

VIVIAN CHRISTINE DOURADO PINTO

Efeitos de diferentes perfis de deficiência de *Pkd1* sobre o
fenótipo vascular em artérias de resistência de camundongos

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

Coorientadora: Prof^a Dr^a Luciana Venturini Rossoni

São Paulo

2023

VIVIAN CHRISTINE DOURADO PINTO

Efeitos de diferentes perfis de deficiência de *Pkd1* sobre o fenótipo vascular em artérias de resistência de camundongos

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

Coorientadora: Prof^a Dr^a Luciana Venturini Rossoni

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Vivian Christine Dourado
Efeitos de diferentes perfis de deficiência de
Pkd1 sobre o fenótipo vascular em artérias de
resistência de camundongos / Vivian Christine
Dourado Pinto. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Luiz Fernando Onuchic.
Coorientadora: Luciana Venturini Rossoni.

Descritores: 1.Doença renal policística autossômica
dominante 2.Gene Pkd1 3.Disfunção vascular
4.Relaxamento dependente do endotélio 5.Hipertensão
6.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-277/23

Dedicatória

*Aos meus pais, Ademir e Janice;
meus irmãos, Rafaela, Letícia e Ademir Filipe;
meus sobrinhos, Beatriz e Benício;
e tantos amigos pela força que me deram.*

Agradecimentos

Agradeço a mim mesma por ter encontrado resiliência nos momentos em que não acreditava em minhas capacidades e por ter aproveitado as oportunidades que surgiram em meu caminho. Os desafios experimentais e sociais, como o período da pandemia e morar sozinha, não foram nada fáceis, mas me fizeram sentir orgulho deste trabalho.

À minha psicóloga, a qual não vou citar o nome, por me auxiliar a compreender minhas forças e fraquezas, e por me ajuda a entender quem sou hoje (em processo constante).

Aos meus pais, Ademir e Janice, agradeço por todos os esforços realizados para que nunca me faltasse nada, por serem exemplos de integridade e perseverança.

Aos meus irmãos, Rafaela, Letícia e Ademir Filipe, que, apesar de toda implicância, estiveram ao meu lado e comemoram essa vitória comigo. Vocês são meu maior orgulho.

Aos meus sobrinhos, Beatriz e Benício, minhas maiores paixões e porto seguro que me dão força todos os dias, apenas por ver a alegria emanada por eles, mesmo estando tão distantes.

Ao meu namorado, Bunes, por aquecer minhas mãos e meus pés, pelo carinho e companheirismo nos dias bons e ruins. Obrigada por escolher amar quem eu sou.

Ao Professor Luiz Fernando Onuchic, por sua dedicação e visão científica, que fortaleceram minha paixão pelo conhecimento.

À Professora Luciana Venturini Rossoni, por todo conhecimento e todas as contribuições indispensáveis.

Às minhas amigas de faculdade, Danielle, Maria e Suelen, que continuam presentes em minha vida até hoje. Agradeço por todas as risadas causadas pelas minhas palavras engraçadas, não necessariamente erradas.

Aos meus amigos artistas, em especial a VCL, por todos os shows, resenhas e momentos de alegria e alívio do estresse que foram tão importantes para mim. Sinto falta das nossas quintas.

Aos meus amigos que carrego pela vida, presencial e virtualmente, especialmente Tuani, Tainah e Mariana. Não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada a todos pelos

desabafos, pelo ombro amigo, pelas festas, pelos incentivos, pelas viagens, por se fazerem presentes mesmo estando tão distantes.

Aos meus colegas médicos, Precil, Eliéser, Andreia, Jukelson e Valkercyo, pela oportunidade de realizar sequenciamento genético com auxílio financeiro no período final sem bolsa governamental. E também a outros colegas dos laboratórios LIM29 na FMUSP e de Fisiologia Vascular no ICBI.

À USP, à coordenação do departamento de Nefrologia, sempre me respondendo com muita eficácia e rapidez. A todos meus professores e funcionários que contribuíram pela minha formação, direta ou indiretamente.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse trabalho e pelo suporte que me deram até aqui. Obrigada.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de genes e proteínas

Lista de unidades de medida

Lista de figuras

Lista de tabelas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença renal policística autossômica dominante: epidemiologia.....	1
1.2. Bases genéticas e moleculares e disfunção da sinalização celular na DRPAD.....	1
1.3. Mecanismos envolvidos na cistogênese da DRPAD.....	8
1.4. Manifestações clínicas da DRPAD	10
1.5. Manifestações cardíacas associadas à DRPAD.....	11
1.6. Patogênese das manifestações cardíacas associadas à DRPAD.....	12
1.7. Patogênese da hipertensão arterial na DRPAD, análises de função vascular e fenótipo vascular associado à doença.....	13
1.7.1. <i>Hipertensão arterial na DRPAD</i>	13
1.7.2. <i>Análises de funcional mecânica vascular</i>	14
1.7.3. <i>Fenótipo vascular funcional associado à DRPAD</i>	24
1.8. Fundamentação do estudo atual	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Eutanásia e instalações.....	30
3.2. Modelos animais	31
3.3. Mensuração da ureia no soro.....	34
3.4. Avaliações biométricas	34
3.5. Aferição de pressão arterial e frequência cardíaca.....	34
3.6. Ultrassonografia renal	35
3.7. Análises de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência.....	35
3.7.1. <i>Miógrafo de arame</i>	35
3.7.1.1. <i>Coleta de artérias mesentéricas de resistência e montagem no sistema</i>	35
3.7.1.2. <i>Normalização das artérias de resistência</i>	36
3.7.1.3. <i>Avaliação das respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio</i> 37	
3.7.1.4. <i>Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina</i>	37

3.7.2.	<i>Miógrafo de pressão</i>	38
3.7.2.1.	<i>Coleta de artérias mesentéricas de resistência e montagem no sistema</i>	38
3.7.2.2.	<i>Normalização das artérias de resistência</i>	38
3.7.2.3.	<i>Avaliação dos parâmetros estruturais e mecânicos</i>	39
3.8.	qPCR em tempo real após RT-pré-amplificação.....	39
3.9.	Análise estatística	40
4.	RESULTADOS.....	41
4.1.	Camundongos <i>Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}</i> apresentaram pequeno aumento da ureia sérica na idade de 8-12 semanas.....	41
4.2.	Camundongos <i>Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}</i> apresentavam doença renal cística significativa na idade de 8-12 semanas.....	42
4.3.	Camundongos haploinsuficientes para <i>Pkd1</i> não desenvolvem doença renal cística significativa mesmo em idade mais avançada.....	44
4.4.	Haploinsuficiência de <i>Pkd1</i> não induz hipertensão arterial mesmo em idade avançada.....	46
4.5.	O diâmetro e a contração mediada por KCl demonstraram integridade morfológica e funcional de artérias mesentéricas de resistência em todos os grupos avaliados	47
4.6.	Haploinsuficiência de <i>Pkd1</i> não afetou relaxamento dependente e independente de endotélio em artérias de resistência mesentéricas	48
4.7.	Haploinsuficiência de <i>Pkd1</i> não determina remodelamento de artérias mesentéricas de resistência em camundongos idosos.....	50
4.8.	Inativação em mosaico de <i>Pkd1</i> compromete significativamente o relaxamento dependente de endotélio de artérias mesentéricas de resistência em camundongos adultos.....	51
4.9.	Inativação em mosaico de <i>Pkd1</i> em idade precoce não afeta o relaxamento dependente de endotélio em artérias mesentéricas de resistência	53
4.10.	Haploinsuficiência de <i>Pkd1</i> e inativação em mosaico de <i>Pkd1</i> não afetam a contração de artérias mesentéricas de resistência em resposta à noradrenalina	55
4.11.	Estudo de Expressão Gênica	56
5.	DISCUSSÃO.....	64
6.	CONCLUSÃO	71
7.	REFERÊNCIAS	72
8.	Anexos.....	1
8.1.	Carta do comitê de ética - 2017.....	1
8.2.	Carta do comitê de ética – 2019	2
8.3.	Artigo submetido.....	3

Lista de abreviaturas e siglas

aa	Aminoácido
AC	Adenilato Ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMR	Artéria mesentérica de resistência
ANOVA	Análise de variância
AR	Artéria de Resistência
ART	<i>Align rank test</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CE	Célula endotelial
CFTR	Regulador da condutância transmembranar da fibrose cística
CI	Camundongo cístico; <i>Pkd1</i> ^{flox/flox} ; <i>Nestin</i> ^{cre}
CMLV	Célula muscular lisa vascular
DAG	Diacilglicerol
De	Diâmetro externo
Di	Diâmetro interno
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
DRP	Doença renal policística
DRPAD	Doença renal policística autossômica dominante
DRPAR	Doença renal policística autossômica recessiva
DRT	Doença renal terminal
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FTR	<i>flippase recognition target</i>
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPS	<i>G-protein-coupled receptor proteolytic site</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HA	Hipertensão arterial
HT	Camundongo heterozigoto; <i>Pkd1</i> ^{+/-}
I/R	Isquemia/Reperfusão
IMC	Índice de massa cardíaca
IMRD	Índice de massa do rim direito
IMVE	Índice de massa do ventrículo esquerdo
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IQR	Intervalo interquartil
K ⁺	Íon potássio
KO	<i>Knockout</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cell</i>

MEJ	Junções mioendoteliais
MM	Massa molecular
MP	Membrana plasmática
NC	Camundongo não cístico; <i>Pkd1</i> ^{flox/flox}
NO	Óxido nítrico
NOR	Noradrenalina
NPS	Nitroprussiato de sódio
NS	Não significativo
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PC	Peso corporal
PCo	Peso do coração
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PRD	Peso do rim direito
PVAT	<i>Perivascular adipose tissue</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RE	retículo endoplasmático
REDOX	reação de oxidação-redução
REJ	<i>Receptor for egg jelly</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SEM	Erro padrão da média
SRA	Sistema renina-angiotensina
SV	Camundongo selvagem; <i>Pkd1</i> ^{+/+}
TFG	Taxa de filtração glomerular
U _s	Ureia sérica
vs.	<i>Versus</i>

Lista de genes e proteínas

<i>Ace</i>	<i>Angiotensin I Converting Enzyme</i>
<i>Agtr1a</i>	<i>Angiotensin II Receptor Type 1a</i>
AGTR1a	Receptor 1a de angiotensina II
<i>Agtr1b</i>	<i>Angiotensin II Receptor Type 1b</i>
AGTR1b	Receptor 1b de angiotensina II
<i>Agtr2</i>	<i>Angiotensin II Receptor Type 2</i>
AGTR2	Receptor 2 de angiotensina II
AKT	Serina/Treonina quinase 1
<i>ALG9</i>	<i>Alpha-1,2-Mannosyltransferase</i>
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AngII	Angiotensina II
BiP	Proteína de imunoglobulina de ligação
<i>Cat</i>	<i>Catalase</i>
Cat	Catalase
CDK2	Quinase dependente de ciclina 2
COX1	Ciclo-oxigenase 1
COX2	Ciclo-oxigenase 2
<i>Cyba</i>	<i>Cytochrome B-245 Alpha Chain</i>
<i>Cybb</i>	<i>Cytochrome B-245 Beta Chain</i>
<i>DNAJB11</i>	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B11</i>
<i>Edn1</i>	<i>Endothelin 1</i>
Edn1	Endotelina 1
<i>Ednra</i>	<i>Endothelin Receptor Type A</i>
Ednra	Receptor A de endotelina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
<i>Endrb</i>	<i>Endothelin Receptor Type B</i>
Endrb	Receptor B de endotelina
ERDj3	Proteína 3 de DNAJ associado ao retículo endoplasmático
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FLP	Flipase
FPC	Fibrocistina/Poliductina
<i>GANAB</i>	<i>glucosidase II alpha subunit</i>
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
HNF1B	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta</i>
<i>IFT140</i>	<i>Intraflagellar Transport 140</i>
IP ₃ R	Receptor de IP ₃
JAK2	Janus quinase 2
<i>Kdr</i>	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
Keap1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a kelch
lacZ	Gene repórter
<i>Lgals3</i>	<i>Galectin 3</i>
M3R	Receptor 3 muscarínico
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno

MEK	Proteína quinase da quinase ativada por mitogene
MLC	Cadeia leve da cabeça da miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da MLC
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
<i>Ncf1</i>	<i>Neutrophil Cytosolic Factor 1</i>
<i>Ncf2</i>	<i>Neutrophil Cytosolic Factor 2</i>
Neor	Gene de resistência à neomicina
<i>Nestin</i>	Nestina
<i>Nfe2l2</i>	<i>NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2</i>
NOS	Óxido nítrico sintase
<i>Nos1</i>	<i>Nitric Oxide Synthase 1</i>
<i>Nos2</i>	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
<i>Nos3</i>	<i>Nitric Oxide Synthase 3</i>
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
<i>Nox2</i>	<i>NADPH Oxidase 2</i>
<i>Nox4</i>	<i>NADPH Oxidase 4</i>
<i>Nox4</i>	<i>NADPH Oxidase 4</i>
Nrf2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2
Orai	Canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio
<i>p21</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
p22phox	Cadeia leve do citocromo b
p47phox	Fator citosólico 1 de neutrófilos
p67phox	Fator 2 do citosol de neutrófilos
PC1	Policistina 1
PC2	Policistina 2
PGIS	Prostaciclina sintase
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
<i>PKD1</i>	<i>Polycystic Kidney Disease 1</i>
<i>Pkd1</i>	<i>Polycystic Kidney Disease 1</i>
<i>PKD2</i>	<i>Polycystic Kidney Disease 2</i>
<i>Pkd2</i>	<i>Polycystic Kidney Disease 2</i>
PKG	Proteína quinase G dependente de GMPC
<i>PKHD1</i>	<i>Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1</i>
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PP1	Subunidade catalítica da proteína fosfatase-1
<i>PRKCSH</i>	<i>Protein Kinase C Substrate 80K-H</i>
<i>Ptgs1</i>	<i>Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1</i>
<i>Ptgs2</i>	<i>Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2</i>
<i>Rac1</i>	<i>Rac Family Small GTPase 1</i>
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido no cérebro
<i>Rhoa</i>	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RHOA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>

<i>Rock1</i>	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
ROCK1	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
<i>Rock2</i>	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2</i>
ROCK2	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2</i>
RV2VP	Vasopressina-receptor V2 da vasopressina
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPase sarcoplasmática/retículo endoplasmático Ca ²⁺
SOD	Superóxido dismutase
<i>Sod1</i>	<i>Superoxide Dismutase 1</i>
<i>Sod2</i>	<i>Superoxide Dismutase 2</i>
<i>Sod3</i>	<i>Superoxide Dismutase 3</i>
Src	Tirosina quinase
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
Stim	Molécula 1 de interação estromal
TRPV4	Canal catiônico membro 4 potencial receptor transitório da subfamília V
<i>TSC2</i>	<i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i>
<i>Vegfa</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Unidades de Medidas

°C	Grau Celsius
g	Gramma
h	Hora
kb	Quilobases
kDa	Quilodalton
Log	Logaritmo
M	Molar
mg	Miligramma
mg/dL	Miligramma por decilitro
mHz	Megahertz
min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmHg	Milimetro de mercúrio
mmol/L	Milimol por litro
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
Rmax	Resposta máxima
x g	Força g
µm	Micrômetro
Π	Número Pi

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura e representação dos domínios fundamentais da policistina-1 (PC1) e da policistina-2 (PC2), os produtos de *PKD1* e *PKD2*, respectivamente. NT: porção N-terminal da policistina-1; CT: porção C terminal da policistina-1. Adaptado de Bastos e Onuchic, e Maser e cols (17,18); criado através do site BioRender.com. 3

Figura 2. Mecanismos de contração da célula do músculo liso vascular (CMLV). Adaptado de Webb, Amberg e Navedo, e Loirand e Pecaud (105,108,112); criado através do site BioRender.com. ANGII, angiotensina II; Ca^{2+} , íon cálcio; CaCC, canal de cloreto dependente de cálcio; CaM, complexo cálcio-calmodulina; CPI-17, inibidor de proteína fosfatase-1 potencializado por C-quinase de 17 kDa; Cl^- , íon cloreto; DAG, diacilglicerol; END1, endotelina 1; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; GAP, junção GAP; GDP, difosfato de guanosina; GEF, fator de troca de nucleotídeo guanina; G_q , proteína G da classe q; GTP, trifosfato de guanosina; IP_3 , inositol 1,2,4 trisfosfato; IP_3R , receptor de inositol 1,2,4 trisfosfato; MEK, proteína quinase da quinase ativada por mitogene; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; MYPT-1, subunidade 1 de direcionamento da fosfatase de miosina; NOR, noradrenalina; P, fósforo; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; RHOA, membro A da família homóloga a Ras; ROCK, quinase associada a Rho; RyR, receptor de rianodina; V, voltagem; V_m , voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com. 16

Figura 3. Ação da acetilcolina (ACh) na produção do vasodilatador óxido nítrico (NO) na célula endotelial vascular, e seu mecanismo de relaxamento do músculo vascular. Feito com o auxílio das imagens de Zhao e cols, Vanhoutte e cols, Saternos e cols, e baseado na literatura descrita (120,125,126,128,130–132). Criado na plataforma BioRender.com. AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; Ca^{2+} , íon cálcio; CaM, complexo cálcio-calmodulina; CE, célula endotelial; CMLV, célula muscular lisa vascular; DAG, diacilglicerol; GCs, guanilato ciclase solúvel; GMP, monofosfato de guanosina; GMPc, monofosfato cíclico de guanosina; G_q , proteína G da classe q; G_s , proteína G da classe s; IP_3 , inositol 1,2,4 trisfosfato; IP_3R , receptor de inositol 1,2,4 trisfosfato; K^+ , íon potássio; M3, receptor muscarínico 3; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; MYPT-1, subunidade 1 de direcionamento da fosfatase de miosina; NOS, óxido nítrico sintase; Orai, canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio; P, fósforo; PP1, subunidade catalítica da proteína fosfatase-1; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKA, proteína quinase A; PKG, proteína quinase G; RHOA, membro A da família homóloga a Ras; ROCK, quinase associada a Rho; RyR, receptor de rianodina; SERCA, adenosinatrifosfatase transportador de Ca^{2+} sarcoplasmática/RE; Stim, molécula 1 de interação estromal; TRPV4, canal catiônico membro 4 potencial receptor transitório da subfamília V; V_m , voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com. 19

Figura 4. Produção de prostaciclina (PGI_2) no endotélio vascular a partir de fosfolipídeos da membrana plasmática, e sua ação vasodilatadora nas células musculares. Feita a partir das descrições na literatura (129,133–137). Criado na plataforma BioRender.com. AC, adenilato ciclase; ACh, acetilcolina; AMP, monofosfato de adenosina; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; Ca^{2+} , íon cálcio; CE, célula endotelial; CMLV, célula muscular lisa vascular; COX, ciclo-oxigenase; G_q , proteína G da classe q; K^+ , íon potássio; M3, receptor muscarínico 3; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; P, fósforo; PGH_2 , prostaglandina endoperóxido; PGIS, prostaciclina sintase; PKA, proteína quinase A; PLA_2 , fosfolipase A2; V, voltagem; V_m , voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com. 21

Figura 5. Produção e ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Baseado em Féléto, Kohler e Hoyer, e Goto e Kitazono (139,141,142). Criado na plataforma BioRender.com. ACh, acetilcolina; ATPase, adenosinatrifosfatase; Ca^{2+} , íon cálcio; CE, célula endotelial; CMLV, célula muscular lisa vascular; DAG, diacilglicerol; GAP, junção GAP; Gq, proteína G da classe q; IP_3 , inositol 1,2,4 trisfosfato; IP_3R , receptor de inositol 1,2,4 trisfosfato; K^+ , íon potássio; M3, receptor muscarínico 3; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; Na^+ , íon sódio; Orai, canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio; P, fósforo; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLC, fosfolipase C; RyR, receptor de rianodina; SERCA, adenosinatrifosfatase transportador de Ca^{2+} sarcoplasmática/RE; Stim, molécula 1 de interação estromal; TRPV4, canal catiônico membro 4 potencial receptor transitório da subfamília V; V, voltagem; V_m , voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com. 23

Figura 6. Genotipagem dos camundongos analisados no estudo. A) Camundongo selvagem (SV) com alelos selvagens ($Pkd1^{+/+}$) e camundongo haploinsuficiente para $Pkd1$ (HT) com alelos selvagem e nulo ($Pkd1^{+/-}$); MM, massa molecular; CN, controle negativo; B) Camundongo não cístico (NC) com alelos $Pkd1^{fllox}$ ($Pkd1^{fllox/fllox}$) e camundongo cístico (CI) com alelos $Pkd1^{fllox}$ ($Pkd1^{fllox/fllox}; Nestin^{cre}$); MM; CN; C) Camundongo NC com alelos $Pkd1^{fllox}$ ($Pkd1^{fllox/fllox}$) e camundongo CI com inativação de uma menor parte dos alelos originalmente $Pkd1^{fllox}$ ($Pkd1^{fllox/fllox}; Nestin^{cre}$); MM; CN; D) Genotipagem por qPCR de camundongos $Pkd1^{fllox/fllox}; Nestin^{cre}$ e $Pkd1^{fllox/-}; Nestin^{cre}$; E) Camundongo NC sem o transgene $Nestin^{cre}$ ($Pkd1^{fllox/fllox}$) e camundongo CI com o transgene $Nestin^{cre}$ ($Pkd1^{fllox/fllox}; Nestin^{cre}$); MM; CN. 33

Figura 7. Fotos representativas da montagem de artéria de resistência no miógrafo de arame. A) Artéria mesentérica de resistência isolada com comprimento aproximado de 2 mm. B) Montagem parcial com o primeiro fio de arame de tungstênio no interior da artéria. C) Artéria mesentérica de resistência com dois fios de tungstênio passados em seu lúmen, montada no sistema de análise. 36

Figura 8. Diagrama do segmento de artéria de resistência montada em miógrafo de arame. Adaptado de Wang e cols (161). 36

Figura 9. Diagrama do segmento de artéria de resistência montada em miógrafo de pressão. Di, diâmetro interno; De, diâmetro externo. Criado através do site BioRender.com. 38

Figura 10. Imagens representativas obtidas por ultrassonografia de rim direito (RD) e rim esquerdo (RE) não císticos de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para $Pkd1$ (HT), nas idades de 35 e 45 semanas. 45

Figura 11. Medidas semanais de: A) pressão arterial sistólica (mmHg); e B) frequência cardíaca (bpm) de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para $Pkd1$ (HT) de 15 semanas até 55 a 60 semanas de vida. Análise de modelos mistos para medidas repetidas; NS. 47

Figura 12. Curvas de concentração-resposta de (A e C) acetilcolina e (B e D) nitroprussiato de sódio em artérias de resistência mesentéricas de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para $Pkd1$ (HT): (A e B) 8 a 12 semanas de idade; (C e D) 55 a 60 semanas de idade. ANOVA duas vias; NS. 49

Figura 13. Análise de parâmetros estruturais: A) diâmetro interno; e B) área de secção transversa; e mecânico: C) Curva proporcional a *stress/strain* de artérias mesentéricas de resistência de camundongos selvagem (SV) e haploinsuficientes para $Pkd1$ (HT) na idade de 55-60 semanas. Di: diâmetro interno; Do: diâmetro original; ANOVA de duas vias; NS. 51

Figura 14. Curvas concentração-resposta de (A e C) acetilcolina e (B e D) nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI): (A e B) 3-4 semanas de idade; (C e D) 8-12 semanas de idade. ANOVA de duas vias, * $p < 0,05$ vs. NC 8-12 semanas. 52

Figura 15. Curva concentração-resposta de relaxamento à acetilcolina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles não císticos (NC) com 3 a 4 semanas e 8 a 12 semanas de vida. ANOVA de duas vias; * $p < 0,005$. 54

Figura 16. Curvas concentração-resposta de contração frente à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) na idade de (A) 8 a 12 semanas e (B) 55 a 60 semanas. ANOVA de duas vias; NS. 55

Figura 17. Curva concentração-resposta de contração frente à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) na idade de 8 a 12 semanas. ANOVA de duas vias; NS. 56

Figura 18. Expressão de (A) *Cat*, (B) *Sod1*, (C) *Sod2*, (D) *Sod3*, (E) *Cyba*, (F) *Cybb*, (G) *Nox4*, (H) *Rac1*, (I) *Ptgs1*, (J) *Ptgs2*, (K) *Ncf1* e (L) *Ncf2* em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) com 3-4 e 8-12 semanas de idade. Variáveis paramétricas: média \pm SEM (preto) analisadas por ANOVA de duas vias; variáveis não paramétricas: mediana (IQR; azul) analisadas por ART e ANOVA de duas vias. 58

Figura 19. Expressão de (A) *Nos1*, (B) *Nos2*, (C) *Nos3*, (D) *Agtr1a*, (E) *Agtr1b*, (F) *Agtr2*, (G) *Ace*, (H) *Edn1*, (I) *Ednra* e (J) *Ednrb* em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) com 3-4 e 8-12 semanas de idade. Variáveis paramétricas: média \pm SEM (preto) analisadas por ANOVA de duas vias; variáveis não paramétricas: mediana (IQR; azul) analisadas por ART e ANOVA de duas vias. 61

Figura 20. Expressão de (A) *Rhoa*, (B) *Rock1*, (C) *Rock2*, (D) *Vegfa*, (E) *Kdr*, (F) *Pkd1* e (G) *Pkd2* em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) com 3-4 e 8-12 semanas de idade. Variáveis paramétricas: média \pm SEM (preto) analisadas por ANOVA de duas vias; variáveis não paramétricas: mediana (IQR; azul) analisadas por ART e ANOVA de duas vias. 63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeito da haploinsuficiência e inativação em mosaico de <i>Pkd1</i> em dados biométricos e ureia sérica.	41
Tabela 2. Análise de diâmetro e integridade contrátil muscular, avaliada por contração em resposta a KCl 120 mM, de anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para <i>Pkd1</i> (HT) nas idades de 8-12 e 55-60 semanas; e de camundongos não císticos (NC) e císticos com inativação de <i>Pkd1</i> em mosaico (CI) nas idades de 3-4 e 8-12 semanas.	48
Tabela 3. Comparações exploratórias dos resultados de RT-qPCR em artérias mesentéricas de resistência, realizadas entre grupos CI e NC em diferentes idades.	59

RESUMO

Pinto VCD. Efeitos de diferentes perfis de deficiência de *Pkd1* sobre o fenótipo vascular em artérias de resistência de camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) constitui-se na doença humana monogênica com risco de óbito mais frequente. A grande maior parte dos casos desta doença é causada por variantes patogênicas nos genes *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) ou *PKD2*. Embora a principal manifestação clínica da DRPAD seja o desenvolvimento progressivo de múltiplos cistos renais e perda gradual relativamente tardia de função renal, a enfermidade é sistêmica, incluindo também manifestações extrarrenais. Manifestações e complicações cardiovasculares respondem por morbidade e mortalidade consideráveis. O desenvolvimento de hipertensão arterial (HA) ocorre em 60% dos pacientes antes de uma perda significativa de função renal. Estudos prévios revelaram disfunção endotelial e redução da atividade de óxido nítrico sintase constitutiva em artérias de resistência subcutâneas de pacientes com DRPAD, normotensos e hipertensos. Esses estudos, no entanto, não foram capazes de identificar as bases genéticas e moleculares desse fenótipo vascular anormal, uma vez que o perfil de deficiência de *PKD1* causador não pode ser discriminado no paciente, as contribuições potenciais dos fenótipos renal e vascular não podem ser avaliados isoladamente no paciente, e a análise em diferentes fases da vida não foi realizada. Resultados anteriores mostraram relaxamento-dependente do endotélio levemente prejudicado em artérias de condutância de camundongos *Pkd1*^{+/-} apenas em resposta a concentrações muito baixas de acetilcolina (ACh) e na idade de 30 semanas (sem), além de contratilidade aumentada em resposta à fenilefrina em camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd2*^{+/-} de idade avançada. Recentemente, mostrou-se que camundongos *knockout* para *Pkd1* específico para endotélio apresentaram menor relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas de resistência (AMR) e pressão arterial (PA) aumentada. Estes achados, no entanto, não são aplicáveis à DRPAD, uma vez que as células endoteliais de pacientes com DRPAD não exibem inativação completa de *Pkd1* e este modelo não permite investigar o papel da deficiência de *Pkd1* em células musculares lisas de AMRs nem manifesta o fenótipo cístico. Era crucial, portanto, conduzir esta investigação em cenários de deficiência de *Pkd1* aplicáveis à DRPAD humana. Nesse contexto, analisamos o fenótipo vascular em AMRs do camundongo *Pkd1*^{+/-} (HT), não cístico, normotenso e que reproduz o *background* genético celular dos pacientes com DRPAD1, e do camundongo *Pkd1*^{flox/flox}.*Nestin*^{cre} (CI), um modelo cístico, hipertenso, que reproduz o fenótipo da doença e cujo padrão em mosaico de inativação de *Pkd1* permite a avaliação potencial do mecanismo de dois eventos no nível vascular. A concentração sérica de ureia (Us) não diferiu entre camundongos HT e *Pkd1*^{+/+} (SV) na idade de 8-12 sem, mas apresentou uma leve elevação nos animais HT com 55-60 sem. Não observamos diferenças nas curvas concentração-resposta (CCR) à ACh, ao nitroprussiato de sódio (NPS) e à noradrenalina (NOR) entre AMRs de camundongos HT e SV em ambas idades. Também não observamos alterações no curso da PA sistólica de 15 a 55-60 sem entre animais HT e SV, assim como em parâmetros estruturais e mecânicos avaliados por miógrafo de pressão na idade de 55-60 sem. Análises ultrassonográficas não identificaram cistos renais em animais HT com 35 e 45 sem. Os animais CI de 8-12 sem apresentaram índice de massa de rim direito e Us maiores que seus controles não císticos (*Pkd1*^{flox/flox}, NC). Camundongos CI apresentaram prejuízo de relaxamento em resposta à ACh na idade de

8-12 sem, mas não de 3-4 sem. Embora o relaxamento-dependente de endotélio tenha sido mais comprometido em camundongos CI que NC na idade de 8-12 sem, a CCR à ACh nestes animais NC também foi afetada. A CCR ao NPS não diferiu entre camundongos CI nas duas idades, assim como a CCR à NOR, avaliada apenas em 8-12 sem. Por fim, avaliamos o perfil de expressão de genes envolvidos em biologia vascular em AMRs de camundongos CI e NC em ambas as idades. Nossos achados revelaram maior expressão de *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Nos2*, *Nos3*, *Vegfa* e *Kdr* em camundongos NC de 3-4 sem que de 8-12 sem, como também menor expressão de *Sod1*, *Sod2* e *Cat* em animais CI comparados a NC na idade de 3-4 sem. Nossos dados revelaram que a inativação em mosaico de *Pkd1* leva ao comprometimento do relaxamento dependente do endotélio em AMRs, um achado não identificado na haploinsuficiência de *Pkd1*. Esses resultados sugerem que um mecanismo genético de dois eventos seja provavelmente determinante para o desenvolvimento de tal fenótipo. Nossos achados também sugerem que o relaxamento dependente do endotélio prejudicado associado à DRPAD seja causado principalmente pela deficiência de *PKDI* a longo prazo, embora a HA crônica também possa desempenhar um papel nessa disfunção. Por fim, nossos resultados sugerem que a defesa antioxidante local prejudicada nos vasos de resistência possa contribuir para o fenótipo vascular defeituoso na DRPAD, bem como para a HA.

