. Os resultados

deste estudo, além disso, levam à conclusão de que a formação e a expansão cística são determinantes para o desenvolvimento do déficit de concentração renal neste modelo animal cístico. Com base nas similaridades entre o modelo ortólogo e a doença humana, tais achados assumem grande relevância potencial para a DRPAD humana.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O desenvolvimento de hipertensão arterial em camundongos CI e o não aumento da pressão arterial nos animais HT sugerem que a formação de cistos renais seja fundamental para o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica na DRPAD.
- A redução de FE_{Na} e FE_K nos camundongos CI, associada a uma tênue elevação da concentração sérica de uréia e a um aumento significativo da pressão arterial média, sugerem que a expansão cística se acompanhe de aumento da reabsorção tubular de solutos.
- A expressão de ECA e AT1R no epitélio cístico renal sugere que a formação progressiva de cistos renais seja fundamental para a ativação do sistema renina-angiotensina na DRPAD.
- Nossos resultados apoiam a hipótese de que o sistema renina-angiotensina intrarrenal seja determinante para a gênese e manutenção da hipertensão arterial associada à DRPAD.
- A diminuição da excreção urinária de NO_2 nos camundongos CI é consistente com as anormalidades endoteliais observadas na DRPAD.
- O déficit de concentração renal presente nos camundongos CI, ausente nos animais HT, sugere que a formação de cistos renais seja fundamental para o desenvolvimento deste distúrbio na DRPAD.
- Nossos resultados demonstram que o padrão de inativação de *Pkd1* no camundongo CI induz aumento nas taxas de proliferação celular e apoptose renais.

ANEXOS

ARTIGO EM REVISÃO NO PERIÓDICO KIDNEY INTERNATIONAL

Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in *Pkd1*-deficient mice.

**Jonathan M. Fonseca¹, Ana P. Bastos¹, Andressa G. Amaral¹, Mauri F. Sousa²,
Leandro E. Souza³, Denise M. Malheiros⁴; Klaus Piontek⁵, Maria C. Irigoyen³,
Terry J. Watnick⁶, 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;

²Department of Medicine, Federal University of Goiás School of Medicine, Goiânia, 74605-020, Brazil; ³Department of Cardiopneumology, Heart Institute, University of

São Paulo School of Medicine, São Paulo, 05403-000, Brazil; ⁴Department of Pathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, 01246-903, Brazil;

⁵Department of Oncology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 21205, USA; ⁶Department of Medicine, Division of Nephrology, Johns

Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 21205, USA.

Running title: Cyst growth, hypertension and concentrating deficit in *Pkd1*-deficient 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

We have bred a *Pkd1* floxed allele with a nestin Cre expressing line to generate cystic mice (CY) with preserved GFR to address the pathogenesis of complex, unresolved phenotypes of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Hypertension affects ~60% of ADPKD patients before loss of renal function, leading to significant morbimortality. CY mice were hypertensive by 10-13 weeks of age, a phenotype not seen in noncystic controls (NC) and *Pkd1*-haploinsufficient animals (HT), which do not develop renal cysts. The fractional excretion of Na^+ and K^+ were reduced and SUN was slightly elevated in CY mice. Angiotensinogen gene expression was higher in CY than NC kidneys, while immunohistochemistry revealed ACE and AT1 receptor expression in renal cyst epithelia. Urine NO_2 excretion was lower in CY mice while renal cell proliferation and apoptosis were increased. Renal concentrating deficit is also an early finding in ADPKD. Maximum urine osmolality was lower in CY animals, a deficit not found in HT and NC controls. A trend toward higher serum vasopressin was observed in CY mice. These results support that cyst growth plays a central role in ADPKD-associated hypertension and that activation of the intrarenal renin-angiotensin system is a key mechanism in this process. Our findings also suggest that renal cyst expansion is essential for the development of concentrating deficit in this disease, and are consistent with the existence of areas of reduced perfusion in ADPKD kidneys.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common monogenic life-threatening disease, with an estimated prevalence of 1:400-1000.¹ By the age of 60 years, more than half of the patients reach end-stage renal disease.² While mutations in one of two genes, *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*) or *PKD2* (*polycystic kidney disease 2*), cause this disorder, approximately 85% of the cases are linked to the *PKD1* locus.³ Mutations in *PKD1*, in turn, are usually associated with a more severe phenotype than *PKD2*.^{4,5} Although most patients seek medical attention due to kidney manifestations, ADPKD is a systemic illness and includes extrarenal phenotypes most often represented by liver cysts, intracranial aneurysms and heart valve abnormalities.⁶

The pathogenesis of critical and complex phenotypes is still unresolved in ADPKD. Systemic arterial hypertension (SAH) is one of the most common findings in this disorder, occurring in approximately 60% of cases prior to a significant loss of renal function⁷ and 10 years earlier than in the general population.⁸ SAH is a major risk factor for cardiovascular disease in this patient population.⁹ The mechanisms involved in ADPKD-associated hypertension, however, are not completely understood, although renal abnormalities influence its genesis and maintenance.¹⁰ It is currently thought that activation of the renin-angiotensin system (RAS), in response to cyst expansion and secondary vascular compression, plays a central role in the development of hypertension in this disease.^{7,10} This model, however, has not been proven yet. Additional data suggest that lower levels of nitric oxide (NO) as a result of ADPKD-associated endothelial dysfunction¹¹ contribute to increased angiotensin II generation through a local increase in oxidative stress. In addition,

reduced cardiac relaxation that is typically associated with this disorder may lead to a reduction in renal blood flow and increase in angiotensin II formation.¹⁰

The ADPKD renal phenotype is also classically associated with a concentrating deficit. This abnormality is usually mild and not associated with polyuria or polydipsia, but can be detected in childhood.¹² The pathogenesis of this concentrating defect is not known but disruption of the corticomedullary architecture due to cyst growth, a principal cell defect and/or development of tubulointerstitial alterations have been proposed as possible causes. These mechanisms, however, are not consistent with its early presentation.¹³ Previous data exclude a central nervous cause, since vasopressin levels have been found to be high in ADPKD patients.¹³ Increased plasma vasopressin in this illness^{14,15} has been postulated to contribute to the degree of hypertension. Notably, the observation that aquaporin-2 is upregulated in animal models of polycystic kidneys, as opposed to what is seen in the central and most nephrogenic forms of diabetes insipidus, suggests that the abnormality is positioned distally to the synthesis of this molecule.^{16,17}

In order to test whether cystic disease is the principal determinant of hypertension and the concentrating defects, we have extensively evaluated and characterized these complex phenotypes in two independent *PKD1* orthologous mouse models. We found that *Pkd1*-haploinsufficient animals were normotensive and had normal concentrating capacity whereas cystic animals were hypertensive, showed increased kidney expression of RAS components and exhibited concentrating defects. These findings suggest that cyst formation is critical for the pathogenesis of both these classic manifestations of ADPKD and that RAS activation plays a significant role in the pathogenesis of hypertension in this disorder.

