

MAURI FÉLIX DE SOUSA

**Efeitos renais da haploinsuficiência do gene *Pkd1*
(*Polycystic kidney disease 1*) em camundongos**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

**São Paulo
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Mauri Félix de

Efeitos renais da haploinsuficiência do gene *Pkd1* (*Polycystic kidney disease 1*) em camundongos / Mauri Félix de Sousa. -- São Paulo, 2005.

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

Área de concentração: Nefrologia.

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.RIM POLICÍSTICO AUTOSSÔMICO DOMINANTE/fisiopatologia
2.CAMUNDONGOS KNOCKOUT 3.CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO
RENAL 4.TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR 5.GLOMÉRULOS
RENAIS/anatomia & histologia

USP/FM/SBD-249/05

Dedicatória

Lilia Vial
Marcelo Vial Félix de Sousa
Irajá Borges Félix de Sousa
Maurílio Félix de Sousa (†)

Agradecimentos

Ao Prof. Luiz Fernando Onuchic, pelo seu exemplo de vida, pelas orientações sempre precisas, pela sua paciência para comigo.

A Edson Moreira, Gustavo Justos, Alexandre Ceroni, Fábio França Lucas e demais membros do Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto do Coração

A Magali de Araujo, Cecília da Conceição Costa, Luís Fernando Carvalho de Menezes, Antônio Carlos Seguro, Antônio Magaldi, Isac de Castro, Cláudia Helou, Luís Yu, Varujan Dichtchekian, Maria Heloísa M Shimizu, Sílvia B de Campos, José Abi Karan, Zenaide Providello Moysés, Lúcia Conceição Andrade, Maria Amélia C. Romano, Fabiano Rodrigues Pizza, Luís Valotta, Gabriela Critchi, Ana Paula Almeida Bastos, Eloá de Sousa Neves, Nivaldo Francisco da Silva e demais membros do Laboratório de Investigações Médicas 12 da FM-USP.

A Francisco Soriano, Márcia Kiyomi Koike, Heraldo Possolo de Souza, Vera Pontieri e demais membros do Laboratório de Investigações Médicas 51 da FM-USP.

A Glória de Fátima Alves da Mota, do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto do Coração da FM-USP.

A Carlos Mandarim de Lacerda e Jorge Reis, do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

A Humberto Dellê, José Mauro Vieira Jr, Roberto Zatz, Clarice Kazue Fujihara, Luciana Faria de Carvalho, Joel Cláudio Heimann, Wagner Vargas Domingues, Denise Maria Avancini Costa Malheiros, Janice da Graça Pião da Silva, Vanda Jorgetti, Viktória Wornik, Hugo Abensur e demais membros do Laboratório de Investigações Médicas 16 da FM- USP.

A Nancy Rebouças e Vera Saddi, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

A Cíntia Santo de Godói, Sônia Aparecida Coutinho e Sílvia Ortiz, e tantos outros do Biotério Central da FM-USP

A Francisca Helena da Silva, Edna Pereira, Valéria Veloso, Dílson Antunes de Oliveira, Antônio Félix e demais companheiros que se esticaram em Goiânia para que eu estivesse em São Paulo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 <i>DOENÇA RENAL POLICÍSTICA AUTOSSÔMICA DOMINANTE.....</i>	01
1.1.1 <i>Epidemiologia.....</i>	01
1.1.2 <i>Manifestações e Curso Clínico.....</i>	02
1.1.3 <i>Genes Modificadores.....</i>	07
1.1.4 <i>Patogênese Molecular e Celular.....</i>	09
1.2 <i>MODELOS DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA OS GENES ORTÓLOGOS Pkd1 E Pkd2.....</i>	14
1.3 <i>IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS FUNCIONAIS EM MODELOS ANIMAIS PARA A ELUCIDAÇÃO DA PATOGÊNESE DA DRPAD.....</i>	19
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 <i>MODELO ANIMAL.....</i>	23
3.2 <i>GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS.....</i>	24
3.3 <i>ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE CAMUNDONGOS.....</i>	27
3.4 <i>MENSURAÇÃO DE CLEARANCE DE INULINA.....</i>	29
3.5 <i>ANÁLISE DA CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO RENAL.....</i>	32
3.5.1 <i>Gaiola Coletora de Urina para Camundongos.....</i>	32
3.5.2 <i>Protocolo Experimental.....</i>	34

3.6	<i>PATOLOGIA RENAL E HEPÁTICA</i>	36
3.7	<i>ESTEREOLOGIA GLOMERULAR</i>	37
3.8	<i>DETERMINAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITRITO/NITRATO</i>	38
3.9	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	39
4	RESULTADOS	40
4.1	<i>GENOTIPAGEM E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA PARA GERAÇÃO DE CAMUNDONGOS $Pkd1^{+/-}$ E $Pkd1^{+/+}$</i>	40
4.2	<i>SOBREVIDA ANIMAL</i>	41
4.3	<i>ANÁLISES DE CLEARANCE DE INULINA</i>	43
4.4	<i>ANÁLISES DA CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO RENAL</i>	46
4.4.1	<i>Estudos Fundamentais</i>	46
4.4.2	<i>Análise de Osmolalidade Urinária Máxima Induzida por Privação Hídrica e Administração de Desmopressina</i>	48
4.4.3	<i>Análise da Concentração Renal em Camundongos Submetidos a Administração de Desmopressina após Administração de Água por Gavagem</i>	49
4.5	<i>ANÁLISES ANÁTOMO-PATOLÓGICAS</i>	51
4.6	<i>ANÁLISES DO NÚMERO DE UNIDADES GLOMERULARES E DO VOLUME GLOMERULAR</i>	53
4.7	<i>ANÁLISE DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITRITO/NITRATO</i>	54
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	67
7	ANEXOS	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	Apêndice	

RESUMO

Sousa MF. *Efeitos renais da haploinsuficiência do gene Pkd1 em camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 95p.

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma enfermidade comum, caracterizada pela substituição de túbulos renais normais por cistos, num processo que resulta em insuficiência renal crônica terminal em até 50% dos pacientes. Mutações no gene *Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1)* são responsáveis por aproximadamente 85% dos casos de DRPAD. Reduções no ritmo de filtração glomerular (RFG) e na capacidade de concentração renal são anormalidades funcionais renais associadas à doença, a última freqüentemente antecedendo a primeira por vários anos. Embora múltiplas linhas de evidência tenham mostrado que os cistos surgem a partir de um mecanismo de “dois-golpes”, a patogênese das manifestações não-císticas é pobremente compreendida. Nesta tese, usamos uma linhagem de camundongos endogâmica (129Sv) com uma mutação nula em *Pkd1* para estudar este problema. Animais heterozigotos apresentaram formação cística renal mínima e esporádica abaixo de 40 semanas de idade, e camundongos fêmeas *Pkd1*^{+/+} tiveram uma maior sobrevivência que fêmeas *Pkd1*^{+/-}. Analisamos o clearance de inulina em machos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} com 187 a 237 dias de idade e mostramos que o mesmo foi significativamente reduzido nos heterozigotos (0,88±0,02 vs 1,13±0,05 ml/min/100g PC; p<0,001). O número de glomérulos, analisado usando a técnica de estereologia, foi significativamente menor em machos *Pkd1*^{+/-} que *Pkd1*^{+/+} (20.039±1.699 vs 26.923±2.567/rim esquerdo; p<0,05), enquanto o volume médio de todos os glomérulos foi maior em heterozigotos (349.256±49.510 vs 249.133±22.310 μm³; p<0,05). A excreção urinária de NO₂/NO₃ não diferiu significativamente entre os dois grupos (0,30±0,04 vs 0,38±0,04 μM/mg Cr em machos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+}, respectivamente; p=0,184). Não foi detectada diferença significativa de peso renal entre heterozigotos e controles selvagens. Avaliamos a osmolalidade urinária máxima em machos e fêmeas *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+}, dentro de uma faixa de idade de 212-282 dias, porém não foi detectada diferença significativa entre os grupos heterozigoto e selvagem (3.540±375 vs 3.523±135 mOsm/kg H₂O em machos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+}; p=0,968, e 3.247±380 vs 3.342±284 mOsm/kg H₂O em fêmeas *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+}; p=0,852). Nossos resultados sugerem que a haploinsuficiência de *Pkd1* determine reduções do número de néfrons e do RFG, mas não diminuição significativa da capacidade de concentração renal neste modelo animal. Estes achados oferecem a primeira evidência direta de que a haploinsuficiência de *Pkd1* resulta em anormalidades anatômicas e funcionais renais. Nossos dados sugerem que a haploinsuficiência de *Pkd1* possa resultar na redução do número de néfrons por diminuir a ramificação tubular renal durante a nefrogênese.

Descritores: 1.RIM POLICÍTICO AUTOSSÔMICO DOMINANTE/fisiopatologia
2.CAMUNDONGOS KNOCKOUT 3.CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO RENAL
4.TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR 4.GLOMÉRULOS RENAI/anatomia e histologia.

SUMMARY

Sousa MF. *Renal effects of Pkd1 gene haploinsufficiency in mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 95p.

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a common disorder characterized by cystic replacement of normal renal tubules in a process that results in end stage kidney disease in up to 50% of the patients. Mutations in the *Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1)* gene are responsible for approximately 85% of the ADPKD cases. Decreases in glomerular filtration rate (GFR) and renal concentrating capacity are typical renal functional abnormalities associated with the disease, the latter often predating the former by several years. While a number of lines of evidence have shown that cysts arise through a “two-hit” mechanism, the pathogenesis of non-cystic features has been poorly understood. We have used an inbred (129Sv) mouse line with a null mutation of *Pkd1* to study this problem. Heterozygotes had minimal and sporadic renal cyst formation below 40 weeks of age and female *Pkd1*^{+/-} mice had a longer survival than *Pkd1*^{+/-} females. We analyzed inulin clearance in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} males at 187-237 days of age and showed that it was significantly reduced in heterozygotes (0.88±0.02 vs 1.13±0.05 ml/min/100g BW; p<0.001). The number of glomeruli, analyzed using the stereology technique, was significantly lower in *Pkd1*^{+/-} than in *Pkd1*^{+/+} males (20,039±1,699 vs 26,923±2,567/left kidney; p<0.05), while a higher average volume of all glomeruli was observed in heterozygotes (349,256±49,510 vs 249,133±22,310 μm³; p<0.05). The urinary excretion of NO₂/NO₃ did not significantly differ between the two groups (0.30±0.04 vs 0.38±0.04 μM/mg Cr in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} males, respectively; p=0.184). No significant difference in kidney weight was detected between heterozygotes and wild type controls. Maximal urinary osmolality was evaluated in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} males and females within the 212-282 day age range, but no significant difference was detected between the heterozygous and the wild type groups (3,540±375 vs 3,523±135 mOsm/kg H₂O in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} males; p=0.968, and 3,247±380 vs 3,342±284 mOsm/kg H₂O in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} females; p=0.852). Our results suggest that *Pkd1* haploinsufficiency determines reductions in nephron number and GFR but no significant decrease in renal concentrating ability in this animal model. These findings provide the first direct evidence that haploinsufficiency for *Pkd1* results in anatomic and functional abnormalities of the kidney. Our data suggest that *Pkd1* haploinsufficiency may result in a reduced number of nephrons by diminishing renal tubule branching during nephrogenesis.