Palavras-chave: Doença renal policística autossômica dominante, gene *Pkd1*, disfunção vascular, relaxamento dependente do endotélio, hipertensão, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Pinto VCD. Effects of different *Pkd1* deficiency profiles on the vascular phenotype in resistance arteries of mice [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common monogenic life-threatening human disease. The vast majority of ADPKD cases is caused by pathogenic variants in the *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) or *PKD2* genes. Although the main clinical manifestation of ADPKD is the progressive development of multiple kidney cysts and relatively late gradual loss of renal function, the disease is systemic, including extrarenal manifestations. Cardiovascular manifestations and complications account for considerable morbidity and mortality. The development of arterial hypertension (AH) occurs in 60% of patients before significant decline in renal function. Previous studies revealed endothelial dysfunction and reduced activity of constitutive nitric oxide synthase in subcutaneous resistance arteries of normotensive and hypertensive ADPKD patients. These studies, however, were not able to identify the genetic and molecular basis of this abnormal vascular phenotype, since the causative *PKD1* deficiency profile cannot be discriminated in the patient, the potential contributions of the kidney and vascular phenotypes cannot be evaluated separately in the patient, and analysis at different stages of life. Previous results have shown mildly impaired endothelium-dependent relaxation in conductance arteries of *Pkd1*^{+/-} mice only in response to very low concentrations of acetylcholine (ACh) and at 30 weeks (wk), as well as increased contractility in response to phenylephrine in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd2*^{+/-} mice at an advanced age. Recently, it was shown that endothelium-specific *Pkd1* knockout mice showed lower endothelium-dependent relaxation in mesenteric resistance arteries (MRA) and increased blood pressure (BP). These findings, however, are not applicable to ADPKD, since endothelial cells from patients with ADPKD do not exhibit complete *Pkd1* inactivation and this model does not allow investigating the role of *Pkd1* deficiency in smooth muscle cells of AMRs nor does it manifest the cystic phenotype. It was crucial, therefore, to conduct this investigation in scenarios of *Pkd1* deficiency applicable to human ADPKD. In this context, we analyzed the vascular phenotype of AMRs in the *Pkd1*^{+/-} (HT) mouse, a noncystic, normotensive model, which reproduces the cellular genetic background of patients with ADPKD1, and of the *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} (CY) mouse, a cystic, hypertensive model, which reproduces the phenotype of the disease and whose mosaic pattern of *Pkd1* inactivation allows the potential evaluation of the two-hit mechanism at the vascular level. Serum urea nitrogen (SUN) did not differ between HT and WT mice at the age of 8-12 wk but showed a slight increase in HT animals at 55-60 wk. We did not observe differences in the concentration-response curves (CRC) to ACh, sodium nitroprusside (NPS) and noradrenaline (NOR) between MRAs of HT and *Pkd1*^{+/+} (WT) mice at both ages. We also did not observe alterations in the course of systolic BP from 15 to 55-60 wk between HT and WT animals, as well as in structural and mechanical parameters evaluated by pressure myograph at the age of 55-60 wk. Ultrasonographic analyses did not identify renal cysts in HT animals with 35 and 45 wk. The 8-12-wk CY animals had higher right kidney mass index and SUN than their noncystic controls (*Pkd1*^{flox/flox}, NC). CY mice showed impaired relaxation in response to ACh at 8-12 wk, but not at 3-4 wk. Although endothelium-dependent relaxation was more impaired in CY than NC mice at the age of 8-12 wk, the CRC to ACh was also altered in these NC animals. The CRC to NPS did not differ between CY mice at both ages, nor the CRC to NOR, evaluated only at 8-12 wk. To conclude, we evaluated the expression profile of

genes involved in vascular biology in MRAs of CY and NC mice at both ages. Our data revealed higher expression of *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Nos2*, *Nos3*, *Vegfa* and *Kdr* in NC MRAs of 3-4-wk than 8-12-wk-old mice, as well as lower expression of *Sod1*, *Sod2* and *Cat* in CY mice compared to NC animals at 3-4 wk. Our data revealed that mosaic inactivation of *Pkd1* leads to impairment of endothelium-dependent relaxation in MRAs, a finding not identified in *Pkd1* haploinsufficiency. These results suggest that a two-hit genetic mechanism is likely determinant for the development of this phenotype. Our findings also suggest that the impaired endothelium-dependent relaxation associated with ADPKD is mainly caused by long-term *PKD1* deficiency, although chronic AH may also play a role in this dysfunction. Finally, our results suggest that impaired local antioxidant defense in resistance vessels may contribute to the defective vascular phenotype in ADPKD, as well as to AH.

Keywords: Autosomal dominant polycystic kidney disease, *Pkd1* gene, vascular dysfunction, endothelium-dependent relaxation, hypertension, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença renal policística autossômica dominante: epidemiologia

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é a doença monogênica renal mais comum, com incidência estimada por estudos de verificação de autópsia de 1:400-1000 nascidos vivos (1), enquanto estudos baseados em registros sugerem prevalências de 1:543 a 1:4000 (2). Mais de 50% dos indivíduos afetados evoluem a falência renal até os 70 anos de idade, fazendo da DRPAD a quarta causa mais frequente de doença renal terminal (DRT) (3). Vale notar que a DRPAD foi responsável por aproximadamente 7,5% dos casos de DRT em um estudo conduzido na Região Sul do Brasil (4), enquanto 8,4% dos pacientes iniciados em terapia renal substitutiva no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo eram afetados por essa enfermidade (5).

1.2. Bases genéticas e moleculares e disfunção da sinalização celular na DRPAD

A DRPAD é geneticamente heterogênea, podendo resultar essencialmente de variantes em um de dois genes: *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*), localizado na região cromossômica 16p13.3, ou *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*), posicionado em 4q21 (6). Aproximadamente 78% das famílias afetadas pela doença apresentam variantes patogênicas no gene *PKD1* – forma denominada DRPAD1 - enquanto em cerca de 15% delas a enfermidade é causada por mutações em *PKD2* - forma denominada DRPAD2 (7). Aproximadamente 7% das famílias com DRPAD permanecem geneticamente não resolvidas ou apresentam variantes patogênicas em outros genes (8). O gene *GANAB* (*Glucosidase II Alpha Subunit*) mapeia em 11q12.3 e responde por ~0,3% do total de casos de DRPAD (8). Outros genes mutados em um número limitado de famílias com DRPAD incluem *DNAJB11* [*DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B11* (9)], *ALG9* [*Alpha-1,2-Mannosyltransferase* (10)] e *IFT140* [*Intraflagellar Transport 140* (11)].

O gene *PKD1* estende-se por um segmento genômico de 52 quilobases (kb), associando-se a 46 éxons e um transcrito de 14,2 kb. Este gene codifica a glicoproteína integral de membrana policistina-1 (PC1), com 4.302 aminoácidos (aa) e massa molecular de ~460 kDa (12). PC1 constitui-se em uma molécula multifuncional, atuando aparentemente tanto como um receptor de membrana quanto uma molécula de adesão. Sua estrutura compreende uma porção extracelular amino-terminal com mais de 3.000 aa, 11 domínios transmembrânicos e uma porção carboxi-terminal intracelular de 197 aa com vários sítios de fosforilação e um domínio helicoidal (12–14). A porção extracelular de PC1 apresenta uma combinação complexa de domínios frequentemente envolvidos em interações proteína-proteína e proteína-carboidrato, incluindo 16 cópias de uma repetição de 80 aa que se assemelham a regiões da imunoglobulina, denominadas repetições PKD, um módulo REJ (*receptor for egg jelly*) aparentemente associado a uma função regulatória, e um domínio GPS (*G-protein-coupled receptor proteolytic site*) fundamental para a clivagem da proteína. Vale destacar que a forma clivada de PC1 é essencial à manutenção da estrutura do néfron distal (15). O domínio helicoidal intracitosólico de PC1, por sua vez, media sua interação física com a policistina-2 (PC2), produto do gene *PKD2* (Figura 1) (16).

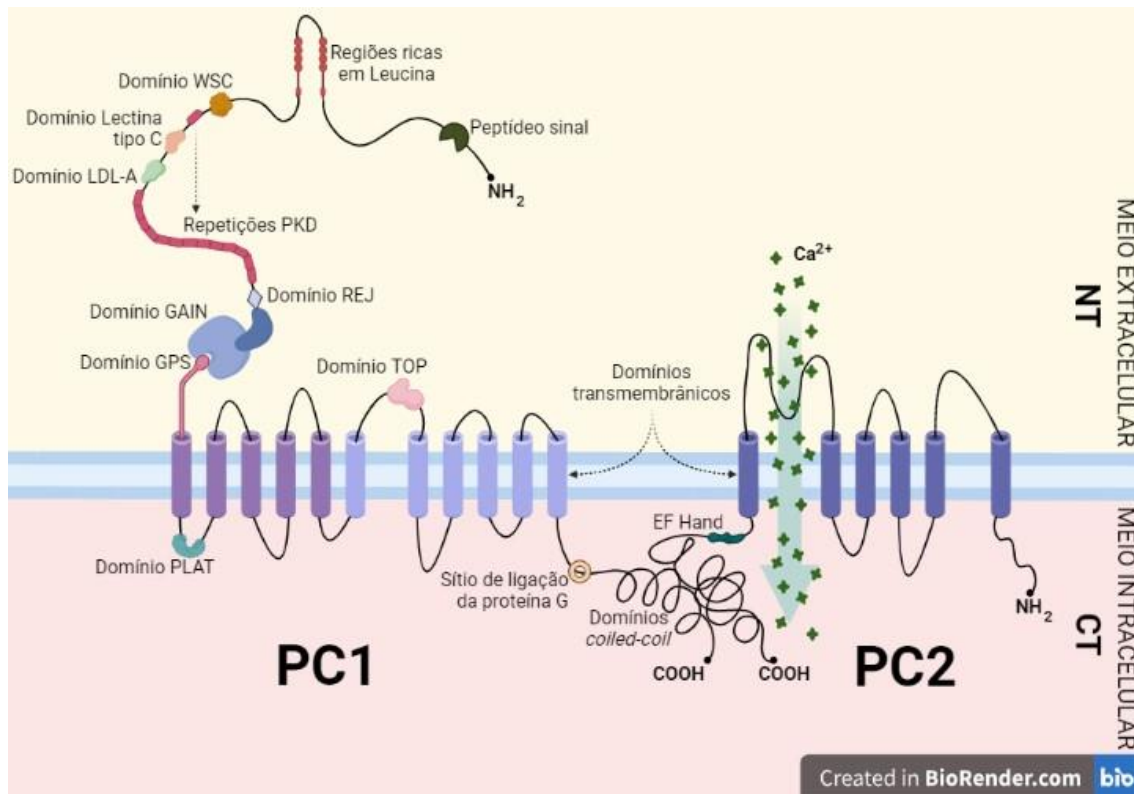


Figura 1. Estrutura e representação dos domínios fundamentais da policistina-1 (PC1) e da policistina-2 (PC2), os produtos de *PKD1* e *PKD2*, respectivamente. NT: porção N-terminal da policistina-1; CT: porção C terminal da policistina-1. Adaptado de Bastos e Onuchic, e Maser e cols (17,18); criado através do site BioRender.com.

PKD2 compreende um seguimento genômico de 68 kb, 15 éxons e dá origem a um RNAm de 5,4 kb. PC2 também se constitui em uma proteína integral de membrana, de 968 aa e massa molecular de ~110 kDa, formada por seis domínios transmembrânicos e extremidades carboxi- e amino-terminais intracitosólicas (19). Esta glicoproteína funciona como um canal para cátions não seletivo com permeabilidade a cálcio (Ca^{2+}) (19). É importante mencionar, ainda, que as porções C-terminais de PC1 e PC2 também se associam a outros ligantes, modulando outras vias de sinalização. Estas incluem vias associadas à proteína G, como a relacionada ao receptor V2 de vasopressina, condições em que a modulação que é feita por meio da modificação da atividade dos receptores (20,21).

O gene *GANAB* codifica a subunidade α da glicosidase II (8), uma holoenzima composta pela subunidade α catalítica, que atua na retirada de frações de N-glicanos, e pela subunidade β regulatória, importante para garantir a localização apropriada do complexo no retículo endoplasmático (RE) (8). A subunidade β da glicosidase II é

codificada pelo gene *PRKCSH* (*Protein Kinase C Substrate 80K-H*), um dos genes mutados na doença hepática policística autossômica dominante. O gene *DNAJB11* codifica a proteína ERdj3 (proteína 3 de DNAJ associado ao retículo endoplasmático), um cofator da proteína chaperona BiP (proteína de imunoglobulina de ligação) que regula enovelamento, tráfego e degradação de proteínas secretadas e de membrana (7). *ALG9* codifica a α -1,2-manosiltransferase, que catalisa a adição da sétima e da nona moléculas de manose a um precursor de N-glicano em crescimento no lúmen do RE (10). O gene *IFT140*, por fim, codifica a proteína transporte intraflagelar 140, um dos componentes principais do complexo central IFT-A (22). As proteínas deste complexo são responsáveis pelo tráfego retrógrado de proteínas associado à dineína (da ponta ciliar ao corpo basal da célula).

A expressão de PC1 é mais intensa no rim em desenvolvimento, reduzindo-se acentuadamente no rim adulto (23). Interessantemente, a expressão de *PKD1* e *PKD2* em túbulo proximal reduz-se a partir de 20-24 semanas de vida embrionária. A partir de então, transcritos de *PKD1* se restringem a túbulos distais na nefrogênese fetal e não são mais detectados em rins adultos, apesar da tênue detecção de PC1. Transcritos de *PKD2*, ao contrário, são persistentemente observados ao longo de toda a nefrogênese (24).

PC1, PC2 e FPC (Fibrocistina/Poliductina), produto proteico do gene *PKHD1* (*Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1*), se expressam no cílio apical primário de células tubulares e ductais renais. Vale notar que *PKHD1* é o gene mutado nas formas típicas da doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR). Essas três proteínas são necessárias para a indução de transientes de Ca^{2+} deflagrados pelo curvamento ciliar determinado pelo fluxo de fluido intratubular. PC2 também interage com outras proteínas que funcionam como canais para Ca^{2+} (25,26). O mecanismo pelo qual a homeostase intracelular de Ca^{2+} é alterada na DRPAD, contudo, ainda não é conhecido com precisão. A maior parte dos estudos que abordam esta questão, no entanto, revelaram níveis intracelulares basais de Ca^{2+} diminuídos em células e tecidos com doença renal policística. Esta concentração reduzida de Ca^{2+} citosólico, por sua vez, associa-se a um aumento das concentrações de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) em tecidos císticos. Três mecanismos poderiam potencialmente contribuir para a elevação das concentrações intracelulares de AMPC: a) ativação da adenilato ciclase 6 (AC); b) inibição da fosfodiesterase 1 dependente do complexo Ca^{2+} -calmodulina (CaM) (27); e

c) inibição indireta da fosfodiesterase 3 (28). Este aumento das concentrações intracelulares de AMPc, por sua vez, desempenha papel determinante na patogênese da DRPAD, uma vez que em células de revestimento cístico o AMPc estimula vias pró-proliferativas, efeito traduzido em uma reposta celular hiperproliferativa anormal. Esta ação diverge do observado em células epiteliais do rim normal, nas quais AMPc inibe proliferação (14). De fato, ao contrário do observado em células renais epiteliais normais, o AMPc estimula a via MAPK/ERK (proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular) em células DRPAD e DRPAR (14).

Além de induzir uma resposta hiperproliferativa na DRPAD, o AMPc também promove secreção transepitelial de fluido mediada pela secreção de cloreto, outro mecanismo fundamental no processo de crescimento cístico (21,29,30). Admite-se que a inibição de CFTR (regulador da condutância transmembranar da fibrose cística), localizado na membrana luminal de células DRPAD e ativado por AMPc, seja responsável pela secreção de fluido para o interior dos cistos, contribuindo para o crescimento dos mesmos. Nesse sentido, inibidores de CFTR retardaram o crescimento cístico e protegeram a função renal em modelos de camundongos ortólogos à DRPAD1 de rápida evolução (31). Tratamento de camundongos *Pkd1^{RC/RC}*, um modelo de doença renal policística (DRP) mais lento, com o modulador de CFTR VX-809, por sua vez, também reduziu o crescimento cístico e preservou a função renal (32).

O sistema vasopressina-receptor V2 da vasopressina (RV2VP) constitui-se no principal sistema agonista de geração de AMPc nas células principais dos ductos coletores. Uma vez que na DRPAD os cistos derivados do ducto coletor parecem ser maiores e mais numerosos, tratamento com antagonistas do RV2VP passaram a ser testados em modelos animais de DRP. De fato, a utilização de um antagonista do RV2VP promoveu inibição do desenvolvimento ou da progressão da doença cística em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD2; em ratos *PCK*, um modelo ortólogo à DRPAR; e em camundongos *pcy*, um modelo ortólogo à nefronoftise da adolescência (27,33). Em seguimento, estudos posteriores mostraram que pacientes com DRPAD tratados com tolvaptan, um antagonista potente e seletivo do RV2VP humano, apresentaram menor crescimento do volume renal total e lentificação do declínio da taxa de filtração glomerular (TFG) (34). Interessantemente, a elevação pronunciada da ingestão hídrica em ratos *PCK* levou à redução da liberação da vasopressina e

consequente diminuição do acúmulo intracelular de AMPc, traduzindo-se em atenuação do fenótipo renal policístico (35). Este efeito, contudo, diferiu entre modelos císticos de rato e camundongo (36).

A ação da somatostatina ou de seus análogos sobre receptores localizados no rim e no fígado também é capaz de modular negativamente os níveis intracelulares de AMPc. Tal efeito, originalmente documentado por meio da atenuação do fenótipo hepático de ratos *PCK* determinado pelo análogo da somatostatina octreotida (37), foi também demonstrado em pacientes com DRPAD (38,39).

As policistinas apresentam também várias funções extraciliares, incluindo regulação do ciclo celular. PC1 induz a ativação da via JAK2-STAT (janus quinase 2 – transdutor de sinal e ativador da transcrição 1), num processo dependente de PC2. A fosforilação e formação de homodímeros STAT1, seguidas de sua migração para o núcleo celular e ligação ao promotor de *p21*, promovem aumento da transcrição deste gene e consequente diminuição da atividade de CDK2 (quinase dependente de ciclina 2) (40). Segue-se, então, inibição do ciclo celular com parada em G0/G1. Admite-se, portanto, que essa via possa contribuir para a redução da taxa de proliferação celular induzida por PC1. Vale destacar que a superexpressão de PC1 foi capaz de induzir tubulogênese espontânea e resistência à apoptose em células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), sugerindo que sua expressão seja fundamental para controlar a proliferação celular no rim embrionário ao impedir que tais células evoluam para apoptose e possam cursar com diferenciação terminal e consequente formação tubular (40,41).

A via mTOR (alvo mamífero da rapamicina) também é ativada inadequadamente no rim da DRPAD. Nesta doença, a interação de PC1 com tuberina, o produto do gene *TSC2* (*tuberous sclerosis complex 2*), é comprometida, impedindo a inibição de Rheb (homólogo de Ras enriquecido no cérebro) e promovendo a ativação de mTOR (42,43). Interessantemente, o tratamento de um camundongo cístico ortólogo à DRPAD1 com rapamicina, um inibidor de mTOR, determinou melhora da função renal e do fenótipo cístico (44).

Estudos recentes mostraram que ativação terapêutica de AMPK (proteína quinase ativada por AMP) atenuou a severidade da doença cística em modelos animais ortólogos à DRPAD1 por meio da melhora da biogênese mitocondrial e da redução de inflamação

tecidual (45). Nesses modelos, a ativação de AMPK: reduziu inflamação e fibrose renal. Vale notar, também, que depleção renal de macrófagos também atenuou a severidade da doença cística experimental (46). É interessante observar que o complexo PC1–PC2 pode se localizar em membranas do RE associado à mitocôndria assim modula a tomada de Ca^{2+} e a fosforilação oxidativa (47).

É bem estabelecido que estresse oxidativo (EO) contribui para a progressão da doença renal na DRPAD (48). O fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2, codificado pelo gene *Nfe2l2*) constitui-se em um fator de transcrição regulador da resposta de defesa contra o EO. Normalmente, Nrf2 se liga a um dos 3 complexos ubiquitina ligases, principalmente *keap1-cullin 3-Ring box 1*, sendo dirigido para rápida degradação ubiquitina-proteassoma (49). O EO, contudo, induz alterações conformacionais na molécula Keap1 (proteína 1 associada a ECH semelhante a kelch), liberando Nrf2 para translocar para o núcleo. No núcleo, Nrf2 se liga ao elemento de resposta antioxidante, induzindo transcrição de vários genes e redução do EO. Nesse contexto, a deleção de *Nfe2l2* em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e promoveu crescimento cístico (50). Em contraste, a indução de Nrf2 reduziu a produção de EROs e a cistogênese (50).

Vários microRNAs encontram-se anormalmente expressos na DRPAD. O cluster microRNA-17~92 é amplamente superexpresso na DRPAD humana e em modelos ortólogos (51). Interessantemente, sua deleção atenua a progressão da doença em modelos animais ortólogos à DRPAD (51). Na mesma linha, camundongos císticos ortólogos à DRPAD1 tratados com anti-microRNA-17 apresentaram redução do crescimento cístico (51). É importante destacar que microRNA-17 controla a expressão de genes regulatórios de vias proliferativas e que é aparentemente capaz de se ligar e reprimir os transcritos de *PKD1*, *PKD2* e *HNF1B* (*Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta*) (52). Vale notar que o oligonucleotídeo anti-microRNA-17 RGLS4326, que tem o rim como alvo preferencial, inibiu o crescimento cístico em vários modelos de camundongos de DRP (53).

1.3. Mecanismos envolvidos na cistogênese da DRPAD

A formação dos cistos renais ocorre a partir de dilatações focais em diferentes segmentos do néfron na DRPAD, principalmente nos ductos e túbulos coletores. Ao atingir um determinado tamanho, tais expansões se desprendem do segmento tubular de origem, individualizando-se como estruturas císticas. Os cistos renais possuem uma monocamada de células epiteliais de revestimento, pouco diferenciadas e associadas a altas taxas de proliferação e apoptose (54). Vale notar que o aumento da taxa de proliferação celular, anormalidades da matriz extracelular, alterações de polaridade e conversão de um fenótipo reabsortivo em secretor são elementos chave no processo de crescimento cístico. A distorção progressiva do parênquima renal decorrente do crescimento cístico, por sua vez, determina compressão de néfrons adjacentes, promovendo atrofia tubular e perda de outras unidades funcionais. Tal alteração, associada a inflamação e fibrose renal progressiva, contribui para a deterioração gradual da função renal (54).

Estudos seminais revelaram que os cistos são monoclonais na DRPAD (55). O mecanismo molecular fundamental envolvido na cistogênese segue um modelo knudsoniano, compreendendo dois eventos. De acordo com este modelo, aplicável à maior parte ou talvez a todos os cistos, todas as células tubulares renais de um paciente com a doença apresentam um dos alelos de *PKD1* ou *PKD2* com a mutação germinativa, representando o primeiro evento. A formação do cisto renal, contudo, ocorre apenas quando o alelo previamente normal é atingido por uma mutação somática, que consiste no segundo evento. Nesse cenário, embora a DRPAD apresente herança autossômica dominante, nos níveis molecular e celular o mecanismo de cistogênese é recessivo, necessitando da inativação ou intensa redução da atividade de ambos os alelos (55). Um estudo posterior demonstrou que tal modelo também era aplicável aos cistos hepáticos (56).

Estudos adicionais ampliaram este modelo nos anos mais recentes. Interessantemente, verificou-se que quando ambas as cópias de *Pkd1* eram inativadas durante o desenvolvimento renal em camundongos, ocorria cistogênese ampla e rápida. Ao contrário, quando tal inativação ocorria após esse período, uma formação relevante

de cistos renais era observada apenas após vários meses (57). Em seguimento a tais achados, Takakura e cols induziram insulto renal unilateral por isquemia/reperfusão (I/R) em camundongos submetidos à inativação de ambas as cópias de *Pkd1* na idade de 5 semanas, portanto após o término do desenvolvimento renal. Notavelmente, o rim submetido ao insulto cursou com formação rápida e ampla de cistos, enquanto o órgão contralateral permaneceu não cístico. Em conjunto, esses resultados mostraram que, enquanto a inativação de ambas as cópias de *Pkd1* durante o desenvolvimento renal é suficiente para promover cystogênese intensa, no rim maduro a formação ampla e rápida de cistos requer um terceiro evento. Esses dados revelaram, ainda, que insulto I/R, e provavelmente outras formas de lesão renal, podem se comportar como tal evento (58). É importante mencionar que um estudo conduzido por nosso grupo confirmou o papel do insulto I/R como evento adicional para cystogênese renal também em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (59). Nesse contexto, admite-se que tal resposta dependa da reativação de programas de desenvolvimento renal e/ou aumento da taxa de proliferação celular, processos deflagrados pela lesão renal. É provável, portanto, que lesões renais se constituam em fator de risco para aceleração da DRPAD.

Com base nas observações elencadas acima, Gallagher e cols propuseram o modelo de limiar como uma versão mais completa para o mecanismo de formação focal de cistos na DRPAD (60). Segundo este modelo, a formação e a manutenção da estrutura dos túbulos renais requerem um nível crítico de atividade funcional de *PKD1* e *PKD2*. Quando o nível de atividade combinada de ambos os alelos *PKD1* ou *PKD2* cai abaixo deste nível crítico em uma dada célula, ocorre a formação do cisto. Este limiar funcional, contudo, depende de vários fatores, incluindo a fase de desenvolvimento renal, demandas funcionais como em resposta a lesão renal, variantes genéticas de *loci* modificadores e fatores ambientais. Outros autores propõem que a dose de PC1 funcional basal se associe à severidade da DRPAD num processo de cystogênese que pode independe da mutação somática (61). Este modelo se baseia nas observações de que camundongos homocigotos para alelos *Pkd1* ou *Pkd2* hipomórficos desenvolvem doença cística progressiva e de que, em famílias com DRPAD atípicas, homocigotos ou heterocigotos compostos para alelos *PKD1* ou *PKD2* incompletamente penetrantes, apresentam doença típica a severa (61). Mais recentemente, com base na observação de que a dosagem funcional celular das policistinas correlaciona-se inversamente com a severidade da doença, outros

investigadores propuseram que a variabilidade de expressão celular estocástica do alelo DRPAD residual e outros fatores, como lesão renal, possam deflagrar a formação do cisto (62). Entretanto, apesar desta proposta alternativa de cistogênese, dois estudos recentes apoiaram fortemente o mecanismo celular recessivo de dois eventos como base genética para a formação dos cistos. O primeiro identificou mutações somáticas em *PKD1* ou *PKD2* em cistos de todos os pacientes com DRPAD avaliados e em 90% dos cistos analisados por sequenciamento de exoma completo e técnicas de *long-range* PCR (reação em cadeia da polimerase) (63). No mesmo sentido, o segundo estudo também detectou alterações somáticas em *PKD1* ou *PKD2* em cistos de todos os pacientes estudados e em 93% dos 90 cistos analisados por sequenciamento de genoma completo (64).

1.4. Manifestações clínicas da DRPAD

O fenótipo renal da DRPAD caracteriza-se pelo desenvolvimento bilateral de cistos renais múltiplos, aumento progressivo do volume renal, distorção estrutural deste órgão e, após décadas de função renal acima de 90 mL/min/1,73m², declínio relativamente rápido da TFG (65–67).

As manifestações clínicas da DRPAD incluem também prejuízo precoce de concentração urinária, além de complicações eventuais como dor lombar ou abdominal, nefrolitíase, hematúria ou sangramento intracístico, e infecção do trato urinário (17,68). Embora as manifestações renais predominem, essa doença é sistêmica, traduzindo-se também em manifestações extrarrenais (17,68). Tais manifestações são representadas pelo desenvolvimento potencial de cistos hepáticos, pancreáticos, esplênicos, seminiais, aracnoides e meníngeo-espiniais, além de anormalidades cardiovasculares que incluem aneurismas intracranianos, alterações valvares cardíacas e cardiomiopatia de diferentes naturezas (3,69).

O desenvolvimento de hipertensão arterial (HA) se destaca entre as manifestações da DRPAD. Esta manifestação acomete cerca de 60% dos pacientes com DRPAD antes de uma perda significativa da função renal e ocorre 15 anos mais cedo que em pacientes

hipertensos essenciais, responsabilizando-se por uma morbidade e mortalidade expressivas entre tais pacientes (70).

1.5. Manifestações cardíacas associadas à DRPAD

As manifestações cardiovasculares são particularmente importantes na DRPAD, uma vez que complicações dessa natureza respondem pela maior parte dos óbitos em tais pacientes (71). Atenção especial deve ser dirigida aos aneurismas intracranianos, visto que cerca de 9-12% dos indivíduos afetados pela doença desenvolvem esta anormalidade, e que sua ruptura constitui-se na complicação potencialmente mais grave desta doença (72).

Anormalidades valvares cardíacas são relatadas como frequentes na DRPAD, com prolapso de valva mitral sido reportado em quase um terço dos pacientes adultos e aproximadamente 12% das crianças com a doença (71,73). Um estudo mais recente, contudo, encontrou uma incidência significativamente menor dessas lesões em pacientes com DRPAD (74). Outros fenótipos cardíacos frequentes incluem o desenvolvimento de derrame pericárdico e aumento do índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) (75). Associação entre DRPAD e cardiomiopatia dilatada idiopática foi recentemente reconhecida, além de coexistência com cardiomiopatia obstrutiva hipertrófica (75,76).

HA manifesta-se em mais da metade dos pacientes com DRPAD antes de uma perda significativa de função renal e em todos os pacientes que atingem DRT (70,77). Vale notar que pacientes normotensos com DRPAD apresentam IMVE maior que indivíduos controle sem a doença (78). O mesmo ocorre com pacientes com DRPAD hipertensos e com função renal normal, que desenvolvem maior IMVE que hipertensos essenciais (79,80).

1.6. Patogênese das manifestações cardíacas associadas à DRPAD

A relevância do fenótipo cardíaco na DRPAD não surpreende, na medida em que PC1 se expressa nos tratos de saída cardíacos, no endotélio, nos folhetos valvares e no próprio miocárdio (81,82), e camundongos com *knockout* (KO) completo para *Pkd1* se acompanham de letalidade embrionária devido a anormalidades de desenvolvimento cardíaco (83). De fato, mostrou-se que PC1 funciona como um mecanossensor em cardiomiócitos, sendo necessária para hipertrofia induzida por estiramento e por sobrecarga de pressão (84). A sinalização por Ca^{2+} está reconhecidamente alterada em corações hipertróficos e insuficientes (85,86). Interessantemente, PC1 estabiliza a proteína α_{1C} , uma subunidade do canal para Ca^{2+} tipo L envolvido no influxo de Ca^{2+} para o cardiomiócito. Enquanto PC1 contribui para a função normal de contração e desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, corações KO para *Pkd1* apresentam níveis diminuídos da proteína α_{1C} , fato que pode estar relacionado com disfunção sistólica (84). Tais observações apoiam a deficiência de *Pkd1* como causa primária do fenótipo cardíaco disfuncional associado à DRPAD (84). Mais recentemente se demonstrou que PC1 é capaz de interagir fisicamente com canais de potássio (K^+) dependentes de voltagem, regulando a atividade elétrica, o processamento de Ca^{2+} e a contratilidade cardíacos (87).

A dependência da atividade de *Pkd1* também se aplica a *Pkd2*, uma vez que a falta de PC2 no peixe paulistinha acompanha-se de sinais de falência cardíaca e, conforme previamente mencionado, pacientes com DRPAD2 são particularmente propensos ao desenvolvimento de miocardiopatia dilatada idiopática (88). Este estudo mostrou que PC2 regula a ciclagem de Ca^{2+} intracelular, fundamental para a atividade funcional cardíaca. Um estudo subsequente revelou, ainda, que camundongos haploinsuficientes para *Pkd2* apresentam desacoplamento exclusivo da interação Ca^{2+} -contração em cardiomiócito e contratilidade aumentada em resposta a estímulo adrenérgico (89).

Um estudo recente de nosso grupo confirmou que deficiência de *Pkd1* pode levar a disfunção cardíaca primária e sugeriu que a elevação da pressão arterial (PA) piore tal anormalidade (90). Este fenótipo acompanha-se de deformabilidade miocárdica (*strain*) anormal. Interessantemente, KO para *Lgals3* (*Galectin 3*), o gene que codifica galectina-3, resgatou o fenótipo cardíaco em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* e em

camundongos císticos deficientes em *Pkd1*. Esta melhora funcional associou-se à diminuição de apoptose cardíaca. É importante mencionar que KO para *Lgals3* também resgatou os fenótipos funcional e apoptótico cardíacos em camundongos *Pkd1^{V/V}*, um modelo cístico renal severo, e ampliou a sobrevivência de tais animais (90).