RESULTS

Pkd1^{cond/cond}:Bal^{cre} and Pkd1^{+/-} mouse models

We have used two *Pkd1*-deficient mouse models in the current work. Using a *Pkd1* floxed allele and a nestin-Cre transgene, we have generated homozygous animals for this conditional allele with a mosaic pattern of gene inactivation, via the excision of the exons 2-4 (*Pkd1^{cond/cond}:Bal^{cre}*; CY).¹⁸ We have also worked with heterozygous mice for a *Pkd1*-null mutation (*Pkd1^{+/-}*; HT).^{18,19} While the CY mice present cystic kidneys without a *Pkd1*-haploinsufficient cell background, the HT animals display non-cystic kidneys in the setting of *Pkd1*-haploinsufficiency.^{18,19}

Serial sections of CY and non-cystic (*Pkd1^{cond/cond}*; NC) left kidneys confirmed the presence of cysts and microcysts only in CY mice (data not shown). The average number of cysts present in the CY left kidneys was 22 ± 6 ; as expected, no cysts were observed in the NC left kidneys. While both right and left KW/body weight (BW) ratios were numerically higher in CY than NC mice, only the right KW/BW difference was statistically significant at the age of 15 weeks (Figure 1A). Occasional compression exerted by renal cysts on blood vessels could be seen in CY kidneys, as shown in Figure 1B.

These models represent, therefore, the two cellular/genetic environments found in the human ADPKD kidneys: the HT mice show almost exclusively *Pkd1^{+/-}* renal cells but do not display cysts, reproducing the background cell environment found in ADPKD1 patients, whereas CY mice have cysts presumably formed by *Pkd1^{-/-}* cells in a predominant background of *Pkd1^{+/+}* cells, reproducing the ADPKD1 cystic phenotype and its expected consequences in an essentially wild-type cell

background. All experiments were performed in male mice to avoid potential gender-related experimental heterogeneity.

Blood pressure analysis

Invasive mean arterial pressure (MAP) measured at 12-13 weeks of age revealed higher levels in CY mice compared to NC animals (150.34 ± 3.90 *versus* 136.10 ± 3.44 mmHg; $p < 0.01$, Figure 2A, Table 1). We did not observe a difference in MAP between HT and wild-type ($Pkd1^{+/+}$; WT) mice (Figure 2B, Table 1).

Glomerular filtration and tubular function analyses

We found that CY mice had slightly lower serum creatinine when compared with NC animals [0.32 (0.30 to 0.34) *versus* 0.36 mg/dL (0.35 to 0.38); $p < 0.01$, Figure 3A, Table 1]. In contrast, serum urea nitrogen (SUN) was slightly but significantly higher in the cystic *versus* control mice: 26.70 ± 1.43 mg/dL in CY *versus* 25.23 ± 1.22 mg/dL in NC animals ($p < 0.05$, Figure 3B, Table 1). There were no significant differences in these parameters, however, between HT and WT mice (Figures 3C and 3D, Table 1). There were no differences in BW between CYs and NCs or between HTs and WTs (Table 1).

Next we studied the renal handling of Na^+ and K^+ . We found that CY mice had a significantly lower fractional excretion of Na^+ (FE_{Na}) compared with NC animals ($0.60 \pm 0.06\%$ *versus* $0.74 \pm 0.09\%$; $p < 0.001$, Figure 4A, Table 2). Similarly, the fractional excretion of K^+ (FE_{K}) was lower in the CY animals ($19.93 \pm 3.71\%$ in CY *versus* $23.64 \pm 2.59\%$ in NC mice; $p < 0.05$, Figure 4B, Table 2). Serum Na^+

(S_{Na}) analysis revealed lower values in CY compared with NC mice [137 (136 to 138)] *versus* 143 mEq/L (141 to 143); $p < 0.01$, Figure 5A, Table 2], while no serum K^+ (S_K) difference was detected between these groups (Figure 5B, Table 2).

Interestingly, HT mice exhibited a lower FE_{Na} compared to WT animals, although the difference was less striking than that observed between CY and NC mice ($0.72 \pm 0.07\%$ in $Pkd1^{+/-}$ *versus* $0.80 \pm 0.06\%$ in $Pkd1^{+/-}$ animals; $p < 0.05$, Figure 4C, Table 2). There was no significant difference in FE_K , S_{Na} or S_K between the HT and WT groups (Figures 4D, 5C and 5D, Table 2).

Plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone

Since the renin-angiotensin-aldosterone system has been implicated in ADPKD-associated hypertension, we evaluated this system in our animal models. We did not detect a significant difference in plasma renin (evaluated at 13 weeks), plasma vasopressin (14 weeks) and serum aldosterone (15 weeks) between CY and NC mice. Despite considerable variability, there was a trend toward higher plasma vasopressin in CY animals (711.6 ± 647.3 *versus* 263.0 ± 373.4 pg/mL; $p = 0.11$, Figure 6A, Table 3). The plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone levels did not differ between HT and WT mice (Figure 6B, Table 3).

Angiotensinogen, renin and angiotensin-converting enzyme gene expression in cystic and non-cystic kidneys

In addition to its primary synthesis and secretion by hepatic cells, angiotensinogen can be also produced locally in the kidneys and constitutes a

component of the intrarenal RAS.²⁰ The angiotensinogen mRNA expression level was elevated in CY *versus* NC mouse kidneys and became statistically significant by 18 weeks of age (1.76 ± 0.65 arbitrary units; AU) compared to the NC organs (1.06 ± 0.39 AU; $p < 0.05$, Figure 7A). There was no difference in the gene expression level of renin and angiotensin-converting enzyme (ACE) between CY and NC kidneys at either 15 or 18 weeks of age (Figures 7B and 7C).

ACE and AT1 receptor immunohistochemical expression in cystic and non-cystic kidneys

Next we studied expression of ACE and AT1 receptor in 15 week-old mice. At this time point, CY kidneys showed nonuniform immunohistochemical ACE staining in renal cyst epithelia, as well as occasional positive signal in tubular segments (Figure 8A). We did not observe ACE staining in the vasculature of CY kidneys. In contrast, NC mouse kidneys showed no ACE staining in either tissue compartment (Figure 8A).

Blood vessels from both CY and NC mouse kidneys exhibited positive AT1 receptor (AT1R) staining (Figure 8B). In addition, cystic epithelia in the CY kidneys stained with antibody to AT1R. There was no AT1R staining in glomeruli or in normal-appearing tubules in both CY and NC kidneys (Figure 8B).

Urinary excretion of nitric oxide metabolites

The urinary excretion of nitrite (UE_{NO_2}) was lower in CY mice (7.0 ± 4.0 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine) compared with NC animals (14.0 ± 5.0 $\mu\text{mol/g}$ of creatinine; $p < 0.01$, Figure 9A, Table 4). In contrast, the urinary excretion of nitrate (UE_{NO_3}) did not differ between the two sets of animals (Figure 9A, Table 4). There was no difference in urinary excretion of these nitric oxide metabolites between HT and WT groups (Figure 9B, Table 4).

Renal concentrating capacity analysis

We found that the renal concentrating capacity, assessed as the maximum urine osmolality (U_{osmMax}), was significantly lower in CY mice compared with NC animals (2733 ± 195 versus 3199 ± 288 mOsm/kg H_2O ; $p < 0.001$, Figure 10A, Table 2). U_{osmMax} did not differ, however, between HT and WT mice (Figure 10B, Table 2).

Cell proliferation and apoptosis in cystic and non-cystic kidneys

Polycystins modulate cell proliferation and are essential to maintain the differentiated phenotype of renal tubule epithelial cells.^{21,22} A fall in polycystin-1 or -2 below critical levels may also lead to apoptosis, loss of planar cell polarity and extracellular matrix remodeling.^{21,23,24} We evaluated cell proliferation and apoptosis in our mouse models.