Descriptors: 1.AUTOSOMAL DOMIMINANT POLYCYSTIC KIDNEY/physiopathology 2.KNOCKOUT MICE 3.KIDNEY CONCENTRATING ABILITY 4.GLOMERULAR FILTRATION RATE 5. KIDNEY GLOMERULUS/anatomy & histology

INTRODUÇÃO

DOENÇA RENAL POLICÍSTICA AUTOSSÔMICA DOMINANTE

Epidemiologia

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) constitui-se numa das doenças hereditárias humanas mais comuns, com uma prevalência populacional de 1:400 a 1:1000 em populações de etnia ou descendência europeia¹. De fato, esta enfermidade é 10 vezes mais comum que a anemia falciforme, 15 vezes mais comum que a fibrose cística e 20 vezes mais comum que a doença de Huntington². A variação da prevalência da DRPAD deve-se a variações populacionais e a diferentes critérios de observação populacional, que podem incluir laudos de necropsia, sintomatologia e/ou critérios genéticos. O desenvolvimento progressivo de técnicas de diagnóstico mais sensíveis tende a favorecer estimativas mais precisas^{3,4}.

Em dezembro de 2001 a DRPAD responsabilizava-se por 4,3% dos pacientes em diálise crônica nos EUA, situando-se como a quarta causa mais freqüente de insuficiência renal crônica dialítica (IRCd) nesse país⁵. Deve-se destacar, ainda, que entre 1990 e 2001 a prevalência da DRPAD em pacientes com IRCd aumentou 57% nos EUA. Entre 1998 e 2001, indivíduos do sexo masculino representavam 53% dos pacientes. A idade na qual o paciente inicia diálise, por sua vez, tem se elevado ao longo das últimas décadas: subiu de 51,1

anos, em 1972, para 54,4 anos em 2001. No nível populacional, portanto, a DRPAD representa um acentuado ônus social e econômico⁶.

Manifestações e Curso Clínico

Embora a DRPAD seja a doença monogênica renal mais comum e apresente um fenótipo renal predominante, ela constitui-se numa doença sistêmica^{2, 3}. Assim, além de cistos renais múltiplos presentes bilateralmente, característicos da doença, a mesma pode se acompanhar de cistos hepáticos, aneurismas intracranianos, anormalidades valvares cardíacas e outras manifestações extra-renais menos freqüentes. A penetrância da doença é virtualmente completa e apenas cerca da metade dos pacientes atingem os 58 anos de idade sem insuficiência renal crônica terminal (IRct)⁷.

A insuficiência renal constitui-se na complicação clássica e de maior repercussão populacional da DRPAD. Um estudo relata que o declínio do ritmo de filtração glomerular (RFG) foi de aproximadamente 5 ml/min ao ano, após ter atingido 50 ml/min. A variabilidade fenotípica renal, contudo, é enorme. Enquanto muitos indivíduos nunca chegam a desenvolver IRC avançada, a doença pode se manifestar na infância e mesmo cursar com IRC severa em crianças⁸.

Vários fatores de risco se associam a progressão mais acentuada da doença renal na DRPAD. Tais fatores incluem diagnóstico em idade mais jovem, insuficiência renal incipiente em indivíduos relativamente jovens, hipertensão arterial, maior taxa de crescimento do volume renal, episódios de hematúria macroscópica, história de infecções do trato urinário em homem, tabagismo, sexo

masculino e índice de massa do ventrículo esquerdo aumentado. A presença concomitante de vários fatores de risco, por sua vez, aumenta consideravelmente o risco de progressão para doença renal terminal em ambos os sexos⁸. Em um estudo clássico, todos os indivíduos do sexo masculino com diagnóstico de DRPAD e com um episódio de hematúria macroscópica antes dos 30 anos de idade e com documentação de hipertensão arterial antes dos 35 anos não apresentaram sobrevida renal aos 48 anos de idade, ao passo que nenhum dos pacientes sem qualquer desses três fatores de risco apresentou tal evolução nessa idade⁹.

A DRPAD é geneticamente heterogênea, podendo decorrer de mutações em dois genes distintos: *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) e *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*). A existência de loci adicionais é atualmente questionada¹⁰. Os pacientes com mutação no gene *PKD2* tendem a se associar a um fenótipo menos severo e apresentam um prognóstico melhor que os com mutação no gene *PKD1*. A idade média para IRCt é de 54 anos na DRPAD1 e de 74 anos na DRPAD2. Além disso, a DRPAD1 apresenta uma maior propensão à hipertensão arterial, a história de infecção do trato urinário e a hematúria que a DRPAD2¹¹.

Mais da metade dos pacientes com DRPAD desenvolvem hipertensão arterial antes de apresentarem redução significativa do RFG. Acredita-se que as expansões císticas renais possam estar envolvidas na gênese da hipertensão arterial associada à DRPAD, determinando uma maior liberação de renina devido a áreas locais de isquemia renal¹². Em suporte a esta hipótese, na DRPAD uma redução do fluxo sanguíneo renal pode preceder o desenvolvimento de hipertensão ou ser encontrada em seu estágio inicial¹³. Além da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), o aumento da atividade simpática, o aumento da geração de

endotelina e a diminuição da produção de óxido nítrico (NO) também podem contribuir para a vasoconstrição renal, para a remodelação da microcirculação e para o desenvolvimento de insuficiência renal^{13, 14}. Estudos microangiográficos¹⁵ e histopatológicos¹⁶ mostraram que o número de arteríolas e pequenas artérias está acentuadamente diminuído em rins policísticos, e que estes vasos apresentam espessamento da média e aumento da razão parede/lúmen¹⁷. A presença de nefroangiosclerose observada em rins com DRPAD, portanto, é consistente com um papel da isquemia na progressão da doença renal. De fato, através de medidas de ressonância magnética, King e cols. mostraram que parâmetros hemodinâmicos renais constituem-se em preditores fortes da função renal¹³.

Várias outras complicações renais podem surgir e se desenvolver no curso clínico da DRPAD. Entre elas destacam-se dor em flanco, lombar ou abdominal, a qual pode se tornar incapacitante e requerer tratamento cirúrgico⁸, e infecção do trato urinário e de cistos renais. Além disso, tais pacientes apresentam maior frequência de nefrolitíase, uma complicação aparentemente associada a obstrução anatômica intrarenal e a redução de magnésio e citrato na urina¹⁸. Hematúria, frequentemente macroscópica, é comum e pode ser o sintoma inicial da doença. Fatores precipitantes como infecção de trato urinário e exercício intenso podem ser frequentemente identificados. Por fim, na DRPAD o carcinoma de células renais apresenta, aparentemente, um comportamento biológico mais agressivo⁸.

Fick e cols. mostraram, em 1994, que crianças com DRPAD com mais de 10 cistos renais apresentavam RFG maior que as sem cistos pertencentes às mesmas famílias, incluindo crianças portadoras e não portadoras da doença. As crianças com 1 a 10 cistos, por sua vez, apresentaram RFG intermediário, sem diferença estatística

em relação aos dois outros grupos¹⁹. Mais recentemente, Wong e cols. também compararam o RFG entre crianças e adolescentes com diagnóstico de DRPAD feito com base em história familiar e ultra-sonografia renal positiva, com um grupo controle equivalente. Utilizando técnicas baseadas em Tc99m e nível plasmático de cistatina-C, este estudo também encontrou RFG aumentado no grupo com DRPAD²⁰. Estes resultados sugerem que a filtração glomerular possa estar aumentada nas fases iniciais da DRPAD, porém a explicação para tais achados permanece desconhecida.

Entre as anormalidades funcionais renais associadas à DRPAD, a redução da capacidade de concentração renal é a que se expressa mais precocemente. Embora seja uma anormalidade leve, não acompanhada por poliúria ou polidipsia, ela pode ser detectada já na infância. Fick cols. encontraram em crianças com DRPAD severa (mais de 10 cistos) diminuição da osmolalidade urinária máxima após 12 horas de jejum em relação ao grupo de crianças com DRPAD moderada (de 1 a 10 cistos) e ao grupo sem cistos (com ou sem DRPAD)¹⁹. Estes dados sugerem uma relação estreita entre o número de cistos e a alteração da concentração urinária.

Da mesma forma, adultos acometidos pela doença com função renal normal apresentam osmolalidade urinária máxima mais baixa que os respectivos membros da família não afetados²¹. Um estudo mais recente confirma estas observações, além de demonstrar a existência de disfunção tubular proximal em pacientes com DRPAD²². O fato dos indivíduos com rins maiores cursarem com maior prejuízo da capacidade de concentração sugere que a distorção da arquitetura renal decorrente da formação de cistos seja, ao menos parcialmente, responsável por esta anormalidade funcional. Observações recentes de Seeman e cols. suportam esta associação, mostrando que a redução da capacidade de concentração se

correlaciona com o número de cistos renais e os níveis de pressão arterial²³. As dificuldades inerentes de estudos clínicos, contudo, impedem uma análise fina desse mecanismo fisiopatológico.

A manifestação extra-renal mais comum da DRPAD é a ocorrência de cistos hepáticos. Os mesmos são detectados em apenas 10% a 17% dos pacientes com idade inferior a 40 anos e em 70% a 75% dos pacientes acima de 60 anos²⁴. A doença cística hepática é mais severa em pacientes com doença renal cística mais intensa e com função renal mais comprometida, acometendo 60% a 75% dos pacientes com DRPAD em IRCt. Embora a prevalência de cistos hepáticos em indivíduos não urêmicos seja similar entre homens e mulheres, o envolvimento cístico severo do fígado afeta principalmente as mulheres, particularmente multíparas. A função hepática, contudo, é classicamente preservada na DRPAD. Os cistos hepáticos da DRPAD se originam do epitélio biliar intra-hepático, eventualmente se separando dos ductos biliares de origem. Embora sejam geralmente assintomáticos, o surgimento de complicações não é incomum, podendo incluir infecção e neoplasias²⁴.

A prevalência de aneurismas assintomáticos em pacientes com DRPAD, avaliada através de trabalhos prospectivos, é de 4 a 12%, bastante superior à prevalência de 1% encontrada na população geral²⁵. Os aneurismas intracranianos podem produzir sintomas por 3 mecanismos: compressão de estruturas adjacentes, isquemia cerebral focal causada por embolia e hemorragia subaracnóidea conseqüente a sua ruptura. A ruptura de aneurisma intracraniano (AIC) consiste na complicação mais séria da DRPAD, com mortalidade de cerca de 50% e morbidade devastadora em 50% dos sobreviventes²⁴. Kaehny e Everson sugeriram que pacientes

com DRPAD apresentam uma mortalidade maior quando sofrem ruptura de AIC devido à maior prevalência de insuficiência renal e hipertensão nestes que em pacientes sem DRPAD. Além disso, a ruptura de AIC ocorre mais precocemente em pacientes com DRPAD. Sua ampla maioria, de 64% a 80% dos casos, ocorre antes dos 50 anos de idade, ao passo que em pacientes sem DRPAD apenas 40% a 45% das rupturas ocorrem antes desta idade. Outras anormalidades vasculares relatadas em pacientes com DRPAD incluem aneurismas de aorta torácica e abdominal, ilíacos, dolicoectasia de artéria intracraniana, dissecação de artéria intracraniana e artéria megadolico basilar²⁶.

Genes Modificadores

Observações de variabilidade fenotípica intrafamiliar e resultados obtidos em modelos murinos sugerem que genes modificadores influenciem a progressão da doença renal na DRPAD. Estes loci modificadores poderiam afetar a cystogênese e/ou a progressão dos cistos, assim como outras disfunções. Baseados na demonstração de disfunção endotelial em camundongos *Pkd1*^{+/-} e em pacientes com DRPAD, Persu e cols. avaliaram o efeito modificador potencial da NO sintase endotelial (eNOS) sobre o curso da doença renal na DRPAD²⁷. Neste estudo, os investigadores encontraram associação entre o polimorfismo Glu298Asp da eNOS e maior gravidade da doença renal na DRPAD no sexo masculino e propuseram que um defeito na liberação de NO pelas células endoteliais poderia acelerar a perda da função renal. Estes resultados também sugeriram que as policistinas pudessem participar da regulação da eNOS²⁸. Entretanto, um outro estudo de Walker e cols.,

realizado apenas com pacientes com DRPAD1 e com maior controle dos fatores básicos populacionais, não confirmou estes achados²⁹. Diante deste quadro conflitivo, Fain e cols. avaliaram 315 pacientes de 83 famílias com DRPAD1, mostrando que genes modificadores são fatores importantes na variabilidade inter e intra-familiar da doença. Tais autores sugerem, portanto, que os resultados conflitantes em relação ao polimorfismo de *eNOS* se devem a outras diferenças genéticas ou não genéticas das populações estudadas ou a efeito relativamente pequeno deste gene em relação a outros modificadores³⁰.