Em linha com os resultados obtidos por nosso grupo, Kuo e cols observaram que as paredes do ventrículo esquerdo de camundongos *Pkd2^{+/-}* de nove meses de idade eram mais finas, um achado consistente com cardiomiopatia dilatada (89). Vale destacar, também, que tais animais apresentavam fração de ejeção do ventrículo esquerdo diminuída. Esse mesmo grupo mostrou, por fim, que estresse cardíaco baseado em um estímulo β -adrenérgico prolongado induziu super-regulação do eixo de sinalização PC2-cromogranina B-BNP (91). Tais resultados revelaram, portanto, que essa via modula a produção de peptídeos natriuréticos.

1.7. Patogênese da hipertensão arterial na DRPAD, análises de função vascular e fenótipo vascular associado à doença

1.7.1. Hipertensão arterial na DRPAD

A prevalência global de HA em adultos com 30-79 anos de idade foi de 32% em mulheres e 34% em homens no ano de 2019 (92). Vale destacar que, apenas no ano de 2019, estima-se que a HA tenha resultado em 10,8 milhões de mortes, o que corresponde a aproximadamente 19% de todas as mortes (93). As expressivas mortalidade e morbidade associadas à HA decorrem do fato de ser o principal fator de maior risco para doenças cardiovasculares, assim como um fator de risco muito importante para DRT (94).

Em linha com a tendência de pacientes com DRPAD desenvolverem HA mais precocemente que pessoas com hipertensão essencial (70,77,95), um número significativo de crianças diagnosticadas precocemente apresenta elevação da PA (96). Admite-se que essa realidade decorra da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), da deficiência na síntese de óxido nítrico (NO) e do remodelamento vascular. Vários estudos sugerem

que a compressão de vasos renais secundária à expansão dos cistos induza áreas setoriais de hipoperfusão renal, determinando ativação do SRA (70,97). É interessante observar que estudos fundamentais demonstraram que a ativação do SRA intrarrenal desempenha um papel central no desenvolvimento e manutenção da HA associada à DRPAD (69,95,97). Vale observar que a angiotensina II (AngII) atua sobre o crescimento dos cistos e sobre a fibrose renal associada à DRPAD, podendo, portanto, também agir, de forma indireta, sobre a gênese da HA nesta doença. Nessa linha conceitual, um estudo recente de nosso grupo revelou que camundongos císticos deficientes em *Pkd1* (*Pkd1*^{flox/flox};*Nestin*^{cre}) desenvolveram HA, enquanto animais haploinsuficientes para este gene (*Pkd1*^{+/-}) não apresentaram modificações nos valores de PA (98). Outros prováveis contribuintes para a HA associada à DRPAD incluem a redução da atividade da NOS renal, atividade simpática aumentada e aumento dos níveis de endotelina (98–100).

A contribuição de anormalidades vasculares primárias para o desenvolvimento e/ou manutenção da HA associada à DRPAD, contudo, assim como sua caracterização e compreensão, permanecem amplamente incertas. Para o adequado entendimento do que se conhece sobre este tópico e do estudo atual, na seção seguinte apresentaremos conceitos fundamentais sobre função vascular mecânica e respectivas análises.

1.7.2. Análises de funcional mecânica vascular

A PA sistêmica é determinada pelo débito cardíaco, resistência vascular periférica e pressão crítica de fechamento no nível dos capilares. Estas condições, por sua vez, são moduladas pela demanda tecidual por nutrientes, volemia, viscosidade do sangue, elasticidade da parede dos vasos, e mecanismos neurais, hormonais e autócrinos/parácrinos (101). A regulação da PA é diretamente afetada pela contração e rigidez da musculatura lisa vascular, fenótipo que inclui o arranjo do citoesqueleto. Outras vias indiretas, como sinalização de inflamação e metabolismo de oxidação-redução (REDOX), também desempenham um papel importante (102–104). O SRA desencadeia e modula várias dessas vias, de modo que inibidores deste sistema constituem reguladores eficientes da PA e da contração vascular, constituindo uma classe importante de drogas

anti-hipertensivas (105). Outros anti-hipertensivos incluem agentes de ação direta em células dos vasos sanguíneos, capazes de alterar a reatividade vascular e regular o tônus vascular (102). O entendimento de suas ações requer, portanto, a compreensão da composição e função dos vasos sanguíneos.

Os vasos sanguíneos são constituídos por três camadas celulares distintas, com variações de espessura e composição determinadas no início de seu desenvolvimento em função do papel fisiológico a ser exercido (106). As três camadas celulares compreendem: a) adventícia, mais externa e quase inteiramente formada por fibroblastos e fibras colágenas; b) média, composta por CMLV e fibras de elastina; e c) íntima, mais interna e geralmente a mais fina, formada por uma monocamada de células endoteliais (CE) dispostas em uma lâmina basal (106). Recentemente, com base em estudos estruturais e funcionais, vários autores passaram a sugerir o tecido adiposo perivascular (PVAT; do inglês *perivascular adipose tissue*) como uma quarta camada (107). Esta camada é constituída por adipócitos e pré-adipócitos, além de pericitos, macrófagos, células T, células B, fibroblastos e miofibroblastos, e células-tronco mesenquimais. A comunicação das células e fibras presentes nos vasos sanguíneos permite o controle do tônus vascular, determinado pelo estado contrátil das CMLVs por meio de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina sob ação dos íons Ca^{2+} (108). A elevação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} propicia a formação do complexo CaM, o qual ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta enzima fosforila as cadeias leves nas cabeças da miosina (MLC), aumentando a atividade da miosina-ATPase e proporcionando, assim, o deslizamento sobre a actina e conseqüente contração muscular (Figura 2) (108,109). Em contrapartida, a tensão muscular é reduzida na medida em que a fosfatase da MLC (MLCP) remove o fosfato desta, em resposta à diminuição da concentração citoplasmática de Ca^{2+} ou a segundos mensageiros, como RHOA/ROCK (membro A da família homóloga a Ras/quinase associada a Rho) (Figura 3, 4 e 5) (105,108).

A contratilidade vascular é geralmente analisada observando os efeitos de noradrenalina (NOR) e/ou fenilefrina (FEN), catecolaminas que se ligam a receptores α -adrenérgicos, sobre artérias isoladas. Estes receptores, presentes na membrana plasmática (MP) das CMLVs, estão acoplados a proteína G_q e ativam a fosfolipase C (PLC) (109–111). PLC cliva fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), os quais atuam como segundos mensageiros em vias subseqüentes.

IP_3 se liga a seu receptor (IP_3R) no RE, acarretando a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma (102,110,111), enquanto DAG ativa proteína quinase C (PKC) que, por meio de MEK/ERK, aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao íon Ca^{2+} (102,110). A elevação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} , por sua vez, estimula duas alças de retroalimentação positiva. Numa delas, a despolarização da membrana ocasionada pelo aumento intracelular de cátions promove a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, elevando acentuadamente sua concentração citoplasmática. A outra ocorre pela ativação do receptor de rianodina (RyR), um canal de Ca^{2+} sensível a Ca^{2+} presente no RE, que libera este íon para o citoplasma (Figura 2) (102,112).

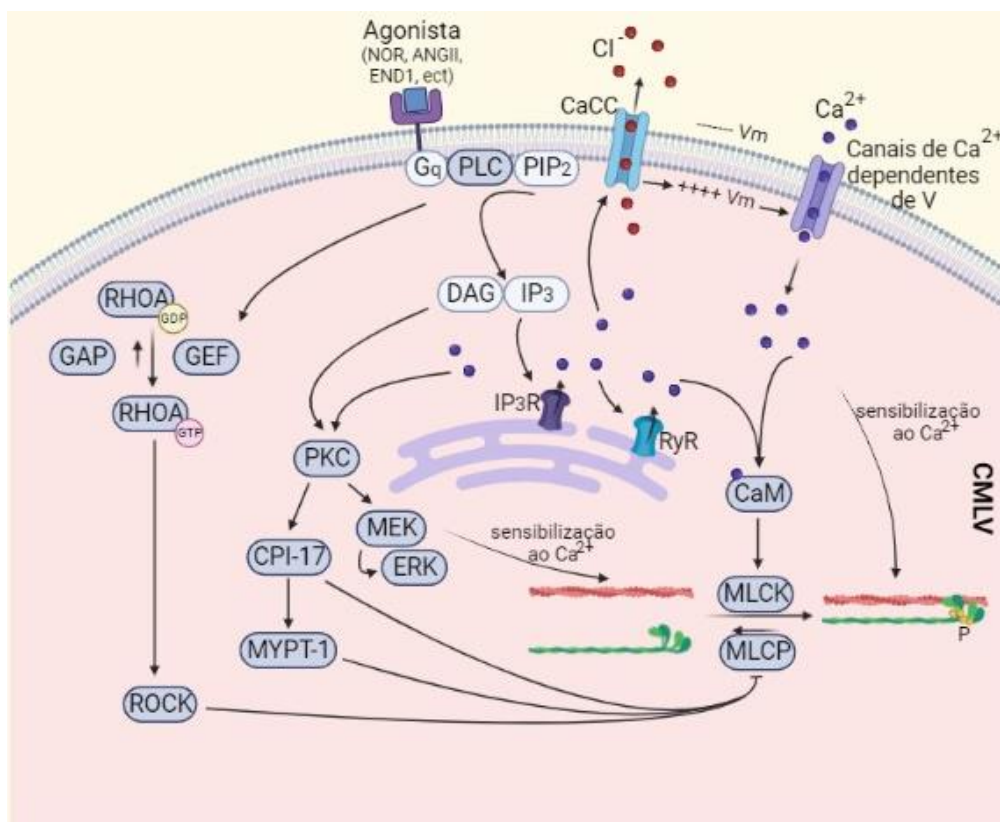


Figura 2. Mecanismos de contração da célula do músculo liso vascular (CMLV). Adaptado de Webb, Amberg e Navedo, e Loirand e Pecaud (105,108,112); criado através do site BioRender.com. ANGII, angiotensina II; Ca^{2+} , íon cálcio; CaCC, canal de cloreto dependente de cálcio; CaM, complexo cálcio-calmodulina; CPI-17, inibidor de proteína fosfatase-1 potencializado por C-quinase de 17 kDa; Cl^- , íon cloreto; DAG, diacilglicerol; END1, endotelina 1; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; GAP, junção GAP; GDP, difosfato de guanosina; GEF, fator de troca de nucleotídeo guanina; G_q , proteína G da classe q; GTP, trifosfato de guanosina; IP_3 , inositol 1,2,4 trisfosfato; IP_3R , receptor de inositol 1,2,4 trisfosfato; MEK, proteína quinase da quinase ativada por mitogene; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; MYPT-1, subunidade 1 de direcionamento da fosfatase de miosina; NOR, noradrenalina; P, fósforo; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; RHOA, membro A da família homóloga a Ras; ROCK, quinase associada a Rho; RyR, receptor de rianodina; V, voltagem; V_m , voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com.

A FEN é um agente seletivo para receptores α 1-adrenérgicos capaz de manter a contração constante, enquanto a NOR age nos receptores α 1 e α 2 e, quando em altas concentrações, também ativa os receptores β -adrenérgicos (113). Os receptores β -adrenérgicos estão acoplados à proteína G_s nas CMLVs, ativando a via de sinalização da AC. Dessa forma, determinam a quebra de adenosina trifosfato (ATP) em AMPc, ativando a proteína quinase A (PKA) (114,115). Tal ativação diminui a afinidade das proteínas contráteis aos íons Ca^{2+} , promove a captação destes íons para o RE em CMLVs por meio da interação com SERCA e estimula a produção de NO em CEs (115).

A avaliação da função endotelial *ex vivo* é geralmente realizada em sistemas de banho de órgãos e registros miográficos, por meio de curvas dose-resposta frente a agonistas e antagonistas; essas curvas permitem estudar respostas fisiológicas e farmacológicas de CEs, CMLVs e outros tecidos e órgãos. Esse método permite a análise do relaxamento dependente e independente do endotélio em anéis arteriais em resposta a agonistas conhecidos, como acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS), respectivamente (116–118). Esse procedimento propicia, portanto, a avaliação funcional do endotélio.

A ACh promove a síntese de três agentes relaxantes principais no endotélio vascular, os quais exercem sua ação nas CMLVs: o NO, a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE). A resposta efetora de cada agente varia de intensidade de acordo com a função e tamanho da artéria. NO desempenha o papel mais efetivo no relaxamento vascular em artérias de grande calibre/condutância, enquanto em artérias de resistência (AR) esse papel tende a ser executado pelo FHDE; embora NO também exerça uma ação relaxadora significativa nestes vasos (119). Para isso, ACh interage com o receptor muscarínico M3 (M3R) no endotélio, que está predominantemente acoplado à proteína G_q ; esta proteína está ligada à PLC, resultando na formação de IP_3 e DAG. Estas moléculas atuam como segundos mensageiros para mobilizar os estoques intracelulares de Ca^{2+} (120,121). M3R também ativa o canal de Ca^{+2} TRPV4 (canal catiônico potencial receptor transitório subfamília V membro 4), promovendo corrente de potássio retificadora retardada. TRPV4, por sua vez, também é capaz de induzir produção intracelular de ACh em CEs para ação autócrina (Figura 3) (122,123).

O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} favorece a formação do complexo CaM no endotélio, que, por sua vez, estimula a ação de óxido nítrico sintase (NOS) e proporciona a ativação de outros canais de Ca^{2+} em retroalimentação positiva, como STIM/ORAI (molécula 1 de interação estromal/canal de Ca^{2+} ativado pela liberação de Ca^{2+}) (124,125). Além disso, ACh promove ativação de eNOS por meio da fosforilação do resíduo Tyr^{81} mediada por Src (tirosina quinase) e/ou desfosforilação do resíduo Tre^{495} via PP1 (subunidade catalítica da proteína fosfatase-1), de modo a permitir a ligação de CaM a eNOS (124,126). NO, por sua vez, tem a capacidade de se dissipar pelas membranas plasmáticas e chegar até o citosol da CMLV, onde ativa guanilato ciclase solúvel para a produção do segundo mensageiro, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (127). Este inibe a liberação de Ca^{2+} para o citosol via canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem e IP_3R , ou promovendo recaptação de Ca^{2+} pelo RE por meio de SERCA. A depleção de Ca^{2+} aumenta a atividade da MLCP, promovendo relaxamento vascular (126,128). Além disso, os canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} são ativados diretamente por NO e os canais de K^+ dependentes de ATP por GMPc, levando a um efluxo de K^+ e hiperpolarização da célula. Como resultado, ocorre fechamento de canais de Ca^{2+} , promovendo relaxamento vascular (Figura 3) (129,130).

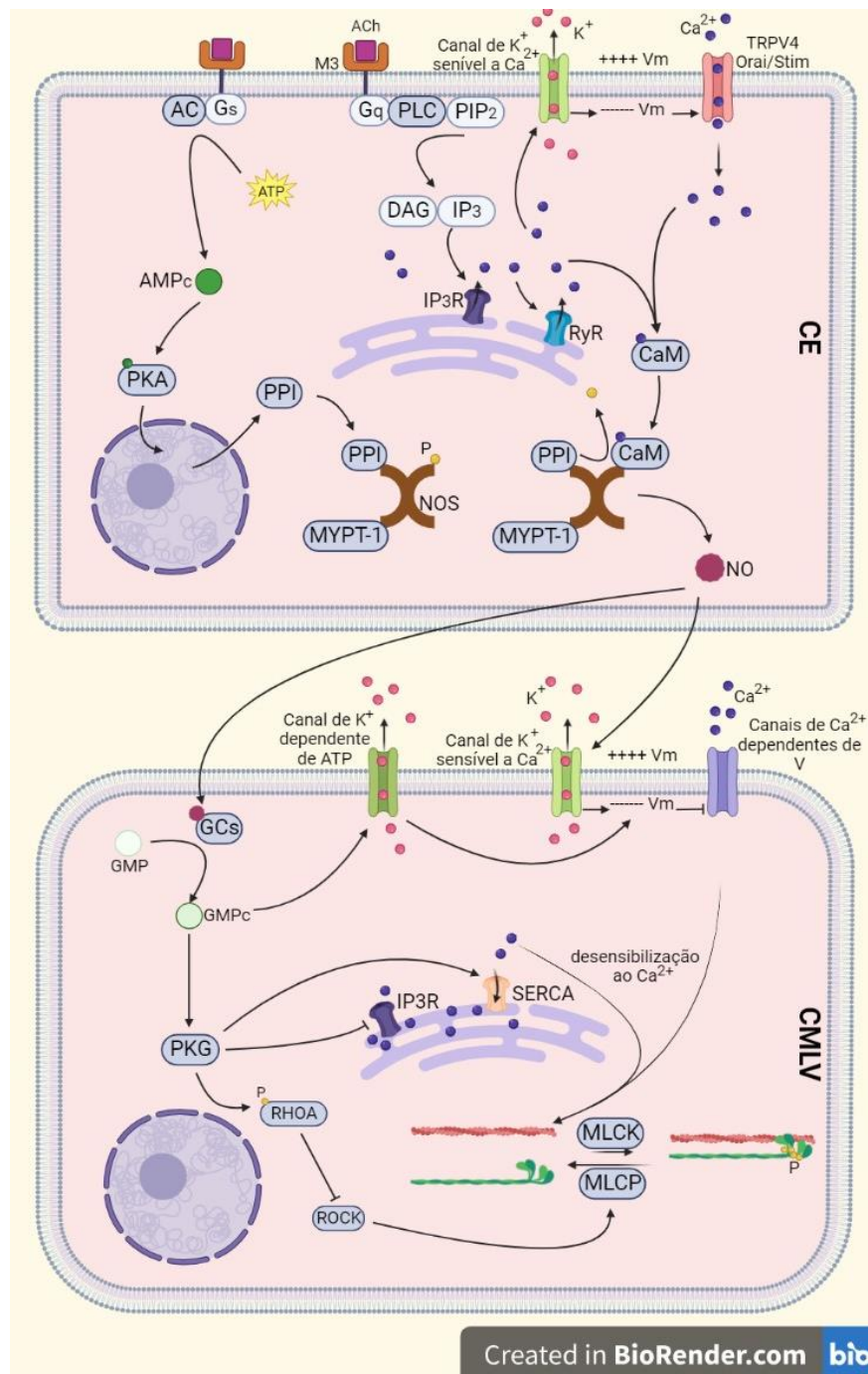


Figura 3. Ação da acetilcolina (ACh) na produção do vasodilatador óxido nítrico (NO) na célula endotelial vascular, e seu mecanismo de relaxamento do músculo vascular. Feito com o auxílio das imagens de Zhao e cols, Vanhoutte e cols, Saternos e cols, e baseado na literatura descrita (120,125,126,128,130–132). Criado na plataforma BioRender.com. AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; Ca^{2+} , íon cálcio; CaM, complexo cálcio-calmodulina; CE, célula endotelial; CMLV, célula muscular lisa vascular; DAG, diacilglicerol; GCs, guanilato ciclase solúvel; GMP, monofosfato de guanosina; GMPc, monofosfato cíclico de guanosina; Gq, proteína G da classe q; Gs, proteína G da classe s; IP₃, inositol 1,2,4 trisfosfato; IP₃R, receptor de inositol 1,2,4 trisfosfato; K^+ , íon potássio; M3, receptor muscarínico 3; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; MYPT-1, subunidade 1 de direcionamento da fosfatase de miosina; NOS, óxido nítrico sintase; Orai, canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio; P, fósforo; PPI, subunidade catalítica da proteína fosfatase-1; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKA, proteína quinase A; PKG, proteína quinase G; RHOA, membro A da família homóloga a Ras; ROCK, quinase associada a Rho; RyR, receptor de rianodina; SERCA, adenosinatrifosfatase transportador de Ca^{2+} sarcoplasmática/RE; Stim, molécula 1 de interação estromal; TRPV4, canal catiônico membro 4 potencial receptor transitório da subfamília V; Vm, voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com.

PGI₂ promove relaxamento vascular e inibe a agregação plaquetária. Esta molécula é sintetizada de forma independente de Ca²⁺ a partir do ácido araquidônico livre, liberado dos fosfolipídios presentes na membrana celular por ação de fosfolipases (PLA₂). O ácido araquidônico é, então, convertido em prostaglandina endoperóxido (PGH₂) pelas ciclooxigenases (COX1/2). PGH₂, por sua vez, é metabolizada em PGI₂ pela ação da enzima prostaciclina sintase (PGIS; Figura 4) (133,134). PGI₂ é o ligante preferido dos receptores IP, e seus efeitos costumam envolver a ativação da AC. Tal ativação resulta em um aumento do AMPc intracelular, segundo mensageiro potente que desencadeia ação similar ao GMPc descrita acima (134). O AMPc, por sua vez, ativa uma cascata de sinalização que resulta na abertura de canais de K⁺ dependentes de ATP, levando a um efluxo de K⁺ e hiperpolarização celular. Este efeito leva a uma diminuição da entrada de Ca²⁺ nas CMLVs, promovendo vasodilatação (129,134,135). Este segundo mensageiro também ativa a PKA, que participa do relaxamento vascular ao inibir MLCK e ativar MLCP (136,137) (Figura 4).

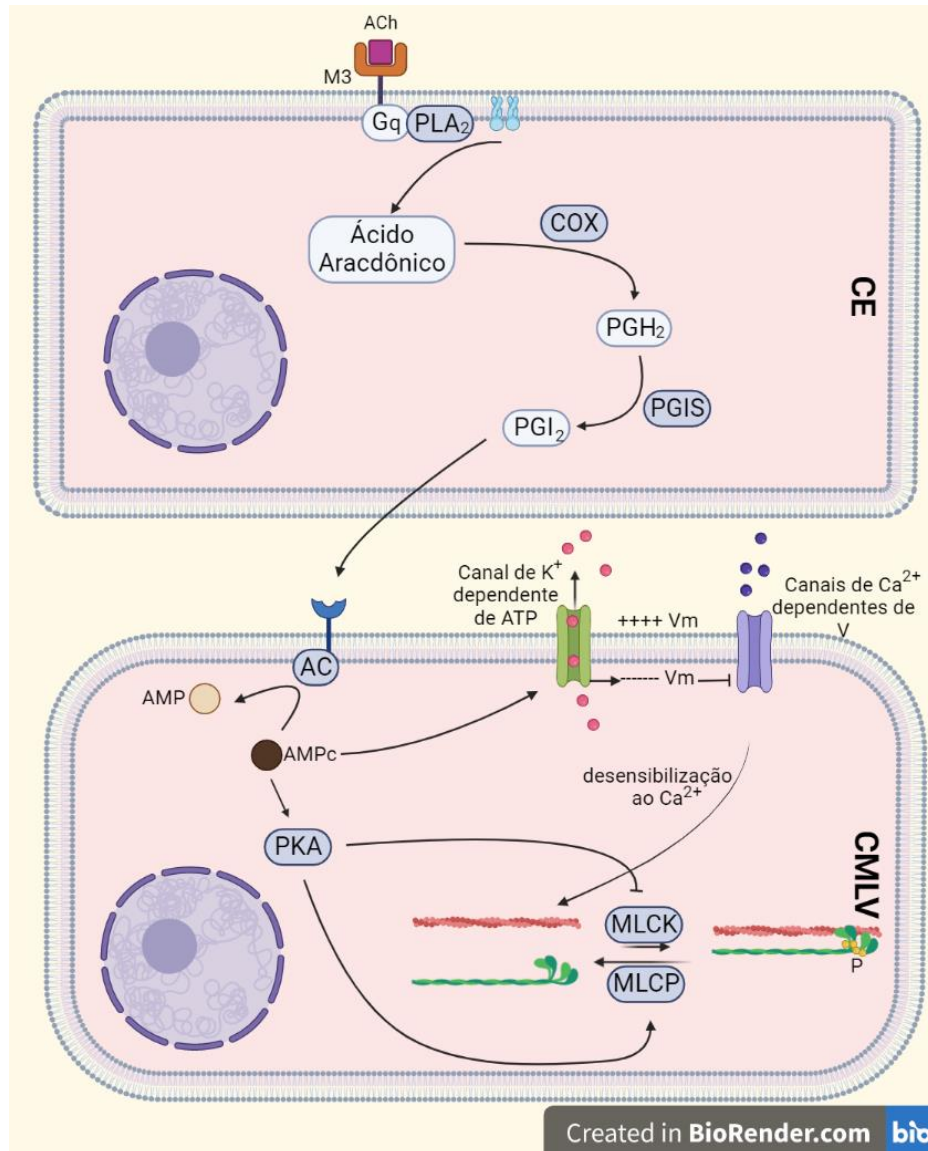


Figura 4. Produção de prostaciclina (PGI_2) no endotélio vascular a partir de fosfolípidos da membrana plasmática, e sua ação vasodilatadora nas células musculares. Feita a partir das descrições na literatura (129,133–137). Criado na plataforma BioRender.com. AC, adenilato ciclase; ACh, acetilcolina; AMP, monofosfato de adenosina; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; Ca^{2+} , íon cálcio; CE, célula endotelial; CMLV, célula muscular lisa vascular; COX, ciclo-oxigenase; Gq, proteína G da classe q; K^+ , íon potássio; M3, receptor muscarínico 3; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; P, fósforo; PGH_2 , prostaglandina endoperóxido; PGIS, prostaciclina sintase; PKA, proteína quinase A; PLA_2 , fosfolipase A2; V, voltagem; Vm, voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com.

O terceiro componente vasodilatador é o FHDE, embora ainda não se conheça ao certo sua natureza molecular. Sabe-se que o NO tem capacidade de ser um FHDE, visto que interage com canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} , acarretando a hiperpolarização da CMLV e, com isso, o fechamento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem que permitem a entrada deste íon para o citosol (129,130,138). Estudos indicam que FHDE também estimula a ação da Na^+/K^+ ATPase e de canais de K^+ para efluxo catiônico,

hiperpolarizando a MP de CMLVs (Figura 5) (129,139–142). A hiperpolarização começa nas CEs e se transmite para as CMLVs por meio de duas vias distintas, química e elétrica, que variam de acordo com a classificação da artéria e o ramo em questão. Na via química, os íons K^+ e o H_2O_2 atuam como agentes efetores; enquanto na via elétrica, a comunicação é realizada por meio de junções comunicantes homocelulares e heterocelulares (conhecidas como junções mioendoteliais; MEJ) capazes de conduzir correntes hiperpolarizantes (Figura 5) (139–142). O papel das MEJs na sinalização bidirecional entre as CMLVs e as CEs também foi identificado. Durante a vasoconstrição, os sinais de Ca^{2+} podem passar das CMLVs para as CEs, ativando a retroalimentação negativa mediada por NO e FHDE e, portanto, estabelecendo um circuito de retroalimentação mioendotelial. Este circuito pode ser responsável pela liberação basal ou constitutiva de NO e FHDE. As MEJs estão presentes em projeções endoteliais e contêm aglomerados de proteínas de sinalização que regulam a hiperpolarização e a liberação de NO. Essas pontes de membrana permitem a sinalização bidirecional, permitindo a vasomoção sinusoidal, que consiste em ciclos coordenados de vasoconstrição/vasodilatação generalizada que otimizam o fluxo sanguíneo (140,141).

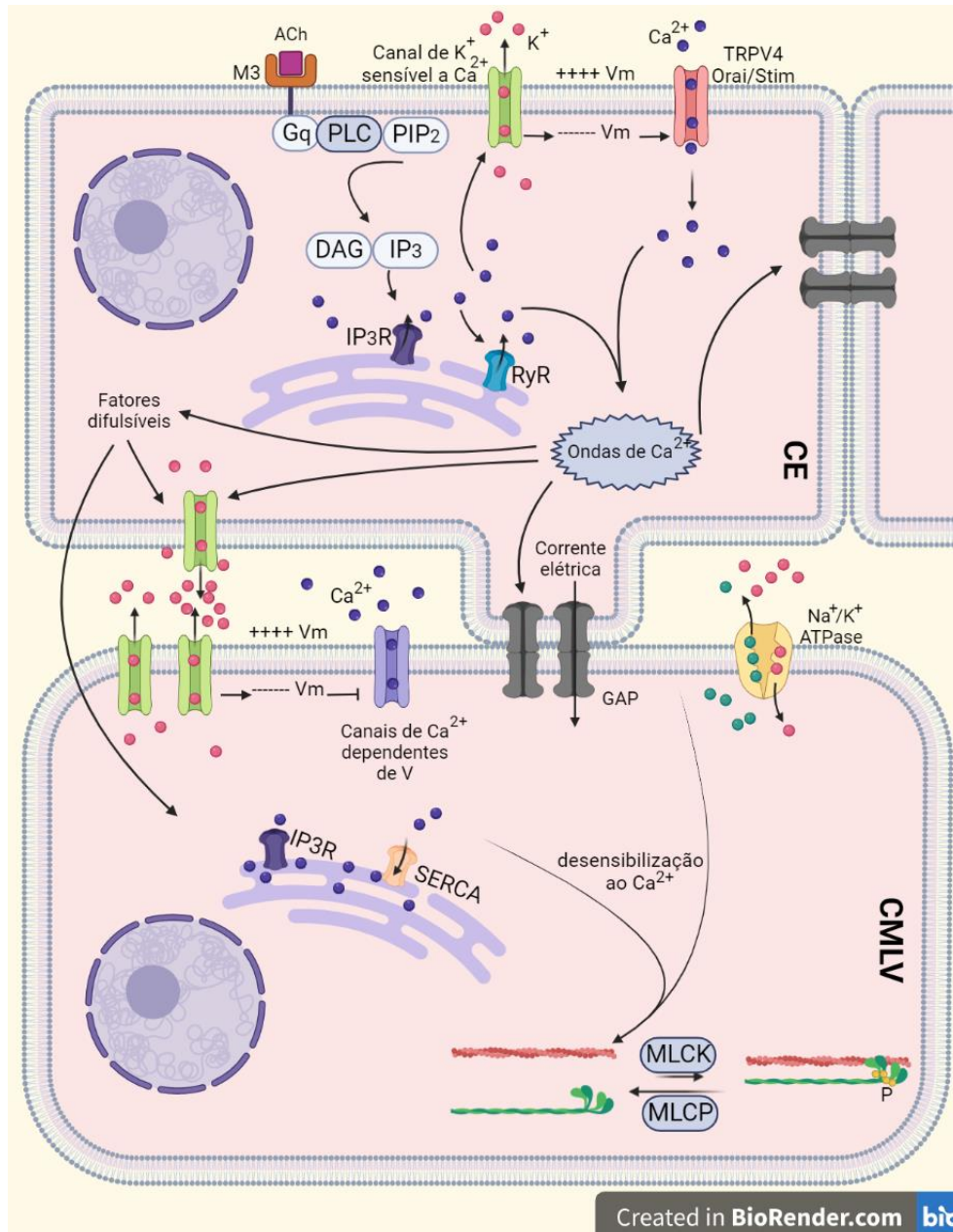


Figura 5. Produção e ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Baseado em Félétou, Kohler e Hoyer, e Goto e Kitazono (139,141,142). Criado na plataforma BioRender.com. ACh, acetilcolina; ATPase, adenosinatrifosfatase; Ca^{2+} , íon cálcio; CE, célula endotelial; CMLV, célula muscular lisa vascular; DAG, diacilglicerol; GAP, junção GAP; Gq, proteína G da classe q; IP_3 , inositol 1,2,4 trisfosfato; IP_3R , receptor de inositol 1,2,4 trisfosfato; K^+ , íon potássio; M3, receptor muscarínico 3; MLCK, quinase da cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; Na^+ , íon sódio; Orai, canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio; P, fósforo; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PLC, fosfolipase C; RyR, receptor de rianodina; SERCA, adenosinatrifosfatase transportador de Ca^{2+} sarcoplasmática/RE; Stim, molécula 1 de interação estromal; TRPV4, canal catiônico membro 4 potencial receptor transitório da subfamília V; V, voltagem; Vm, voltagem da membrana. Criado através do site BioRender.com.