The Ki-67 immunohistochemical analyses revealed an elevated cellular proliferation rate in CY [17% (9 to 35)] compared with NC kidneys [5% (1 to 9); $p < 0.05$, Figures 11A and 11C] at the age of 15 weeks. As expected, there were equally low rates of cell proliferation in both HT and WT kidneys (Figures 11B and 11C).

We used terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) to study apoptosis in kidneys from 15 week-old animals. CY kidneys had a significantly higher apoptotic rate [16.6% (14.0 to 30.2)] compared with NC kidneys [0.0% (0.0 to 4.6), $p < 0.001$; Figures 12A and 12C]. There was no difference in apoptotic rates between HT and WT kidneys (Figures 12B and 12C).

DISCUSSION

Hypertension affects most adult ADPKD patients prior to significant loss in renal function, is the main risk factor for cardiovascular events and accounts for significant morbidity and mortality in this population.²⁵ The complex mechanisms that underlie SAH pathogenesis in ADPKD, however, are incompletely understood.¹⁰ It is still debated whether ADPKD-related SAH is primarily caused by vascular/endothelial abnormalities or depends on renal cyst formation and expansion.

We addressed this question using two orthologous ADPKD mouse models, with distinct profiles of *Pkd1* gene deficiency. *Pkd1* heterozygous (HT) mice do not develop renal cysts at the analyzed ages and therefore represent a pure *Pkd1*-haploinsufficiency model¹⁹. CY mice are cystic but have preserved glomerular filtration rate (GFR) at the evaluated ages. This latter model reproduces the phenotype observed in humans with early-stage ADPKD. We used invasive blood pressure monitoring and found that CY mice exhibited significant hypertension while HT animals had no elevation in mean arterial pressure when compared to controls.

Interestingly we found that CY mice in fact had a slightly lower S_{Cr} than NC animals at 10-13 weeks of age. While we presently have no clear explanation for this finding, it is possible that early cyst formation is associated with hyperfiltration by the subset of remaining functional glomeruli. Taken together, the CY and HT results are consistent with the idea that the pathogenesis of ADPKD-associated hypertension is primarily due to cyst formation and enlargement rather than a primary vascular defect or the results of haploinsufficiency. Moreover we conclude that, at least in our

cystic mouse model, renal dysfunction per se does not play a role in the genesis of hypertension.

It has been proposed that hypertension in ADPKD is caused by cyst compression of intrarenal blood vessels with consequent ischemia and activation of the renin-angiotensin axis.^{7,10} Our studies support with this model. Interestingly, the CY mice exhibited a lower FE_{Na} accompanied by a slight but uniform increase in SUN compared with their NC controls. These findings are consistent with increased urea/solute/ Na^+ tubular reabsorption, a process also consistent with renal vascular compression, reduced perfusion induced by cystic expansion, and RAS activation. The vascular compression that we observed in CY kidneys is highly supportive of this mechanism.

We interrogated the RAS system using a variety of approaches and found significant evidence of increased activation in CY animals. Our qPCR assays demonstrated increased angiotensinogen mRNA levels in CY versus NC kidneys at 18 weeks of age. These findings support the importance of intrarenal RAS involvement in the pathogenesis of SAH in ADPKD, corroborating previous studies that propose that the intrarenal system plays a significant role in its genesis.^{1,26} We were unable, however, to detect differences in renin and ACE mRNA expression between CY and NC mouse kidneys.

ACE staining was detected in cystic epithelia and some tubular segments of CY kidneys, but was absent in vascular structures. NC kidneys did not show tubular or vascular signal. Positive AT1R staining was also observed in CY renal cystic epithelia, as well as in blood vessels. In NC renal tissue, however, AT1R signal was restricted to vascular structures. These data are similar to those reported by Loghman-Adham *et al*, who found ACE and AT1R expression in cystic epithelia and

dilated tubules of human ADPKD kidneys.²⁷ These authors also described angiotensin II staining in cystic epithelia and proximal tubules. Additional studies found increased renin concentration in the juxtaglomerular apparatus, arterioles and connective tissue cells surrounding cysts in ADPKD kidneys²⁸, as well as in fibrous tissue located at a distance from vascular structures.²⁹ Our findings, therefore, provide additional support for the role of intrarenal RAS in the genesis and maintenance of ADPKD-related hypertension.

The importance of circulating RAS in ADPKD-related hypertension remains controversial.^{1,26,30,31} In our animal models we found that renin plasma concentration was not statistically different between CY and NC mice nor between HT and WT animals. Similar results were observed for serum aldosterone. This is consistent with a prior study that showed no difference in plasma renin activity between hypertensive and normotensive ADPKD patients.³²

ADPKD is associated with abnormal endothelium-dependent vasodilation that has been attributed to a reduced NO generation.^{11,33,34} CY animals did in fact display lower UE_{NO2} than NC mice but no difference in UE_{NO3} . Our findings suggest that the decreased NO production previously associated with human ADPKD is related to cystic kidney disease and could conceivably contribute to worsening of SAH. We did not find significant differences in UE_{NO2} and UE_{NO3} between HT and WT mice which differs from findings reported by another group.³⁵ This difference may have occurred due to the age of the animals in this study or alternatively differences in genetic background.

The occurrence of a renal concentrating deficit is one of the earliest renal manifestations of ADPKD but the mechanism remains unclear.³⁶ One proposed hypothesis invokes a primary abnormality in the principal cells of the collecting

tubule. The fact that polyuria develops only after renal cyst detection, however, makes this unlikely.¹³ The early presentation of concentrating deficits, in turn, argues against a primary role for tubulointerstitial alterations or cyst-dependent disruption of the corticomedullary architecture in determining this phenotype.³⁷ Our data did not reveal a difference in $U_{osm}Max$ between HT and WT mice, suggesting that *PKD1* haploinsufficiency does not result in ADPKD-related concentrating defects. In contrast, CY mice have a significant decrease in $U_{osm}Max$ compared to NC animals which leads us to infer that cyst development and structural disruption in renal architecture play a central role in the genesis of renal concentrating impairment. These findings are consistent with observations of Gabow *et al* in children, where a significant concentration deficit was detected only in children with more than 10 cysts³⁸, and Seeman *et al*, who showed that this defect correlates with the number of cysts.³⁷

Increased vasopressin levels have been described in ADPKD^{14,15}, an observation that has been interpreted as an attempt to compensate for a renal concentrating defect. High vasopressin levels could also contribute to hypertension via effects on either the V1a or V2 receptors. The former mediates a direct effect on vascular smooth muscle thereby decreasing medullary renal blood flow³⁹ while activation of the the latter increases expression of the ENaC β and γ subunits.⁴⁰ In the current study we found a trend toward higher vasopressin levels in CY mice but the difference did not reach statistical significance. The failure to detect a more dramatic difference might be due to the variability in renal cystic phenotype observed in this mouse line. The mosaic expression of nestin-Cre recombinase is one likely reason for such phenotypic variation.⁴¹ The observation of lower S_{Na} in CY mice, in addition, suggests an effect of increased vasopressin in these animals.