Estudos iniciais sugeriram que pacientes com DRPAD homozigotos para o alelo D do polimorfismo do gene da ECA apresentavam risco aumentado para desenvolvimento mais precoce de IRCt^{31, 32}. No entanto, estudos mais recentes não confirmaram estes achados. Ecker e cols., por exemplo, avaliando uma população de 409 pacientes caucasianos com DRPAD, não encontraram diferença significativa em relação ao polimorfismo I/D do gene da ECA e desenvolvimento de IRCt, prevalência de hipertrofia ventricular esquerda, pressão arterial, proteinúria, idade de diagnóstico de hipertensão e volume renal³³. Deve-se ressaltar que van Dijk e cols. não foram capazes de detectar efeito benéfico da inibição da ECA na perda da função renal de pacientes com DRPAD, numa fase ainda não avançada da doença, ao longo de um período de 3 anos³⁴. Ausência de associação entre o polimorfismo I/D do gene *ACE* e progressão da doença renal na DRPAD também foi encontrada por Merta e cols. Esses investigadores também não encontraram tal associação para o polimorfismo G460W da alfa-aducina³⁵.

Patogênese Molecular e Celular

O gene *PKDI* localiza-se no cromossomo 16p13.3³⁶, enquanto *PKD2* mapeia em 4q22³⁷. Mutações em *PKDI* são responsáveis por cerca de 85% dos casos da doença, enquanto aproximadamente 15% são causados por mutações em *PKD2*¹. O gene *PKDI* foi identificado em 1994³⁸, porém sua estrutura completa só foi definida um ano depois^{39, 40, 41}. Este gene associa-se a um transcrito de 14,2 kb, codificado por 46 éxons distribuídos ao longo de um segmento genômico de aproximadamente 53 kb. Uma de suas características mais marcantes é que a porção 5', correspondente a aproximadamente 70% do gene, é replicada várias vezes em outra posição no cromossomo 16, com identidade de seqüência superior a 95%. Um estudo recente, contudo, demonstrou que tais homólogos constituem-se em pseudogenes⁴².

O gene *PKDI* codifica uma enorme proteína de membrana, de 4.302 aminoácidos (aa) e 11 domínios transmembrana, denominada policistina-1. Esta proteína apresenta uma porção extracelular amino-terminal de aproximadamente 3.000 aa, que compreende uma combinação nova de domínios aparentemente envolvidos em interações proteína-proteína e proteína-carboidrato^{41, 43}. Apresenta ainda uma cauda intracitoplasmática curta, onde se encontra um domínio espiral-enrolado denominado *coiled-coil*. Por meio deste domínio, essencial em interações proteína-proteína, se liga à policistina-2, o produto do gene *PKD2*⁴⁴. Policistina-2, por sua vez, constitui-se numa proteína de 968 aa, com seis domínios transmembrana e terminações amino e carboxi intracitoplasmáticas.

A cistogênese renal da DRPAD consiste num processo focal que se inicia ainda intra-uterinamente e se estende ao longo da vida. Este processo patológico se

associa a anormalidades biológicas que envolvem proliferação celular aumentada, secreção transepitelial de fluido e anormalidades da matriz extracelular. Uma característica chave da doença é sua ampla variabilidade fenotípica, em níveis interfamiliar, intrafamiliar e mesmo dentro de um mesmo órgão. Estudos realizados em rins humanos com DRPAD demonstraram que os cistos são monoclonais e sugerem fortemente que no nível molecular o mecanismo da cistogênese seja recessivo⁴⁵. De acordo com este modelo, a formação de cistos na DRPAD segue um padrão *knudsoniano*, de dois golpes, onde o primeiro golpe constitui-se na mutação de linhagem germinativa e o segundo numa mutação somática que inativa a cópia previamente normal (Figura 1). A elucidação deste mecanismo molecular foi essencial para o entendimento da patogênese da moléstia, pois demonstrou que a cistogênese decorre da perda de função do produto gênico. Embora múltiplos estudos voltados a este mecanismo molecular suportem o modelo de dois golpes, é importante mencionar que a manipulação genética de animais por meio da introdução de cópias de *PKDI* traduziu-se na formação de numerosos microcistos corticais, principalmente glomerulares, indicando que o excesso de função também pode induzir um fenótipo cístico⁴⁶.

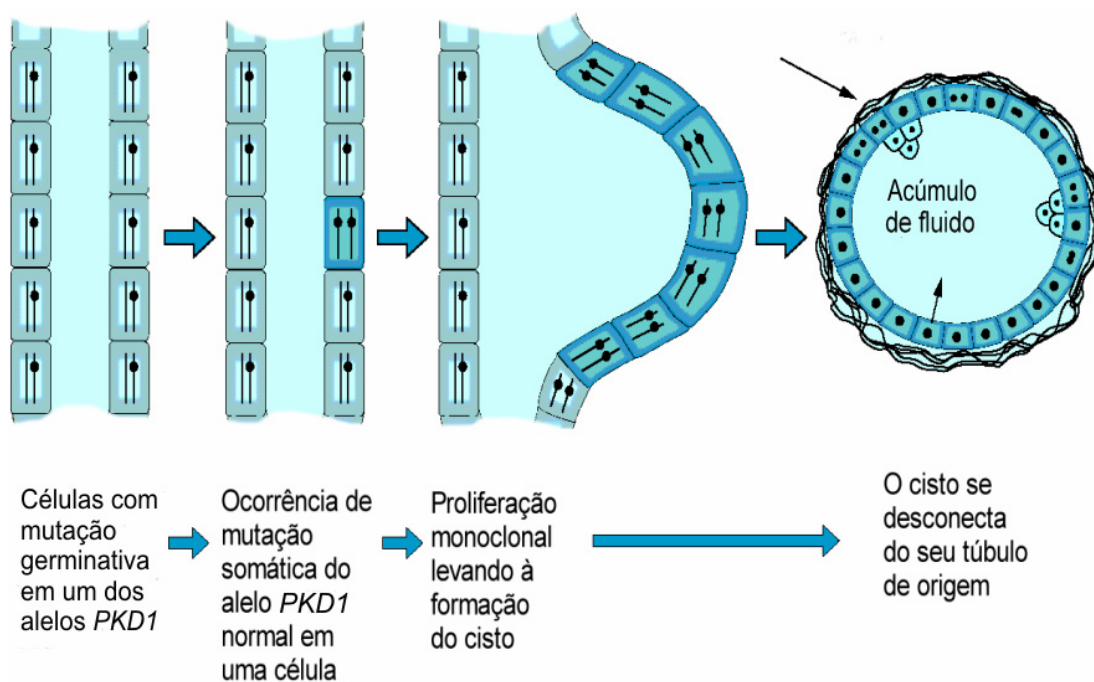


Figura 1 - Mecanismo molecular da cistogênese, baseado no modelo de dois golpes.

O papel biológico da policistina-1 no desenvolvimento renal foi recentemente analisado. Células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), transfectadas de forma estável com *PKDI* e cultivadas em gel de colágeno de três dimensões, formaram estruturas tubulares epiteliais bem desenvolvidas, ao passo que as mesmas células, submetidas a transfecção controle negativa e cultivadas nas mesmas condições, formaram estruturas císticas⁴⁷. Além disso, a expressão de policistina-1 induziu redução na taxa de proliferação celular e resistência a apoptose neste modelo experimental. Em conjunto, os resultados sugerem que a policistina-1 desempenha um papel fundamental nos estágios finais da nefrogênese. De acordo com este modelo, um baixo limiar para a função da policistina-1 é necessário para se atingir tubulogênese normal. Neste cenário, o estado haploinsuficiente de *PKDI* não seria suficiente para determinar a formação de cistos. Faz-se importante mencionar, ainda,

que a deterioração progressiva da função renal na DRPAD pode estar parcialmente relacionada à perda de tecido renal por apoptose⁴⁸.

Um outro estudo recente sugere que a interação entre as policistinas seja essencial para a adequada tubulogênese renal⁴⁹. Células CHO (*Chinese hamster ovary*) transfectadas conjuntamente com *PKD1* e *PKD2* apresentaram uma nova atividade de canal, caracterizada por corrente catiônica não-seletiva com permeabilidade a Ca^{++} . Ao contrário, quando estas células foram transfectadas apenas com *PKD1*, apenas com *PKD2* ou foram submetidas a uma transfecção controle negativa, esta corrente não foi observada. A presença de mutações relacionadas à DRPAD, associadas a alterações nas caudas carboxílicas de policistina-1 ou policistina-2, por sua vez, impediu o aparecimento desta atividade de canal. Este trabalho sugere ainda que a expressão de policistina-1 seja fundamental para a translocação da policistina-2, o canal de cátions propriamente dito, para a membrana plasmática, onde as duas moléculas se associariam para formar o complexo policistínico e gerar a nova atividade de canal.

Estudos recentes demonstraram que proteínas relacionadas a doenças renais policísticas humanas e de animais, incluindo policistinas 1 e 2, são expressas em cílios apicais primários de células epiteliais renais, sugerindo um importante papel desta organela na patogênese das doenças renais policísticas^{50, 51}. O cílio primário parece ser sensível a estímulos ou variações mecânicas, como fluxo de fluido intratubular, e transduzir sinais do meio extracelular para o intracelular através de transientes intracelulares de Ca^{++} . Nauli e cols. mostraram que células renais embrionárias de camundongos expressando uma forma truncada da policistina-1 formaram cílios mas não aumentaram o influxo de cálcio em resposta a fluxo luminal

de fluido^{50, 51, 52}. Utilizando anticorpos contra a policistina-2, estes investigadores demonstraram perda da resposta a fluxo luminal de fluido também em células de camundongos selvagens. Estes dados sugerem que as policistinas-1 e 2 participam ativamente do mecanismo de mecanossensação do cílio primário das células epiteliais renais e que a perturbação deste mecanismo possa estar diretamente relacionada à patogênese da DRPAD.

Para verificar a importância dos cílios apicais primários das células tubulares renais na formação dos cistos, Lin e cols. geraram um camundongo com inativação renal específica da subunidade KIF3A da quinesina II, um componente fundamental do cílio primário⁵³. Estes animais apresentaram inibição da ciliogênese e desenvolveram cistos renais numerosos, com aumento do volume renal e elevação da concentração plasmática de uréia. Estes resultados, portanto, suportam o envolvimento ciliar na tubulogênese renal, bem como um papel para a disfunção ciliar na patogênese das doenças renais policísticas.

Os efeitos celulares das policistinas parecem também depender de sua interação com o citoesqueleto e de sua mediação da adesão célula-célula^{51, 54, 55}. De fato, a policistina-1 interage com moléculas de adesão celular, tais como cateninas α , β e γ e E-caderina⁵⁶. Utilizando células DRPAD em cultura, Charron e cols. verificaram alteração da exocitose, comprometimento da citoarquitetura e do tráfico celular⁵⁷. A desregulação do mecanismo de transporte basolateral leva à interrupção da exocitose basolateral e dilatação do complexo de Golgi, assim como acumulação de transportadores nas cisternas.