Análise *ex vivo* da vasodilatação dependente de endotélio promovida por ACh permite a avaliação da integridade endotelial durante experimentos funcionais, enquanto a aplicação de NPS permite avaliar a capacidade de relaxamento do músculo vascular

sem depender da produção interna de agentes vasodilatadores pelas CEs. Isso porque o NPS é uma molécula carreadora de NO, conhecida como doadora de NO, que promove vasodilatação por disponibilizar NO para as CMLVs (116,117). Assim, a análise da reatividade vascular deve contemplar os relaxamentos dependente e independente do endotélio, uma vez que a avaliação do relaxamento obtido sob ação de ACh indica integridade ou disfunção endotelial, enquanto a avaliação do relaxamento obtido por NPS reflete capacidade adequada ou desarranjo do componente muscular vascular em responder a esses estímulos.

1.7.3. Fenótipo vascular funcional associado à DRPAD

Estudos iniciais revelaram que o relaxamento dependente do endotélio foi significativamente reduzido em ratos císticos Han:SPRD cy/+, um modelo de DRP não ortólogo à DRPAD humana (143). Além disso, esse relaxamento não foi atenuado na presença de L-arginina, co-fator da NOS. Vale notar que ratos *PCK* também cursam com redução do relaxamento dependente do endotélio, mesmo antes do desenvolvimento de anormalidades de PA ou distúrbio renal (144). É interessante relatar que pacientes com DRPAD apresentam disfunção endotelial com diminuição da atividade da sintase de óxido nítrico constitutiva (NOS_c) em AR subcutâneas, mesmo na ausência de HA e insuficiência renal crônica (145). Tal alteração, por sua vez, se intensifica na presença de HA. Estudos adicionais sugerem que a disfunção endotelial presente em pacientes com DRPAD, associada a baixos níveis de NO, possam estar associadas à formação de AngII, em virtude do EO local (69,145). Além disso, o prejuízo da capacidade de relaxamento do músculo cardíaco associado à DRPAD pode levar a uma diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumentando a produção de AngII. Este efeito também favorece a retenção renal de sódio e a elevação da resistência vascular periférica, elementos centrais no estabelecimento da HA (146). É interessante ressaltar, contudo, que o comprometimento da geração de NO não foi necessário para o desenvolvimento da HA em um modelo de camundongo cístico ortólogo à DRPAD1, embora pareça ter contribuído para a ampliação desse fenótipo (98).

A diminuição da síntese de NO, associada à deficiência de *Pkd1*, pode, portanto, atenuar o relaxamento vascular, um fenótipo também associado à deficiência de *Pkd2* (69). PC2 se expressa no cílio apical de CEs, sendo necessária para a sensibilidade vascular ao estresse de cisalhamento. O fato de CEs de camundongo *knockdown* ou KO para *Pkd1* ou *Pkd2* perderem a capacidade de gerar NO em resposta a este estímulo ampara esse conceito (147,148). Este processo ocorre por meio da ativação de vias bioquímicas envolvendo Ca^{2+} , CaM, AKT/PKG (serina/treonina quinase 1/proteína quinase G dependente de GMPc) e PKC (70,148,149). Nessa linha, CEs provenientes de pacientes com DRPAD não expressam PC2 no cílio primário e deixam de ser sensíveis ao fluxo. É importante mencionar que a PC2 ciliar responde ao estresse de cisalhamento, mas não ao estiramento mecânico (70,148). Tais achados sugerem que PC2 esteja envolvida na transmissão de sinal associado a estresse de cisalhamento, responsável pela produção intracelular de NO. Portanto, o comprometimento da expressão de PC2 de qualquer natureza pode potencialmente impedir a síntese de NO mediada pelo fluxo sanguíneo e levar à elevação da PA (70,148).

O endotélio vascular é de fundamental importância para o controle do tônus vascular. Além de produzir e liberar fatores vasodilatadores, representados por NO, PGI₂ e FHDE, o endotélio também produz e libera fatores vasoconstritores, como endotelina-1 (END1), prostanoídes vasoconstritores, AngII e EROs (103,104). Uma regulação fina da liberação destes fatores modula o tônus vascular às necessidades metabólicas dos órgãos e tecidos. Em situações de desequilíbrio dessa homeostase, entretanto, desenvolve-se a condição patológica de disfunção endotelial. Vale notar que ratos Han:SPRD císticos desenvolvem não apenas disfunção do sistema nitrérgico (NO), mas também suprarregulação de END1 (146). Um estudo posterior revelou disfunção da microcirculação cutânea em pacientes com DRPAD e reportou concentrações plasmáticas elevadas de lipoproteína A, fator potencialmente envolvido na disfunção endotelial e no aumento da incidência de complicações cardíacas (150).

Os demais estudos fundamentais voltados à caracterização e análise do fenótipo vascular funcional associado à DRPAD ou à disfunção vascular das policistinas encontram-se relatados na seção seguinte, integrados ao planejamento e construção do estudo atual.

1.8. Fundamentação do estudo atual

O modelo atualmente aceito para a patogênese da HA associada à DRPAD admite, portanto, um papel determinante da expansão cística. Paralelamente, propõe a participação de disfunções vasculares, primárias e secundárias, na definição quantitativa e na manutenção desse fenótipo. Nesse cenário, os papéis do crescimento cístico e da ativação do SRA foram cuidadosamente estudados nas últimas duas décadas. Os papéis e mecanismos associados às alterações vasculares, por sua vez, receberam menos atenção, o que se traduziu em análises menos sistematizadas e integradas a sistemas *in vivo*. É importante considerar, ainda, que disfunções ou alterações estruturais vasculares extrarrenais relacionadas à deficiência de atividade de *PKD1* ou *PKD2* podem se associar a complicações vasculares não diretamente relacionadas à HA, como as formações aneurismáticas. Nesse contexto, a elucidação de mecanismos envolvidos no fenótipo vascular da DRPAD constitui-se em tarefa de grande impacto científico e médico. De fato, a compreensão bem fundamentada de tais mecanismos traria contribuições essenciais ao entendimento da patogênese vascular e sistêmica desta enfermidade, enquanto ampliaria o desenvolvimento de intervenções terapêuticas potenciais sobre tais anormalidades.

Dois estudos iniciais avaliaram efeitos da inativação de *Pkd1* sobre aspectos específicos do fenótipo vascular. No primeiro, Morel e cols mostraram ausência de relaxamento anormal induzido por ACh em aorta abdominal de camundongos normotensos haploinsuficientes para *Pkd1* nas idades de 12 e 20 semanas (151). Com 30 semanas, entretanto, animais heterozigotos desenvolveram PA mais alta e relaxamento aórtico levemente atenuado em concentrações de ACh muito baixas, além de contração induzida por FEN aumentada. Vale notar que os sinais de Ca^{2+} basal e induzidos por KCl e FEN foram menores em aortas de camundongos haploinsuficientes, ao passo que a liberação de Ca^{2+} induzida por cafeína ou tapsigargina foi maior (151). No segundo estudo, a inativação uni ou bialélica seletiva de *Pkd1* em CMLVs ou a haploinsuficiência para de *Pkd1* não determinaram alterações estruturais significativas em aorta de camundongos (152). Nessa linha, as respostas ao KCl, ACh, FEN ou serotonina não diferiram em anéis de aorta na idade de 11 semanas, porém observou-se aumento na

contratilidade induzida por FEN em artérias de camundongos *Pkd1*^{+/-} com 40 semanas de vida (152). Artérias mesentéricas de resistência (AMR) de camundongos *Pkd2*^{+/-} também desenvolvem contratilidade aumentada a FEN (153). Um estudo recente, no entanto, mostrou relaxamento induzido por ACh diminuído e elevação de PA em camundongos com inativação de *Pkd1* específica em endotélio (154). Estes resultados são muito importantes para caracterizar a função de *Pkd1* em AR, porém o modelo animal empregado não reproduz o padrão de deficiência de *Pkd1* nem o fenótipo da doença de pacientes com DRPAD, limitando significativamente a interpretação de tais dados na patogênese vascular da DRPAD. No momento, portanto, os dados experimentais disponíveis estão longe de ser capazes de identificar o mecanismo genético preciso do fenótipo vascular funcional da DRPAD ou do fenótipo vascular funcional dependente de *Pkd1* que mimetizam a doença humana.

Uma vez que os cistos renais desempenham um papel central na patogênese da HA associada à DRPAD e uma reatividade vascular defeituosa no nível de AR parece ampliar o fenótipo, decidimos investigar reatividade vascular em AMRs de animais que mimetizam a doença humana e os estados de deficiência de *PKDI* encontrados em pacientes com a doença. Os modelos *in vivo* escolhidos incluíram o camundongo *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}, um animal cístico e hipertenso com um padrão esperado de inativação em mosaico de *Pkd1* em AMRs - reproduzindo o modelo de dois eventos em nível vascular; e o camundongo *Pkd1*^{+/-}, um animal não cístico e normotenso até 15 semanas de idade com um *background* vascular haploinsuficiente para *Pkd1*. Por reproduzir o fenótipo renal cístico associado à doença humana, o primeiro modelo permite avaliar os efeitos do fenótipo cístico sobre as AR, assim como efeitos potenciais da inativação em mosaico de *Pkd1* em células vasculares. A não identificação de fenótipos vasculares robustos em animais haploinsuficientes para *Pkd1/Pkd2* até o momento sugere que o mecanismo de dois eventos seja necessário e/ou relevante para o desenvolvimento de alterações de reatividade vascular significativas. No entanto, até o presente, o modelo de dois eventos foi mostrado apenas para cistogênese renal e hepática na DRPAD (55,56,155,156). No segundo modelo, por sua vez, avaliaremos o fenótipo vascular associado à haploinsuficiência de *Pkd1*, sem a interferência de HA e dos efeitos secundários à expansão cística renal. A integração de dados de reatividade vascular obtidos em AMRs em diferentes perfis relevantes de deficiência de *Pkd1*, diferentes

idades, presença ou ausência de HA e presença ou ausência de cistos renais, nos permitiu entender mais profundamente a base genética do fenótipo de AR e propor um modelo para a contribuição vascular à patogênese da HA na DRPAD.

2. OBJETIVOS

Objetivo Central

O objetivo central deste estudo foi caracterizar e estender o entendimento do fenótipo vascular associado à DRPAD, por meio de análises funcionais e estruturais de artérias de resistência em modelos de camundongo com diferentes perfis de deficiência do gene *Pkd1*.

Objetivos Específicos

1. Determinar e analisar a concentração sérica de ureia em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) e seus controles selvagens (SV) nas idades de 8-12 e 55-60 semanas, assim como em camundongos císticos *Pkd1^{flox/flox}:Nestin^{cre}* (CI) e seus controles não císticos *Pkd1^{flox/flox}* (NC) nas idades de 8-12 semanas.
2. Quantificar a massa cardíaca e renal direita nos grupos experimentais citados nas idades de 8-12 e 55-60 semanas (SV e HT) e de 8-12 semanas (NC e CI).
3. Analisar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de camundongos HT e SV nas idades de 8-12 e 55-60 semanas, bem como de camundongos CI e NC nas idades de 3 a 4 e 8 a 12 semanas, por meio da avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio induzida por acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, e da resposta vasoconstritora adrenérgica induzida por noradrenalina em animais adultos.
4. Analisar a pressão arterial de camundongos HT e SV semanalmente de 15 até 55-60 semanas de vida.
5. Avaliar a presença potencial de cistos renais em camundongos HT e SV nas idades de 35 e 45 semanas.
6. Avaliar propriedades estruturais e mecânicas de artérias mesentéricas de resistência de camundongos HT e SV na idade de 55-60 semanas por meio do controle da pressão intramural e manutenção das concentrações do íon Ca^{2+} ;
7. Quantificar e analisar a expressão dos seguintes genes em artérias mesentéricas de resistência de camundongos CI e NC com 3-4 e 55-60 semanas de vida: *Ace*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Agtr2*, *Cat*, *Cyba*, *Cybb*, *End1*, *Ednra*, *Ednrb*, *Kdr*, *Ncf1*, *Ncf2*, *Nos1*, *Nos2*, *Nos3*, *Nox4*, *Pkd1*, *Pkd2*, *Ptgs1*, *Ptgs2*, *Rac1*, *Rhoa*, *Rock1*, *Rock2*, *Sod1*, *Sod2*, *Sod3* e *Vegfa*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Eutanásia e instalações

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob os registros de números 901/17 e 1233/2019 (Anexo I e II), seguindo os parâmetros nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais.

Os camundongos HT e SV foram submetidos a eutanásia nas idades de 8-12 ou 55-60 semanas de vida, enquanto camundongos CI e NC foram eutanasiados nas idades de 3-4 ou 8-12 semanas de vida. Animais adultos foram eutanasiados por deslocamento cervical, uma vez que anestésicos e o estresse da anestesia induzem alterações nos parâmetros de reatividade vascular em camundongos, parâmetros avaliados em nosso estudo. Esta técnica consiste no rompimento da medula espinhal entre o côndilo occipital e a primeira vértebra cervical, com consequente perda total e imediata da sensibilidade e morte. Após o deslocamento cervical, animais adultos foram submetidos a decapitação para coleta de sangue. Dado o tamanho reduzido dos camundongos recém desmamados, o que impede a realização adequada de deslocamento cervical, estes animais foram eutanasiados por decapitação.

Utilizamos dois modelos de camundongos geneticamente modificados, gerados em *background* C57BL/6, ortólogos à DRPAD humana. Nosso estudo foi conduzido em camundongos machos de modo a evitar heterogeneidade experimental relacionada a gênero. Os camundongos foram mantidos em *racks* ventiladas, sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h) e de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com livre acesso a água e ração. Após o desmame, os camundongos foram identificados e pequenas amostras de tecido caudal foram coletadas para posterior extração de DNA e determinação do genótipo. O DNA genômico foi extraído pela técnica de precipitação salina e a genotipagem realizada por PCR convencional e em tempo real quantitativo (qPCR), utilizando *primers* específicos para cada modelo animal.

3.2. Modelos animais

O primeiro modelo consiste em um camundongo com uma mutação nula em um dos alelos do gene *Pkd1*. A construção deste alelo baseou-se na substituição de parte do éxon 2 e todo o éxon 3 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 (cassete *neor*). O fragmento *LacZ-neor* inclui sequências de término de transcrição, determinando a inativação de *Pkd1* (59,98). Dada a virtual ausência de cistos renais em camundongos heterozigotos para a mutação mencionada (*Pkd1*^{+/-}) pelo menos até a idade de 15 semanas, este modelo representa um estado de haploinsuficiência gênica pura, reproduzindo o *background* genético da DRPAD humana. Como vimos previamente, animais *Pkd1*^{+/-} não desenvolvem HA, mas apresentam alterações cardiovasculares em idade precoce (90). A genotipagem desses animais distingue um produto originado do alelo selvagem de 180 pb de um produto proveniente do alelo KO com 220 pb. Nesta reação empregamos um *primer* comum a ambos os alelos (KF1, 5'-ATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3') e *primers* reversos específicos a cada um dos alelos. O *primer* reverso específico para o alelo selvagem se localiza na região do DNA substituído pelo construto recombinante (KR1, 5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'), enquanto o *primer* específico para o alelo KO se posiciona no próprio construto (M3-2B, 5'-TACTCACACCTCCACCAGTGC-3'). Uma vez que a prole foi constituída a partir de um macho HT e de uma fêmea SV, esta reação distingue animais SV, com apenas uma banda de 180 pb, de animais HT, com duas bandas: uma de 180 pb e outra de 220 pb (Figura 6A).

O segundo modelo animal baseia-se na construção de um alelo *floxed* (condicional) com sítios loxP flanqueando os íntrons 1 e 4 de *Pkd1* e um cassete de neomicina flanqueado por sítios FRT (*flippase recognition target*) no íntron 1 (157). O cassete de resistência foi retirado através do cruzamento com camundongos transgênicos que expressam a enzima FLP (flipase) e o alelo resultante foi denominado *Pkd1*^{fllox}. Os sítios loxP são induzidos a recombinar via Cre recombinase, de forma a produzir um novo alelo inativo. Em camundongos TgN(balancer2)3Cgn, a expressão de Cre recombinase é controlada pelo promotor do gene de rato nestina (*Nestin*), gerando animais que expressam a Cre recombinase em apenas parte das células do animal (158,159). A

linhagem *Pkd1*^{flox/flox} foi cruzada com a linhagem balancer Cre, de forma a induzir inativação do alelo *floxed* em mosaico (*Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}), no rim e em outros órgãos (98). Dessa forma, geramos camundongos com fenótipo cístico renal moderado, semelhante à DRPAD humana. Como vimos anteriormente, esses animais desenvolvem HA precocemente, assim como disfunção cardíaca (90,98).

Dada a possibilidade de expressão gonadal de Nestin, a certificação do genótipo *Pkd1*^{flox/flox} (NC), excluindo o genótipo potencial *Pkd1*^{flox/-}, foi realizada por uma reação de PCR específica, revelando presença do alelo *Pkd1*^{flox} e ausência do alelo *Pkd1* inativado *Pkd1*⁻ (157). A reação que demonstra a presença do alelo *Pkd1*^{flox} incluiu o par de primers F4 (5'-CCTGCCTTGCTCTACTTTCC-3') e R5 (5'-AGGGCTTTTCTTGCTGGTCT-3'), identificando um produto de 250 pb (Figura 6B), enquanto a reação que mostra a presença do alelo *Pkd1*⁻ incluiu o par de primers F4 e R4 (5'-TCGTGTTCCCTTACCAACCCTC-3'), identificando um produto de 200 pb (Figura 6C) (159). Na ausência de inativação de *Pkd1*, F4-R4 gera um produto de 1300 pb (Figura 6C). Camundongos *Pkd1*^{flox/flox}, portanto, não apresentam este produto de 200 pb. A verificação do genótipo *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} (CI), por sua vez, excluindo o genótipo potencial *Pkd1*^{flox/-}:*Nestin*^{cre}, foi realizada por reações específicas de SYBR Green-based qPCR (PowerUp SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) incluindo amplificações paralelas dos alelos *Pkd1*^{flox} e *Pkd1*⁻ (159). Uma amplificação aproximadamente similar ou levemente maior de F4-R4 comparada a F4-R5 identificou camundongos *Pkd1*^{flox/-}:*Nestin*^{cre}, enquanto uma amplificação muito maior de F4-R5 com respeito a F4-R4 definiu os animais como *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} (Figura 6D). A incorporação do transgene *Nestin*^{cre}, por sua vez, foi avaliada por meio de uma reação de PCR que incluiu os primers CreF (5'-ATTGCTGTCACTTGGTCGTGGC-3') e CreR (5'-GGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC-3'). A identificação de um produto de 200 pb indica a presença do transgene, enquanto a ausência de produto indica sua ausência (Figura 6E) (158).

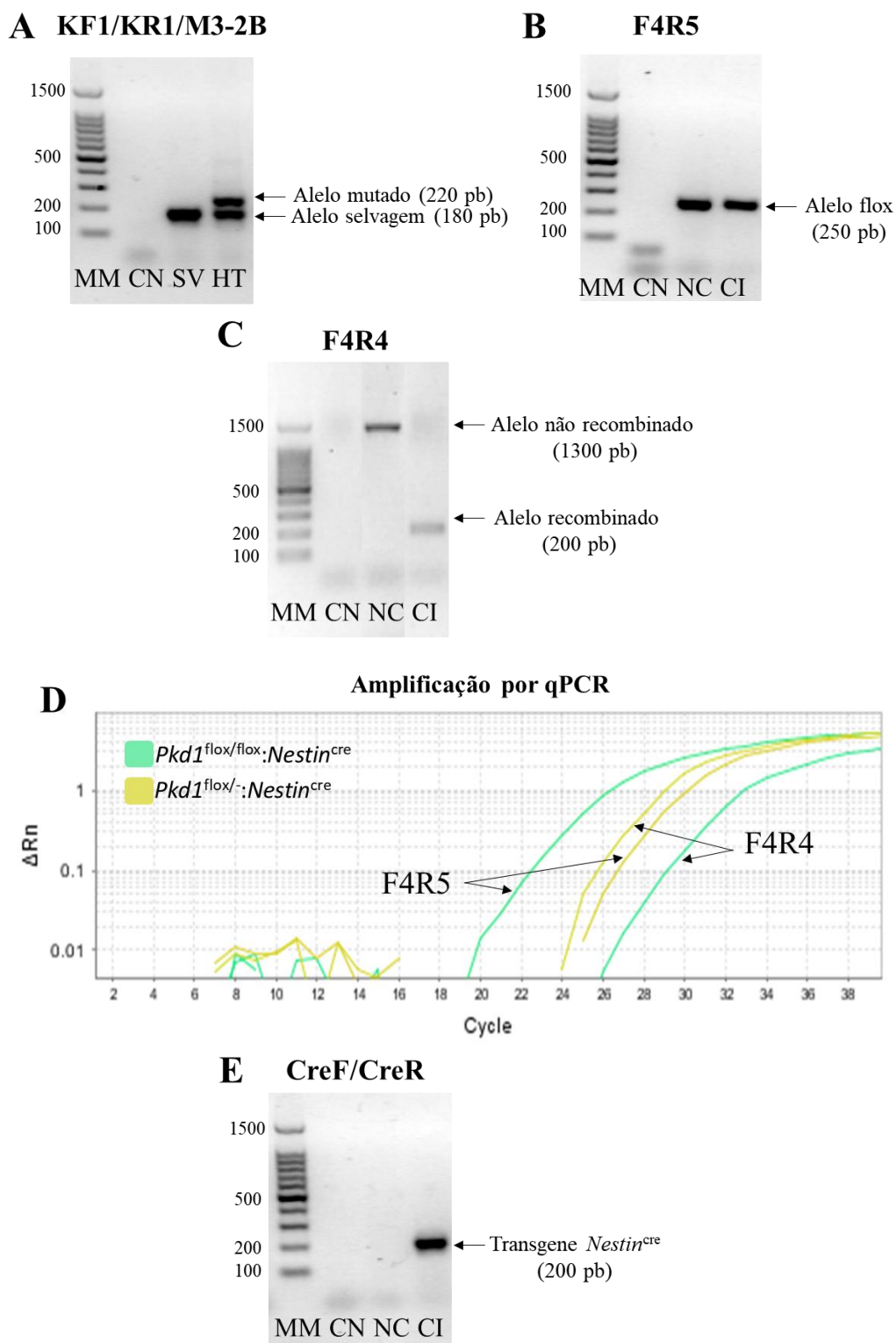


Figura 6. Genotipagem dos camundongos analisados no estudo. A) Camundongo selvagem (SV) com alelos selvagens (*Pkd1^{+/+}*) e camundongo haploinsuficiente para *Pkd1* (HT) com alelos selvagem e nulo (*Pkd1^{+/-}*); MM, massa molecular; CN, controle negativo; B) Camundongo não cístico (NC) com alelos *Pkd1^{flox}* (*Pkd1^{flox/flox}*) e camundongo cístico (CI) com alelos *Pkd1^{flox}* (*Pkd1^{flox/flox}; Nestin^{cre}*); MM; CN; C) Camundongo NC com alelos *Pkd1^{flox}* (*Pkd1^{flox/flox}*) e camundongo CI com inativação de uma menor parte dos alelos originalmente *Pkd1^{flox}* (*Pkd1^{flox/flox}; Nestin^{cre}*); MM; CN; D) Genotipagem por qPCR de camundongos *Pkd1^{flox/flox}; Nestin^{cre}* e *Pkd1^{flox/-}; Nestin^{cre}*; E) Camundongo NC sem o transgene *Nestin^{cre}* (*Pkd1^{flox/flox}*) e camundongo CI com o transgene *Nestin^{cre}* (*Pkd1^{flox/flox}; Nestin^{cre}*); MM; CN.

3.3. Mensuração da ureia no soro

Após a coleta de sangue e formação do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 2500 g por 15 min para obtenção do soro. A mensuração da concentração sérica de ureia (Us) foi realizada por método enzimático-colorimétrico utilizando o kit Ureia CE (Labteste, Minas Gerais, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Avaliações biométricas

Os animais foram pesados (Acrimet Megacril Ind. Com. Prod. Acrílicos Metalúrgicos Ltda., São Paulo, Brasil) e a seguir eutanasiados nas idades anteriormente referidas. O rim direito e o coração foram retirados e lavados em solução de Krebs-Henseleit (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂.2H₂O 2,5 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; EDTA 0,01 mM e glicose 11 mM). O rim direito e o coração foram então pesados em balança analítica (BEL Equipamentos Analíticos Ltda., São Paulo, Brasil) para obtenção de seus índices de massa: peso do rim direito/peso corpóreo x 100 (IMRD, %) e peso do coração/peso corpóreo x 100 (IMC, %).

3.5. Aferição de pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) de camundongos SV e HT foram monitoradas semanalmente por *tail-cuff* (BP Blood Pressure Analysis System 2000; Visitech System, EUA). Os animais foram adaptados à cuba aquecida de medida caudal por 3 dias antes de atingirem 15 semanas de vida. A partir de então, suas medidas foram registradas semanalmente, com pelo menos 20 registros válidos em cada sessão. Estes registros foram usados para calcular a média por sessão até que os camundongos atingissem a faixa etária de 55 a 60 semanas de vida, quando foram submetidos a eutanásia para o experimento de reatividade vascular.

3.6. Ultrassonografia renal

Animais HT e SV foram submetidos a anestesia por inalação de isoflurano 3-5 % para indução de inconsciência e 1-2 % para manutenção por tempo suficiente para a captura de imagens bidirecionais por ultrassonografia renal, tanto do lado direito quanto do esquerdo. As análises foram realizadas nas idades de 35 e 45 semanas com o equipamento Vevo 2100 (VisualSonics Inc., Canadá) com transdutor de 40 mHz. Estes animais retornaram para o biotério em que estavam adaptados para continuar no monitoramento semanal de sua PAS.

3.7. Análises de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência

3.7.1. Miógrafo de arame

3.7.1.1. Coleta de artérias mesentéricas de resistência e montagem no sistema

As análises de função vascular de AMRs de camundongos foram realizadas utilizando o método previamente descrito por Couto e cols (160). O leito mesentérico foi retirado do animal e colocado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C e devidamente gaseificada, pH 7,4. Em seguida, os primeiros ramos (animais de 3-4 semanas) e os segundos ramos (camundongos de 8-12 e 55-60 semanas) das AMRs foram limpos de tecido conectivo, isolados e cortados em segmentos de 2,0 mm de comprimento com auxílio de uma lupa (Nikon SMZ 645, EUA). Dois fios de tungstênio (25 ou 40 µm de diâmetro cada) foram inseridos no lúmen desses vasos e montados em miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 610M, JP-Trading I/S, Dinamarca) para estudos de tensão isométrica (Figuras 7 e 8). Esse miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab/ 8SP, Austrália), e este a um computador.

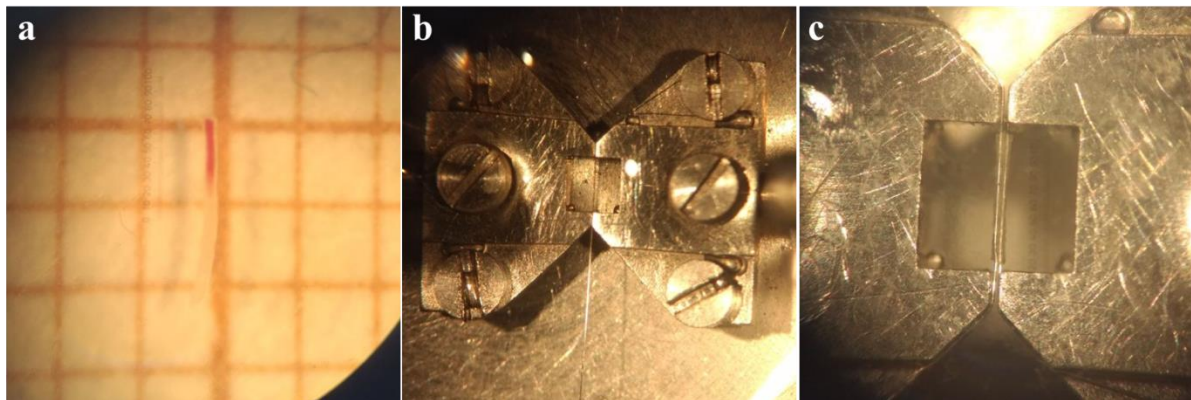


Figura 7. Fotos representativas da montagem de artéria de resistência no miógrafo de arame. A) Artéria mesentérica de resistência isolada com comprimento aproximado de 2 mm. B) Montagem parcial com o primeiro fio de arame de tungstênio no interior da artéria. C) Artéria mesentérica de resistência com dois fios de tungstênio passados em seu lúmen, montada no sistema de análise.

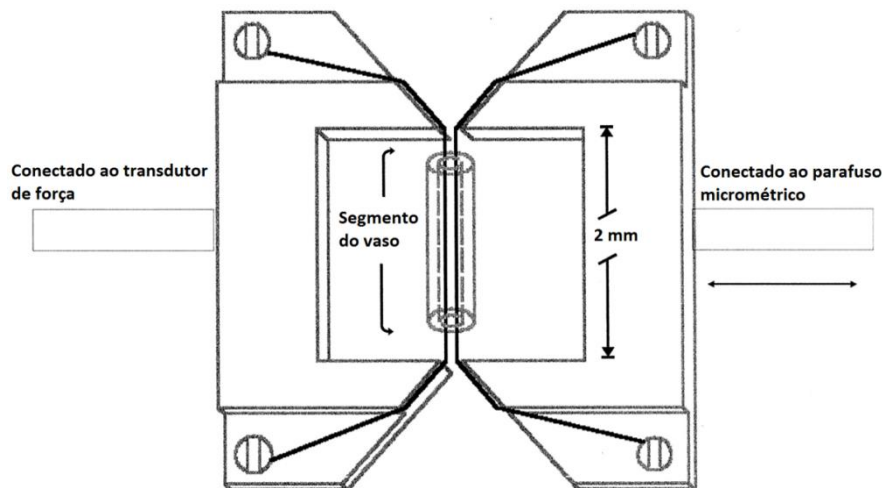


Figura 8. Diagrama do segmento de artéria de resistência montada em miógrafo de arame. Adaptado de Wang e cols (161).

3.7.1.2. Normalização das artérias de resistência

Após um período de estabilização de 30 min em solução de Krebs-Henseleit pH 7,4 a 37 °C, as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão/diâmetro interno foi calculada e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L_{100}) foi determinada. As artérias foram mantidas com uma circunferência interna L_1 para a realização dos experimentos, onde $L_1 = 0,90 \times L_{100}$, valor para o qual o desenvolvimento de força é

máximo. O diâmetro luminal efetivo (l_1) foi determinado de acordo com a equação $l_1 = L_1/\pi$. Após o processo de normalização, as artérias foram contraídas três vezes com KCl 120 mM para avaliar sua integridade muscular funcional (160,162). A contração induzida por KCl (ΔKCl) foi calculada a partir da média dos dois últimos valores.

3.7.1.3. Avaliação das respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio

As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio foram avaliadas após 30 min da contração induzida por KCl. Para isso, os segmentos arteriais foram inicialmente pré-contraídos com FEN (animais adultos; Sigma cód. P6126) ou NOR (animais jovens; Sigma cód. A9512), a uma concentração capaz de induzir 80-100 % da resposta contrátil induzida por KCl (média de ΔKCl). A função endotelial foi avaliada por meio do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico ACh (10^{-9} M- 10^{-5} M; Sigma cód. A6625), enquanto o relaxamento independente do endotélio foi avaliado por indução por NPS (10^{-11} M- 10^{-4} M; Sigma cód. S-0501).

3.7.1.4. Avaliação da resposta vasoconstritora à noradrenalina

Dada a importância do sistema nervoso simpático no controle do tônus vascular, avaliamos a resposta contrátil induzida por NOR. Para tanto, após 60 min da curva de relaxamento à ACh, foi construída uma curva concentração-resposta ao agonista adrenérgico NOR (10^{-9} M- 10^{-4} M; Sigma cód. A9512) em anéis de AMRs de camundongos adultos. A tensão de contração foi normalizada pelo valor de ΔKCl , expressa em porcentagem. Este experimento não foi realizado em anéis de camundongos de 3-4 semanas porque os receptores de NOR se dessensibilizaram, não permitindo a indução de uma contração cumulativa e consistente durante o registro.