Our study revealed higher cell proliferation and apoptotic rates in CY kidneys compared with NC organs, including areas near and distant from cysts. This cell proliferation pattern differs from a previous report, in which the investigators inactivated *Pkd1* at five weeks of age and did not detect increased cell proliferation in areas distant from cysts.⁴² The distinct profiles observed in the two models is likely explained by the fact that in our model *Pkd1* inactivation is not synchronous.

Our data, therefore, not only support the cyst expansion/local hypoperfusion model for hypertension in an orthologous mouse model of ADPKD but also strongly implicates intrarenal RAS activation as a critical player in its pathogenesis. Such data also support decreased NO generation as a contributory factor to hypertension. Our results, in addition, lead to the conclusion that cyst formation and expansion are determinants for the development of renal concentrating deficit in this cystic model. Based on the similarity between the orthologous model and human disease, these findings are likely relevant and applicable to human ADPKD.

METHODS

Mouse models

The generation of the cystic model was based on a *Pkd1* floxed allele (*Pkd1*^{cond}) that contains lox P sites inserted in introns 1 and 4 and a neomycin cassette flanked by FRT sites inserted in intron 1.¹⁸ In the presence of Cre recombinase, exons 2-4 are excised, producing the new allele *Pkd1*^{del2-4}. In TgN(balancer2)3Cgn mice, Cre recombinase expression is controlled by the nestin promoter and enhancer sequences located in the second intron.⁴³ The *Pkd1*^{cond} line, generated on a C57BL/6 *background*, was crossed with a mouse line carrying this transgene, leading to inactivation of the floxed allele following a mosaic pattern. The presence of *Pkd1*^{cond} alleles and the nestin-Cre transgene was determined using specific PCR reactions. Animals with the *Pkd1*^{cond/cond}.Bal^{cre} genotype (CY), in turn, develop a renal cystic phenotype that mimics human ADPKD. *Pkd1*^{cond/cond} (NC) littermates were used as controls.

We have previously reported and characterized a 129Sv mouse line with a *Pkd1* null allele.^{18,19} The construct had part of exon 2 and the entire exon 3 replaced with *lacZ* cloned in frame to the remainder of exon 2, followed by the neomycin resistance gene (*neor*). The *lacZ-neor* 5' segment contains transcriptional termination sequences that preclude expression of 3' *Pkd1* exons. The mice were genotyped using a three-primer PCR strategy. Heterozygotes for the *Pkd1*-null mutation (*Pkd1*^{+/-}, HT) present virtually no renal cysts by 15 weeks of age, representing a pure *Pkd1*-haploinsufficiency model. In this case, wild-type littermates (*Pkd1*^{+/+}, WT) were employed as controls.

The study was performed in accordance with international standards of animal care and experimentation.

Assessment of renal cyst formation and histology

The 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. The left kidney was then harvested and fixed *in situ* with 4% buffered paraformaldehyde, paraffin embedded, and sectioned at 4 µm. Kidney sections were mounted on slides and stained using hematoxylin and eosin for histological analysis. The number of cysts present in each left kidney was calculated by evaluating entire sections obtained at 70-µm intervals.

Invasive measurement of mean arterial pressure

The mice were submitted to inhalation anesthesia with isoflurane 1.5%. A catheter 4.0 cm in length, 0.4 mm in external diameter and 0.25 mm in internal diameter (Micro-Renathane, Braintree Science Inc, Braintree, USA) was inserted into the right carotid artery to record MAP.⁴⁴ Prior to implantation, the catheter was filled with saline solution containing heparin 50 IU/mL and occluded with a metal pin. It was exteriorized at the nape with a trocar and the incision sutured. The catheter was then connected to a pressure transducer linked to a data acquisition

system (BIOPAC Systems, Santa Barbara, USA) for measurement in mmHg. MAP was assessed 24 h after surgery, allowing animals to recover and return to baseline conditions.

Biochemical determinations

All biochemical measurements were performed in 10-13 week-old mice. Blood samples were drawn by retro-orbital bleeding. Four hours (h) after this procedure the animals were 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). Mice with baseline SUN above 30 mg/dL and/or S_{Cr} above 0.6 mg/dL were excluded from the study. 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^+ . A similar approach was applied to determine FE_K .

Renal concentrating capacity was analyzed by determining U_{osm}^{Max} . The animals were weighted and housed thereafter for 32 h in metabolic cages with food but no water. This period was followed by 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).

UE_{NO2} and UE_{NO3} were determined by chemiluminescence using an NO analyzer (NOA280; Stevers Instruments, Boulder, USA).

Plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone

Plasma renin was measured using a commercial immunoradiometric assay kit (Active Renin IRMA, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, USA). Plasma vasopressin and serum aldosterone were determined with commercial radioimmunoassay kits (RK-065-07, Phoenix Pharmaceuticals, Phoenix, USA; and Coat-A-Count Aldosterone, Siemens, Los Angeles, USA, respectively).

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from the right kidneys of nine CY and nine NC 15 week-old mice using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). Quantitative real-time RT-PCR was performed using the *TaqMan* system (Applied Biosystems, Warrington, UK) with cDNA amplification using ImProm II reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) and specific assays for renin (Mm02342889_g1), angiotensinogen (Mm00599662_m1), ACE (Mm00802048_m1) and GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Mm99999915_g1) as control.

Renin, angiotensinogen, ACE and GAPDH amplifications were performed applying 40 cycles with steps of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s, followed by a final step of 72 °C for 10 min. Results were obtained with the $\Delta\Delta C_t$ methodology, including normalization to the corresponding GAPDH signal, and are expressed as arbitrary units (AU).

Immunohistochemistry

Incubation with the primary antibodies was carried out overnight at 4 °C in serial sections. A monoclonal IgG1 antibody to ACE (clone 2E2, MAB3502, Chemicon International Inc., Temecula, USA), a polyclonal IgG anti-AT1R antibody (Angio2RNAABR, RDI Division of Fitzgerald Ind., Acton, USA), and a monoclonal IgG2a antibody to Ki-67 (clone TEC-3, M7249, Dako, Carpinteria, USA) were used. Control sections for ACE, AT1R and Ki-67 analyses were 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-positive nuclei was performed under light microscopy at x400 magnification, yielding results expressed as positive cells/total cells ratios. ACE and AT1R analyses, on the other hand, comprised the description of the staining pattern, including presence/absence and expression profile in the different kidney structures.

Analyses of apoptosis were performed using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Positive nuclei were stained with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Positive controls were performed 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.

Statistical analyses

The data were preanalyzed using the K-S test. When parametric, the analyses were performed with nonpaired t test with Welch correction, for unbalanced variation, and the results were presented as mean and standard deviation. When nonparametric, we used the Mann-Whitney test between two groups, and the data were presented as median (lower quartile to upper quartile). We have accepted an α error $\leq 5\%$ to reject the null hypothesis. The tests were applied using Sigma Plot 9.0 (Jandel ® Corporation) and GraphPad 5.00 (Prism ® Software).