MODELOS DE CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA OS GENES ORTÓLOGOS Pkd1 E Pkd2

Apesar das grandes contribuições geradas pelas preparações moleculares e *in vitro*, muitas questões relacionadas à patogênese e à fisiopatologia da DRPAD não podiam ser abordadas sem um modelo *in vivo*. Em 1997, portanto, criou-se o primeiro modelo animal para a DRPAD1, através de uma mutação dirigida que determinava deleção do éxon 34 (del34)⁵⁸. Esta mutação induziu o truncamento da proteína e determinou a morte perinatal dos camundongos homozigotos para a mesma. Tais animais apresentaram rins císticos severamente aumentados, cistos ductais pancreáticos e hipoplasia pulmonar. A formação cística renal se iniciou no dia embrionário 15,5 nos túbulos proximais e progrediu rapidamente para substituir o parênquima renal inteiro. O sincronismo da formação dos cistos sugere que a integridade da policistina-1 é requerida para a morfogênese normal, durante o prolongamento e a maturação das estruturas tubulares nos rins e no pâncreas. Não se detectou anormalidades em miocárdio e em músculo liso de vasos onde a policistina-1 é normalmente expressa. Isto sugere que esta forma truncada da molécula consegue resgatar o fenótipo normal nesses órgãos. Os heterozigotos, por seu turno, apresentaram aparecimento tardio de cistos renais e hepáticos, o que os aproxima da doença humana⁵⁹. Estas observações suportaram o modelo molecular de dois golpes.

Wu e cols. introduziram em 1998 um éxon 1 mutante em sequência ao éxon 1 selvagem do gene *Pkd2* de camundongo⁶⁰. Este é um alelo instável que sofre inativação somática por recombinação homóloga. Camundongos heterozigotos (*Pkd2*^{+/^{WS25}}) e homozigotos para esta mutação (*Pkd2*^{WS25/WS25}), assim como

camundongos *Pkd2*^{WS25}, desenvolveram rins policísticos e lesões hepáticas que foram indistinguíveis do fenótipo humano. Em todos os casos os cistos renais foram provenientes das células tubulares renais que perderam a capacidade de produzir policistina-2.

Utilizando embriões de camundongos homozigotos para mutação nula em *Pkd1*, em 2000 Kim e cols. demonstraram o papel primário de *Pkd1* na fragilidade vascular⁶¹. Tais embriões apresentaram edema subcutâneo, extravasamento vascular e ruptura de vasos sangüíneos, que culminavam em letalidade no dia embrionário 15,5. Estes animais apresentaram cistos renais e pancreáticos. Estes dados suportaram que a policistina-1 é necessária para a manutenção da integridade estrutural de vasos sangüíneos.

Ainda em 2000 Pritchard e cols. geraram um camundongo transgênico com várias cópias de um fragmento genômico humano de 108 kb, contendo o gene *PKDI* inteiro⁴⁶. Duas linhagens produziram RNA mensageiro completo de *PKDI*, e a produção de policistina-1 foi regulada durante o desenvolvimento de forma similar ao modelo endógeno. Como vimos antes, ambas as linhagens apresentaram microcistos renais múltiplos, principalmente de origem glomerular. Cistos hepáticos e proliferação de ductos biliares também foram observados. Para testar a funcionalidade do transgene, os animais foram cruzados com o camundongo *del34*⁵⁸. A linhagem transgênica resultante (*Pkd1*^{del34/del34}.n*PKDI*) apresentou recuperação do fenótipo embrionário em relação a *Pkd1*^{del34/del34}, demonstrando que a policistina-1 humana pôde compensar a perda da proteína endógena do camundongo. Os animais foram viáveis até a idade adulta, sendo que mais da metade desenvolveu cistos hepáticos, como nos animais *Pkd1*^{del34/+}.

Boulter e cols. desenvolveram em 2001 um novo modelo de camundongo com mutação no gene *Pkd1*, no qual a cópia mutada se traduzia por um truncamento mais proximal da proteína que no modelo *del34* (*Pkd1*^{del17-21βgeo})⁶². Embora camundongos adultos heterozigotos tenham desenvolvido cistos renais e hepáticos, embriões homozigotos para a mutação morreram nos dias embrionários 13,5 a 14,5, devido a alterações cardiovasculares que incluíam ventrículo direito com dupla saída, desorganização do miocárdio e alteração do septo átrio-ventricular. O desenvolvimento do esqueleto foi também seriamente comprometido. Estas anomalias correlacionaram-se com os locais principais de expressão de *Pkd1*. Durante a nefrogênese *Pkd1* foi expresso por células epiteliais tubulares em maturação a partir do dia embrionário 15,5. Esta expressão coincidiu com o período de aparecimento de formações císticas em camundongos com mutações dirigidas tanto a *Pkd1* como a *Pkd2*, apoiando a hipótese de que policistina-1 e policistina-2 interagem *in vivo* e que o comprometimento desse processo leva a alteração na morfologia e na função tubular.

Também em 2001 Lu e cols. geraram um camundongo com mutação nula em *Pkd1*, inserindo um segmento fosfoglicerato quinase-neomicina (*neor*) no éxon 4 por recombinação homóloga⁶³. Eles compararam seu fenótipo com os camundongos *del34*. Os camundongos homozigotos para a mutação nula desenvolveram doença cística renal e hepática mais intensa que os animais *del34/del34*. Ambos os mutantes homozigotos, por sua vez, apresentaram polidrâmnio, hidrópsia fetal, espinha bífida oculta e osteocondrodisplasia. Por fim, os camundongos heterozigotos para a nova mutação apresentaram cistos renais mais precocemente que os heterozigotos *del34* (2,5 meses contra 9 meses de idade)

e comprometimento hepático em 100% dos casos aos 18-24 meses de idade, porém um envolvimento pancreático semelhante a estes na idade adulta.

Para estudar as alterações moleculares em mutantes no gene *Pkd1*, Muto e cols. geraram em 2002 um camundongo com deleção envolvendo os éxons 2 a 6 de *Pkd1*⁶⁴. Embriões homozigotos *Pkd1*^{-/-} apresentaram hidrôpsia, malformações do complexo cono-truncal e cistos renais. O nível total da proteína catenina β no coração e nos rins, assim como c-myc no coração, estavam diminuídos nos embriões *Pkd1*^{-/-}. Nos rins de embriões *Pkd1*^{-/-}, a expressão de E-caderina e PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*) nas membranas basolaterais dos túbulos renais foi atenuada e a fosforilação da tirosina de EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e de Gab1 (*growth factor receptor-bound protein 2(GRB2)-associated binding protein 1*) constitutivamente aumentada quando a cistogênese se iniciou no dia embrionário 15,5-16,5.

Wu e cols. investigaram o papel de mutação trans-heterozigótica em modelos de doença renal policística em camundongos utilizando três modelos animais⁶⁵. A lesão cística renal foi leve e variada em camundongos *Pkd1*^{+/-}, *Pkd2*^{+/-} e *Pkd1*^{+/-}:*Pkd2*^{+/-}, sem efeito adverso na sobrevivência até um ano de idade. Em conformidade com o mecanismo de dois golpes observado para a cistogênese, cerca de 70% dos cistos renais em camundongos *Pkd2*^{+/-} apresentaram perda uniforme da expressão da policistina-2. A doença cística nos camundongos trans-heterozigotos *Pkd1*^{+/-}:*Pkd2*^{+/-} foi, entretanto, bem mais intensa que nos camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd2*^{+/-}. Estes dados sugerem um efeito trans dos genes codificadores das policistinas, modificando a formação e o crescimento dos cistos.

Lantinga-van Leeuwen e cols. desenvolveram um novo modelo de camundongo, através da geração de uma construção contendo o gene de resistência à neomicina, dois sítios *loxP* no íntron 1 e um terceiro destes sítios no íntron 11. Esta construção causa *splicing* aberrante do íntron 1, resultando em apenas 13 a 20 % de transcritos *Pkd1* com *splicing* normal⁶⁶. Com esta estratégia obtiveram um animal com um alelo hipomórfico de *Pkd1* (*Pkd1(nl)*). Camundongos homozigotos *Pkd1(nl)* foram viáveis, desenvolvendo cistos renais numerosos e bilaterais, retardo do crescimento e evoluindo a óbito aos dois meses de idade. Vinte e cinco por cento destes sobreviveram com um fenótipo menos intenso e tornaram-se adultos férteis. Os heterozigotos apresentaram fenótipo normal. Este modelo corroborou a hipótese de que um limiar baixo de atividade da policistina-1 precisa ser alcançado para o desenvolvimento de tubulogênese normal, não se acompanhando da formação de cistos.

Piontek e cols. desenvolveram recentemente uma nova linhagem de camundongos com a inserção do gene de resistência à neomicina no íntron 1 e de sítios *loxP* nos íntrons 1 e 4. O alelo *Pkd1*^{cond} mostrou-se completamente funcional⁶⁷. A indução de recombinação, por sua vez, produziu o alelo *Pkd1*^{del 2-4}, que funciona como um alelo nulo verdadeiro. Este estudo demonstrou que a inativação somática de *Pkd1* resulta na formação de cistos renais e hepáticos. Esse modelo animal permite o controle temporal da inativação somática de *Pkd1*, viabilizando estudos sobre a função de *Pkd1* na formação e na manutenção dos túbulos renais. Além disso, permitirá o estudo de manifestações biológicas associadas à nulidade de *Pkd1*, que não podiam ser observadas em modelos prévios devido à morte pré ou perinatal de homozigotos *Pkd1*^{-/-}.

IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS FUNCIONAIS EM MODELOS ANIMAIS PARA A ELUCIDAÇÃO DA PATOGÊNESE DA DRPAD

Com base no modelo de dois golpes, no paciente com DRPAD a perda de função do alelo previamente normal deve desempenhar um papel fundamental na evolução da doença cística. A compreensão de mecanismos e a identificação de agentes capazes de modular ou alterar a taxa de mutações somáticas sobre o gene, portanto, deverão contribuir substancialmente para o entendimento da progressão da doença cística renal.

Amparados pelas evidências biológicas e moleculares apresentadas, formulamos a hipótese de que a severidade da doença cística, e provavelmente a velocidade de perda da função renal, sejam determinadas principalmente pela frequência com que mutações somáticas inativam cópias de *PKDI* previamente normais, em células tubulares renais de pacientes com DRPAD. Além da taxa de mutações somáticas, a natureza da mutação e o momento em que a mesma ocorre podem ser fatores capitais nesse processo.

A análise dos aspectos moleculares, bioquímicos e clínicos da doença sugere que fatores genéticos e ambientais possam participar do potencial de mutabilidade de *PKDI*. Este gene apresenta particularidades estruturais que poderiam favorecer uma taxa elevada de mutabilidade. Além de uma seqüência de código longa, *PKDI* contém em seu íntron 21 o maior trato polipirimidínico até então identificado no genoma humano, com aproximadamente 2,5 kb⁶⁸. A presença dessa seqüência favorece a formação de hélices triplas, podendo impedir a transcrição gênica e induzir erros de reparo do DNA. Este mecanismo mutagênico é particularmente

interessante porque não requer que as células estejam se dividindo, um evento pouco comum em células renais maduras. Embora bastante atraente, a possibilidade de se analisar a importância desse processo e de se interferir sobre o mesmo nos parece distante no momento atual.

Estudos populacionais de severidade de expressão da DRPAD têm apresentado limitações devido à separação não adequada dos grupos em relação ao tipo e posição da mutação em *PKDI*²⁹, além de incertezas diagnósticas em alguns casos^{4, 69}. Por isso os estudos em modelos animais ortólogos à DRPAD, com homogeneidade de *background* genético, são essenciais para evitar distorções nos resultados. Esta estratégia permite manipulações funcionais mais homogêneas e precisas, manipulações experimentais não factíveis em humanos e um controle experimental e populacional muito maior.