3.7.2. Miógrafo de pressão

3.7.2.1. Coleta de artérias mesentéricas de resistência e montagem no sistema

Para avaliação de propriedades estruturais e mecânicas de AMRs de camundongos SV e HT de 55 a 60 semanas de vida, as mesmas foram dissecadas, livres tecido conjuntivo e mantidas em solução de Krebs gaseificada a frio. Segmentos de aproximadamente 6 mm de comprimento foram canulados com micropipetas de vidro na câmara de microvasos e presos com fio de nylon imersos em solução de Krebs (Figura 9) (163,164).

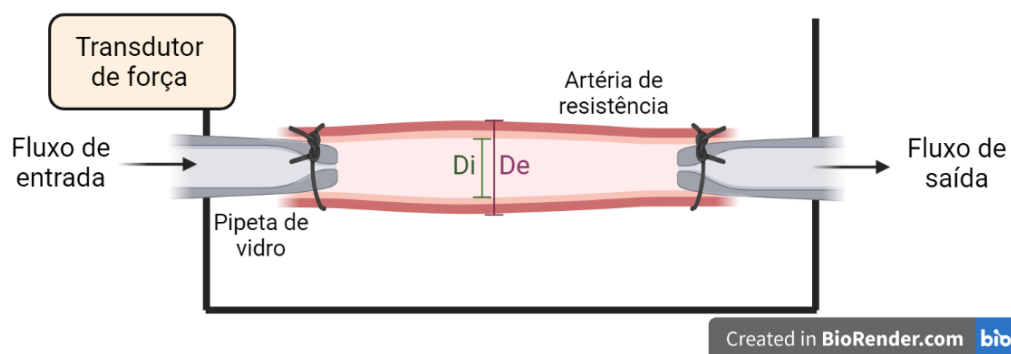


Figura 9. Diagrama do segmento de artéria de resistência montada em miógrafo de pressão. Di, diâmetro interno; De, diâmetro externo. Criado através do site BioRender.com.

3.7.2.2. Normalização das artérias de resistência

A pressão intraluminal foi elevada para 140 mmHg para ajustar o estiramento longitudinal da artéria e avaliar possível vazamento. Em seguida, a pressão intraluminal foi reduzida para 70 mmHg, permitindo que o segmento de AMR se estabilizasse por 1 h. Após este período, a AMR foi lavada com Krebs livre de Ca^{2+} gaseificada (contendo 10 mmol/L de EGTA) e mantida nesta solução por 15 min para garantir a depleção de Ca^{2+} e relaxamento completo. Para confirmar a depleção de Ca^{2+} , as artérias foram expostas a uma solução rica em potássio (120 mmol/L), o que certificou a ausência de resposta contrátil.

3.7.2.3. Avaliação dos parâmetros estruturais e mecânicos

Após outra lavagem e 15 min de estabilização em Krebs livre de Ca^{2+} , a pressão intraluminal foi reduzida para 3 mmHg, iniciando a curva pressão-diâmetro em condição passiva – realizada por aumentos de pressão intraluminal de 3 a 140 mmHg, com intervalo de 5 min para cada aumento de pressão intraluminal.

Os diâmetros interno e externo (D_i , D_e) foram avaliados continuamente pelo software MyoView II (DMT, Aarhus, Dinamarca) durante toda a curva pressão-diâmetro. A partir dos valores obtidos de D_i e D_e , foram calculados os seguintes parâmetros estruturais e mecânicos de acordo com Dardi e cols (163).

3.8. qPCR em tempo real após RT-pré-amplificação

RNA total foi extraído de AMRs de camundongos CI e NC nas idades de 3-4 e 8-12 semanas de vida utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Os respectivos DNAc foram obtidos usando o kit de transcrição reversa *High-Capacity* (Applied Biosystem, Warring, RU). Devido à baixa concentração de RNA proveniente das AMRs, estabelecemos um padrão de qualidade na seleção de DNAc para assegurar a viabilidade do teste. Para isso, confirmamos que as amostras de RNA não estavam degradadas (analisadas por RNA 6000 Pico Kit; Agilent Technologies, EUA) e tiveram seus respectivos DNAc amplificados em um padrão *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*; com CT menor que 25), *Sod1* (*Superoxide Dismutase 1*) e *Ptgs1* (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1*, codifica COX1) -presentes. Verificamos que amostras degradadas não atingiram esses critérios de amplificação. As amostras que obedeceram a esses critérios seguiram para o protocolo de pré-amplificação.

Um pool de ensaios/pares de primers *TaqMan* foi customizado para 100 genes selecionados de acordo com vias moleculares alvo de interesse. Este pool foi adicionado à amostra e ao Master Mix *TaqMan* PreAmp (Applied Biosystem) para a pré-amplificação por 14 ciclos. O produto proveniente da pré-amplificação foi submetido a qPCR em tempo real utilizando *TaqMan* Gene Expression Assays (Applied Biosystem)

analisados pelo software StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystem). Os resultados desta amplificação foram então normalizados em relação aos resultados obtidos para o gene constitutivo também amplificado *Gapdh*, calculados usando a metodologia $\Delta\Delta C_t$ e expressos como razão em relação ao valor obtido para AMRs de camundongos NC com 3-4 semanas de idade.

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis paramétricas foram expressas como média \pm erro padrão e as variáveis não paramétricas como mediana (percentis 25-75%). Na representação gráfica, média \pm erro padrão estão representados por barra preta e bigodes, e mediana (25-75% percentis) estão expressos por barra azul e bigodes. As comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste *t* de *Student* para variáveis paramétricas, usando a correção de Welch quando foram detectadas diferenças nas variâncias. As comparações entre dois grupos de distribuição não paramétrica foram realizadas com o teste de Mann-Whitney. A comparação entre dois fatores foi realizada usando análise de variância (ANOVA) de duas vias para variáveis paramétricas e, para distribuição não paramétrica, o procedimento *Align Rank Test* (ART) foi realizado seguido de ANOVA de duas vias. Comparações exploratórias entre dois subgrupos específicos foram realizadas após ANOVA de duas vias/ART-ANOVA quando considerado biologicamente relevante (Tabela 1). Comparações entre grupos para variáveis com múltiplas medidas repetidas foram realizadas usando análises de modelos mistos para medidas repetidas. Consideramos diferenças significativas com valor de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com Graphpad Prism 8.0.1 (La Jolla, CA, EUA), SPSS 25 (IBM, Armonk, NY, EUA) e R 4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

4. RESULTADOS

4.1. Camundongos *Pkd1*^{fl^{ox}/fl^{ox}}:*Nestin*^{cre} apresentaram pequeno aumento da ureia sérica na idade de 8-12 semanas

Confirmamos dados de estudo anterior que não mostraram diferença de U_S entre camundongos HT e SV com 10-13 semanas (122), agora na idade de 8-12 semanas (Tabela 1). No presente estudo, também avaliamos a U_S em animais HT e SV em 55-60 semanas, idade ainda não analisada. Nesta idade muito mais avançada, os camundongos HT exibiram U_S mais alta do que os animais SV (Tabela 1). Este achado revelou um leve efeito deletério renal da haploinsuficiência de *Pkd1* associada ao envelhecimento.

Tabela 1. Efeito da haploinsuficiência e inativação em mosaico de *Pkd1* em dados biométricos e ureia sérica.

	Peso corporal (g)	Índice de massa do rim direito (%)	Índice de massa cardíaco (%)	Ureia sérica (mg/dL)
SV 8-12	22,00 ± 0,73 (n=14)	0,66 ± 0,01 (n=14)	0,44 ± 0,01 (n=11)	68,40 ± 3,416 (n=14)
HT 8-12	21,44 ± 0,87 (n=9)	0,64 ± 0,01 (n=9)	0,43 ± 0,02 (n=5)	69,53 ± 3,97 (n=11)
SV 55-60	29,36 ± 0,66 (n=11)	0,67 ± 0,02 (n=11)	0,44 ± 0,02 (n=10)	77,36 ± 3,12 (n=9)
HT 55-60	29,33 ± 0,92 (n=12)	0,72 ± 0,02 (n=12)	0,45 ± 0,01 (n=12)	94,20 ± 5,79 (n=11)*
NC 8-12	25,00 ± 0,98 (n=11)	0,69 ± 0,02 (n=11)	0,45 ± 0,01 (n=10)	49,21 ± 1,85 (n=10)
CI 8-12	24,20 ± 0,83 (n=10)	1,21 ± 0,32 (n=10)†	0,48 ± 0,02 (n=7)	73,58 ± 4,49 (n=8)†

SV: selvagem; HT: haploinsuficiente para *Pkd1*; NC: não cístico; CI: cístico *p < 0,05 vs. SV 55-60 semanas;

†p < 0,05 vs. NC 8-12 semanas.

Camundongos CI mostraram aumento na concentração de U_S em comparação com animais NC na idade de 8-12 semanas (Tabela 1). Vale notar que também observamos um aumento da U_S em animais CI em 10-13 semanas em nosso estudo anterior, embora

em menor grau (98). Neste caso, como a creatinina sérica e a cistatina C não foram maiores nos camundongos CI que nos animais NC, o aumento de U_s foi interpretado como secundário ao aumento da reabsorção de ureia no túbulo proximal dos camundongos CI. Devido as limitações técnicas, no entanto, creatinina sérica e a cistatina C não foram analisadas no estudo atual.

4.2. Camundongos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} apresentavam doença renal cística significativa na idade de 8-12 semanas

Os efeitos dos perfis de deficiência de *Pkd1* sobre o desenvolvimento sistêmico e orgânico específico dos camundongos foram avaliados por meio de mensuração do peso corporal (PC), do peso do rim direito (PRD) e do peso do coração (PCo). Com base nestes dados, calculamos o IMRD e o IMC. Nossos dados mostraram que o estado de haploinsuficiência de *Pkd1* não resultou em alteração significativa do PC na idade de 8-12 semanas [$21,44 \pm 0,87$ para HT vs. $22,00 \pm 0,73$ g para SV; não significativo (NS); Tabela 1]. Estes resultados confirmam achados anteriores de nosso grupo que não revelaram diferença de PC entre camundongos HT e SV na idade de 15 semanas (98).

Não detectamos diferença de PRD entre camundongos HT e SV com 8 a 12 semanas ($138,4 \pm 7,37$ vs. $145,5 \pm 3,65$ mg, respectivamente; NS) nem de PCo ($86,88 \pm 5,44$ vs. $92,55 \pm 1,69$ mg; NS). Conforme esperado, os grupos HT e SV não diferiram quanto ao IMRD ($0,64 \pm 0,01\%$ vs. $0,66 \pm 0,01\%$, respectivamente; NS), e IMCo ($0,43 \pm 0,02\%$ vs. $0,44 \pm 0,01\%$; NS) (Tabela 1). Nossos resultados encontram-se em sintonia com achados prévios de nosso grupo, que não detectaram diferença para a razão peso renal total/peso corporal e peso do coração/peso corporal entre camundongos HT e SV na idade de 15 semanas (98).

Camundongos HT e SV também não apresentaram diferença de PC na idade de 55 a 60 semanas ($29,33 \pm 0,92$ vs. $29,36 \pm 0,66$ g; NS; Tabela 1). Embora este dado obtido em idade avançada seja novo, um estudo anterior também reportou ausência de diferença de PC entre camundongos com esses genótipos na idade de 30 semanas (151).

O PRD também não diferiu entre camundongos HT e SV na idade de 55 a 60 semanas ($209,50 \pm 8,64$ vs. $197,20 \pm 6,52$ mg, respectivamente; NS), assim como o PCo ($131,40 \pm 4,20$ vs. $126,70 \pm 4,76$ mg, respectivamente; NS). Nesse contexto, também não foram observadas diferenças entre esses grupos nessa faixa de idade para IMRD ($0,72 \pm 0,02\%$ vs. $0,67 \pm 0,02\%$, respectivamente; NS) e IMCo ($0,45 \pm 0,01\%$ vs. $0,44 \pm 0,02\%$, respectivamente, NS) (Tabela 1). Associados às análises macroscópicas e ultrassonográficas descritas a seguir, os resultados apresentados mostraram ausência de diferenças estruturais pronunciadas renais e cardíacas entre camundongos HT e SV em idade avançada.

A dupla inativação em mosaico dos alelos de *Pkd1* não promoveu variação no PC na idade de 3-4 semanas ($14,12 \pm 1,31$ mg para CI vs. $15,13 \pm 1,12$ mg para NC; NS). Embora o valor de PRD tenha sido numericamente maior em camundongos CI que NC nessa faixa etária, não observamos diferença significativa desse parâmetro entre esses grupos ($102,30 \pm 9,75$ vs. $89,18 \pm 7,98$ mg, respectivamente; NS). Também não foi detectada diferença de PCo entre os mesmos ($74,72 \pm 3,55$ vs. $72,81 \pm 3,53$ mg, respectivamente; NS), assim como de IMRD e IMCo ($0,76 \pm 0,10\%$ vs. $0,64 \pm 0,09\%$ e $0,56 \pm 0,06\%$ vs. $0,51 \pm 0,05\%$, respectivamente; NS).

Camundongos CI e NC não diferiram quanto ao PC na idade de 8-12 semanas ($24,20 \pm 0,83$ vs. $25,00 \pm 0,98$ g, respectivamente; NS; Tabela 1), corroborando dados anteriores de nosso laboratório obtidos na idade de 15 semanas (98). O fenótipo cístico moderado, contudo, resultou em aumento do PRD nos camundongos CI nessa faixa de idade ($292,4 \pm 77,31$ vs. $172,6 \pm 6,93$ mg; $p < 0,05$), bem como do IMRD ($1,21 \pm 0,32\%$ vs. $0,69 \pm 0,02\%$; $p < 0,05$; Tabela 1). Resultados similares foram obtidos anteriormente em nosso laboratório na idade de 15 semanas (98). O fenótipo renal cístico, entretanto, não se acompanhou de alterações significantes no PCo ($118,6 \pm 5,68$ para CI vs. $109,8 \pm 3,79$ mg para NC; NS), assim como no IMCo ($0,48 \pm 0,02\%$ vs. $0,45 \pm 0,01$, respectivamente; NS; Tabela 1). Estes resultados também estão de acordo com resultados anteriores de nosso grupo na idade de 15 semanas (98).

4.3. Camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* não desenvolvem doença renal cística significativa mesmo em idade mais avançada

Animais HT e SV foram submetidos a ultrassonografia renal (rins direito e esquerdo) nas idades de 35 e 45 semanas durante seu seguimento para aferição semanal da PAS. Não encontramos cistos renais nesses animais em ambas as idades (imagens representativas na Figura 10). Nossos resultados indicam, portanto, que camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* não desenvolveram doença renal cística significativa mesmo em idade mais avançada. Um estudo prévio mostrou que 12 de 15 camundongos *Pkd1*^{+/-} analisados histologicamente apresentaram 1 a 7 cistos renais na faixa etária de 9 a 14 meses, entre os quais 5 exibiram cistos bilaterais (165). Após 16 meses, os 8 camundongos analisados apresentaram 2 a 50 cistos renais. Outro estudo anterior, contudo, não identificou cistos renais em camundongos com esse mesmo genótipo na idade de 20 a 35 semanas, macroscópica e histologicamente (166). Nossos resultados são consistentes com este segundo estudo, enquanto a diferença observada em relação ao primeiro pode ser potencialmente explicada pelo fato de neste estudo a avaliação ter sido histológica, enquanto no nosso foi por imagem ultrassonográfica.

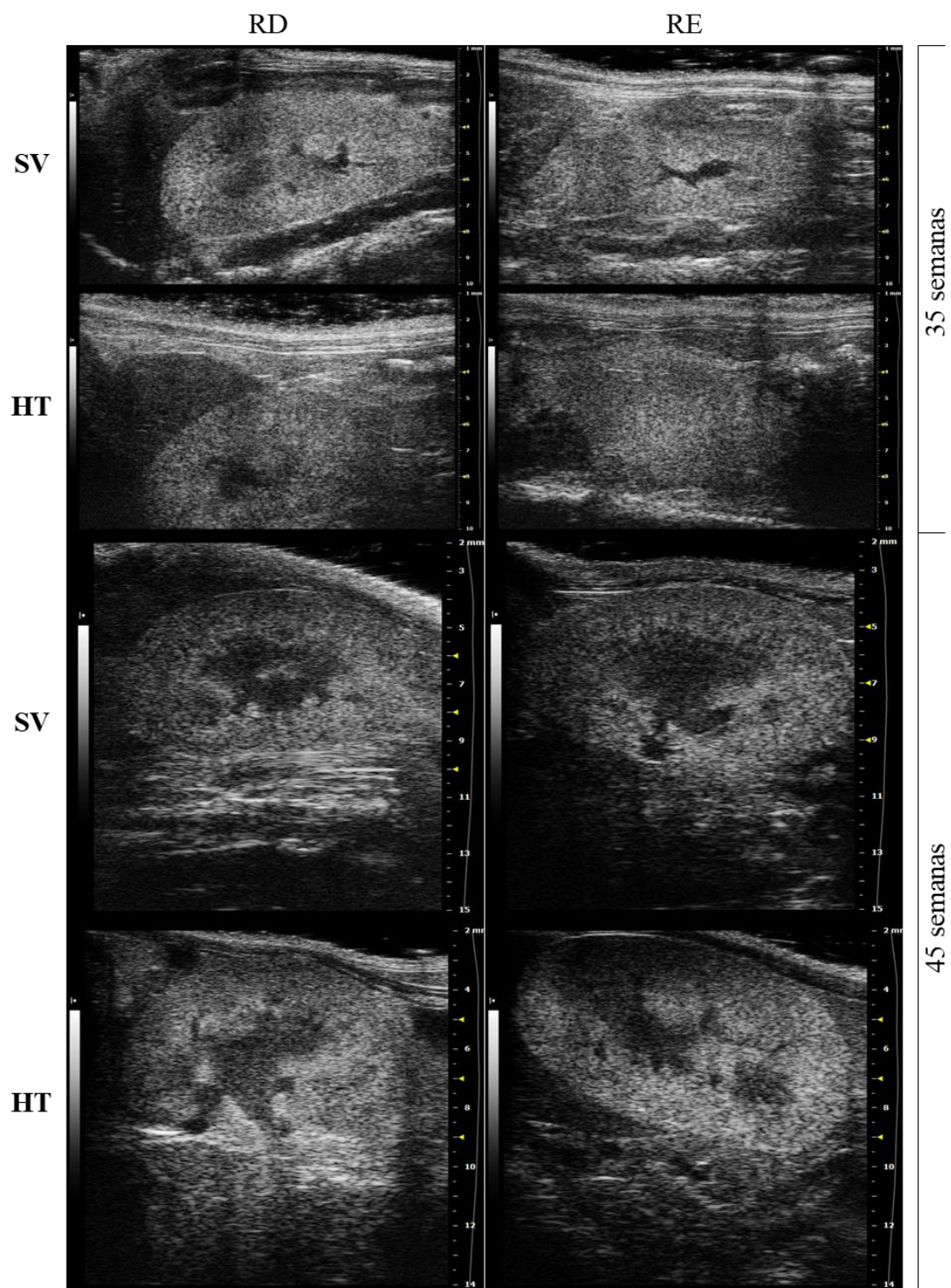


Figura 10. Imagens representativas obtidas por ultrassonografia de rim direito (RD) e rim esquerdo (RE) não císticos de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT), nas idades de 35 e 45 semanas.

4.4. Haploinsuficiência de *Pkd1* não induz hipertensão arterial mesmo em idade avançada

Além de observarmos leve aumento na U_S em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* com 55-60 semanas de idade, testamos se os animais HT desenvolvem HA em idade avançada. Para isso, PAS e FC foram aferidas semanalmente em animais SV e HT até 55-60 semanas de vida. Apesar da análise por *tail-cuff* ser relativamente imprecisa, seguimos os padrões descritos anteriormente para minimizar ao máximo essa potencial imprecisão. Com a mesma finalidade, avaliamos em paralelo um número elevado de animais com idades diferentes em ambos os grupos.

Os registros variaram em número de animais por semana, pois por vezes foram implantadas medidas de segurança sanitária durante a pandemia de SARS-CoV-2. Animais com sinais de brigas devido à longa convivência não foram submetidos à avaliação para evitar registros alterados por estresse. Assim que estes foram identificados, estes animais foram separados com o intuito de aliviar o estresse; resolvido o problema, voltaram a ser avaliados na semana seguinte.

Não foram detectadas diferenças significantes de PAS ou FC entre camundongos HT e SV ao longo de todo o registro de 15 a 60 semanas de idade (Figura 11). Nossos resultados divergem dos de Morel e cols, que relataram elevação da PAS em camundongos HT na idade de 30 semanas (151). Estes resultados, contudo, foram obtidos por *tail-cuff* aparentemente sem a devida adaptação. Tal achado não foi confirmado pelos mesmos autores utilizando radiotelemetria (151).

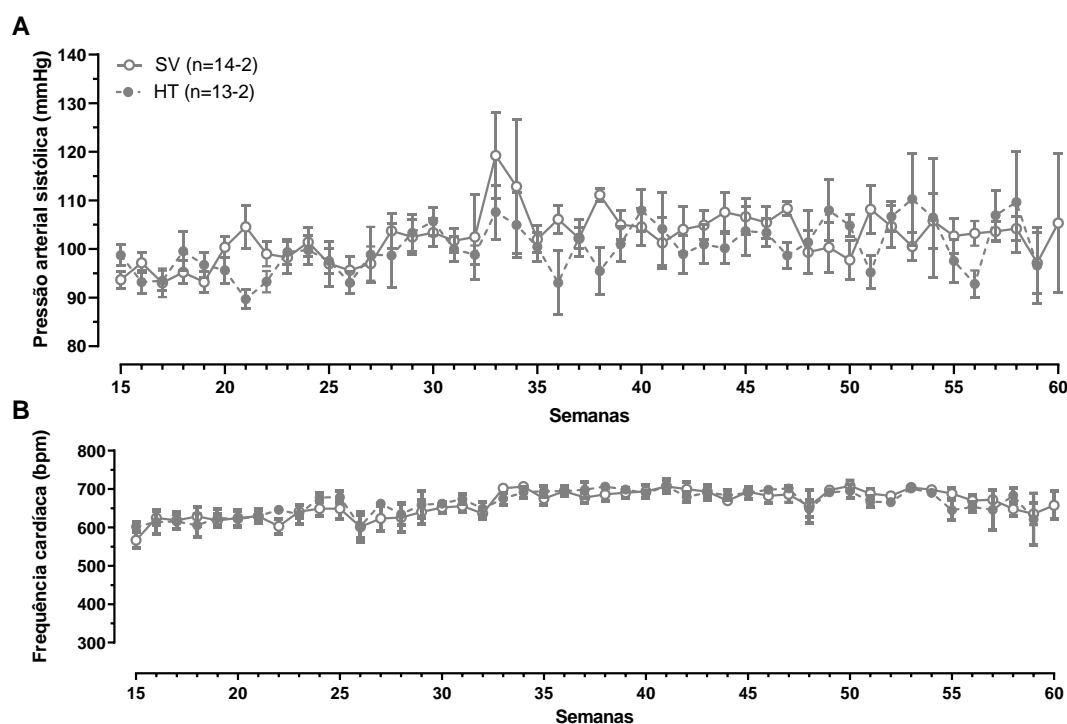


Figura 11. Medidas semanais de: A) pressão arterial sistólica (mmHg); e B) frequência cardíaca (bpm) de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) de 15 semanas até 55 a 60 semanas de vida. Análise de modelos mistos para medidas repetidas; NS.

4.5. O diâmetro e a contração mediada por KCl demonstraram integridade morfológica e funcional de artérias mesentéricas de resistência em todos os grupos avaliados

Neste estudo trabalhamos com anéis de AMRs com diâmetro inferior a 300 μm . Nossos experimentos foram realizados com segundos ramos de AMRs nas idades de 8-12 e 55-60 semanas, e com primeiros ramos de AMRs em camundongos com 3-4 semanas de vida. Conforme esperado, o diâmetro de tais vasos aumentou com a idade (Tabela 2). A contração induzida por KCl também aumentou com a idade, uma observação consistente com aumento progressivo do componente vascular muscular liso (Tabela 2). Os dados obtidos revelaram integridade morfológica e funcional dos anéis de AMRs em todos os grupos avaliados. Não foram observadas diferenças no diâmetro dos anéis de AMRs entre animais HT e SV nas duas faixas etárias analisadas nem entre anéis CI e NC nas idades de 3-4 e 8-12 semanas (Tabela 2). Também não encontramos diferença de

resposta contrátil ao estímulo com KCl (120 mM) entre os anéis de AMRs dos grupos HT e SV nas idades de 8-12 e 55-60 semanas e entre anéis CI e NC na idade de 3-4 semanas (Tabela 2). Uma contração induzida por KCl discretamente maior foi observada em anéis de AMRs de camundongos CI comparados a de animais NC na idade de 8-12 semanas (Tabela 2). *A priori*, o grau desse aumento não tem implicações funcionais, exceto por confirmar a integridade muscular vascular.

Tabela 2. Análise de diâmetro e integridade contrátil muscular, avaliada por contração em resposta a KCl 120 mM, de anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) nas idades de 8-12 e 55-60 semanas; e de camundongos não císticos (NC) e císticos com inativação de *Pkd1* em mosaico (CI) nas idades de 3-4 e 8-12 semanas.

	Diâmetro (μm)	Contração por KCl (mN/mm)
SV 8-12 (n=14)	214,2 \pm 5,10	2.12 \pm 0.10
HT 8-12 (n=9)	203,6 \pm 12,32	1.91 \pm 0.08
SV 55-60 (n=9)	219,6 \pm 9,98	2.63 \pm 0.20*
HT 55-60 (n=8)	220,6 \pm 6,92	2.67 \pm 0.07 [†]
NC 3-4 (n=6)	171,3 \pm 7,10	1.48 \pm 1.01
CI 3-4 (n=7)	142,6 \pm 12,95	1.71 \pm 0.10
NC 8-12 (n=10)	187,9 \pm 5,02	2.21 \pm 0.09 [‡]
CI 8-12 (n=10)	186,4 \pm 5,13	2.48 \pm 0.09 ^{§,}

Teste *t* de Student; *p < 0.05 vs. SV 8-12, [†]p < 0.05 vs. HT 8-12; [‡]p < 0.05 vs. NC 3-4; [§]p < 0.05 vs. NC 8-12; ^{||}p < 0.05 vs. CI 3-4.

4.6. Haploinsuficiência de *Pkd1* não afetou relaxamento dependente e independente de endotélio em artérias de resistência mesentéricas

Com o objetivo de esclarecer o impacto potencial da haploinsuficiência de *Pkd1* em diferentes idades no relaxamento dos vasos de resistência, avaliamos por miografia de fio os componentes dependente e independente do endotélio em camundongos HT e SV com 8-12 e 55-60 semanas de idade. Partindo do princípio de que a ACh promove síntese de vasodilatadores nas CEs, como NO, PGI₂ e FHDE, analisamos o relaxamento dependente do endotélio em anéis de AMR submetidos a doses crescentes de ACh. A curva de

concentração-resposta de ACh revelou claramente que o relaxamento de AMR induzido por ACh não diferiu entre camundongos HT e SV em todas as concentrações de ACh avaliadas e em ambas as idades [Resposta máxima (Rmax): $93,46 \pm 1,55\%$ vs. $94,46 \pm 1,05\%$ em 8-12 semanas, respectivamente; NS; e $92,29 \pm 1,62\%$ vs. $93,03 \pm 1,69\%$ em 55-60 semanas, NS; Figuras 12A e C]. NPS, por outro lado, promove relaxamento de ARs atuando diretamente nas CMLVs. O relaxamento independente do endotélio foi, portanto, analisado expondo anéis de AMRs a doses crescentes de NPS. Nossos dados também não mostraram diferença no relaxamento de AMR induzido por NPS entre camundongos HT e SV em todas as concentrações de NPS estudadas e em ambas as idades (Rmax: $99,03 \pm 0,42\%$ vs. $98,54 \pm 0,97\%$ em 8-12 semanas, NS; e $96,80 \pm 0,89\%$ vs. $103,92 \pm 6,85\%$ em 55-60 semanas, NS; Figuras 12B e D).

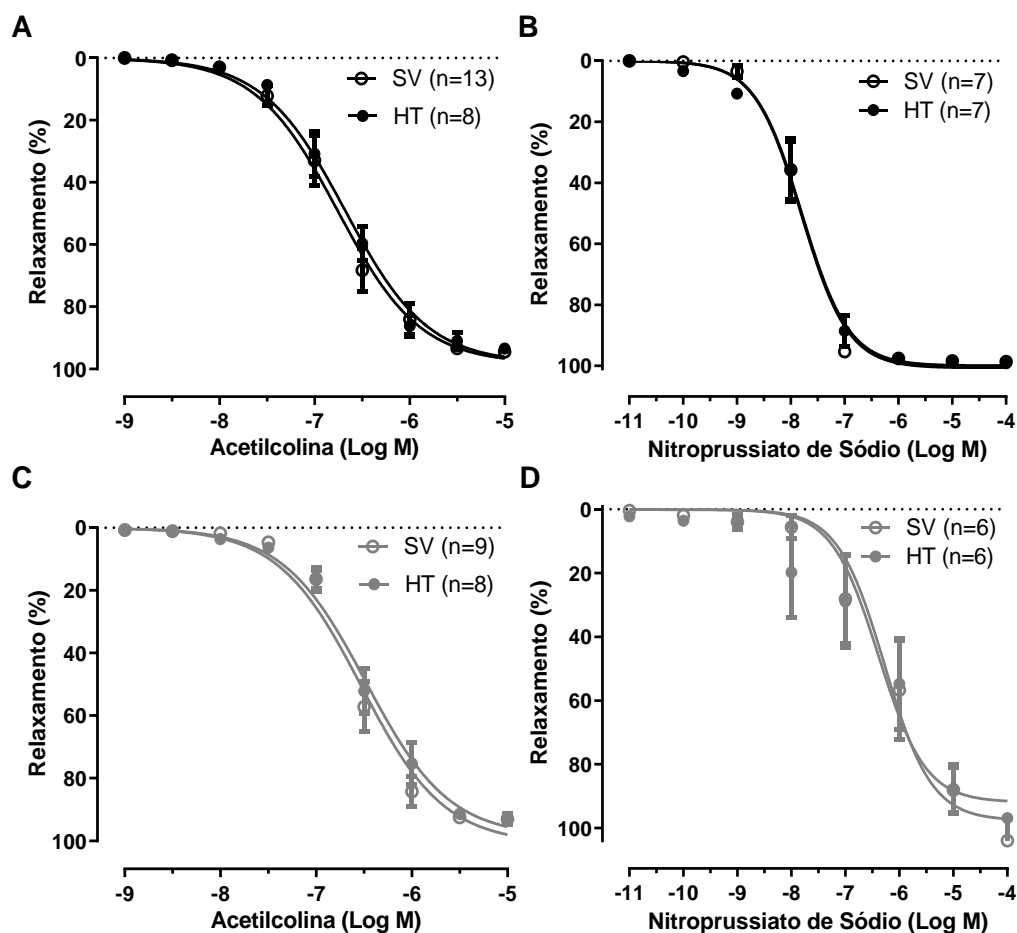


Figura 12. Curvas de concentração-resposta de (A e C) acetilcolina e (B e D) nitroprussiato de sódio em artérias de resistência mesentéricas de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT): (A e B) 8 a 12 semanas de idade; (C e D) 55 a 60 semanas de idade. ANOVA duas vias; NS.

4.7. Haploinsuficiência de *Pkd1* não determina remodelamento de artérias mesentéricas de resistência em camundongos idosos

Um estudo prévio relatou aumento da espessura da parede da aorta, sem alteração no volume luminal, em camundongos homozigotos para um alelo hipomórfico de *Pkd1* (167). Visto que aumento da razão túnica média/lúmen associa-se a evolução para lesão de órgãos alvo na vigência de fatores de risco cardiovasculares (168), também avaliamos parâmetros estruturais e mecânicos de AMRs de camundongos HT na idade de 55-60 semanas por meio de miógrafo de pressão. Com isso, observamos que o diâmetro interno de AMRs de animais HT não se apresentou alterado em relação aos de animais SV, assim como a área de secção transversa (Figuras 13A e B). Também não identificamos anormalidades de parâmetro mecânico (curva de *stress/strain*; Figura 13C) analisado em AMRs de camundongos HT, o que, em conjunto com os resultados estruturais, demonstra ausência de remodelamento vascular em decorrência da haploinsuficiência de *Pkd1*. Tais resultados indicam ausência de anormalidades mecânicas e/ou estruturais que pudessem interferir na resistência vascular periférica de camundongos HT.