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 76: 149-68, 2009
2. Reed BY, McFann K, Bekheirnia MR, *et al.* Variation in age at ESRD in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 51: 173-183, 2008
3. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, *et al.* Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18: 2143-2160, 2007
4. Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, *et al.* Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *Lancet* 353: 103-107, 1999
5. Dicks E, Ravani P, Langman D, *et al.* Incident renal events and risk factors in autosomal dominant polycystic kidney disease: a population and family-based cohort followed for 22 years. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 710-717, 2006
6. Pirson Y. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 173-180, 2010
7. Ecker T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5: 221-228, 2009
8. Kelleher CL, McFann KK, Johnson AM, *et al.* Characteristics of hypertension in young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease compared with the general U.S. population. *Am. J. Hypertens* 17: 1029–1034, 2004
9. Oflaz H, Alisir S, Buyukaydin B, *et al.* Biventricular diastolic dysfunction in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 68: 2244-2249, 2005

10. Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17: 153-163. 2010
11. 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
12. Fick GM, Duley IT, Johnson AM, *et al.* The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J Am Soc Nephrol* 4: 1654-1660, 1994
13. Torres VE. Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 68: 2405-2418, 2005
14. Danielsen H, Nielsen AH, Pedersen EB, *et al.* Exaggerated natriuresis in adult polycystic kidney disease. *Acta Med Scand* 219: 59-66, 1986
15. Michalski A, Grzeszczak W. The effect of hypervolemia on electrolyte level and level of volume regulating hormones in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pol Arch Med Wewn* 96: 329-343, 1996
16. Gattone VH 2nd, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med* 9: 1323-1326, 2003
17. Torres VE, Wang X, Qian Q, *et al.* Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 10: 363-364, 2004
18. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, *et al.* A functional floxed allele of *Pkd1* that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* 15: 3035-3043, 2004
19. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, *et al.* *Pkd1* haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 20: 2389-2402, 2009

20. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59: 251-287, 2007
21. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, *et al.* Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 6: 1267-1273, 2000
22. Nickel C, Benzing T, Sellin L, *et al.* The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest* 109: 481–489, 2002
23. Luyten A, Su X, Gondela S, *et al.* Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 21: 1521-1532, 2010
24. Torres VE, Harris PC. Polycystic kidney disease in 2011: Connecting the dots toward a polycystic kidney disease therapy. *Nat Rev Nephrol* 8: 66-68, 2011
25. Johnson AM, Gabow PA. Identification of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease at highest risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 8: 1560-1567, 1997
26. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 369: 1287-1301, 2007
27. Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T, *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: 775-788, 2004
28. Torres VE, Donovan KA, Sicli G, *et al.* Synthesis of renin by tubulocystic epithelium in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 42: 364-373, 1992

29. Graham PC, Lindop GB. The anatomy of the renin-secreting cell in adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 33: 1084-1090, 1988
30. Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, *et al.* The renin-angiotensin-aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 323: 1091–1096, 1990
31. Doultou T, Saggari-Malik AK, He FJ, *et al.* The effect of sodium and angiotensin-converting enzyme inhibition on the classic circulating renin-angiotensin system in autosomal-dominant polycystic kidney disease patients. *J Hypertens* 24: 939–945, 2006
32. Valvo E, Gammara L, Tessitore N, *et al.* Hypertension of polycystic kidney disease: mechanisms and hemodynamic alterations. *Am J Nephrol* 5: 176-181, 1985
33. 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* 11: 1371-1376, 2000
34. 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
35. Muto S, Aiba A, Saito Y, *et al.* Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet* 11: 1731-1742, 2002
36. Martinez-Maldonado M, Yium JJ, Eknayan G, *et al.* Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int* 2: 107-113, 1972

37. Seeman T, Dusek J, Vondrák K, *et al.* Renal concentrating capacity is linked to blood pressure in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol Res* 53: 629-634, 2004
38. Gabow PA, Kaehny WD, Johnson AM, *et al.* The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 35: 675-680, 1989
39. Cowley AW Jr, Skelton MM, Kurth TM. Effects of long-term vasopressin receptor stimulation on medullary blood flow and arterial pressure. *Am J Physiol* 275(5 Pt 2): R1420-4, 1998
40. Nicco C, Wittner M, DiStefano A, *et al.* Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension* 38: 1143–1149, 2001
41. Chen J, Boyle S, Zhao M, *et al.* 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
42. Takakura A, Contrino L, Beck AW, *et al.* Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol* 19: 2351-2363, 2008
43. Betz UA, Vosschenrich CA, Rajewsky K, *et al.* Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol* 6: 1307–1316, 1996
44. Ceroni A, Moreira ED, Mostarda CT, *et al.* Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37: 490-495, 201

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gregory Germino, M.D., for his suggestions, Isac de Castro, Ph.D., for his valuable help in the statistical analyses, Elia Caldini, Ph.D., for technical suggestions, and Dulce Casarini, Ph.D., for providing essential reagents. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grants 2010/17424-0 to LFO and 2009/10748-7 to JMF and LFO), The National Institutes of Health (grant R01DK076017 to TJW) and Laboratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. These studies utilized resources provided by the NIDDK sponsored Johns Hopkins Polycystic Kidney Disease Research and Clinical Core Center (grant P30DK090868).

TITLES AND LEGENDS

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Comparative analysis of right and left kidney weight/body weight ratios between NC (n = 8) and CY (n = 9) kidneys. ** $p < 0.01$ *versus* NC. Right and left KW/BW were compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD. (B) Vascular compression determined by a cyst in a CY mouse kidney. Original magnification, x400.

Figure 2. Comparative analyses of mean arterial pressure between NC and CY (A) and between WT and HT (B) male mice. ** $p < 0.01$ *versus* NC. MAP was compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 3. Comparative analyses of serum creatinine (A and C) and SUN (B and D) between NC and CY (A and B) and between WT and HT (C and D) male mice. ** $p < 0.01$ *versus* NC; * $p < 0.05$ *versus* NC. S_{Cr} was compared using the Mann-Whitney test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile). SUN was compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 4. Comparative analyses of fractional excretion of Na^+ (A and C) and fractional excretion of K^+ (B and D) between NC and CY (A and B) and WT and HT (C and D) male mice. *** $p < 0.001$ *versus* NC; * $p < 0.05$ *versus* NC; # $p < 0.05$ *versus* WT. FE_{Na} and FE_K were compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 5. Comparative analyses of serum Na^+ (A and C) and K^+ (B and D) between NC and CY (A and B) and between WT and HT (C and D) male mice. * $p < 0.05$ *versus* NC. S_{Na} and S_{K} were compared using the Mann-Whitney test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile).

Figure 6. Comparative analyses of plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone between NC and CY (A) and between WT and HT (B) male mice. Plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone were compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 7. Comparative analyses of angiotensinogen (A), renin (B) and angiotensin-converting enzyme (C) mRNA expression between NC ($n = 7$) and CY ($n = 8$) mouse kidneys at the age of 18 weeks. * $p < 0.05$ *versus* NC. Angiotensinogen, renin and ACE mRNA levels were compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 8. (A) ACE staining in NC (a, b) and CY mouse kidneys (c, d, e, f). NC kidney: no signal is detected in tubules and glomeruli (a) as well as in blood vessels (b). CY kidney: positive signal detected in cystic epithelium (c, d); absence of staining in blood vessel (e); and positive signal in tubules (f). (B) AT1R staining in NC (a, b) and CY mouse kidneys (c, d). NC kidney: no signal is detected in tubules and glomeruli (a) and positive staining in vascular structures (b). CY kidney: positive signal detected in cystic epithelium (c) and vascular structures (d). Original magnification, $\times 400$.