Embora o modelo animal inicial gerado por Lu e cols. tenha sido muito importante para a comunidade nefrológica, possibilitando estudos pioneiros sobre o papel do gene *Pkd1* no desenvolvimento renal e as consequências de sua mutação, o alelo criado não se constituía num alelo propriamente nulo. Dado o mecanismo molecular da DRPAD, a geração de um camundongo portador de um alelo nulo provavelmente sensibilizaria a avaliação funcional da patologia. Este aspecto é de grande importância na planificação da caracterização funcional do animal e de sua utilização para intervenções potenciais. Foi com estes objetivos que Klaus Piontek e Gregory Germino, da Johns Hopkins University School of Medicine, geraram um camundongo com mutação nula dirigida ao gene *Pkd1*. Dada a ampla interação científica entre nossos laboratórios, iniciamos o projeto que deu origem a esta tese, procurando caracterizar as possíveis alterações funcionais renais associadas a

camundongos heterozigotos para mutação nula em *Pkd1*, bem como investigar a natureza molecular e estrutural ou bioquímica de tais disfunções potenciais. Como questão central, procuramos estabelecer se as disfunções renais presentes na DRPAD são decorrentes de haploinsuficiência (perda de função de apenas uma das cópias de *PKDI*), ou se são causadas pelo acúmulo de segundos golpes sobre o alelo previamente normal, traduzido pelo aparecimento de cistos renais.

Redução do ritmo de filtração glomerular e déficit de concentração renal são descritos na DRPAD, este freqüentemente precedendo a primeira por vários anos⁷⁰. Não é claro, contudo, se estas anormalidades não focais seguem um mecanismo molecular distinto ou se são secundárias à alteração da arquitetura do rim induzida pela expansão progressiva dos cistos. De fato, enquanto uma redução severa da expressão de policistina-1 parece impedir a maturação de túbulos renais e a perda de função de ambos os alelos induzir a formação de cistos, os papéis potenciais da haploinsuficiência de *PKDI* no desenvolvimento e na função renais é essencialmente desconhecida. Nesta tese utilizamos a linhagem de camundongo 129Sv endogâmica descrita acima, com mutação nula em *Pkd1*, para abordar estas questões, uma vez que nesta linhagem animal mostramos que camundongos heterozigotos apresentam formação cística renal mínima até os nove meses de idade. Nossos achados de diminuição do número de néfrons e redução do RFG nos animais heterozigotos sugerem um papel importante para a haploinsuficiência de *Pkd1* no desenvolvimento e na função dos rins.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo central desta tese foi caracterizar as alterações funcionais renais básicas de camundongos heterozigotos para mutação nula em *Pkd1* e elucidar a patogênese molecular dessas disfunções potenciais. Para que tal objetivo fosse alcançado, seguimos os seguintes objetivos específicos:

1. Genotipar os camundongos e estabelecer uma colônia de animais com mutação nula em *Pkd1* e seus respectivos controles.
2. Analisar o efeito da mutação nula em uma das cópias de *Pkd1* sobre a taxa de filtração glomerular.
3. Analisar o efeito da mutação nula em uma das cópias de *Pkd1* sobre a capacidade de concentração renal.
4. Caracterizar as alterações anátomo-patológicas renais nos animais heterozigotos para mutação nula em *Pkd1*.
5. Analisar o efeito da mutação nula em uma das cópias de *Pkd1* sobre o número total de glomérulos e sobre o volume glomerular.
6. Analisar a participação potencial do sistema NO sobre as disfunções encontradas no camundongo *Pkd1*^{+/-}.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina/Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, de acordo com os padrões nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais (Anexo A).

MODELO ANIMAL

Piontek e Germino utilizaram uma estratégia baseada em PCR (*polymerase chain reaction*) para gerar uma construção na qual parte do éxon 2 e todo o éxon 3 de *Pkd1* foram substituídos por um gene repórter (*lacZ*) acoplado em fase à porção restante do éxon 2, seguido pelo gene *neor*⁷¹. O segmento *lacZ-neor*, inserido na porção 5' de *Pkd1*, possui seqüências de terminação de transcrição que impedem a expressão completa do gene, ao mesmo tempo em que um promotor PGK promove expressão do marcador selecionável *neor* de forma independente. A integração bem sucedida da construção resultou na inativação de *Pkd1*, ao mesmo tempo em que criou um marcador para a expressão do mesmo, pois a expressão de *lacZ* é controlada pelos elementos regulatórios do gene *Pkd1*, os quais permaneceram intactos. Esta construção permite acompanhar a atividade de *Pkd1* nos tecidos em todos os estágios de desenvolvimento e sob várias condições normais e patológicas.

Os animais quiméricos foram feitos pela companhia Genome Systems (St. Louis, MO, EUA) e recebidos para cruzamento subsequente a camundongos normais

C57BL/6J. A homogeneização progressiva para o *background* genético 129Sv foi feita através de cruzamentos sucessivos dentro desta linhagem. O camundongo 129Sv é uma das subcepas da cepa 129, sendo freqüentemente utilizado na construção de camundongos geneticamente modificados devido à disponibilidade de células tronco. Análises iniciais destes animais demonstram inviabilidade dos fetos homozigotos para o alelo anormal e surgimento tardio de cistos renais e hepáticos em animais heterozigotos^{67, 72}. O animal heterozigoto, que à semelhança dos pacientes com DRPAD1 também apresenta uma das cópias do gene mutada, foi nosso elemento experimental. Algumas diferenças, no entanto, são notadas entre este modelo animal e a doença humana. Pontos que merecem maior atenção são a ausência do longo trato polipirimidínico no gene *Pkd1*⁷³ e o curto tempo de vida destes animais. Estes fatores poderiam determinar penetrância e expressividade menores nos animais quando comparados a humanos, o que poderia justificar o surgimento apenas tardio de cistos renais e hepáticos nos camundongos *Pkd1*^{+/-}. Estas diferenças fenotípicas parciais, por seu lado, favorecem as análises de certos mecanismos patogénéticos, particularmente do efeito da haploinsuficiência gênica sobre as disfunções renais potenciais.

GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS

A primeira etapa experimental na elaboração de uma colônia de animais geneticamente modificados é estabelecer métodos que permitam sua adequada identificação genética. Este procedimento diagnóstico é importante não apenas para a

montagem dos casais reprodutores, como também para a seleção dos animais a serem utilizados nos experimentos.

A identificação dos camundongos 129Sv como heterozigotos ou selvagens foi feita através de genotipagem. O primeiro passo deste método consistiu na extração de amostras de DNA de cada um dos animais a partir de amostras de orelha ou de cauda, a depender das condições experimentais. O procedimento de extração de DNA seguiu o seguinte protocolo. Quatrocentos μl de tampão proteinase K (proteinase K 1 mg/ml (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA), TrisHCl 20 mM pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA 30 mM pH 8,0 e SDS 0,5%) foram adicionados a cada tubo contendo as amostras individuais de tecido cortadas em pequenos fragmentos. Estas suspensões foram homogeneamente misturadas e incubadas a 55-60 °C em banho-maria por 8-12 horas. As suspensões foram então misturadas com vórtex brevemente e centrifugadas a seguir a 16000 xg por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos, aos quais foram adicionados 200 μl de NaCl saturado, e misturados com vórtex por 15 s. Em seguida, 450 μl de isopropanol foram acrescentados a cada tubo e misturados suavemente, oscilando os tubos 50 vezes. As amostras foram então centrifugadas a 16000 xg por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes desprezados. Os tubos foram lavados a seguir com 250 μl de etanol 70% e uma segunda vez com 500 μl da mesma solução. Após uma centrifugação final a 16000 xg por 5 min, os sobrenadantes foram descartados e os tubos deixados para secar em posição invertida. Após constatar que o *pellet* de DNA estava seco, cada amostra foi dissolvida em 50 μl de H₂O. As amostras de DNA foram então armazenadas a 4 °C por até duas semanas. Após esse período foram estocadas a -20 °C.

A utilização de um *primer* comum a ambos os alelos e de segundos *primers* específicos para os alelos selvagem e *knock-out* permitiram a realização da genotipagem através da técnica de PCR. Enquanto o *primer* específico ao alelo selvagem foi posicionado na região do DNA substituído pela construção recombinante, o *primer* específico ao alelo *knock-out* foi posicionado na construção de DNA. Esta técnica permitiu a identificação de dois produtos de PCR de tamanhos distintos, cada qual correspondente a um dos alelos. Uma banda de 180 pares de bases (pb), detectada por eletroforese em gel de agarose, corresponde ao alelo selvagem, ao passo que uma banda de 220 pb corresponde ao alelo mutante. Dessa forma, os animais com banda única de 180 pb foram classificados como selvagens, enquanto os animais com as duas bandas (180 e 220 pb) foram caracterizados como heterozigotos. A vantagem desta técnica é que não apenas confere o diagnóstico de certeza a todos os animais avaliados, como também oferece controle técnico da reação de PCR.

A reação de PCR incluiu os *primers* KF1 (5'-AATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3'), comum a ambos os produtos, KR1 (5'-TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3'), específico à cópia normal do gene, e M3-2B (5'-TACTCACCTCCACCAGTGC-3'), específico à cópia mutada do gene. Os componentes da reação, realizada em volumes de 50 µl, incluíram tampão da reação 1X, MgCl₂ 2 mM, DNTPs 200 µM, os três *primers* à concentração de 0,5 µM cada, Taq polimerase 1,5 U/reação e DNA genômico 300 ng/reação. O programa utilizado no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) para a reação compreendeu um período inicial de 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 61,5 °C por 25 s e 72 °C por 35 s; e um período de 10 min de extensão final a 72 °C. Os

produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo 1 µg/ml e fotografados para documentação usando o sistema *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech).

ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE CAMUNDONGOS

A colônia de camundongos, incluindo animais com mutação nula em *Pkd1* e selvagens, foi estabelecida e mantida no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para garantir estabilidade da colônia, controle sobre a reprodução e homogeneidade fenotípica entre os animais, particularmente no nível renal, a reprodução foi realizada em ambiente SPF (*specific pathogen free*) (Figura 2). Este regime compreende gaiolas com filtro (modelo TEMI109, Beiramar), manipulação dos camundongos com luvas estéreis e dentro de câmara de fluxo laminar para evitar contaminação, temperatura ambiental controlada entre 21 e 22 °C, iluminação durante o dia, ciclo de atividade do camundongo durante a noite e umidade do ar em torno de 55%⁷⁴. Além disso, a ração (Nuvilab Cr-1, autoclavável, Colombo, PR) e a água utilizadas são autoclavadas. Por fim, para garantir a não contaminação da colônia, os animais foram periodicamente submetidos a controles bacteriológico e parasitológico.

Os casais foram sempre constituídos por um animal heterozigoto e um selvagem, com o intuito de gerar uma prole aproximadamente 50% heterozigota e 50% selvagem. Com esse desenho de reprodução, visamos obter as melhores

condições controle experimentais, incluindo animais selvagens controle com *background* genético o mais próximo possível dos heterozigotos e em número similar. Os casais foram preferencialmente formados por animais da mesma prole e, sempre que possível, por macho heterozigoto e fêmea selvagem.

Os casais reprodutores foram mantidos com suas respectivas proles nas caixas de reprodução até o desmame, quando os filhotes, com 21 dias de idade, eram transferidos para as caixas de estoque. Os casais não reprodutivos por um período de três meses consecutivos ou com animais de mais de 11 meses de idade eram desfeitos e também transferidos para as caixas de estoque. Após genotipagem, novos casais eram formados em substituição aos casais anteriores. Os animais não formadores de casais foram mantidos nas caixas de estoque, também em regime SPF, até o desmame e a genotipagem, sendo então transferidos para um biotério convencional entre quatro e cinco meses de idade. Nesse biotério, os animais foram mantidos em caixas não estéreis forradas com maravalha, com água não estéril e com ração padrão (Nuvilab Cr-1, Colombo, PR), até serem utilizados nos experimentos.



Figura 2 - Colônia de camundongos 129Sv mantida em regime SPF.