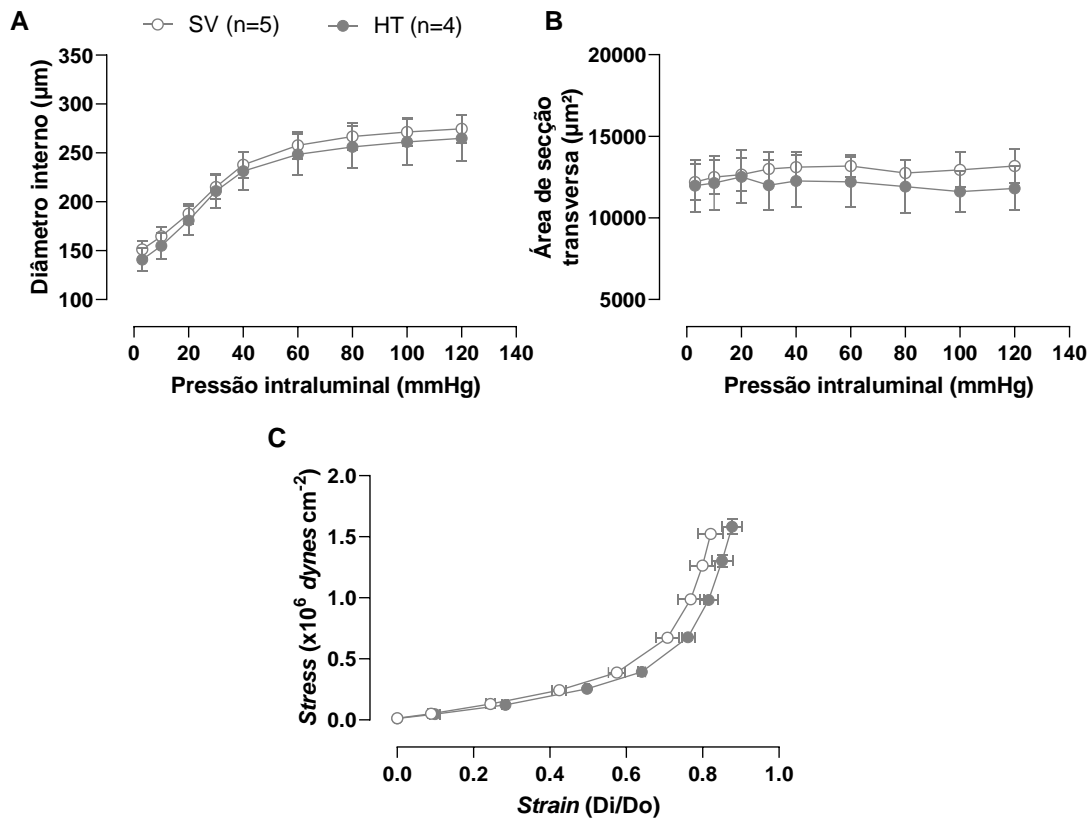


Figura 13. Análise de parâmetros estruturais: A) diâmetro interno; e B) área de secção transversa; e mecânico: C) Curva proporcional a *stress/strain* de artérias mesentéricas de resistência de camundongos selvagem (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) na idade de 55-60 semanas. Di: diâmetro interno; Do: diâmetro original; ANOVA de duas vias; NS.

4.8. Inativação em mosaico de *Pkd1* compromete significativamente o relaxamento dependente de endotélio de artérias mesentéricas de resistência em camundongos adultos

Estendemos nossa investigação a um ponto crucial ainda não resolvido na DRPAD: o papel potencial e a contribuição de um mecanismo de dois golpes para o fenótipo da doença vascular. A ausência de fenótipos vasculares de relaxamento robustos em animais haploinsuficientes para *Pkd1/Pkd2* até o momento sugere que o mecanismo de dois eventos possa ser necessário e/ou relevante para o desenvolvimento de alterações de relaxamento vascular significativas. Este modelo tem sido fortemente apoiado para cystogênese renal e hepática por vários estudos ao longo das últimas três décadas (55,56,155,156), mas não para fenótipos vasculares. Esta hipótese foi testada avaliando o

relaxamento dependente e independente do endotélio de AMRs de camundongos CI e NC na idade de 8-12 semanas. A curva de concentração-resposta frente à ACh mostrou menor indução de relaxamento em camundongos CI que em animais NC, revelando menor diferença numérica em 10^{-8} - 10^{-7} M e diferenças significativamente maiores em $5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-5} M (Rmax: $22,24 \pm 5,35\%$ vs. $46,31 \pm 7,10\%$; $p = 0,0038$; Figura 14C). Interessantemente, a exposição de anéis de AMR a doses crescentes de NPS não mostrou diferenças entre animais CI e NC (Rmax: $96,14 \pm 2,72\%$ vs. $99,86 \pm 0,82\%$, NS; Figura 14D), revelando que a inativação em mosaico de *Pkd1* não afetou o relaxamento independente do endotélio.

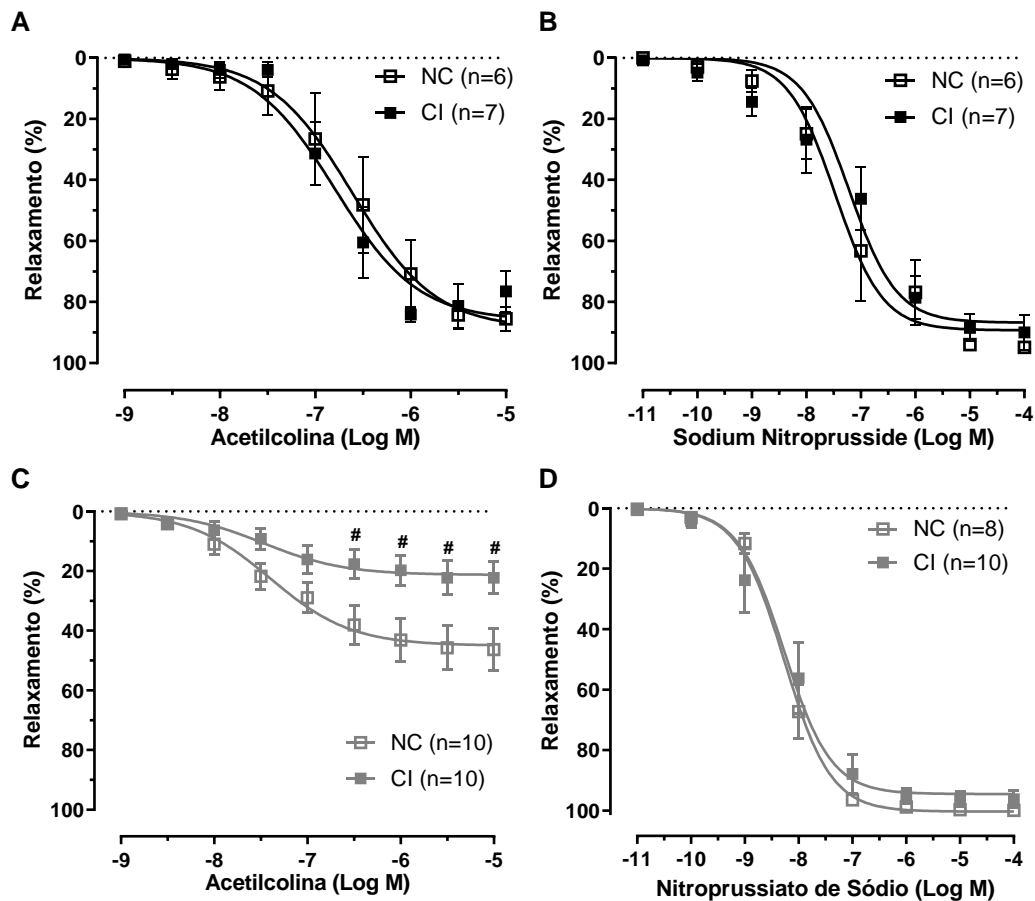


Figura 14. Curvas concentração-resposta de (A e C) acetilcolina e (B e D) nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI): (A e B) 3-4 semanas de idade; (C e D) 8-12 semanas de idade. ANOVA de duas vias, * $p < 0,05$ vs. NC 8-12 semanas.

4.9. Inativação em mosaico de *Pkd1* em idade precoce não afeta o relaxamento dependente de endotélio em artérias mesentéricas de resistência

Em seguida, tentamos responder se o relaxamento dependente do endotélio defeituoso identificado em camundongos CI adultos era um fenótipo precoce ligado à inativação celular em mosaico de *Pkd1* ou era um fenótipo tardio dependente da inativação em mosaico de longo prazo de *Pkd1* e/ou de HA crônica. As curvas de concentração-resposta de ACh obtidas em anéis de AMR de camundongos CI e NC jovens de 3-4 semanas mostraram ausência de diferença no relaxamento entre os dois grupos, bem como relaxamento normal em ambos os casos ($R_{max}: 76,52 \pm 6,62\%$ vs. $85,48 \pm 3,81\%$, NS; Figura 14A). Esses achados indicam que a inativação de *Pkd1* em mosaico no endotélio de AMRs não leva a relaxamento dependente de endotélio anormal no início da vida, mas, em vez disso, sugere que esse fenótipo observado em animais CI depende das consequências biológicas da inativação de *Pkd1* em mosaico a longo prazo e/ou da HA desenvolvida a longo prazo por tais camundongos. De fato, em um estudo anterior, documentamos aumento da PA em camundongos CI com 5 e 13 semanas de idade (98). As curvas de concentração-resposta de NPS não diferiram entre camundongos CI e NC de 3-4 semanas, revelando que a inativação de *Pkd1* em mosaico não alterou o relaxamento independente do endotélio nessa faixa etária ($R_{max}: 89,95 \pm 5,68\%$ vs $94,82 \pm 0,81\%$, NS; Figura 14B).

No entanto, é interessante notar que o relaxamento induzido por ACh foi menor em AMRs de camundongos NC na idade de 8-12 semanas em comparação com AMRs de animais NC na idade de 3-4 semanas ($R_{max}: 46,31 \pm 7,10\%$ vs. $85,48 \pm 3,81\%$; $p = 0,0008$; Figura 15). Isso foi uma grande surpresa para nós, não apenas porque se espera que *Pkd1*^{flox/flox} seja a contrapartida controle não cística e normotensa do camundongo *Pkd1*^{flox/flox}.*Nestin*^{cre} cístico e hipertenso, mas também porque nos estudos realizados até o momento os camundongos NC não apresentaram qualquer anormalidade fenotípica (90,98). Esse achado sugere a ocorrência de recombinação espontânea de loxP independente da Cre-recombinase em uma minoria de CEs *Pkd1*^{flox/flox}, um processo que foi previamente descrito no coração(169). Não houve diferença na R_{max} da curva de relaxamento induzida por NPS em AMRs de camundongos NC em ambas as idades (comparar Figuras 14D e B).

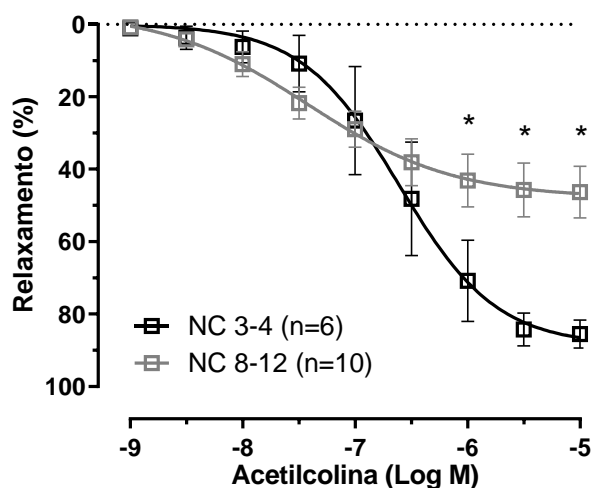


Figura 15. Curva concentração-resposta de relaxamento à acetilcolina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles não císticos (NC) com 3 a 4 semanas e 8 a 12 semanas de vida. ANOVA de duas vias; * $p < 0,005$.

Em conjunto, esses achados indicam que a inativação em mosaico de *Pkd1* não leva a relaxamento dependente do endotélio anormal em AMR no início da vida; em vez disso, sugere que esse fenótipo CI dependa das consequências biológicas da inativação em mosaico de *Pkd1* a longo prazo e/ou da PA mais alta desses camundongos. De fato, em um estudo anterior, nosso grupo registrou aumento da PA em camundongos CI com 5 e 13 semanas de idade (98). Além disso, a observação de que camundongos NC normotensos também desenvolveram algum grau de disfunção de relaxamento dependente do endotélio sugere que, pelo menos parcialmente, a inativação vascular em mosaico de *Pkd1* de longo prazo desempenhe um papel nessa anormalidade de relaxamento de AMR. Nossos achados também sugerem que o desenvolvimento de hipertensão na DRPAD não requer necessariamente reatividade vascular anormal, uma vez que camundongos CI demonstraram elevação da PA já na idade de 5 semanas (98).

4.10. Haploinsuficiência de *Pkd1* e inativação em mosaico de *Pkd1* não afetam a contração de artérias mesentéricas de resistência em resposta à noradrenalina

Para completar a avaliação de reatividade vascular em ambos os cenários de deficiência de *Pkd1*, também analisamos contração induzida por NOR em anéis de AMRs. Nossos dados não mostraram diferenças de contração entre os anéis de camundongos HT e SV nas idades de 8-12 (Rmax: $129,05 \pm 5,11\%$ vs. $136,04 \pm 3,54\%$, NS; Figura 16A) e de 55-60 semanas (Rmax: $133,95 \pm 2,72\%$ vs. $138,16 \pm 7,03\%$, NS; Figura 16B).

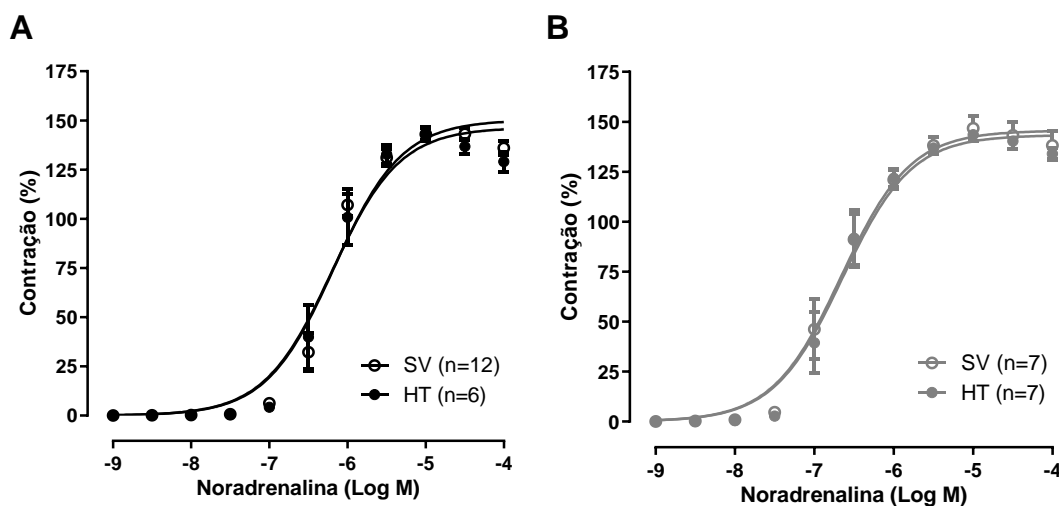


Figura 16. Curvas concentração-resposta de contração frente à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos selvagens (SV) e haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) na idade de (A) 8 a 12 semanas e (B) 55 a 60 semanas. ANOVA de duas vias; NS.

Detectamos maiores valores absolutos de contração induzida por NOR em anéis de camundongos CI comparados aos de NC na idade de 8-12 semanas; no entanto, quando os valores de tensão foram devidamente padronizados pela capacidade contrátil (ΔKCl) dos anéis individualmente, essa diferença desapareceu (Rmax: $130,99 \pm 3,62\%$ vs. $129,53 \pm 6,11\%$, NS; Figura 17). Essa normalização indica que, embora os anéis CI selecionados

possam ter maior capacidade intrínseca de contração, o efeito da NOR na maquinaria contrátil absoluta não foi maior devido ao estado deficiente de *Pkd1*.

Não analisamos a resposta contrátil à NOR em anéis de AMRs de camundongos CI e NC com 3-4 semanas de idade devido à sensibilidade tecidual. De fato, tais anéis não mantiveram o nível de contração cumulativo e consistente.

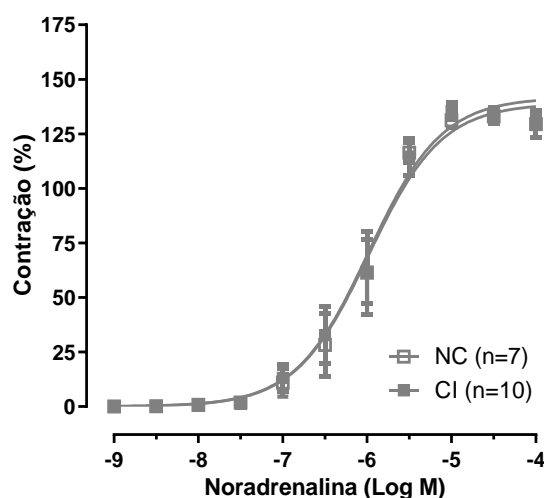


Figura 17. Curva concentração-resposta de contração frente à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) na idade de 8 a 12 semanas. ANOVA de duas vias; NS.

4.11. Estudo de Expressão Gênica

A fim de elucidar mecanismos potenciais associados aos perfis funcionais vasculares identificados em camundongos CI com 3-4 e 8-12 semanas de idade, quantificamos a expressão de 29 genes envolvidos em contração e relaxamento vascular, EO, angiogênese e vias de expressão gênica em AMRs de camundongos CI e NC em ambas as idades. As análises de RT-qPCR revelaram expressão aumentada dos genes *Cat* (*Catalase*), *Sod1*, *Sod2* (*Superoxide Dismutase 2*), *Cyba* (*Cytochrome B-245 Alpha Chain*, codifica p22pfox), *Cybb* (*Cytochrome B-245 Beta Chain*, codifica NOX2), *Nox4* (*NADPH Oxidase 4*), *Rac1* (*Rac Family Small GTPase 1*) e *Ptgs1* em AMRs de animais NC de 3-4 semanas de idade em comparação com animais de 8-12 semanas de vida (Figura 18). *Cat*, *Sod1* e *Sod2* codificam produtos antioxidantes envolvidos na regulação

do tônus vascular e seus níveis mais altos de expressão em uma idade mais jovem são consistentes com o relaxamento dependente do endotélio intacto nessa fase da vida. *Cyba*, *Cybb*, *Nox4* e *Rac1*, por outro lado, são *a priori* pró-oxidantes, porém seu envolvimento na modulação do tônus vascular é complexo. Vale destacar que a inativação do mosaico de *Pkd1* diminuiu a expressão de *Cat*, *Sod1*, *Sod2*, *Cyba*, *Cybb*, *Nox4* e *Rac1* na idade de 3-4 semanas (Figura 18). Embora não tenhamos identificado diferença no relaxamento de AMR camundongos CI e NC na idade de 3-4 semanas, a diminuição da expressão desses genes nos animais CI com essa idade pode ter impactado no relaxamento tardio dependente do endotélio observado em camundongos CI com idade de 8-12 semanas. Não observamos diferença relacionada à deficiência de *Pkd1* ou idade para *Ptgs2* (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*, codifica COX2) e *Ncf1* (*Neutrophil Cytosolic Factor 1*, codifica p47phox), ao passo que a expressão de *Ncf2* (*Neutrophil Cytosolic Factor 2*, codifica p67phox) e *Sod3* (*Superoxide Dismutase 3*) foi maior nos camundongos NC adultos em comparação com animais NC jovens, mas não diferiu entre animais CI de 3-4 e 8-12 semanas de vida (Figura 18 e Tabela 3).

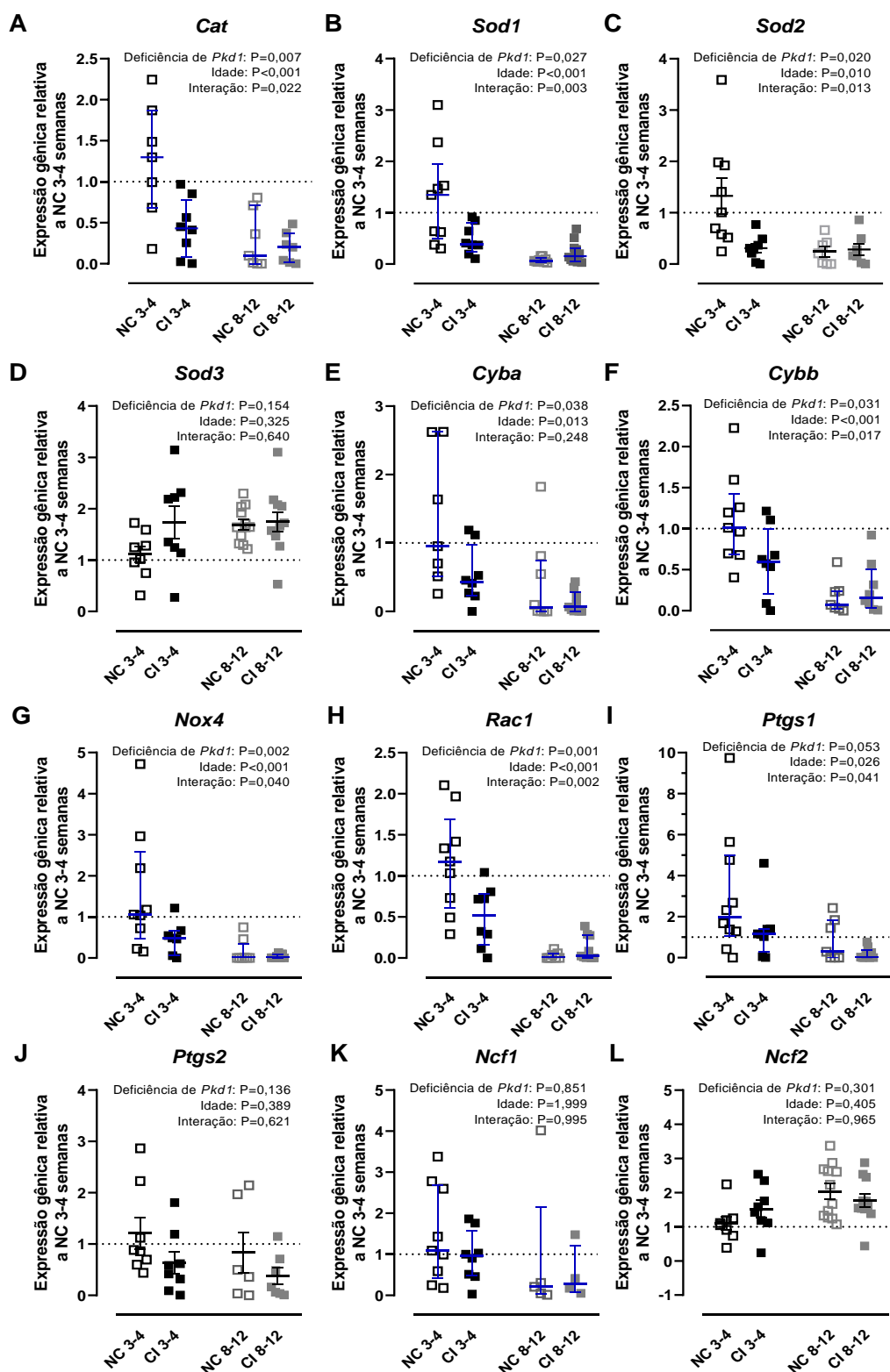


Figura 18. Expressão de (A) *Cat*, (B) *Sod1*, (C) *Sod2*, (D) *Sod3*, (E) *Cyba*, (F) *Cybb*, (G) *Nox4*, (H) *Rac1*, (I) *Ptgs1*, (J) *Ptgs2*, (K) *Ncf1* e (L) *Ncf2* em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) com 3-4 e 8-12 semanas de idade. Variáveis paramétricas: média \pm SEM (preto) analisadas por ANOVA de duas vias; variáveis não paramétricas: mediana (IQR; azul) analisadas por ART e ANOVA de duas vias.

Tabela 3. Comparações exploratórias dos resultados de RT-qPCR em artérias mesentéricas de resistência, realizadas entre grupos CI e NC em diferentes idades.

Gene	Comparações	NC 3-4 vs. CI 3-4	NC 3-4 vs. NC 8-12	CI 3-4 vs. CI 8-12
Sod3	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.11 ± 0.16 vs. 1.74 ± 0.32	1,11 ± 0,16 vs. 1,69 ± 0,10	1,74 ± 0,32 vs. 1.74 ± 0.32
	p	0.101	0,004	0.979
	teste	Não pareado	Não pareado	Não pareado
Ncf2	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.11 ± 0.19 vs. 1.53 ± 0.26	1,11 ± 0,19 vs. 2,04 ± 0,23	1,53 ± 0,26 vs. 1.77 ± 0,20
	p	0.215	0,009	0.464
	teste	Não pareado	Não pareado	Não pareado
Nos1	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.50(0.16-2.13) vs. 0.44(0.01-0.82)	1.50(0.16-2.13) vs. 0.30(0.10-1.21)	0.44(0.01-0.82) vs. 0.11(0.08-0.91)
	p	0.088	0,106	0.945
	teste	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Mann-Whitney
Nos3	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.65 ± 0.49 vs. 0.46 ± 0.11	1.26(0.39-3.06) vs. 0.06(0.00-0.47)	0.47(0.19-0.72) vs. 0.02(0.00-0.25)
	p	0.056	0,012	0.016
	teste	Não pareado	Mann-Whitney	Mann-Whitney
Ace	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.10 ± 0.15 vs. 0.39 ± 0.09	1.25(0.67-1.45) vs. 0.00(0.00-0.01)	0.38(0.12-0.60) vs. 0.01(0.00-0.16)
	p	0.001	<0,001	0.028
	teste	Não pareado	Mann-Whitney	Mann-Whitney
Edn1	média ± SEM ou mediana (IQR)	0.081(0.67-1.64) vs. 0.32(0.07-0.38)	0.081(0.67-1.64) vs. 0.04(0.00-0.32)	0.30 ± 0.09 vs. 0.15 ± 0.05
	p	0.004	<0,001	0.175
	teste	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Não pareado
Ednra	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.15 ± 0.22 vs. 0.48 ± 0.15	0.94(0.63-1.75) vs. 0.16(0.00-0.98)	0.58(0.03-0.86) vs. 0.07(0.00-0.39)
	p	0.032	<0,001	0.133
	teste	Não pareado	Mann-Whitney	Mann-Whitney
Ednrb	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.66 ± 0.54 vs. 0.26 ± 0.07	1.56(0.37-2.46) vs. 0.00(0.00-0.8)	0.29(0.00-0.35) vs. 0.01(0.00-0.29)
	p	0.039	<0,001	0.300
	teste	Não pareado	Mann-Whitney	Mann-Whitney
Vegfa	média ± SEM ou mediana (IQR)	0.84(0.61-2.17) vs. 0.36(0.14-0.59)	0.84(0.61-2.17) vs. 0.04(0.00-0.46)	0.45 ± 0.14 vs. 0.31 ± 0.12
	p	0.021	0,001	0.622
	teste	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Não pareado
Kdr	média ± SEM ou mediana (IQR)	1.35 ± 0.34 vs. 0.51 ± 0.13	0.84(0.55-2.38) vs. 0.02(0.00-0.29)	0.51(0.14-0.71) vs. 0.02(0.00-0.29)
	p	0.040	0,002	0.101
	teste	Não pareado	Mann-Whitney	Mann-Whitney

CI: cístico; NC: não cístico; SEM: erro padrão da média; IQR: intervalo interquartil.

Interessantemente, *Nos2* e *Nos3* (*Nitric Oxide Synthase 2* e *3*; codificam NOS induzível e NOS endotelial, respectivamente), em princípio genes que codificam enzimas

antioxidantes, e *Agtr1b* (*Angiotensin II Receptor Type 1b*), *Agtr2* (*Angiotensin II Receptor Type 2*), *Ace* (*Angiotensin I Converting Enzyme*), *Edn1* (*Endothelin 1*) e *Ednrb* (*Endothelin Receptor Type B*), genes associados a aumento do tônus arterial, exibiram maior expressão em AMRs de camundongos jovens que de adultos (Figura 19). Além disso, a expressão de *Edn1*, *Ednra* (*Endothelin Receptor Type A*), *Ednrb* e *Ace* mostrou-se reduzida em camundongos CI comparados a animais NC na idade de 3-4 semanas (Tabela 3), sugerindo papéis importantes de tais genes em AMRs nas fases iniciais da vida. A expressão de *Nos1* (*Nitric Oxide Synthase 1*, codifica NOS neuronal) e *Agtr1a* (*Angiotensin II Receptor Type 1a*) não diferiu em nosso estudo (Figura 19). Os genes *Rhoa* (*Ras Homolog Family Member A*), *Rock1* (*Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1*) e *Rock2* (*Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2*), cujos produtos medeiam o aumento da contração arterial, também apresentaram maior expressão em 3-4 semanas que em 8-12 semanas, mas a inativação em mosaico de *Pkd1* não afetou sua expressão em AMRs em ambas as idades analisadas (Figura 20).

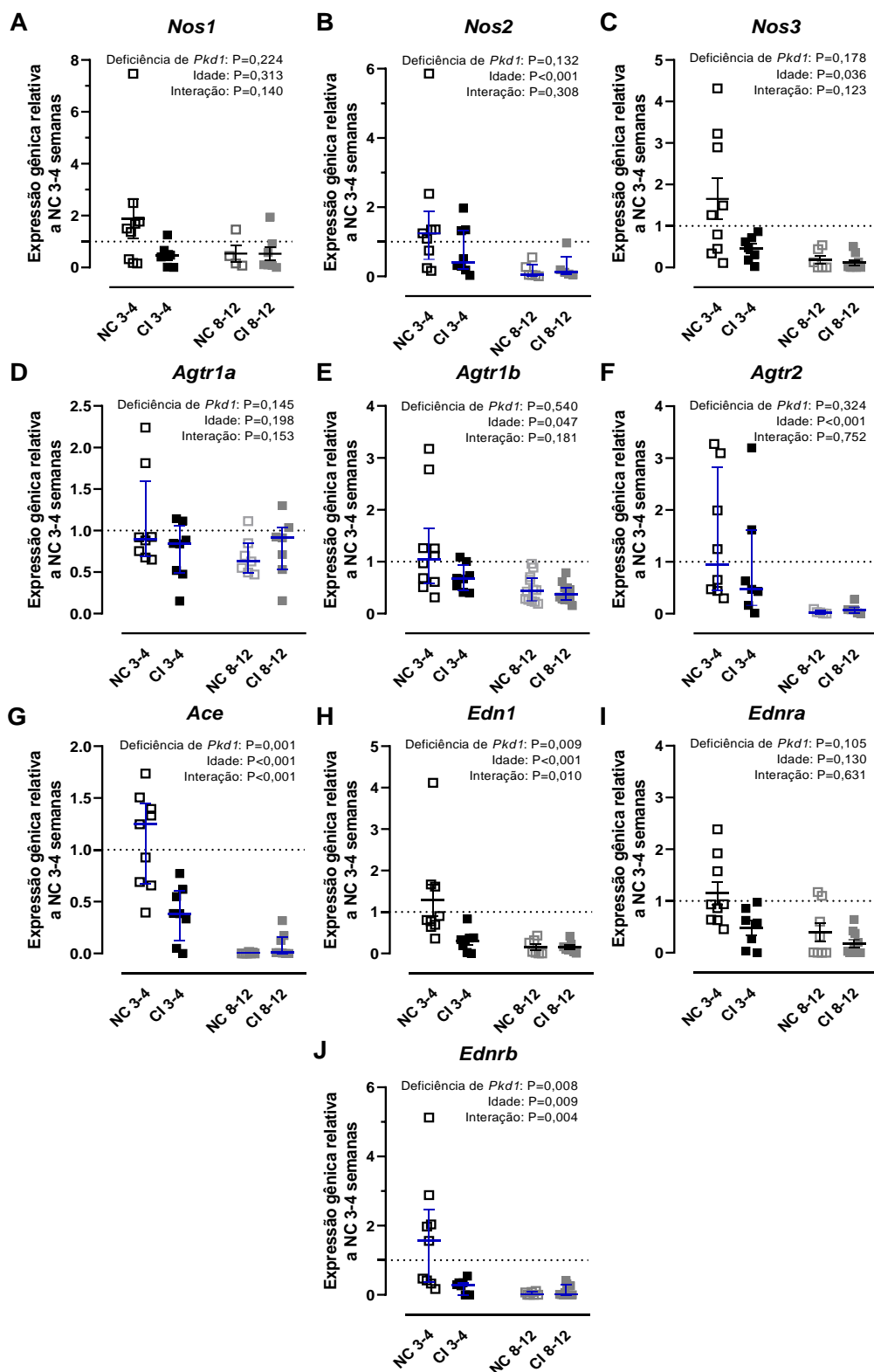


Figura 19. Expressão de (A) *Nos1*, (B) *Nos2*, (C) *Nos3*, (D) *Agtr1a*, (E) *Agtr1b*, (F) *Agtr2*, (G) *Ace*, (H) *Edn1*, (I) *Ednra* e (J) *Ednrb* em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) com 3-4 e 8-12 semanas de idade. Variáveis paramétricas: média \pm SEM (preto) analisadas por ANOVA de duas vias; variáveis não paramétricas: mediana (IQR; azul) analisadas por ART e ANOVA de duas vias.