Figure 9. Comparative analyses of urinary excretion of nitrite and urinary excretion of nitrate between NC and CY (A) and between WT and HT (B) male mice. ** $p < 0.01$ *versus* NC. UE_{NO_2} and UE_{NO_3} were compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 10. Comparative analyses of maximum urine osmolality between NC and CY (A) and between WT and HT (B) male mice. *** $p < 0.001$ *versus* NC. $U_{osm}Max$ was compared using the nonpaired t test, with the data presented as mean $\pm$ SD.

Figure 11. Comparative analyses of Ki-67 staining between NC ($n = 8$) and CY ($n = 8$) (A) and between WT ($n = 8$) and HT ($n = 8$) mouse kidneys (B). * $p < 0.05$ *versus* NC. Kidney Ki-67 staining was compared using the Mann-Whitney test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile). (C) Representative images of Ki-67 staining in NC (a), CY (b), WT (c) and HT (d) kidneys. Original magnification, x400.

Figure 12. Comparative analyses of kidney TUNEL staining between NC ($n = 8$) and CY ($n = 8$) (A) and between WT ($n = 8$) and HT ($n = 8$) (B) mouse kidneys. *** $p < 0.001$ *versus* NC. Kidney TUNEL staining was compared using the Mann-Whitney test, with the data expressed as median (lower quartile to upper quartile). Representative images of TUNEL staining in NC (a), CY (b), WT (c) and HT (d) kidneys. Original magnification, x400.

TABLE TITLES

Table 1. MAP, S_{Cr} , SUN and BW in NC, CY, WT and HT male mice.

Table 2. FE_{Na} , FE_K , S_{Na} , S_K and $U_{osm}Max$ in NC, CY, WT and HT male mice.

Table 3. Plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone in NC, CY, WT and HT male mice.

Table 4. UE_{NO2} and UE_{NO3} in NC, CY, WT and HT male mice.

Table 1. MAP, S_{Cr}, SUN and BW in NC, CY, WT and HT male mice.

Parameters	MAP (mmHg, Mean ± SD)	S _{Cr} [mg/dL; Median [Lower Quartile to Upper Quartile]]	SUN (mg/dL, Mean ± SD)	BW[g; Median [Lower Quartile to Upper Quartile]]
NC	136.10 ± 3.44 (n = 6)	0.36 (0.35 to 0.38) (n = 9)	25.23 ± 1.22 (n = 9)	19.3 (18.7 to 19.9) (n = 9)
CY	150.34 ± 3.90** (n = 6)	0.32 (0.30 to 0.34)** (n = 9)	26.70 ± 1.43* (n = 9)	19.6 (19.2 to 20.1) (n = 9)
WT	127.54 ± 2.99 (n = 8)	0.38 (0.36 to 0.39) (n = 8)	26.27 ± 1.16 (n = 8)	19.2 (18.5 to 19.7) (n = 8)
HT	131.03 ± 4.36 (n = 6)	0.36 (0.34 to 0.36) (n = 8)	25.34 ± 1.18 (n = 8)	19.5 (18.8 to 20.3) (n = 8)

MAP, SUN and BW were compared using the nonpaired t test.

S_{Cr} was compared using the Mann-Whitney test.

*p < 0.05 *versus* NC.

**p < 0.01 *versus* NC.

Table 2. FE_{Na}, FE_K, S_{Na}, S_K and U_{osm}Max in NC, CY, WT and HT male mice.

Parameters	FE _{Na} (%, Mean ± SD)	FE _K (%, Mean ± SD)	S _{Na} [mEq/L; Median (Lower Quartile to Upper Quartile)]	S _K [mEq/L; Median (Lower Quartile to Upper Quartile)]	U _{osm} Max (mOsm/kg H ₂ O, Mean ± SD)
NC (n = 9)	0.74 ± 0.09	23.64 ± 2.59	143 (141 to 143)	4.9 (4.7 to 4.9)	3199 ± 288
CY (n = 9)	0.60 ± 0.06***	19.93 ± 3.71*	137 (136 to 138)**	4.8 (4.7 to 4.9)	2733 ± 195***
WT (n = 8)	0.80 ± 0.06	22.98 ± 3.65	143 (142 to 144)	4.8 (4.7 to 4.9)	3067 ± 176
HT (n = 8)	0.72 ± 0.07 [#]	20.64 ± 1.60	142 (140 to 144)	4.8 (4.6 to 4.9)	3158 ± 123

FE_{Na}, FE_K and U_{osm}Max were compared using the nonpaired t test.

S_{Na} and S_K were compared using the Mann-Whitney test.

*p < 0.05 *versus* NC.

**p < 0.01 *versus* NC.

***p < 0.001 *versus* NC.

[#]p < 0.05 *versus* WT.

Table 3. Plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone in NC, CY, WT and HT male mice.

Parameters	Plasma renin (pg/ml, Mean $\pm$ SD)	Plasma vasopressin (pg/ml, Mean $\pm$ SD)	Serum aldosterone (ng/dl, Mean $\pm$ SD)
NC (n = 8)	3.61 $\pm$ 3.96	263.04 $\pm$ 373.48	30.51 $\pm$ 18.90
CY (n = 9)	2.62 $\pm$ 2.42	711.59 $\pm$ 647.30	39.58 $\pm$ 17.19
WT (n = 8)	6.86 $\pm$ 9.34	177.67 $\pm$ 260.15	27.11 $\pm$ 7.88
HT (n = 8)	9.15 $\pm$ 19.02	80.50 $\pm$ 68.65	26.81 $\pm$ 6.80

Plasma renin, plasma vasopressin and serum aldosterone were compared using the nonpaired t test.

Table 4. UE_{NO2} and UE_{NO3} in NC, CY, WT and HT male mice.

Parameters	UE_{NO2} (μmol/g creat, Mean ± SD)	UE_{NO3} (mmol/g creat, Mean ± SD)
NC (n = 8)	14.0 ± 5.0	12.30 ± 3.06
CY (n = 9)	7.0 ± 4.0**	8.21 ± 5.62
WT (n = 8)	14.0 ± 13.0	5.67 ± 3.82
HT (n = 8)	16.0 ± 11.0	7.88 ± 3.76

UE_{NO2} and UE_{NO3} were compared using the nonpaired t test.

**p < 0.01 *versus* NC.

FIGURE 1

A

B

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

FIGURE 7

FIGURE 8

FIGURE 9

FIGURE 10

FIGURE 11

FIGURE 12

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Igarashi P, Somlo S: Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:2384-2398.
2. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 1993;329:332-42.
3. Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, *et al*: Factors affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 1992;41:1311-1319.
4. U.S. Renal Data System, *USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003.
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* 200830(2):169-73.
6. Bruno Eduardo Pedroso Balbo, Rosa Maria Cavalcante, João Egídio Romão Júnior, Rui Toledo de Barros, Roberto Zatz e Hugo Abensur. Perfil dos pacientes encaminhados à terapia renal substitutiva de um ambulatório de nefrologia pertencente a um hospital terciário. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2007; 29(4):205-208.
7. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 2009;60:321-37.
8. Reed BY, McFann K, Bekheirnia MR, Nobakhthaghighi N, Masoumi A, Johnson AM, Shamshirsaz AA, Kelleher CL, Schrier RW. Variation in age at ESRD in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2008;51(2):173-83.
9. Devuyst O, Burrow CR, Smith BL, Agre P, Knepper MA, Wilson PD: Expression of aquaporin-1 and -2 during nephrogenesis and in autosomal

dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol* 1996;271:F169 –F183.