Um banco de dados baseado no *software* Microsoft Access (Microsoft) foi construído para catalogar e administrar os genótipos, a reprodução, as idades, as genealogias, as características fenotípicas e os planos experimentais relacionados aos animais (Figura 3). Nele incluímos identificação, localização, dados individuais e mecanismos de busca.

Figura 3 - Página representativa do programa de controle da colônia de camundongos.

MENSURAÇÃO DE CLEARANCE DE INULINA

Avaliamos o *clearance* de inulina (CIn) em sete camundongos machos *Pkd1*^{+/-} e sete camundongos machos controle *Pkd1*^{+/+}, com idades pareadas dentro do intervalo de 187-237 dias. Uma vez que em outros modelos animais de DRP machos podem desenvolver uma doença renal mais severa, decidimos realizar estes estudos

em animais machos^{75, 76}. Optamos por conduzir as análises dentro da faixa de idade de 26 a 33 semanas, por tal intervalo ser relativamente limitado, incluir o período adulto dos animais e por se localizar longe do período de senilidade. A homogeneidade genética destes animais, garantida por um *background* genético homogêneo e reprodução endogâmica, fez com que o número de animais utilizados em cada grupo auferisse um alto poder discriminatório ao estudo. O método de medida de CIn seguiu os procedimentos seguintes (Figura 4):

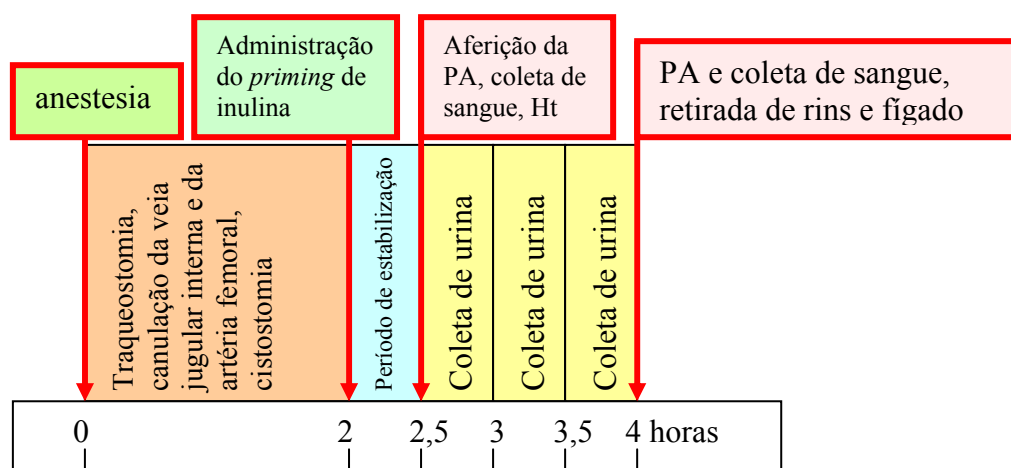


Figura 4 - Protocolo de mensuração do *clearance* de inulina em camundongos.

Os camundongos foram pesados no início dos experimentos e a seguir anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 100mg/100g de peso corporal (PC), administrado por via intra-peritoneal (IP). Doses adicionais equivalentes a 10% da dose inicial foram administradas quando os animais apresentaram sinais de recuperação da anestesia. Os camundongos foram mantidos em placa aquecida durante todo o procedimento. A traquéia foi exposta por incisão mediana e um catéter T20 (PE20, Clay Adams, Sparks, MD, EUA) introduzido pela traqueostomia. A veia jugular interna esquerda foi então dissecada, ampliando a incisão para a

região lateral esquerda do pescoço e introduzindo uma cânula T10 (PE10, Clay Adams, Sparks, MD, EUA). Para aferição da pressão arterial (PA) e coleta de amostras de sangue, uma das artérias femorais foi dissecada por meio de uma incisão na região coxo-femoral, exposição da artéria e passagem de um tubo T10. A seguir, através de uma incisão mediana no baixo ventre, a bexiga foi exposta e canulada com um tubo T40 (PE40, Clay Adams, Sparks, MD, EUA).

Estabelecida a preparação do animal, o experimento foi iniciado com um *priming* endovenoso de inulina (Serva, Heidelberg, Alemanha), de 10 mg/100g PC na cânula da veia jugular interna, seguida por uma infusão de 0,37 mg/min, utilizando uma bomba de infusão Harvard, modelo 55-1689 (Harvard Apparatus), na escala 24. Após um período mínimo de 30 minutos iniciou-se a coleta de amostras de urina. As coletas de urina foram realizadas em três períodos de 30 minutos. Uma amostra de sangue foi obtida no início da coleta de urina e ao final do experimento. Uma medida de hematócrito foi tomada com a primeira amostra de sangue para, conjuntamente com a avaliação da PA, controlar o estado volêmico dos animais. O volume de sangue extraído nesta amostra, por sua vez, foi repostado com solução NaCl 0,9% .

O *clearance* de inulina foi calculado a partir da equação:

$$C_{In} = \frac{U_{In} \cdot V}{P_{In}}$$

Onde U_{In} = concentração urinária de inulina

P_{In} = concentração plasmática de inulina

V = débito urinário

A PA foi obtida através da medida da altura da coluna de mercúrio conectada à cânula inserida na artéria femoral, utilizando equipamento construído em nosso laboratório.

ANÁLISE DA CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO RENAL

Os estudos de avaliação da capacidade de concentração renal foram realizados através da mensuração da osmolalidade urinária máxima (UosmMax) em animais *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}*.

Gaiola Coletora de Urina para Camundongos

Inicialmente constatamos que gaiolas metabólicas de ratos adaptadas para camundongos não se constituíam numa opção experimental apropriada, visto que uma quantidade substancial da urina coletada se cristalizava na parede da mesma. Este problema não foi solucionado mesmo com a aplicação de silicone nas paredes dos tubos coletores da gaiola. Decidimos então pela criação de um novo modelo de gaiola coletora de urina, desenhada para camundongos (Figura 5). Neste caso o prato é preenchido com vaselina para que a urina não evapore, enquanto uma tela superior sustenta o camundongo e uma rede logo abaixo retém as fezes. A conservação da osmolalidade de soluções presentes no prato e recobertas com vaselina foi testada com soluções padrões. Esta análise revelou que uma camada de vaselina de 70 ml é suficiente para alcançar precisão e uniformidade dos resultados.

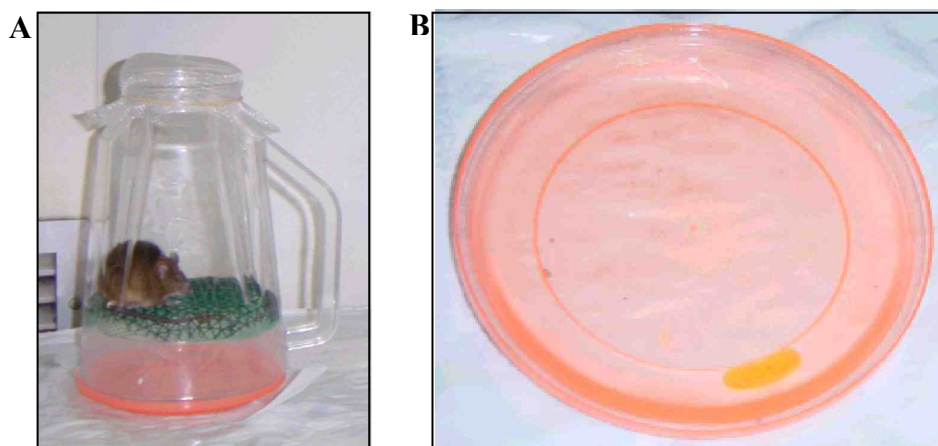


Figura 5 - Gaiola coletora de urina para camundongos. A: Camundongo na gaiola; B: Urina coletada abaixo da camada de óleo mineral.

Verificamos, contudo, que a rede utilizada ainda retinha gotas de urina (Figura 6A). Confeccionamos, então, uma nova rede com o traçado da malha em um único sentido, utilizando fio de anzol número 16 (Figura 6B).

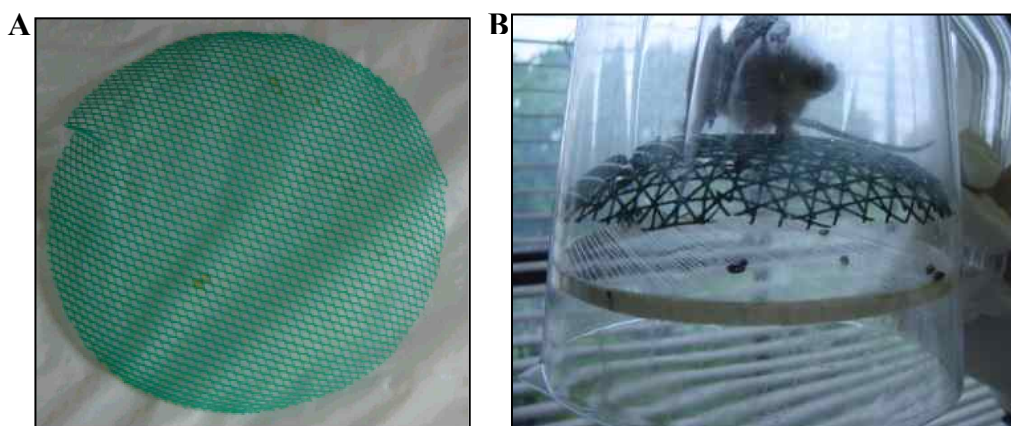


Figura 6 - Redes da nova gaiola para camundongos utilizada para reter as fezes. A: Rede inicial que também retinha parte da urina; B: Rede final, não associada a retenção aparente de urina.

Protocolo Experimental

Os animais foram inicialmente deixados em privação hídrica por 48 horas em gaiola metabólica, de acordo com um protocolo anterior⁷⁷. Foram então pesados e devolvidos à gaiola metabólica. A seguir a urina foi coletada por um período de 12 horas. O volume de urina foi aferido e a osmolalidade urinária medida utilizando o osmômetro de pressão de vapor *Vapro 5500* (Wescor), que permite a análise de amostras de até 10 µl de urina. O peso dos animais foi, então, novamente determinado (Figura 7).

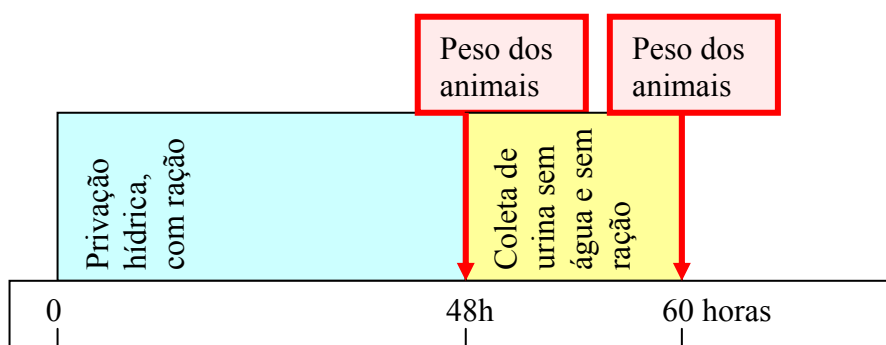


Figura 7 - Protocolo de mensuração da osmolalidade urinária máxima em camundongos.

Estes estudos foram realizados em camundongos de três faixas etárias diferentes e de ambos os sexos, para analisar esta função de forma ampla. Em adição, com o objetivo de analisá-la de forma mais detalhada e integrada, dois protocolos alternativos também foram aplicados. Num deles, os animais foram deixados em privação hídrica por 48 horas, foram pesados, receberam desmopressina (DDAVp) (Laboratórios Ferring, Lausanne, Suíça) 1 µg/kg PC por via subcutânea (SC) e foram devolvidos à gaiola metabólica duas horas após, seguindo um outro protocolo

previamente estabelecido⁷⁸. A seguir a urina foi coletada por 12 horas e a osmolalidade urinária medida conforme descrito acima (Figura 8).