Nosso estudo mostrou expressão aumentada de *Vegfa* (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) e *Kdr* (*Kinase Insert Domain Receptor*, codifica VEGFR2), genes envolvidos na angiogênese, em AMRs de camundongos NC de 3-4 semanas em comparação com animais NC de 8-12 semanas, um achado consistente com crescimento vascular mais proeminente na idade de 3-4 semanas (Figura 20 e Tabela 3). De fato, a expressão de ambos os genes foi menor em camundongos CI que NC na idade de 3-4 semanas (Tabela 3). Vale notar, no entanto, que esse efeito da idade não está presente em camundongos CI, sugerindo que a expressão inadequadamente diminuída desses genes angiogênicos no início da vida possa afetar o relaxamento dependente do endotélio em idades mais avançadas (Figura 20 e Tabela 3). Nosso achado de maior expressão de *Pkd1* e *Pkd2* em AMRs dos camundongos jovens que dos animais adultos não foi uma surpresa, dado o esperado desenvolvimento e crescimento vascular mais pronunciado em fases iniciais da vida (Figura 20). Interessantemente, no entanto, enquanto a inativação de *Pkd1* em mosaico induziu a diminuição da expressão de *Pkd2* em ambas as idades, a diminuição da expressão de *Pkd1* foi verificada apenas na idade de 3-4 semanas (Figura 20).

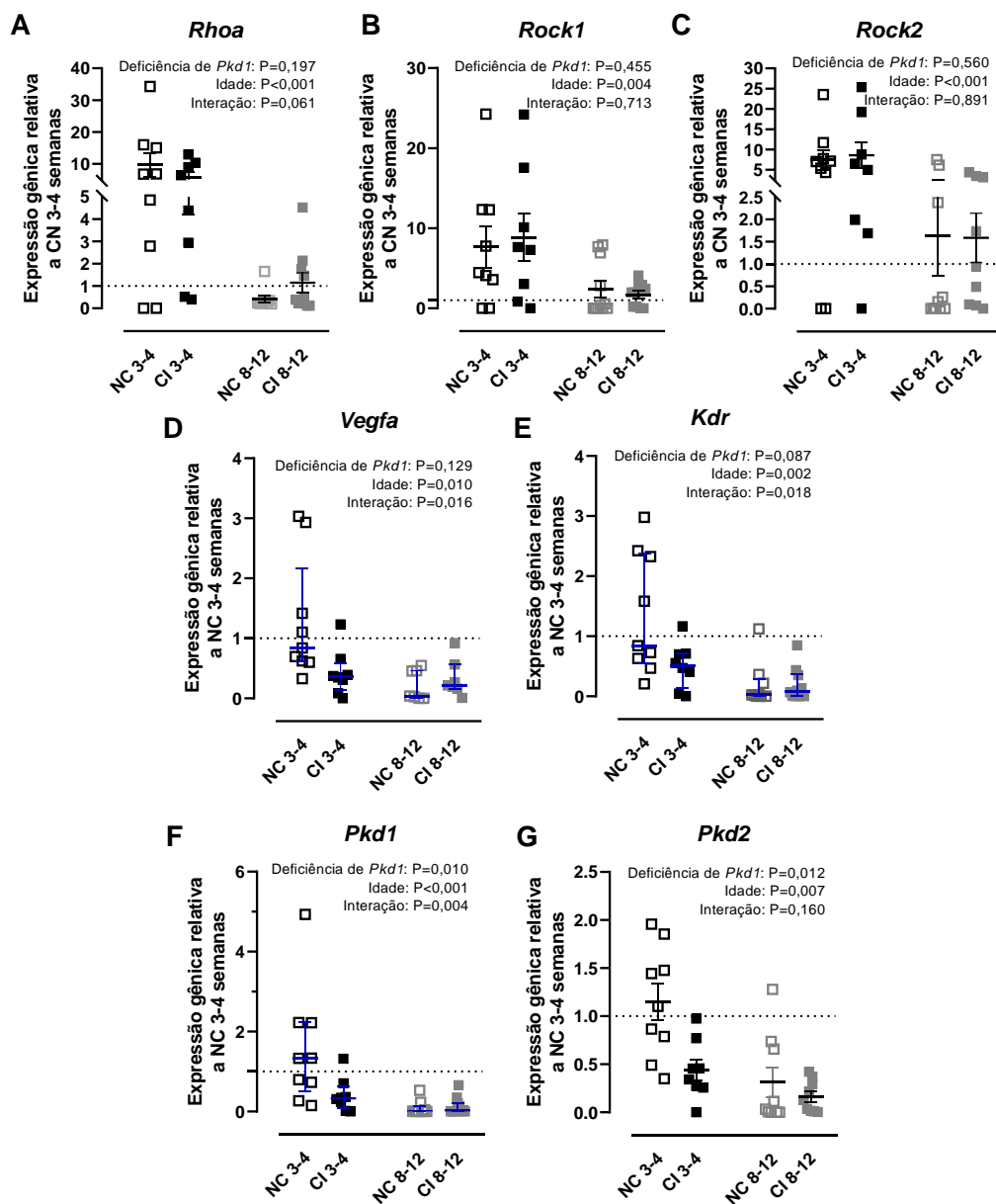


Figura 20. Expressão de (A) *Rhoa*, (B) *Rock1*, (C) *Rock2*, (D) *Vegfa*, (E) *Kdr*, (F) *Pkd1* e (G) *Pkd2* em artérias mesentéricas de resistência de camundongos não císticos (NC) e císticos (CI) com 3-4 e 8-12 semanas de idade. Variáveis paramétricas: média \pm SEM (preto) analisadas por ANOVA de duas vias; variáveis não paramétricas: mediana (IQR; azul) analisadas por ART e ANOVA de duas vias.

5. DISCUSSÃO

Anormalidades na reatividade e remodelamento vascular constituem fatores importantes no desenvolvimento e progressão da HA. Estudos anteriores utilizando aorta de modelos animais ortólogos à DRPAD, entretanto, não foram suficientes para esclarecer defeitos vasculares potencialmente envolvidos na HA nesta doença. Um estudo inicial com anéis de aorta torácica de camundongos com inativação em um ou ambos alelos de *Pkd1* especificamente em CMLVs não detectou diferenças no relaxamento induzido por ACh nas idades de 11 e 40 semanas (152). Aortas de camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* também não apresentaram defeito de relaxamento dependente do endotélio com 40 semanas, mas apresentaram contração aumentada em resposta à fenilefrina (152). O fenótipo vascular também foi explorado em aortas abdominais de camundongos haploinsuficientes para *Pkd1*. Este estudo também mostrou relaxamento induzido por ACh preservado em 12 e 20 semanas de vida, enquanto uma discreta atenuação foi observada em concentrações muito baixas de ACh na idade de 30 semanas, associada a maior PA e aumento da contração induzida por FEN (151). Além disso, utilizando artérias sem endotélio de camundongos *Pkd2^{+/-}*, os autores observaram que aorta e AMR também desenvolveram contratilidade aumentada frente à fenilefrina, a qual se associou à geração de força independente do Ca^{2+} e maior fosforilação do MLC20 (153).

No entanto, a aorta não é uma AR, portanto não é um modelo vascular apropriado para investigar fenótipos de reatividade vascular potencialmente ligados à HA. As AMRs, por outro lado, tornaram-se um modelo clássico para abordar tais questões. Usando essa abordagem, um estudo recente mostrou menor relaxamento dependente do endotélio de AMRs e maior PA em camundongos com inativação total de *Pkd1* específica para o endotélio comparados com seus controles (154). Este estudo revelou que *Pkd1* desempenha um papel significativo no endotélio e na fisiologia de AMRs. Os dados obtidos, no entanto, não podem ser traduzidos diretamente para a patogênese da DRPAD, uma vez que CEs de ARs de pacientes com DRPAD não exibem inativação completa de *Pkd1* e o modelo empregado não permite investigar o papel da deficiência de *Pkd1* em CMLVs de AMRs. Além disso, nesse estudo, o modelo de camundongo não manifesta o fenótipo da doença humana, em particular rins císticos. Atualmente, portanto, as bases

genéticas e funcionais do fenótipo das ARs na DRPAD ou em modelos animais deficientes em *Pkd1* que mimetizam a doença humana permanecem indefinidas, assim como sua contribuição para a HA associada à DRPAD. Um estudo anterior em vasos de resistência mostrou que a capacidade máxima de relaxamento induzida por ACh era diminuída em pacientes com DRPAD em comparação com indivíduos controle, revelando relaxamento dependente do endotélio prejudicado na DRPAD (161). Este estudo foi seguido por outro do mesmo grupo que mostrou que o relaxamento derivado do endotélio em pacientes com DRPAD é prejudicado mesmo na ausência de HA e que tais pacientes têm geração prejudicada de NO devido à diminuição da atividade NOSc (145). Esses estudos, no entanto, também não foram capazes de identificar as bases genéticas e moleculares deste fenótipo vascular anormal nem a contribuição potencial do fenótipo vascular para o desenvolvimento de HA, uma vez que o perfil de deficiência de *PKDI* causador não pode ser discriminado em pacientes, as contribuições potenciais dos fenótipos renal e vascular não podem ser avaliados isoladamente no paciente, e a análise em diferentes fases da vida e uma investigação robusta de vias moleculares não foram realizadas (145,161). Era crucial, portanto, conduzir esta investigação em cenários de deficiência de *Pkd1* aplicáveis à DRPAD humana. Nesse contexto, selecionamos dois modelos de camundongos ortólogos à DRPAD1: o camundongo haploinsuficiente para *Pkd1*, o qual não é cístico, é normotenso e reproduz o *background* genético celular encontrado nos pacientes com DRPAD1; e o camundongo *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}, um modelo cístico e hipertenso que reproduz o fenótipo da doença, e cujo padrão em mosaico de inativação completa de *Pkd1* permite a avaliação potencial do mecanismo de dois golpes em nível vascular. Vale destacar que este é um mecanismo levantado, mas nunca comprovado, potencialmente associado aos fenótipos vasculares na DRPAD.

Nossos dados não revelaram alterações nas curvas de relaxamento mediado por ACh e NPS em AMRs de camundongos HT e SV, tanto com 8-12 quanto com 55-60 semanas de idade. Embora estes resultados sejam essencialmente semelhantes aos dados anteriores obtidos em aorta (151,152), nossos dados revelaram que os animais HT permanecem normotensos e não císticos, e não desenvolvem remodelamento vascular significativo até aproximadamente 1 ano de idade. Esse achado é particularmente importante, uma vez que os camundongos HT apresentaram um leve aumento de ureia sérica nessa idade. Nossos resultados também mostraram que a haploinsuficiência de *Pkd1* não afetou a contração

de AMRs em resposta à NOR em ambas as faixas etárias avaliadas. Acreditamos, portanto, que nossos dados mostraram que a haploinsuficiência de *Pkd1* em AMRs não é suficiente para induzir aumento da PA, promover remodelamento vascular, causar relaxamento anormal mediado ou não por endotélio ou comprometer a fisiologia da contração, mesmo em idades avançadas.

Um achado fundamental de nosso estudo foi a redução significativa do relaxamento induzido por ACh observada em anéis de AMR de camundongos CI em comparação com os de animais NC na idade de 8-12 semanas. A ausência de tal diferença entre camundongos CI e NC na idade de 3-4 semanas tornou este resultado particularmente interessante, indicando que a diminuição do relaxamento dependente do endotélio de AMRs é um efeito relativamente tardio da inativação em mosaico de *Pkd1*. No momento, contudo, não é possível concluir se essa disfunção endotelial é causada por efeitos tardios/de longo prazo da inativação em mosaico de *Pkd1* no nível vascular, por HA crônica secundária a rins císticos desenvolvidos por camundongos CI ou por uma combinação de ambos os fatores. O fato de camundongos NC normotensos não apresentarem relaxamento normal induzido pela ACh, no entanto, sugere que a HA de longa duração não seja completamente responsável pelo fenótipo e que os efeitos de longa duração da inativação em mosaico de *Pkd1* constituam-se no deflagrador primário desta anormalidade vascular. É possível que tais efeitos possam ser mediados por vesículas extracelulares produzidas pela minoria de células vasculares com inativação bialélica de *Pkd1*, agindo sobre células vasculares selvagens. Esta hipótese reproduziria efeitos recentemente descritos de células epiteliais renais císticas sobre o fenótipo cístico renal (170). Embora a princípio não esperada, a provável ocorrência de recombinação de loxP em um número muito pequeno de CEs *Pkd1*^{flox/flox} não é um fenômeno novo, uma vez que foi previamente reportado que o processo de recombinação do sistema cre-loxP no nível do coração pode ocorrer espontaneamente ou ectopicamente (169). Não é claro, contudo, porque a recombinação espontânea ocorreu aparentemente em AMRs mas não nos rins no nosso modelo. Um estudo anterior também sustenta que efeitos de longo prazo da deficiência de *Pkd1* sejam a principal causa da disfunção endotelial na DRPAD, uma vez que o relaxamento dependente do endotélio prejudicado foi detectado em pacientes com DRPAD (145). É interessante notar que ratos PCK apresentaram disfunção endotelial já na idade de 5-6 semanas, na ausência de HA (144). Nossa hipótese é que a inativação

bialélica em mosaico de *Pkd1* nas células dos vasos pode levar a anormalidades que iniciam o dano vascular em uma idade jovem, sem causar alteração no relaxamento nesse momento. A manutenção crônica desses estímulos deletérios, no entanto, pode causar algum nível de remodelação vascular e disfunção endotelial. Embora esses efeitos nocivos possam contribuir ainda mais para a progressão da HA, deve-se notar que o desenvolvimento da HA parece não depender do déficit de relaxamento dependente do endotélio, uma vez que os camundongos CI desenvolveram aumento da PA já com 5 semanas de vida (98). Nossos dados sugerem, portanto, que o fenótipo renal cístico constitui o fator desencadeador da HA em camundongos CI, e provavelmente na DRPAD humana. Essa conclusão é consistente com um estudo anterior em ARs de humanos que revelou relaxamento dependente do endotélio prejudicado em pacientes normotensos com DRPAD (145). Neste caso, a HA ainda estava ausente mesmo na vigência de relaxamento vascular anormal. Nossos dados sobre relaxamento induzido por NPS e contração induzida por NOR, por sua vez, mostraram que a inativação em mosaico de *Pkd1* não afetou o relaxamento independente do endotélio ou a contração de AMRs em ambas as idades analisadas.

Disfunção endotelial é frequentemente associada ao EO. Interessantemente, pacientes com DRPAD em estágios iniciais apresentaram marcadores plasmáticos de EO (171,172). Nos últimos anos, as EROs foram propostas como o principal mecanismo de lesão às células e tecidos em uma ampla gama de doenças cardiovasculares. EROs associam-se com disfunção endotelial e anormalidades na permeabilidade vascular, remodelamento vascular, inflamação, apoptose, senescência celular, crescimento celular e anormalidades de migração celular (173). Nossos resultados revelaram níveis de expressão mais altos de *Sod1*, *Sod2* e *Cat* em AMRs de camundongos NC de 3-4 semanas que de animais NC com 8-12 semanas de idade. Vale notar que a expressão de *Sod1*, *Sod2* e *Cat* mostrou-se reduzida em camundongos CI comparados a animais NC na idade de 3-4 semanas. EROs podem alterar as vias de sinalização, ativando ou inativando quinases e fosfatases específicas que favorecem fosforilação de serina/tirosina. Este processo de fosforilação, por sua vez, modula a sinalização via tirosina quinase. Vias oxidativas também podem ativar fatores de transcrição sensíveis a REDOX, regulando expressão gênica e desencadear respostas fisiopatológicas (173). Nas CEs, as enzimas superóxido dismutases (SOD) são os principais geradores de espécies antioxidantes. Outros

complexos antioxidantes significativos incluem catalase, glutathione peroxidase, hemeoxigenases e o sistema tioredoxina (173). É interessante observar que pacientes normotensos com DRPAD com função renal preservada apresentam níveis plasmáticos de SOD diminuídos em comparação com indivíduos controle. Tais níveis não diferiram de pacientes com pior função renal ou hipertensos, indicando um desequilíbrio oxidativo precoce na DRPAD (172). A catalase é a principal enzima que metaboliza H_2O_2 . A superexpressão de uma catalase direcionada à mitocôndria reduziu EROs mitocondriais e dano oxidativo, e melhorou a progressão da doença cística em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1 (174). Nossos resultados são consistentes com esses dados, revelando um ambiente pró-oxidante em AMRs de animais jovens submetidos à inativação vascular em mosaico de *Pkd1*. Essa defesa antioxidante local prejudicada pode afetar negativamente a reatividade da AMR a longo prazo, assim como outras características angiogênicas essenciais. Também levantamos a hipótese de que esse desequilíbrio antioxidante possa contribuir para a HA em camundongos com esse perfil de deficiência de *Pkd1* e na DRPAD.

Observamos também menor expressão de *Cyba* (p22phox) e *Nox4* em MRAs de camundongos CI do que NC em 3-4 semanas, bem como valores mais altos nesta idade em comparação com 8-12 semanas. Esses dados requerem uma interpretação cuidadosa, uma vez que os papéis das diferentes isoformas de NADPH oxidases (NOX) na função/disfunção cardiovascular são controversos. A NOX4 foi identificada como uma proteína vasoprotetora devido à sua capacidade de gerar H_2O_2 , manter a produção de NO e induzir a expressão da enzima antioxidante hemeoxigenase-1 (175). Além disso, a deleção de *Nox4* diminuiu a angiogênese induzida por isquemia e aumentar as respostas à AngII (175). KO de *Cyba* em uma linhagem celular com superexpressão de *Nox4*, por sua vez, levou à ablação da atividade de NOX4 (176). É possível que a menor expressão de *Cyba* e *Nox4* observada em camundongos jovens CI reflita o papel de NOX4 no desenvolvimento e proteção biológica de AMRs.

A expressão de *Rac1* foi maior em AMRs de camundongos jovens do que em adultos, enquanto a inativação de *Pkd1* diminuiu sua expressão em camundongos com 3-4 semanas. RAC1 é uma GTPase envolvida em vários processos celulares, como angiogênese (177), e atua como ativador do complexo NADPH oxidase (178,179). Sua ativação por AngII contribui para o aumento da geração de EROs em células vasculares

e está relacionada a condições como hipertrofia vascular, HA e aterosclerose (178). Nossos dados sugerem que *Rac1* desempenhe um papel no desenvolvimento das AMRs ou que sua menor expressão se constitua em uma regulação compensatória ao aumento da geração de EROs em camundongos jovens com inativação de *Pkd1*.

A expressão de *Nos2* e *Nos3* em AMRs foi maior em camundongos de 3-4 semanas do que em camundongos de 8-12 semanas. A deficiência de *Pkd1* em mosaico não induziu a expressão diferencial de *Nos1*, *Nos2* e *Nos3*; no entanto, tendências não significativas de menor expressão de *Nos1* e *Nos3* foram identificadas em camundongos CI de 3-4 semanas em comparação com camundongos NC. Em ECs, a ativação de NOS pode ser induzida por vários mecanismos, incluindo tensão de cisalhamento e sinalização induzida por agonistas (124,180). Os resultados estatisticamente marginais obtidos para *Nos1* e *Nos3* em AMRs de camundongos CI jovens sugerem que níveis mais baixos de tais enzimas possam contribuir para a HA neste modelo animal e DRPAD, bem como para o fenótipo vascular de longo prazo.

A expressão de *Agtr1b*, *Agtr2* e *Ace* foi maior em AMRs de camundongos com 3-4 semanas de idade em comparação com os de 8-12 semanas. AGTR1 está envolvido na resposta contrátil arterial, interage com tirosina quinases e vias de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) e s-Src, e afeta a produção e liberação de NOR e END1. AGTR1 também está envolvido no crescimento e migração celular via conexões com JAK2, MAPKs e RHO (183,184). A ativação de AGTR2, por sua vez, está aparentemente associada a um efeito pró-vasodilatador via bradicinina-2/NO e se associa à regulação da PA e à produção renal de NO (175). Nossos dados sugerem que a maior expressão de *Agtr1b*, *Agtr2* e *Ace* em animais jovens reflete o papel do SRA na angiogênese, enquanto a ausência do efeito de *Pkd1* na expressão de *Agtr2* sugere ausência de um efeito protetor anti-HA mediado por AGTR2 em camundongos CI. A observação de menor expressão de *Ace* em camundongos CI que em camundongos NC na idade de 3-4 semanas pode sugerir de um efeito negativo da baixa expressão de *Ace* na angiogênese ou uma resposta anti-HA compensatória precoce.

AMRs de animais com 3-4 semanas apresentaram maior expressão de *Vegfa* e *Kdr* que AMRs de camundongos com 8-12 semanas de vida. Este achado não nos surpreendeu, uma vez que é esperado que fatores angiogênicos sejam expressos em níveis mais elevados nas estruturas vasculares em fases iniciais da vida. É interessante notar, contudo,

que uma menor expressão desses genes em AMRs foi observada em camundongos CI que em animais NC com 3-4 semanas de idade. Vale destacar que o desenvolvimento de cistos renais se associa à angiogênese defeituosa na DRPAD em tecidos císticos e não císticos (181). O fenótipo angiogênico em DRPAD, no entanto, foi apenas parcialmente investigado no rim e pouco avaliado em outros tecidos. VEGFA é uma molécula central na angiogênese, estando envolvido na migração e proliferação de células vasculares, permeabilidade vascular e remodelamento vascular (182–184). VEGFA regula o desenvolvimento dos vasos sanguíneos atuando nas CEs, enquanto o VEGFR2 constitui-se no receptor mais importante de VEGFA na angiogênese. Nossos resultados sugerem que a redução da expressão de *Vegfa* e *Kdr* em AMRs de camundongos CI jovens possa contribuir para sua reatividade vascular defeituosa a longo prazo. No entanto, a interpretação dos perfis de expressão obtidos para os demais genes avaliados requer informações adicionais substanciais, o que acreditamos ser assunto para estudos futuros.

Nossos dados revelaram que a inativação em mosaico de *Pkd1* em AMRs leva ao comprometimento do relaxamento dependente do endotélio, um achado não identificado na haploinsuficiência de *Pkd1*, mas presente em pacientes com DRPAD mesmo na ausência de HA. Em conjunto, esses achados sugerem que um estímulo extravascular constitui o gatilho inicial para o desenvolvimento de HA na DRPAD, provavelmente o fenótipo cístico renal, embora a disfunção endotelial também possa contribuir para isso. Nossos achados também sugerem que o relaxamento dependente do endotélio prejudicado associado à DRPAD é causado principalmente pela deficiência de *PKD1* a longo prazo, embora a HA a longo prazo também possa desempenhar um papel nessa disfunção. Um achado importante de nosso estudo, no entanto, foi a identificação de relaxamento dependente do endotélio prejudicado em um modelo de camundongo de inativação de *Pkd1* em mosaico, mas não em camundongos *Pkd1*-haploinsuficientes, sugerindo que um mecanismo genético de dois eventos seja provavelmente determinante para o desenvolvimento de tal fenótipo. Nossos dados também sugerem que a defesa antioxidante local prejudicada nos vasos de resistência possa contribuir para o fenótipo vascular defeituoso na DRPAD, bem como para o desenvolvimento de HA.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que a inativação em mosaico de *Pkd1* acarreta o comprometimento do relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas de resistência de camundongos, um fenótipo não identificado na haploinsuficiência de *Pkd1*. Nossos achados sugerem que a disfunção endotelial presente na DRPAD seja causada primariamente pela deficiência de *PKD1* a longo prazo, embora a hipertensão arterial crônica possa também participar dessa alteração vascular. Nossos resultados sugerem, por fim, que um mecanismo genético de dois eventos seja provavelmente determinante para o prejuízo do relaxamento dependente do endotélio no modelo animal empregado e na DRPAD humana, e que a defesa antioxidante local prejudicada nos vasos de resistência possa contribuir para esse fenótipo vascular.

7. REFERÊNCIAS

1. Subramanian S, Ahmad T. Polycystic Kidney Disease of Childhood. *StatPearls*. 2023.
2. Chebib FT, Torres VE. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *Am. J. Kidney Dis.* 2016;67(5):792–810.
3. Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, *et al.* Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 1992 May;41(5):1311–9.
4. Nunes ACF, Milani V, Porsch DB, Rossato LB, Mattos CB, Roisenberg I, *et al.* Frequency and clinical profile of patients with polycystic kidney disease in southern Brazil. *Ren Fail.* 2008;30(2):169–73.
5. Balbo B, Cavalcante R, Romão J, Barros R, Zatz R, Abensur H. Profile of Patients with End-Stage Renal Disease before Starting Renal Replacement Therapy, derived from a Tertiary Nephrology Center. *J Bras Nefrol.* 2007;29(4):203–8.
6. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science.* 1996 May;272(5266):1339–42.
7. Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC. Genetic complexity of autosomal dominant polycystic kidney and liver diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Jan;29(1):13-23.
8. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, *et al.* Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am. J. Med. Genet.* 2016 Jun;98(6):1193–207.
9. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, Heyer CM, Gainullin VG, Smith JM, *et al.* Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Hum Genet.* 2018 May 3;102(5):832–44.

10. Besse W, Chang AR, Luo JZ, Triffo WJ, Moore BS, Gulati A, *et al.* ALG9 Mutation Carriers Develop Kidney and Liver Cysts. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2019 Nov;30(11):2091–102.
11. Senum SR, Li Y (Sabrina) M, Benson KA, Joli G, Olinger E, Lavu S, *et al.* Monoallelic IFT140 pathogenic variants are an important cause of the autosomal dominant polycystic kidney-spectrum phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 2022 Jan;109(1):136–56.
12. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, *et al.* The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet.* 1995 Jun;10(2):151–60.
13. Streets AJ, Newby LJ, O’Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong ACM. Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jul;14(7):1804–15.
14. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014;25:18–32.
15. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, Garcia-Gonzalez MA, *et al.* Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov;104(47):18688–93.
16. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet.* 1997 Jun;16(2):179–83.
17. Bastos AP, Onuchic LF. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res.* 2011 Jul;44(7):606–17.
18. Maser RL, Calvet JP, Parnell SC. The GPCR properties of polycystin-1- A new paradigm. *Front Mol Biosci.* 2022 Nov 4;9:1200.
19. González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, *et al.* Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 30;98(3):1182–7.

20. Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Rankin CA, Smine A, Okamoto T, *et al.* The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 20;251(2):625–31.
21. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int.* 2009 Jul;76(2):149–68.
22. Hirano T, Katoh Y, Nakayama K. Intraflagellar transport-A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein–coupled receptors. *Mol Biol Cell.* 2017 Feb;28(3):429–39.
23. Grimm DH, Cai Y, Chauvet V, Rajendran V, Zeltner R, Geng L, *et al.* Polycystin-1 Distribution Is Modulated by Polycystin-2 Expression in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36786–93.
24. Chauvet V, Qian F, Boute N, Cai Y, Phakdeekitacharoen B, Onuchic LF, *et al.* Expression of *PKD1* and *PKD2* Transcripts and Proteins in Human Embryo and during Normal Kidney Development. *Am J Pathol.* 2002 Mar;160(3):973–83.
25. Li Y, Wright JM, Qian F, Germino GG, Guggino WB. Polycystin 2 Interacts with Type I Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor to Modulate Intracellular Ca²⁺ signaling. *J. Biol. Chem.* 2005 Dec 16;280(50):41298–306.
26. Kötting M, Buchholz B, Garcia-Gonzalez MA, Kotsis F, Fu X, Doerken M, *et al.* TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J Cell Biol.* 2008 Aug 11;182(3):437–47.
27. Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med.* 2003 Oct 21;9(10):1323–6.
28. Wang X, Ward CJ, Harris PC, Torres VE. Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2010 Jan;77(2):129–40.
29. Belibi FA, Reif G, Wallace DP, Yamaguchi T, Olsen L, Li H, *et al.* Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int.* 2004 Sep 1;66(3):964–73.

30. Schultz BD, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. Pharmacology of CFTR Chloride Channel Activity. *Physiol Rev.* 1999 Jan 1;79(1):S109–44.
31. 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 Jul;19(7):1300–10.
32. Yanda MK, Cebotaru L. VX-809 mitigates disease in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease bearing the R3277C human mutation. *The FASEB Journal.* 2021 Nov 18;35(11).
33. Wang X, Li VG, Harris PC, Torres VE. Effectiveness of Vasopressin V2 Receptor Antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on Polycystic Kidney Disease Development in the PCK Rat. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:846–51.
34. Torres VE, Meijer E, Bae KT, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, *et al.* 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 May 1;57(5):692–9.
35. Nagao S, Nishii K, Katsuyama M, Kurahashi H, Marunouchi T, Takahashi H, *et al.* Increased Water Intake Decreases Progression of Polycystic Kidney Disease in the PCK Rat. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2220–7.
36. Hopp K, Wang X, Ye H, Irazabal M V, Harris PC, Torres VE, *et al.* Effects of hydration in rats and mice with polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308:261–6.
37. Masyuk T V, 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 Mar;132(3):1104-16.
38. Hogan MC, Masyuk T V, Page LJ, Kubly VJ, Bergstralh EJ, Li X, *et al.* Randomized Clinical Trial of Long-Acting Somatostatin for Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:1052–61.

39. Hogan MC, Masyuk T, Bergstralh E, Li B, Kremers WK, Vaughan LE, *et al.* Efficacy of 4 Years of Octreotide Long-Acting Release Therapy in Patients With Severe Polycystic Liver Disease. *Mayo Clin Proc.* 2015 Aug 1;90(8):1030–7.
40. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, *et al.* *PKD1* induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring *PKD2*. *Cell.* 2002 Apr 19;109(2):157–68.
41. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K, *et al.* Polycystin-1, the gene product of *PKD1*, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell.* 2000 Nov;6(5):1267–73.
42. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, *et al.* The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006 Apr 4;103(14):5466–71.
43. Dere R, Wilson PD, Sandford RN, Walker CL. Carboxy Terminal Tail of Polycystin-1 Regulates Localization of *TSC2* to Repress mTOR. Blagosklonny M V., editor. *PLoS One.* 2010 Feb 16;5(2):e9239.
44. Shillingford JM, Leamon CP, Vlahov IR, Weimbs T. Folate-Conjugated Rapamycin Slows Progression of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012 Oct;23(10):1674–81.
45. Song X, Tsakiridis E, Steinberg GR, Pei Y. Targeting AMP-activated protein kinase (AMPK) for treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Cell Signal.* 2020 Sep;73:109704.
46. Zimmerman KA, Hopp K, Mrug M. Role of chemokines, innate and adaptive immunity. *Cell Signal.* 2020 Sep;73:109647.
47. Padovano V, Kuo IY, Stavola LK, Aerni HR, Flaherty BJ, Chapin HC, *et al.* The polycystins are modulated by cellular oxygen-sensing pathways and regulate mitochondrial function. *Mol Biol Cell.* 2017 Jan 15;28(2):261–9.