10. Bae KT, Zhu F, Chapman AB, Torres VE, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, Baumgarten DA, King BF Jr, Wetzel LH, Kenney PJ, Brummer ME, Bennett WM, Klahr S, Meyers CM, Zhang X, Thompson PA, Miller JP. Magnetic resonance imaging evaluation of hepatic cysts in early autosomal-dominant polycystic kidney disease: the Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease cohort. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1(1):64-9.

11. Perrone RD. Extrarenal manifestations of ADPKD. *Kidney Int.* 1997;51:2022-36.

12. Qian Q, Li A, King BF, Kamath PS, Lager DJ, Huston J 3rd, Shub C, Davila S, Somlo S, Torres VE. Clinical profile of autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology* 2003;37(1):164-71.

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

14. Rinkel GJ. Natural history, epidemiology and screening of unruptured intracranial aneurysms. *Rev Neurol (Paris)* 2008;164(10):781-6.

15. Kaehny WD, Everson GT. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease *Semin Nephrol.* 1991;11(6):661-70.

16. Lumiaho A, Ikaheimo R, Miettinen R, Niemitukia L, Laitinen T, Rantala A, Lampainen E, Laakso M, Hartikainen J. Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1. *Am J Kidney Dis* 2001;38(6):1208-16.

17. Qian Q, Hartman RP, King BF, Torres VE. Increased occurrence of pericardial effusion in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2(6):1223-7.

18. Gabow PA, Kaehny WD, Johnson AM, *et al*: The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 1989;35:675-680.

19. Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease - more than a renal disease [review]. *Am J Kidney Dis.* 1990;16:403-413.
20. Ecker T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2009;5:221-228
21. Martinez-Maldonado M, Yium JJ, Eknoyan G, *et al*: Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int.* 1972;2:107-113.
22. Fick GM, Duley IT, Johnson AM, *et al*: The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:1654-1660.
23. D'Angelo A, Mioni G, Ossi E, *et al*: Alterations in renal tubular sodium and water transport in polycystic kidney disease. *Clin Nephrol.* 1975;3:99-105.
24. Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, *et al*: Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmstead County, Minnesota:1935-1980. *Am J Kidney Dis* 1983;2: 630-639.
25. Dedoussis GV, Luo Y, Starremans P, Rossetti S, Ramos AJ, Cantiello HF, Katsareli E, Ziroyannis P, Lamnissou K, Harris PC, Zhou J: Co-inheritance of a *PKD1* mutation and homozygous *PKD2* variant: a potential modifier in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(3):180-90.
26. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 2009;60:321-37.
27. Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Sagar-Malik AK, San Millan JL, Torra R, Breuning M, Ravine D. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European *PKD1-PKD2* Study Group. *Lancet* 1999;353(9147):103-7.
28. The European Polycystic Kidney Disease Consortium: The Polycystic Kidney Disease 1 gene encodes a 14kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994;77:881-894.

-
29. Hughes J, Ward CJ, Peral B, *et al*: The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995;10: 151-160.
30. Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong AC. Functional analysis of *PKD1* transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1804-15.
31. 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 USA* 2000;97(8):4017-22.
32. Moy GW, Mendoza LM, Schulz JR, Swanson WJ, Glabe CG, Vacquier VD. The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, *PKD1*. *J Cell Biol* 1996;133(4):809-17.
33. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(26):16981-6.
34. 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.
35. 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 USA* 2007;104(47):18688-93.
36. Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell* 2004;118(2):145-8.
37. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu

W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 2003;33(2):129-37.

38. 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.

39. 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.

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

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

42. 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.

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

44. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ, Charlesworth MC, Torres VE, LaRusso NF, Harris PC, Ward CJ. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(2):278-88.

-
45. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 1996;87(6):979-87.
 46. Lu W, Peissel B, Babakhanlou H *et al*: Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with targeted *PKD1* mutation. *Nat Genet.* 1997;17:179-181.
 47. Boletta A, Qian F, Onuchic LF *et al*: Polycystin-1, the gene product of *PKD1*, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 2000;6:1267-1273.
 48. Latinga-Van Leeuwen IS, Dauwerse JG *et al*: Lowering of *Pkd1* expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2004;13:3069-3077.
 49. Nishio S, Hatano M, Nagata M, Horie S, Koike T, Tokuhisa T, Mochizuki T. *Pkd1* regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 2005;115(4):910-8.
 50. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA *et al*: A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of *Pkd1*. *Nat Med.* 2007;13(12):1409-1411.
 51. Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J: *Pkd1* inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol.* 19(12):2351-2363, 2008.
 52. 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;(11):2389-402.
 53. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2010. 17(2):118-130.
 54. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease.

Mol Cell 1998;2:247-51.

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

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

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

58. Torres VE, Harris PC. Polycystic kidney disease: genes, proteins, animal models, disease mechanisms and therapeutic opportunities. *J Intern Med*. 2007;261:17-31.

59. Hanaoka K, Guggino WB. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11: 1179-1187.

60. Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, Calvet JP. Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *J Biol Chem*. 2004;279:40419-40430.

61. Chabardes D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM. Functional properties of Ca²⁺-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal*. 1999;11:651-663.

62. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int*. 1999;55:29-62.

63. Ruggenti P, Remuzzi A, Ondei P, Fasolini G, Antiga L, Ene-Iordache B,

Remuzzi G, Epstein FH. Safety and efficacy of long-acting somatostatin treatment in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68(1):206-16.

64. Torres VE, Wang X, Qian Q, Somlo S, Harris PC, Gattone VH, 2nd. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 2004;10(4):363-4.

65. Torres VE, Meijer E, Bae KT, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, Perrone RD, Krasa H, Ouyang JJ, Czerwiec FS. Rationale and design of the TEMPO (Tolvaptan efficacy and safety in management of autosomal dominant polycystic kidney disease and its outcomes) 3-4 study. *Am J Kidney Dis* 2011;57(5):692-699.

66. Wahl PR, Le Hir M, Voetseder A, Arcaro A, Starke A, Waeckerle-Men Y, Serra AL, Wuthrich RP. Mitotic activation of Akt signalling pathway in Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2007;12(4):357-63.

67. Boca M, D'Amato L, Distefano G, Polishchuk RS, Germino GG, Boletta A. Polycystin-1 induces cell migration by regulating phosphatidylinositol 3-kinase-dependent cytoskeletal rearrangements and GSK3 β -dependent cell cell mechanical adhesion. *Mol Biol Cell* 2007;18(10):4050-61.

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

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

70. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, *et al.* PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling

pathway in a process requiring *PKD2*. *Cell* 2002;109:157-168.

71. Arnould T, Kim E, Tsiokas L, *et al*: The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem*. 1998;273:6013-6018.

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

73. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:5466-5471.

74. Serra AL, Poster D, Kistler AD, Krauer F, Raina S, Young J, Rentsch KM, Spanaus KS, Senn O, Kristanto P, Scheffel H, Weishaupt D, Wüthrich RP. Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):820-9.

75. Walz G, Budde K, Mannaa M, Nürnberger J, Wanner C, Sommerer C, Kunzendorf U, Banas B, Hörl WH, Obermüller N, Arns W, Pavenstädt H, Gaedeke J, Büchert M, May C, Gschaidmeier H, Kramer S, Eckardt KU. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):830-40.