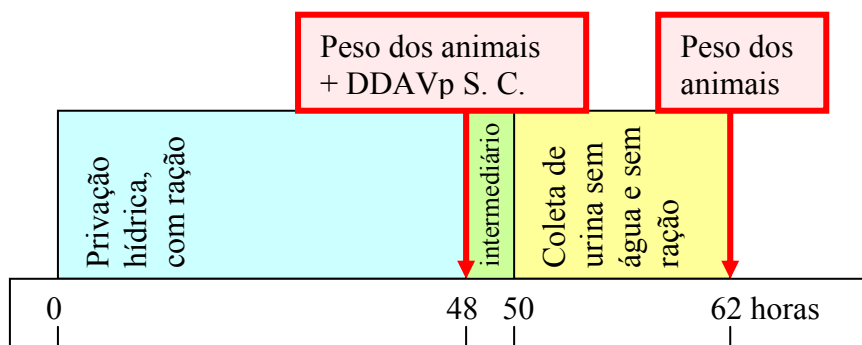


Figura 8 - Protocolo de mensuração da osmolalidade urinária máxima em camundongos, com administração de DDAVp.

No segundo protocolo alternativo avaliamos a resposta a DDAVp após administração de água por gavagem. Os animais foram colocados em gaiola metabólica por 24 horas com água e dieta padrão. Após este período a urina foi coletada durante 3 horas. Foram então realizadas duas infusões de 1,2 ml de água por gavagem, obedecendo a intervalos de uma hora entre as mesmas. Os animais que não urinaram foram estimulados a urinar por cuidadosa compressão da bexiga. Após atingir uma osmolalidade urinária inferior a 1000 mOsm/Kg H₂O, os animais receberam DDAVp 1 µg/kg PC por via SC e, após 2 horas, a urina foi coletada por um período de 3 horas. A osmolalidade urinária foi então determinada nas amostras correspondentes a cada período (Figura 9).

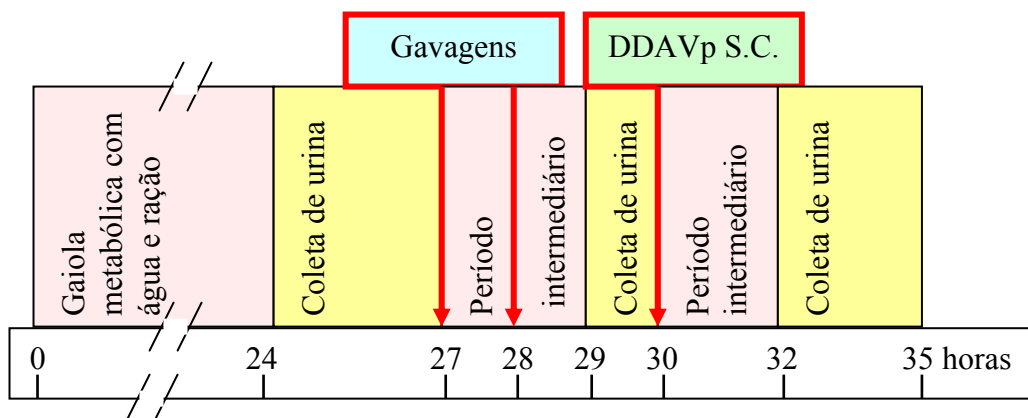


Figura 9 - Protocolo de mensuração da osmolalidade urinária em camundongos, com administração de H₂O e DDAVp.

PATOLOGIA RENAL E HEPÁTICA

Realizamos análises morfológicas de rim e fígado em 16 camundongos machos *Pkd1^{+/+}* e 22 *Pkd1^{+/-}*, dentro de uma faixa etária de 20-72 semanas. Os rins extraídos foram cortados longitudinalmente e colocados em formalina tamponada. Após um período mínimo de 48 horas as amostras foram incluídas em parafina, e secções de 3-4 µm foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina. O mesmo procedimento foi aplicado para os fígados, cortados em quatro secções transversais. Duas secções longitudinais de cada rim foram avaliadas para a presença de cistos. Utilizamos uma tela com pontos distantes entre si 50 µm para quantificar as estruturas císticas. Dilatações acima de 500 µm foram definidas como cistos, seguindo critérios previamente sugeridos⁵⁹. As análises de fígado, por sua vez, compreenderam a identificação de anormalidades do trato portal e de dilatações de ductos biliares.

ESTEREOLOGIA GLOMERULAR

Utilizamos o método *disector* físico, também usado por Woods e cols., para quantificar o número de glomérulos em sete camundongos machos *Pkd1^{+/+}* e sete *Pkd1^{+/-}* com idades pareadas, dentro da faixa etária de 186 a 236 dias⁷⁹. Os animais foram submetidos a toracotomia, seguida da inserção de um cateter no ventrículo esquerdo e de um corte no átrio direito para drenar o sangue. Os mesmos foram então perfundidos com solução salina até a exsanguinação completa. Este passo foi seguido por imediata perfusão com formalina de Millonig, modificada por Carlson. Os rins esquerdos foram extraídos, pesados, tiveram seus volumes medidos pelo método de Scherle⁸⁰, e foram processados para análises estereológicas. Estes rins foram incluídos em parafina, seccionados completamente a intervalos de 5 μm e corados com hematoxilina-eosina. Seguindo numeração apropriada, cinco lâminas foram escolhidas aleatoriamente e definidas como planos de face superior. Secções seqüenciais separadas 15 μm destes níveis corresponderam a cada uma dessas lâminas e foram denominadas planos de face inferior. Esta análise foi realizada com um microscópio ótico Leica acoplado a uma vídeo-câmera CF15/15 Kappa e um monitor Triniton Sony, considerando um quadro de 3.260 μm^2 .

A densidade numérica de glomérulos, $Nv_{[G]}$, foi determinada por 15 pares *disector* aleatórios para cada espécime. $Q_{[-]}$ representa o número de glomérulos visto em foco apenas no plano de face superior, quando os mesmos estavam parcialmente ou totalmente dentro do quadro e não intersectavam a linha proibida. O produto da espessura (e) pela área total (A_T) estimou o volume-teste *disector*, permitindo chegar à equação $Nv_{[G]}=Q_{[-]}/e.A_T$ ⁸¹.

A razão córtico-medular e a densidade de volume glomerular ($V_{v[G]}=P_{p[G]}/P_T$, onde $P_{p[G]}$ representa os glomérulos atingidos por pontos e P_T os pontos totais presentes no sistema-teste – 36 pontos neste caso) foram calculadas por contagem de pontos e pelo método de Cavalieri⁸². Estes parâmetros permitiram estimar o volume ocupado pelos glomérulos ($Volume_{[G]}$) no córtex renal ($Volume_{[G]}=Volume[\text{córtex}] \times V_{v[G]}$). O volume médio de todos os glomérulos (V_G) foi calculado para os camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$, usando a razão $V_{v[G]}/N_{v[G]}$.

DETERMINAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITRITO/NITRATO

A quantificação da excreção urinária de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) foi realizada em dois grupos de camundongos machos com idades pareadas, um incluindo oito animais $Pkd1^{+/-}$ e outro oito animais controle $Pkd1^{+/+}$, na faixa de idade de 244 a 323 dias. Os animais foram colocados em gaiola para coleta de urina por um período de 24 horas. A concentração de creatinina urinária foi determinada utilizando um kit (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) cuja reação é baseada no método de Jaffé modificado. O método consiste na reação, em solução alcalina, da creatinina com o ácido pícrico, formando um complexo amarelo avermelhado onde a intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de creatinina. A leitura espectrofotométrica foi feita em comprimento de onda de 510 nm. Após a primeira leitura a solução foi acidificada, seguindo-se redução da coloração amarelo avermelhada e permanência da relacionada a outros pigmentos. Nova leitura foi então realizada e a diferença entre a primeira e a última comparada a uma solução padrão de creatinina 4 mg/dl, permitindo a determinação de sua concentração.

A dosagem urinária de NO_2/NO_3 foi realizada pelo método de Conrad⁸³. A 200 μl da amostra acrescentamos 200 μl de tampão fosfato pH 7,2 0,1 M, 100 μl de nitrato redutase 43 mU/ml, 100 μl de NADPH 0,28 mM, e 100 μl de FAD 35 mM (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A amostra foi então incubada a 25 °C por 2 horas para reduzir nitrito a nitrato, e a reação finalizada por incubação a 98 °C por 3 min.

A reação colorimétrica foi realizada acrescentando 700 μl de reagente B de Griess 2% em reagente A de Griess 0,2%, seguindo-se incubação a 60 °C por 10 min. A leitura colorimétrica foi feita ao fim desta reação usando um espectrofotômetro Hitachi U2000 a 546 nm. Os valores foram ajustados de acordo com curvas de redução nitrito de sódio/nitrato de sódio. A excreção de NO_2/NO_3 foi finalmente corrigida para a excreção urinária total de creatinina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores relacionados aos grupos experimentais quantitativos foram expressos como média e erro padrão da média. Aplicamos o teste *t* de Student não pareado, utilizando a correção de Welch conforme necessário. A análise de volume glomerular foi conduzida usando teste unicaudal, baseando-nos na hipótese original de que seria maior em heterozigotos. As análises de sobrevida foram realizadas usando o teste de Kaplan-Meier, com pós-teste discriminante de Log-Rank. Aceitamos erro alfa menor ou igual a 5% para rejeitar a hipótese de nulidade. Estes testes foram aplicados usando o *software* Prism 4.00 (GraphPad Software, CA, EUA).

RESULTADOS

GENOTIPAGEM E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA PARA GERAÇÃO DE CAMUNDONGOS $Pkd1^{+/-}$ E $Pkd1^{+/+}$

Os camundongos foram genotipados entre o desmame e quatro meses de idade, dependendo dos planos experimentais e da formação dos grupos. Entre os 441 animais genotipados de agosto de 2000 a março de 2004, 433 tiveram sua tipagem definida de forma clara, configurando uma taxa de detecção genotípica de 98,2%. Destes, 201 foram heterozigotos para mutação nula em *Pkd1*, enquanto 232 foram selvagens. A fotografia de um gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo 1 µg/ml, demonstrando os resultados obtidos para um grupo inicial de animais, é mostrada na Figura 10.

A colônia de animais foi constituída a partir de sete animais enviados da Johns Hopkins University School of Medicine em julho de 2000. Destes, três machos e uma fêmea eram heterozigotos, e três fêmeas eram selvagens. Entre os 433 camundongos gerados e genotipados no período de agosto de 2000 a março de 2004, 212 foram fêmeas e 221 machos. Este período de reprodução e expansão da colônia incluiu seis gerações de animais. O estabelecimento e a expansão da colônia foram realizados sem contaminações microbiológicas ou parasitológicas relevantes.

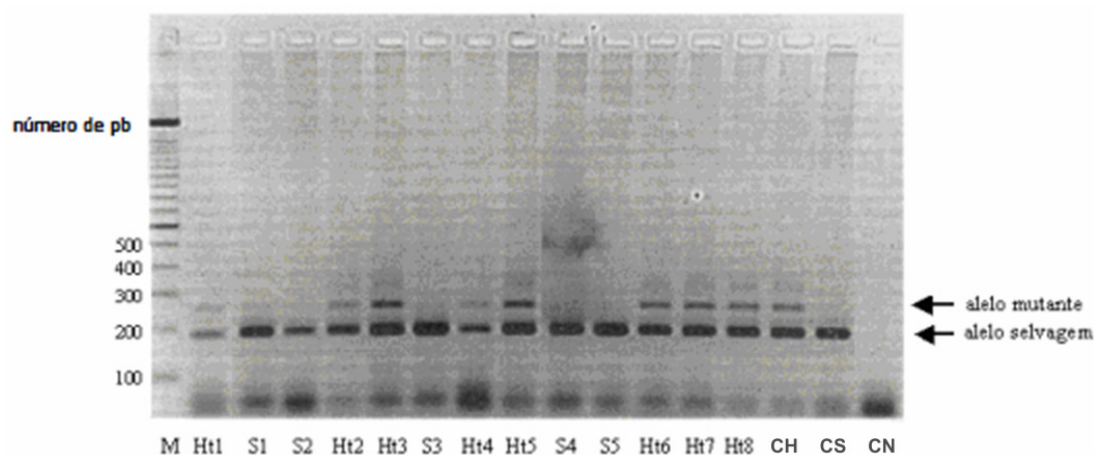


Figura 10 - Genotipagem de camundongos gerados na colônia constituída. Ht1 a Ht8: animais heterozigotos para a mutação nula em *Pkd1*; S1 a S5: animais selvagens; CH: controle heterozigoto; CS: controle selvagem; CN: controle negativo; M: marcadores de peso molecular.