48. Andries A, Daenen K, Jouret F, Bammens B, Mekahli D, Van Schepdael A. Oxidative stress in autosomal dominant polycystic kidney disease: player and/or early predictor for disease progression? *Pediatric Nephrology*. 2019 Jun 13;34(6):993–1008.
49. Ma Q, He X. Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2. *Pharmacol Rev*. 2012 Oct;64(4):1055–81.
50. Lu Y, Sun Y, Liu Z, Lu Y, Zhu X, Lan B, *et al*. Activation of NRF2 ameliorates oxidative stress and cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Sci Transl Med*. 2020 Jul 29;12(554).
51. Hajarnis S, Lakhia R, Yheskel M, Williams D, Sorourian M, Liu X, *et al*. microRNA-17 family promotes polycystic kidney disease progression through modulation of mitochondrial metabolism. *Nat Commun*. 2017 Feb 16;8(1):14395.
52. Patel V, Williams D, Hajarnis S, Hunter R, Pontoglio M, Somlo S, *et al*. MiR-17~92 miRNA cluster promotes kidney cyst growth in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 25;110(26):10765–70.
53. Lee EC, Valencia T, Allerson C, Schairer A, Flaten A, Yheskel M, *et al*. Discovery and preclinical evaluation of anti-miR-17 oligonucleotide RGLS4326 for the treatment of polycystic kidney disease. *Nat Commun*. 2019 Sep 12;10(1):4148.
54. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011 Oct 23;7(10):556–66.
55. 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 Dec;87(6):979–87.
56. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, *et al*. Somatic Mutation in Individual Liver Cysts Supports a Two-Hit Model of Cystogenesis in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):247–51.
57. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of *Pkd1*. *Nat Med*. 2007 Dec 28;13(12):1490–5.

58. Takakura A, Contrino L, Zhou X, Bonventre J V, Sun Y, Humphreys BD, *et al.* Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 15;18(14):2523-31.
59. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, *et al.* Pkd1 Haploinsufficiency Increases Renal Damage and Induces Microcyst Formation following Ischemia/Reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:2389–402.
60. Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular Advances in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010 Mar 1;17(2):118–30.
61. Hopp K, Ward CJ, Hommerding CJ, Nasr SH, Tuan HF, Gainullin VG, *et al.* Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J. Clin. Invest.* 2012 Nov 1;122(11):4257–73.
62. Lanktree MB, Haghghi A, di Bari I, Song X, Pei Y. Insights into Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease from Genetic Studies. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021 May;16(5):790–9.
63. Tan AY, Zhang T, Michael A, Blumenfeld J, Liu G, Zhang W, *et al.* Somatic Mutations in Renal Cyst Epithelium in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018 Aug;29(8):2139–56.
64. Zhang Z, Bai H, Blumenfeld J, Ramnauth AB, Barash I, Prince M, *et al.* Detection of *PKD1* and *PKD2* Somatic Variants in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Cyst Epithelial Cells by Whole-Genome Sequencing. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2021 Dec;32(12):3114–29.
65. Martinez-Maldonado M, Yium JJ, Eknayan G, Suki WN. Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int.* 1972 Aug;2(2):107–13.
66. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, Torres VE, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, *et al.* Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jul;18(7):2143–60.
67. Lanktree MB, Chapman AB. New treatment paradigms for ADPKD: Moving towards precision medicine. *Nat. Rev. Nephrol.* 2017;13:750–68.

68. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*. 2007 Apr;369(9569):1287–301.
69. Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010 Mar;17(2):153–63.
70. Rahbari-Oskoui F, Williams O, Chapman A. Mechanisms and management of hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2014 Dec;29(12):2194–201.
71. Perrone RD, Ruthazer R, Terrin NC. Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct 1;38(4):777–84.
72. Arogundade FA, Akinbodewa AA, Sanusi AA, Okunola O, Hassan MO, Akinsola A. Clinical presentation and outcome of autosomal dominant polycystic kidney disease in Nigeria. *Afri Health Sci*. 2018;18(3).
73. Timio M, Monarca C, Pede S, Gentili S, Verdura C, Lolli S. The spectrum of cardiovascular abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease: a 10-year follow-up in a five-generation kindred. *Clin Nephrol*. 1992 May;37(5):245–51.
74. Savis A, Simpson JM, Kabir S, Peacock K, Beardsley H, Sinha MD. Prevalence of cardiac valvar abnormalities in children and young people with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pediatr. Nephrol*. 2023 Mar 28;38(3):705–9.
75. Krishnappa V, Vinod P, Deverakonda D, Raina R. Autosomal dominant polycystic kidney disease and the heart and brain. *Cleve Clin J Med*. 2017 Jun;84(6):471–81.
76. Chebib FT, Hogan MC, El-Zoghby ZM, Irazabal M V., Senum SR, Heyer CM, et al. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Patients May Be Predisposed to Various Cardiomyopathies. *Kidney Int Rep*. 2017 Sep;2(5):913–23.
77. Bell PE, Hossack KF, Gabow PA, Durr JA, Johnson AM, Schrier RW. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 1988 Nov;34(5):683–90.

78. De Almeida EAF, De Oliveira EI, Lopes JA, Almeida AG, Prata MM. Tissue Doppler imaging in the evaluation of left ventricular function in young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2006;47(4):587–92.
79. Chapman AB, Gabow PA. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 1997 Oct;61:S71-3.
80. Alberto Martinez-Vea, F. Alfredo Valero, Alfredo Bardaji, Cristina Gutierrez, Montse Broch, Carmen Garcia, Cristobal Richart JAO. Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Influence of Blood Pressure and Humoral and Neurohormonal Factors. *Am J Nephrol.* 2000 May-Jun;20(3):193-200.
81. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, Coleman N, Thiru S, Petry LR, *et al.* Polycystin: In vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6397–402.
82. Kuo IY, Chapman AB. Polycystins, ADPKD, and Cardiovascular Disease. *Kidney Int. Rep.* 2020;5:396–406.
83. Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R. Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12174–9.
84. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernández C, *et al.* Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation.* 2015 Jun 16;131(24):2131–42.
85. Huo R, Sheng Y, Guo WT, Dong DL. The potential role of Kv4.3 K⁺ channel in heart hypertrophy. *Channels.* 2014;8:203–9.
86. Facundo H di TF, Brainard RE, Caldas FR de L, Lucas AMB. Mitochondria and cardiac hypertrophy. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC*; 2017. p. 203–26.
87. Altamirano F, Schiattarella GG, French KM, Kim SY, Engelberger F, Kyrchenko S, *et al.* Polycystin-1 Assembles with Kv Channels to Govern

Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. *Circulation*. 2019 Jun 21;CIRCULATIONAHA.118.034731.

88. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IYT, Yuan S, Sun Z, *et al*. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 May;58:199–208.

89. Kuo IY, Kwaczala AT, Nguyen L, Russell KS, Campbell SG, Ehrlich BE. Decreased polycystin 2 expression alters calcium-contraction coupling and changes β -adrenergic signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16604–9.

90. Balbo BE, Amaral AG, Fonseca JM, de Castro I, Salemi VM, Souza LE, *et al*. Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice with phenotype rescue by galectin-3 knockout. *Kidney Int*. 2016 Sep;90(3):580–97.

91. Giehl E, Lemos FO, Huang Y, Giordano FJ, Kuo IY, Ehrlich BE. Polycystin 2-dependent cardio-protective mechanisms revealed by cardiac stress. *Pflugers Arch*. 2017 Nov;469(11):1507–17.

92. Zhou B, Carrillo-Larco RM, Danaei G, Riley LM, Paciorek CJ, Stevens GA, *et al*. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*. 2021 Sep;398(10304):957–80.

93. Jeemon P, Séverin T, Amodeo C, Balabanova D, Campbell NRC, Gaita D, *et al*. World heart federation roadmap for hypertension – A 2021 update. *Glob Heart*. 2021 Sep 10;16(1):63.

94. Tedla FM, Brar A, Browne R, Brown C. Hypertension in Chronic Kidney Disease: Navigating the Evidence. *Int J Hypertens*. 2011;2011:1–9.

95. Ecker T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol*. 2009;5:221–8.

96. Tee J, Acott P, McLellan D, Crocker J. Phenotypic Heterogeneity in Pediatric Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease at First Presentation: A Single-Center, 20-Year Review. *AM J Kidney Dis*. 2004;43(2):296–303.

97. Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T, Cassis L. The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004 Oct;287(4):F775–88.
98. Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM, *et al.* Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in *Pkd1*-deficient mice. *Kidney Int.* 2014 May;85(5):1137–50.
99. Klein IHHT, Ligtenberg G, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic Activity Is Increased in Polycystic Kidney Disease and Is Associated with Hypertension. *Am. Soc. Nephrol.* 2001 Nov;12(11):2427–33.
100. Merta M, Reiterová J, Rysavá R, Tesar V, Závada J, Jáchymová M, *et al.* Role of endothelin and nitric oxide in the pathogenesis of arterial hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol Res.* 2003;52(4):433–7.
101. Magder S. The meaning of blood pressure 11 Medical and Health Sciences 1102 Cardiorespiratory Medicine and Haematology Luigi Forni. *Critical Care.* 2018;22:257.
102. Brozovich F V., Nicholson CJ, Degen C V., Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacol. Rev. (ASPET)*; 2016;68:476–532.
103. Wang C, Luo Z, Kohan D, Wellstein A, Jose PA, Welch WJ, *et al.* Thromboxane prostanoid receptors enhance contractions, endothelin-1, and oxidative stress in microvessels from mice with chronic kidney disease. *Hypertension.* 2015 May 21;65(5):1055–63.
104. Wang D, Chabrashvili T, Wilcox CS. Enhanced Contractility of Renal Afferent Arterioles From Angiotensin-Infused Rabbits. *Circ Res.* 2004 Jun 11;94(11):1436–42.
105. Loirand G, Pacaud P. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases.* 2014 Oct 31;5(4).
106. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000 Sep-Oct;44(2):333-40.

107. Hillock-Watling C, Gotlieb AI. The pathobiology of perivascular adipose tissue (PVAT), the fourth layer of the blood vessel wall. *Cardiovasc Pathol.* 2022 Nov-Dec;61:107459.
108. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. In: American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education. *Am. J. Physiol. (APS)*; 2003. p. 201–6.
109. Somlyo AP, Somlyo A v. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews. American Physiological Society*; 2003;83:1325–58.
110. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-saito M, Amano K ichi, Harada K ichi, et al. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. *Pharmacol Rev.* 1997 Jun;49(2):157-230.
111. Westcott EB, Goodwin EL, Segal SS, Jackson WF. Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles. *J. Physiol.* 2012 Apr;590(8):1849–69.
112. Amberg GC, Navedo MF. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation.* 2013 May;20(4):281–9.
113. Perez DM. Current Developments on the Role of α 1-Adrenergic Receptors in Cognition, Cardioprotection, and Metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 2021 May 25;9:652152.
114. Man KNM, Bartels P, Horne MC, Hell JW. Tissue-specific adrenergic regulation of the L-type Ca^{2+} channel $\text{Ca}_v1.2$. *Sci Signal.* 2020 Dec 22;13(663):eabc6438.
115. Irie T, Sips PY, Kai S, Kida K, Ikeda K, Hirai S, et al. S-nitrosylation of calcium-handling proteins in cardiac adrenergic signaling and hypertrophy. *Circ Res.* 2015 Oct 9;117(9):793–803.
116. Sena CM, Gonçalves L, Seiça R. Methods to evaluate vascular function: a crucial approach towards predictive, preventive, and personalised medicine. *EPMA J.* 2022 May 20;13(2):209-235.

117. Mordi I, Mordi N, Delles C, Tzemos N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2016 Aug;34(8):1464-72.
118. Tesfamariam B, Halpern W. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 1988 May;11(5):440-4.
119. Godo S, Takahashi J, Yasuda S, Shimokawa H. Endothelium in Coronary Macrovascular and Microvascular Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021 Dec;78(6S):S19-29.
120. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, *et al*. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol Genomics*. 2018 Jan 1;50(1):1-9.
121. Kudlak M, Tadi P. Physiology, Muscarinic Receptor. *StatPearls*. 2023.
122. Zou Q, Leung SWS, Vanhoutte PM. Transient Receptor Potential Channel Opening Releases Endogenous Acetylcholine, which Contributes to Endothelium-Dependent Relaxation Induced by Mild Hypothermia in Spontaneously Hypertensive Rat but Not Wistar-Kyoto Rat Arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2015 Aug;354(2):121-30.
123. Darby WG, Potocnik S, Ramachandran R, Hollenberg MD, Woodman OL, McIntyre P. Shear stress sensitizes TRPV4 in endothelium-dependent vasodilatation. *Pharmacol Res*. 2018 Jul 1;133:152-9.
124. Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SWS. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res*. 2016 Jul 8;119(2):375-96.
125. Silva JDP da, Ballejo G. Pharmacological characterization of the calcium influx pathways involved in nitric oxide production by endothelial cells. *Einstein (Sao Paulo)*. 2019 Jun 3;17(3):eAO4600.
126. Moncada S, Higgs EA. Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 1):213-54.

127. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ. Res.* 2003;93:96–105.
128. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015 Oct;129(2):83-94.
129. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008 Apr;44(2):65-81.
130. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994 Apr;368(6474):850–3.
131. Chen YL, Sonkusare SK. Endothelial TRPV4 channels and vasodilator reactivity. *Curr Top Membr.* 2020 Jan 1;85:89–117.
132. Bátori R, Bécsi B, Nagy D, Kónya Z, Hegedüs C, Bordán Z, *et al.* Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Sci Rep.* 2017 Mar 16;7.
133. Merhi-Soussi F, Dominguez Z, Macovschi O, Dubois M, Nemoz G, Lagarde M, *et al.* Mechanisms involved in the stimulation of prostacyclin synthesis by human lymphocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2003 May;139(2):321–8.
134. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011 Oct;164(3):894–912.
135. Feng X, Zhang Y, Zhang Y, Yang X, Man D, Lu L, *et al.* Prostaglandin I₂ mediates weak vasodilatation in human placental microvessels. *Biol Reprod.* 2020 Dec 1;103(6):1229–37.
136. Morgado M, Cairrão E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012 Jan 27;69(2):247–66.
137. Lubomirov LT, Schubert R, Gagov HS, Duridanova DB, Pfitzer G. Urocortin increases the intracellular cAMP concentration and thus decreases the degree of

phosphorylation of MYPT1 and increases the myosin phosphatase activity. *Biophysics (Oxf)*. 2006 Oct;51(5):679–86.

138. Geletyuk VI, Kazachenko VNJ, Krouse ME, Schneider GT, Gage PW, Oberleithner H, *et al*. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Physiol*. 1982;86:132-42.

139. Félétou M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016 May;67(5):373–87.

140. Garland CJ, Dora KA. Endothelium-Dependent Hyperpolarization: The Evolution of Myoendothelial Microdomains. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021 Dec;78(6S):S3–12.

141. Köhler R, Hoyer J. The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models. *Kidney Int*. 2007 Jul;72(2):145–50.

142. Goto K, Kitazono T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Diabetes: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 31;20(15):3737.

143. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Contractility and Endothelium-Dependent Relaxation of Resistance Vessels in Polycystic Kidney Disease Rats. *J Vasc Res*. 1999 Nov-Dec;36(6):502-9.

144. Peterson KM, Franchi F, Loeffler DL, Psaltis PJ, Harris PC, Lerman LO, *et al*. Endothelial Dysfunction Occurs prior to Clinical Evidence of Polycystic Kidney Disease. *Am J Nephrol*. 2013;38(3):233–40.

145. 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 Oct;64(4):1381–8.

146. Al-Nimri MA, Komers R, Oyama TT, Subramanya AR, Lindsley JN, Anderson S. Endothelial-derived vasoactive mediators in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2003 May;63(5):1776–84.

147. 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 Mar 4;117(9):1161–71.
148. AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, *et al*. Ciliary Polycystin-2 Is a Mechanosensitive Calcium Channel Involved in Nitric Oxide Signaling Cascades. *Circ Res*. 2009 Apr 10;104(7):860–9.
149. Alaiwi WAA, Lo ST, Nauli SM. Primary cilia: Highly sophisticated biological sensors. *Sensors*. 2009;9(9):7003–20.
150. Ramunni A, Brescia P, Quaranta D, Bianco MS, Ranieri P, Dolce E, *et al*. Cutaneous Microcirculation Is Impaired in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract*. 2009 Jul 14;113(2):c71–5.
151. Morel N, Vandenberg G, Ahrabi AK, Caron N, Desjardins F, Balligand JL, *et al*. PKD1 haploinsufficiency is associated with altered vascular reactivity and abnormal calcium signaling in the mouse aorta. *Pflugers Arch*. 2009 Feb 5;457(4):845–56.
152. Hassane S, Claij N, Jodar M, Dedman A, Lauritzen I, Duprat F, *et al*. *Pkd1*-inactivation in vascular smooth muscle cells and adaptation to hypertension. *Lab. Invest*. 2011 Jan;91(1):24–32.
153. Qian Q, Hunter LW, Du H, Ren Q, Han Y, Sieck GC. *Pkd2*^{+/-} Vascular Smooth Muscles Develop Exaggerated Vasocontraction in Response to Phenylephrine Stimulation. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2007 Feb;18(2):485–93.
154. Hamzaoui M, Groussard D, Nezam D, Djerada Z, Lamy G, Tardif V, *et al*. Endothelium-Specific Deficiency of Polycystin-1 Promotes Hypertension and Cardiovascular Disorders. *Hypertension*. 2022 Nov 1;79(11):2542–51.
155. Tan AY, Zhang T, Michael A, Blumenfeld J, Liu G, Zhang W, *et al*. Somatic mutations in renal cyst epithelium in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2018 Aug 1;29(8):2139–56.
156. Zhang Z, Bai H, Blumenfeld J, Ramnauth A, Barash I, Prince M, *et al*. Detection of PKD1 and PKD2 somatic variants in autosomal dominant polycystic kidney cyst epithelial cells by whole-genome sequencing. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2021 Dec 1;32(12).

157. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al. A Functional Floxed Allele of Pkd1 that Can Be Conditionally Inactivated In Vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004 Dec;15(12):3035–43.
158. Betz UAK, Voßhenrich CAJ, Rajewsky K, Müller W. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol.* 1996 Oct 1;6(10):1307-16.
159. Sousa M V., Amaral AG, Freitas JA, Murata GM, Watanabe EH, Balbo BE, et al. Smoking accelerates renal cystic disease and worsens cardiac phenotype in Pkd1-deficient mice. *Sci Rep.* 2021 Jul 14;11(1):14443.
160. Couto GK, Davel AP, Brum PC, Rossoni L V. Double disruption of α 2A - and α 2C -adrenoceptors induces endothelial dysfunction in mouse small arteries: role of nitric oxide synthase uncoupling. *Exp Physiol.* 2014 Oct 1;99(10):1427–38.
161. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Endothelium-Dependent Relaxation of Small Resistance Vessels Is Impaired in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000 Aug;11(8):1371–6.
162. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ Res.* 1977 Jul;41(1):19-26.
163. Dardi P, Santos-Eichler RA dos, de Oliveira S, Vinolo MAR, Câmara NOS, Rossoni LV. Reduced intestinal butyrate availability is associated with the vascular remodeling in resistance arteries of hypertensive rats. *Front Physiol.* 2022 Sep 29;13.
164. Avendaño MS, Martínez-Revelles S, Aguado A, Simões MR, González-Amor M, Palacios R, et al. Role of COX-2-derived PGE 2 on vascular stiffness and function in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2016 May;173(9):1541–55.
165. Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, et al. Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):160–1.
166. Ahrabi AK, Terryn S, Valenti G, Caron N, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, et al. PKD1 Haploinsufficiency Causes a Syndrome of Inappropriate Antidiuresis in Mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007 Jun;18(6):1740–53.

167. Hassane S, Claij N, Lantinga-van Leeuwen IS, Van Munsteren JC, Van Lent N, Hanemaaijer R, et al. Pathogenic Sequence for Dissecting Aneurysm Formation in a Hypomorphic Polycystic Kidney Disease 1 Mouse Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Oct 1;27(10):2177–83.
168. Masi S, Georgiopoulos G, Chiriaco M, Grassi G, Seravalle G, Savoia C, et al. The importance of endothelial dysfunction in resistance artery remodelling and cardiovascular risk. *Cardiovasc Res.* 2020 Feb 1;116(2):429-437.
169. Andrusaite A, Milling S. Should we be more cre-tical? A cautionary tale of recombination. *Immunology.* 2020 Feb;159(2):131-132.
170. Ding, H, Li, LH, Harris PC, Yang J, Li X. Extracellular vesicles and exosomes generated from cystic renal epithelial cells promote cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Commun.* 2021;12:4548.
171. Klawitter J, Reed-Gitomer BY, McFann K, Pennington A, Klawitter J, Abebe KZ, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014 Dec 1;307(11):F1198–206.
172. Menon V, Rudym D, Chandra P, Miskulin D, Perrone R, Sarnak M. Inflammation, oxidative stress, and insulin resistance in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Jan 1;6(1):7–13.
173. Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: Role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Apr;11(4):791-810.
174. Daneshgar N, Baguley AW, Liang PI, Wu F, Chu Y, Kinter MT, et al. Metabolic derangement in polycystic kidney disease mouse models is ameliorated by mitochondrial-targeted antioxidants. *Commun Biol.* 2021 Dec 1;4(1).
175. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 Is a Protective Reactive Oxygen Species Generating Vascular NADPH Oxidase. *Circ Res.* 2012 Apr 27;110(9):1217–25.

176. Prior KK, Leisegang MS, Josipovic I, Löwe O, Shah AM, Weissmann N, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol.* 2016 Oct 1;9:287–95.
177. Borges RE, Batista WL, Rodrigues EG, Monteiro HP. Endothelium and Nitric Oxide: Interactions in Cancer Evolution. In: *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes.* Elsevier; 2018. p. 665–71.
178. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: The role of Rac proteins. *Circ Res.* 2006 Mar 3;98(4):453–62.
179. Pendyala S, Usatyuk P V, Gorshkova IA, Garcia JGN, Natarajan V. Regulation of NADPH Oxidase in Vascular Endothelium: The Role of Phospholipases, Protein Kinases, and Cytoskeletal Proteins. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Apr;11(4):841–60.
180. Hill-Kapturczak N, Kapturczak MH, Block ER, Patel JM, Malinski T, Madsen KM, *et al.* Angiotensin II-Stimulated Nitric Oxide Release from Porcine Pulmonary Endothelium Is Mediated by Angiotensin IV. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999 Mar;10(3):481–91.
181. Song X, Di Giovanni V, He N, Wang K, Ingram A, Rosenblum ND, *et al.* Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 1;18(13):2328–43.
182. Sun Z, Li X, Massena S, Kutschera S, Padhan N, Gualandi L, *et al.* VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAD. *J. Exp. Med.* 2012 Jul 2;209(7):1363–77.
183. Ye X, Beckett T, Bagher P, Garland CJ, Dora KA. VEGF-A inhibits agonist-mediated Ca^{2+} responses and activation of IKCa channels in mouse resistance artery endothelial cells. *J. Physiol.* 2018 Aug 15;596(16):3553–66.
184. Kim YW, Byzova T V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* 2014 Jan 30;123(5):625–31.

185. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, *et al.* Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011 Sep;301(3):C695–704.

8. Anexos

8.1. Carta do comitê de ética - 2017



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos de Diferentes Perfis de Deficiência de Pkd1 sobre o Fenótipo em Artérias de Resistência de Camundongos”, registrada com o nº 901/17, sob a responsabilidade de **Luiz Fernando Onuchic** e **Vivian Christine Dourado Pinto**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 02.08.2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 12-07-2017 Término: 12-07-2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Transgênicos: Pkd1+/, Pkd1flox/flox, Pkd1flox/flox PC e Pkd1+/-
Nº de animais	80 (20 de cada linhagem)
Peso/Idade	De 4 a 6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 02 de Agosto de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8.2. Carta do comitê de ética – 2019



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeitos de Diferentes Perfis de Deficiência de Pkd1 sobre o Fenótipo Vascular em Artérias de Resistência de Camundongos**” registrada com o n^o **1233/2019**, sob a responsabilidade de **Luiz Fernando Onuchic** e **Vivian Christine Dourado Pinto**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n^o 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n^o 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 06.02.19.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 02-01-2019 Término: 02-01-2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo transgênico PKD1KO e PKD1BC
N ^o de animais	80 PKD1KO e 120 PKD1BC
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério Central da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 06 de Fevereiro de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8.3. Artigo submetido

≡ Tese



Hypertension

Manuscript Submission and Peer Review System

[Tracking System Home](#)

[Author Help](#)

[Reviewer Help](#)

[Change Journal](#)

[Tips](#)

[Logout](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	HYPE/2023/21677
Current Revision #	0
Submission Date	28-Jun-2023 16:45
Current Stage	Submitted
Title	Mosaic Pkd1 inactivation impairs endothelium-dependent relaxation of resistance vessels in mice
Manuscript Type	Original Article
Category	Basic
Corresponding Author	Prof. Luiz Onuchic (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)
Contributing Authors	Vivian Pinto, Patrizia Dardi, Gilson Murata, Gisele K. Couto, Livia Barbosa, Elieser Watanabe, Prof. Luciana Rossoni
Abstract	<p>Background: Cardiovascular abnormalities, including hypertension, are major manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). The mechanisms involved in resistance artery dysfunction, however, remain largely unclear.</p> <p>Methods: Endothelium-dependent [acetylcholine (ACh)] and -independent relaxation [sodium nitroprusside (SNP)] were assessed in mesenteric-resistance-artery (MRA) rings of normotensive noncystic Pkd1+/- (HT), Pkd1+/+ (WT), hypertensive cystic Pkd1flox/flox:Nestincre (CY), and Pkd1flox/flox (NC) mice. Systolic blood pressure (SBP) and MRA structural and mechanical parameters were evaluated in HTs and WTs. The expression of 29 genes involved in vascular phenotypes was quantified in CY and NC MRAs.</p> <p>Results: ACh-induced relaxation did not differ between HTs and WTs at 8-12 and 55-60 weeks. Neither the time-course of SBP nor structural and mechanical parameters of MRAs were modified in HTs at 55-60 weeks. Interestingly, CYs displayed lower ACh-induced relaxation than NCs at 8-12 weeks, while this response was similar between them at 3-4 weeks. Moreover, reduced ACh response was observed in NCs at 8-12 compared to 3-4 weeks. SNP-induced relaxation was similar across all groups. Expression of Sod1, Sod2, Cat, Nos2, Nos3, Vegfa and Kdr in NC MRAs was higher at 3-4 than 8-12 weeks, whereas Sod1, Sod2 and Cat expression was lower in CYs than NCs at 3-4 weeks.</p> <p>Conclusion: Mosaic Pkd1 inactivation leads to impaired endothelium-dependent relaxation in resistance arteries, a finding not identified in Pkd1 haploinsufficiency, suggesting that a two-hit mechanism can induce a vascular phenotype. Our findings also suggest that this impairment is mainly caused by long-term Pkd1 deficiency, although long-term hypertension likely contributes to it.</p>
Associate Editor	Not Assigned
Keywords	
MESH Terms	
Authors' Electronic License Form	N/A
Preprint Server	No, I do not want to post to a preprint server at this time. This is a competitive field.
Classification	Basic
Word Count	5982

Stage	Start Date
Submitted	28-Jun-2023 16:45
Submission Pending	18-Jun-2023 13:04



[Journal Home](#) | [Instructions for Authors](#) | [Editorial Board](#) | [Contact the Journal](#) | [AHA Journals Home](#) | [Feedback](#)
[Council on Hypertension](#) | [Council on the Kidney in CVD](#) | [About AHA](#) | [AHA Ethics Policy](#) | [AHA Privacy Policy](#) | [Donate to AHA](#)
[Terms of Service](#) | [EJPress Software by eJournalPress](#) | [Licensed under Patent #US 7,620,555B1](#)
 ©2023 American Heart Association, Inc. All rights reserved. Unauthorized use prohibited.

https://hype-submit.aha-journals.org/cgi-bin/main.plex?form_type=status_details&j_id=402&ms_id=477348&ms_rev_no=0&ms_id_key=ftdKQ85y...

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

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

Manuscript Number: HYPE/2023/21677

Title: Mosaic Pkd1 inactivation impairs endothelium-dependent relaxation of resistance vessels in mice

Authors:

Vivian Pinto (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

Patrizia Dardi (University of São Paulo)

Gilson Murata (University of São Paulo)

Gisele K. Couto (Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo)

Livia Barbosa (University of São Paulo)

Elieser Watanabe (University of São Paulo)

Luciana Rossoni (University of Sao Paulo)

Luiz Onuchic (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

Mosaic *Pkd1* inactivation impairs endothelium-dependent relaxation of resistance vessels in mice

Short title: Mosaic *Pkd1* inactivation and vascular relaxation

Vivian C. D. Pinto¹; Patrizia Dardi, MS²; Gilson M. Murata, PhD¹; Gisele K. Couto, PhD²;
Lívia M. G. Barbosa, MS^{1,3}; Elieser H. Watanabe, PhD¹; Luciana V. Rossoni, MD, PhD^{2*};
Luiz F. Onuchic, MD, PhD^{1,*}

¹Divisions of Molecular Medicine and Nephrology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Department of Sciences and Mathematics, Federal Institute of Education, Science and Technology of São Paulo, São Paulo, Brazil

***Correspondence should be addressed to:**

Luiz F. Onuchic, MD, PhD

Divisions of Molecular Medicine and Nephrology

University of São Paulo School of Medicine

Avenida Dr. Arnaldo, 455 - Sala 4304, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

E-mail: lonuchic@usp.br

or

Luciana Venturini Rossoni, MD, PhD

Department of Physiology and Biophysics

Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo

Avenida Prof. Lineu Prestes, 1524 - Sala 205, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil

E-mail: lrossoni@icb.usp.br

Total words: 5982

Key words: Autosomal dominant polycystic kidney disease, *Pkd1* gene, Vascular dysfunction, Endothelium-dependent relaxation, Hypertension, Oxidative stress

ABSTRACT

Background: Cardiovascular abnormalities, including hypertension, are major manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). The mechanisms involved in resistance artery dysfunction, however, remain largely unclear.

Methods: Endothelium-dependent [acetylcholine (ACh)] and -independent relaxation [sodium nitroprusside (SNP)] were assessed in mesenteric-resistance-artery (MRA) rings of normotensive noncystic *Pkd1*^{+/-} (HT), *Pkd1*^{+/+} (WT), hypertensive cystic *Pkd1*^{flox/flox};*Nestin*^{cre} (CY), and *Pkd1*^{flox/flox} (NC) mice. Systolic blood pressure (SBP) and MRA structural and mechanical parameters were evaluated in HTs and WTs. The expression of 29 genes involved in vascular phenotypes was quantified in CY and NC MRAs.

Results: ACh-induced relaxation did not differ between HTs and WTs at 8-12 and 55-60 weeks. Neither the time-course of SBP nor structural and mechanical parameters of MRAs were modified in HTs at 55-60 weeks. Interestingly, CYs displayed lower ACh-induced relaxation than NCs at 8-12 weeks, while this response was similar between them at 3-4 weeks. Moreover, reduced ACh response was observed in NCs at 8-12 compared to 3-4 weeks. SNP-induced relaxation was similar across all groups. Expression of *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Nos2*, *Nos3*, *Vegfa* and *Kdr* in NC MRAs was higher at 3-4 than 8-12 weeks, whereas *Sod1*, *Sod2* and *Cat* expression was lower in CYs than NCs at 3-4 weeks.

Conclusion: Mosaic *Pkd1* inactivation leads to impaired endothelium-dependent relaxation in resistance arteries, a finding not identified in *Pkd1* haploinsufficiency,

suggesting that a two-hit mechanism can induce a vascular phenotype. Our findings also suggest that this impairment is mainly caused by long-term *Pkd1* deficiency, although long-term hypertension likely contributes to it.