76. 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.

77. 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.

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

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

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

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

82. Li Y, Wright JM, Qian F, Germino GG, Guggino WB. Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca^{2+} signaling. *J Biol Chem* 2005;280(50):41298-306.

83. 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.

84. Ecker T, Schrier RW: Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: Early occurrence and unique aspects. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:194–200.

85. Chapman AB, Schrier RW. Pathogenesis of hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin. Nephrol* 1991;11:653–660.

86. Chapman AB. Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 1997;8:1292–1297.

-
87. Sedman A, *et al.* Autosomal dominant polycystic kidney disease in childhood: a longitudinal study. *Kidney Int* 1987;31:1000–1005.
88. Ivy DD, *et al.* Cardiovascular abnormalities in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 1995;5:2032–2036.
89. Shamshirsaz A, *et al.* Autosomal-dominant polycystic kidney disease In infancy and childhood: progression and outcome. *Kidney Int* 2005;68:2218–2224.
90. Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; 153-163.
91. Gabow PA, *et al.* Renal structure and hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1990;38:1177–1180.
92. Chapman AB. The renin-angiotensin-aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med* 1990;323:1091–1096.
93. Torres VE, *et al.* Effect of inhibition of converting enzyme on renal hemodynamics and sodium management in polycystic kidney disease. *Mayo Clin. Proc* 1991;66:1010–1017.
94. Watson ML, *et al.* Effects of angiotensin converting enzyme inhibition in adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1991;41:206–210.
95. Doulton TW, *et al.* The effect of sodium and angiotensin-converting enzyme inhibition on the classic circulating renin-angiotensin system in autosomal-dominant polycystic kidney disease patients. *J. Hypertens* 2006;24:939–945.
96. Harrap SB, *et al.* Renal, cardiovascular and hormonal characteristics of young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1991;40:501–508.
97. Barrett BJ, *et al.* Differences in hormonal and renal vascular responses between normotensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease and unaffected family members. *Kidney Int* 1994;46:1118–1123.

98. 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;64:1381-1388.
99. Klein IH, *et al*. Sympathetic activity is increased in polycystic kidney disease and is associated with hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol* 2001;12:2427-2433.
100. Torres VE. Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2405-2418.
101. Danielsen H, *et al*. Expansion of extracellular volume in early polycystic kidney disease. *Acta Med. Scand* 1986;219:399-405.
102. Danielsen H, Nielsen AH, Pedersen EB, Herlevsen P, Kornerup HJ, Posborg V. Exaggerated natriuresis in adult polycystic kidney disease. *Acta Med Scand* 1986;219: 59-66.
103. Michalski A, Grzeszczak W. The effect of hypervolemia on electrolyte level and level of volume regulating hormones in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pol Arch Med Wewn* 1996;96: 329-343.
104. Bakris G, *et al*. Role of vasopressin in essential hypertension: racial differences. *J. Hypertens* 1997;15:545-550.
105. Fernandes S, *et al*. Chronic V2 vasopressin receptor stimulation Increases basal blood pressure and exacerbates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Endocrinology* 2002;143:2759-2766.
106. Griffin MD, *et al*. Vascular expression of polycystin. *J. Am. Soc. Nephrol* 1997;8:616-626.
107. Torres VE, *et al*. Vascular expression of polycystin-2. *J. Am. Soc. Nephrol* 2001;12:1-9.
108. Qian Q, Li M, Cai Y, *et al*. Analysis of the polycystins in aortic vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2280-2287.
109. Qian Q, Hunter LW, Li M, *et al*. *Pkd2* haploinsufficiency alters intracellular

calcium regulation in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet* 2003;12:1875–1880.

110. Gao Z, Joseph E, Ruden DM, Lu X. *Drosophila Pkd2* is haploid-insufficient for mediating optimal smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 2004;279:14225–14231.

111. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation* 2008;117:1161–1171.

112. Kim K, Drummond I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Arnaout MA. Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1731–1736.

113. Abou Alaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, *et al.* Ciliary polycystin-2 is a mechanosensitive calcium channel involved in nitric oxide signaling cascades. *Circ Res* 2009;104:860–869.

114. Wang D, *et al.* Endothelium-dependent relaxation of small resistance vessels is impaired in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 2000;11:1371–1376.

115. Hocher B, *et al.* Renal endothelin system in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 1998;9:1169–1177.

116. Munemura C, *et al.* Epidermal growth factor and endothelin in cyst fluid from autosomal dominant polycystic kidney disease cases: Possible evidence of heterogeneity in cystogenesis. *Am. J. Kidney Dis* 1994;24:561–568.

117. Giusti R, *et al.* Plasma concentration of endothelin and arterial pressure in patients with ADPKD. *Contrib. Nephrol* 1995;115:118–121.

118. Al-Nimri MA, *et al.* Endothelium-derived vasoactive mediators in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2003;63:1776–1784.

119. Merta M, *et al.* Role of endothelin and nitric oxide in the pathogenesis of arterial hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol. Res* 2003;52:433–437.
120. McPherson EA, Luo Z, Brown RA, *et al.* Chymase-like angiotensin II-generating activity in endstage human autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:493–500.
121. Chapman AB, Torres VE, Perrone RD, *et al.* The HALT Polycystic Kidney Disease Trials – Design and Implementation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan;5(1):102-9
122. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG. A functional floxed allele of *Pkd1* that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec;15(12):3035-43.
123. Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, Harris PC, Perez-Atayde AR, Rennke HG, Zhou J. Late onset of renal and hepatic cysts in *Pkd1*-targeted heterozygotes. *Nat Genet* 1999; 21(2):160-1.
124. Ceroni A, Moreira ED, Mostarda CT, *et al.* Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:490-495, 201.
125. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59:251-287.
126. Wu G, D'agati V, Cai Y, *et al.* Somatic inactivation of *Pkd2* results in polycystic kidney disease. *Cell* 1998;93:177-188.
127. Johnson AM, Gabow PA. Identification of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease at highest risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1560-1567.

-
- 128.** Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 2009;76:149-168.
- 129.** Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007;369:1287-1301.
- 130.** Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T, *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:775-788.
- 131.** Torres VE, Donovan KA, Sicli G, *et al.* Synthesis of renin by tubulocystic epithelium in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1992;42:364-373.
- 132.** Graham PC, Lindop GB. The anatomy of the renin-secreting cell in adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1988;33:1084-1090.
- 133.** Valvo E, Gammara L, Tessitore N, *et al.* Hypertension of polycystic kidney disease: mechanisms and hemodynamic alterations. *Am J Nephrol* 1985;5:176-181.
- 134.** 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* 2004;43:854-860.
- 135.** Muto S, Aiba A, Saito Y, *et al.* Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet* 2002;11:1731-1742.
- 136.** Seeman T, Dusek J, Vondrák K, *et al.* Renal concentrating capacity is linked to blood pressure in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol Res* 2004;53:629-634.
- 137.** Cowley AW_Jr, Skelton MM, Kurth TM. Effects of long-term vasopressin receptor stimulation on medullary blood flow and arterial pressure. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 2): R1420-4.

- 138.** Nicco C, Wittner M, DiStefano A, *et al.* Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension* 2001;38:1143–1149.
- 139.** Chen J, Boyle S, Zhao M, *et al.* Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1283-1291.