SOBREVIDA ANIMAL

O efeito da inativação de uma das cópias de *Pkd1* em camundongos 129Sv sobre a sobrevida dos animais foi avaliado em nossa colônia. Para tanto, utilizamos 247 animais, 93 machos e 154 fêmeas, não sacrificados em experimentos, mantidos conforme previamente descrito. Embora a mediana de sobrevida de camundongos machos obtida pelo teste de Log-Rank tenha sido de 716 dias para os camundongos heterozigotos (n=36) e 807 dias para os selvagens (n=57), não se detectou diferença de sobrevida estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,3613). A análise realizada em fêmeas, no entanto, revelou sobrevida menor para heterozigotas (n=74) em relação às selvagens (n=80; p=0,0339). Nesta avaliação, a mediana de sobrevida de fêmeas *Pkd1*^{+/-} foi de 713 dias, enquanto para fêmeas *Pkd1*^{+/+} foi de 773 dias. A

taxa de risco observada neste caso foi de 1,6, com intervalo de confiança de 95% de 1,04-2,73. As curvas actuariais de sobrevivência para machos e fêmeas são mostradas na Figura 11.

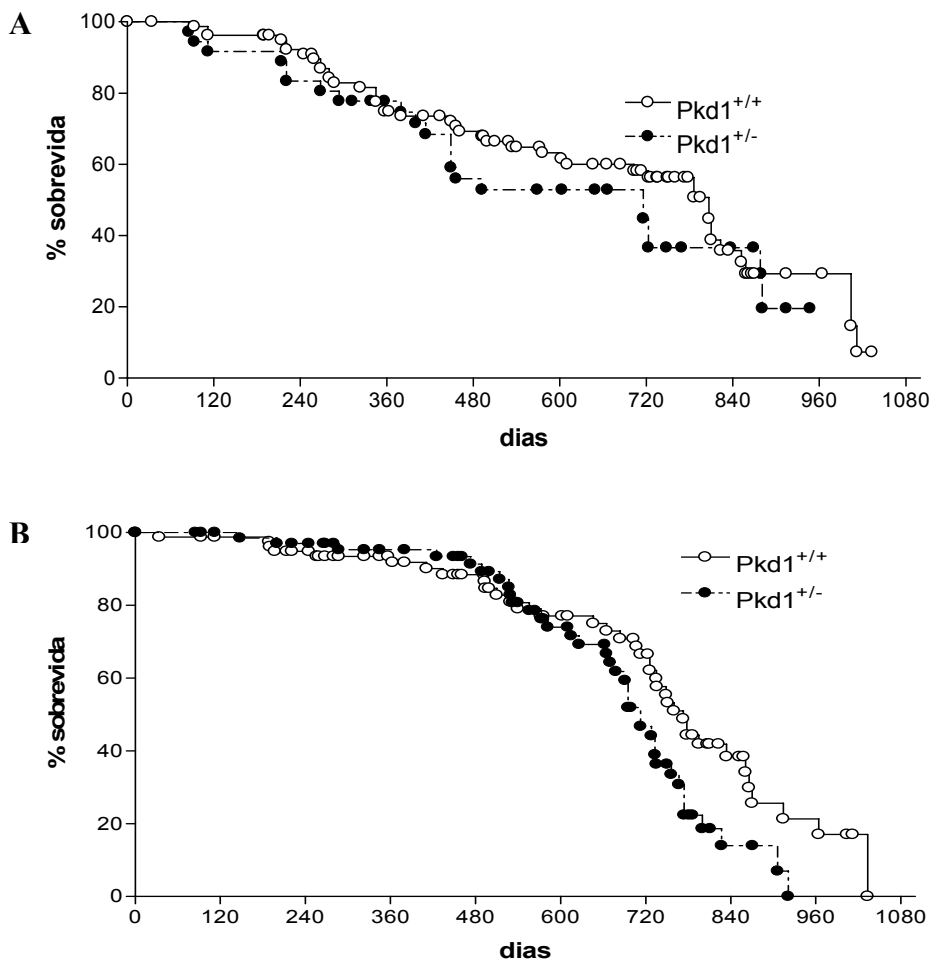


Figura 11 - Análise comparativa de sobrevivência entre camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} machos (A) e fêmeas (B).

ANÁLISES DE CLEARANCE DE INULINA

Os experimentos de medida de CIn foram realizados em camundongos machos. Todos os animais incluídos no estudo apresentavam entre 187 e 237 dias de vida, uma faixa etária já adulta mas longe da senilidade. O estudo incluiu um grupo teste e um controle. O grupo teste foi constituído por sete animais heterozigotos, enquanto o grupo controle compreendeu sete animais selvagens. As medidas de CIn foram tomadas imediatamente após a canulação da veia jugular interna, da artéria femoral e da cistostomia.

Nossos resultados demonstraram diminuição significativa do CIn nos camundongos *Pkd1*^{+/-} comparados aos animais *Pkd1*^{+/+} ($p=0,0002$). Os valores encontrados, por sua vez, situam-se dentro do intervalo esperado para camundongos 129Sv⁸⁴. Os valores obtidos foram normalizados para 100g de PC, para adequada comparação dos resultados. Enquanto os camundongos *Pkd1*^{+/+} apresentaram CIn de $1,13 \pm 0,05$ ml/min/100g PC, os animais *Pkd1*^{+/-} apresentaram $0,88 \pm 0,02$ ml/min/100g PC (Figura 12-A, Anexo B). Esta diferença mantém-se significativa mesmo quando analisada para valores absolutos ($p=0,0145$; Figura 12-B, Anexo B).

Um dos parâmetros mais importantes a serem controlados em experimentos de CIn é a PA, visto ser um determinante maior do fluxo sanguíneo renal (FSR). Variações significantes de PA, portanto, poderiam potencialmente interferir na avaliação do CIn. Nestes experimentos, entretanto, não observamos diferença estatisticamente significativa entre as medidas de pressão arterial média (PAM) tomadas para os animais heterozigotos e selvagens no início do período de coleta (Figura 12-F, Anexo B). Um outro parâmetro que auxilia a controlar possíveis

variações volêmicas é o hematócrito. Neste estudo, o hematócrito medido ao final do experimento não diferiu estatisticamente entre os grupos, sugerindo ausência de interferência de tais variações sobre as medidas de CIn (Figura 12-G, Anexo B). Por fim, os tempos cirúrgicos também não diferiram entre os grupos de animais, sugerindo uniformidade técnica do procedimento (Figura 12-H, Anexo B).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os PCs e os pesos renais (PR) dos animais *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}* (Figura 12-C, D e E, Anexo C). As medidas de PR incluíram ambos os rins e são apresentadas tanto na forma normalizada para 100g de PC do animal como em valores absolutos. O peso renal obtido para os animais *Pkd1^{+/+}* foi de $1,51 \pm 0,03$ g/100g PC, enquanto os camundongos *Pkd1^{+/-}* apresentaram $1,61 \pm 0,10$ g/100g PC ($p=0,40$).

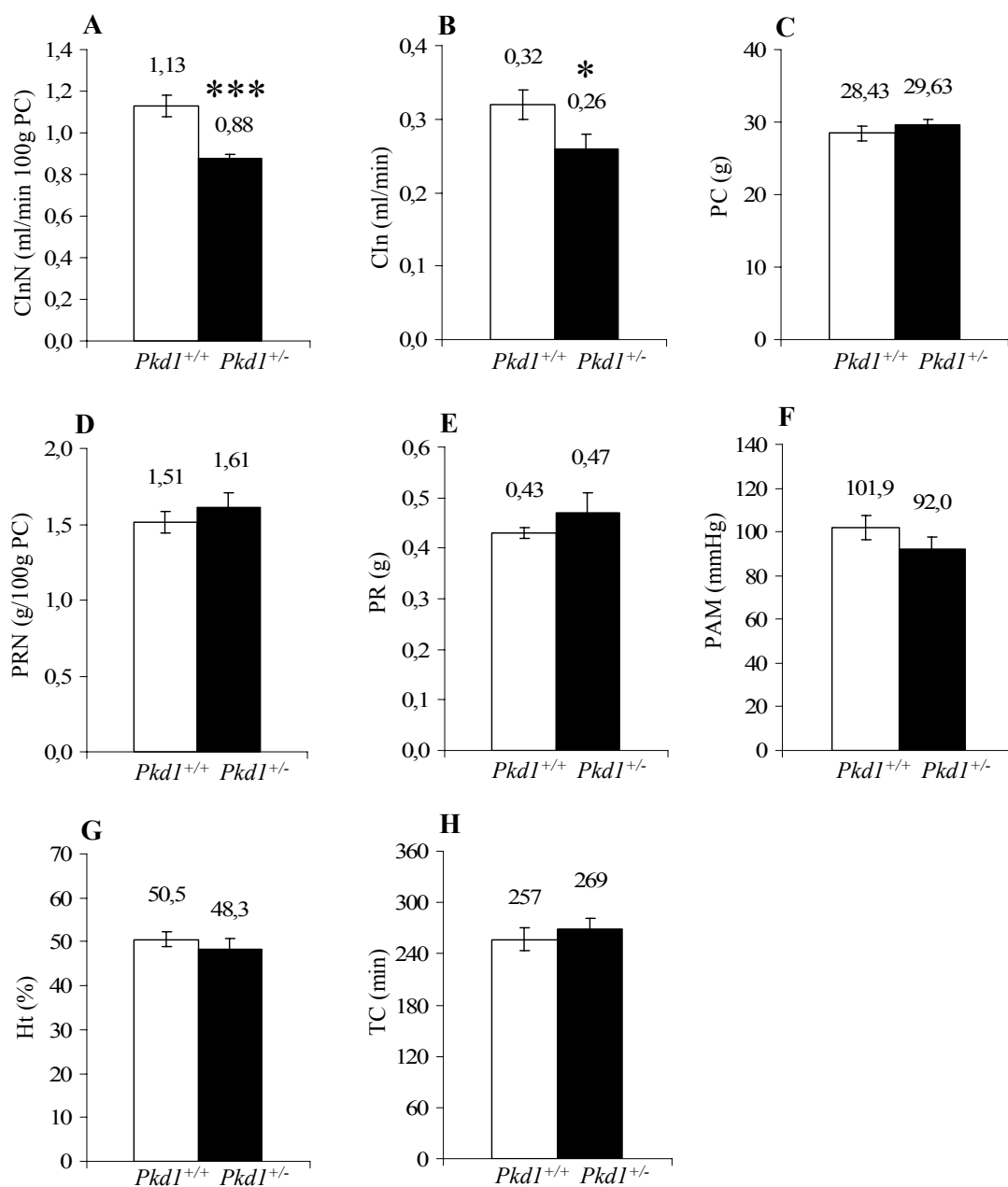


Figura 12 - Análise comparativa do clearance de inulina em camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}. (A) CInN: clearance de inulina normalizado para o peso corpóreo. (B) CIn: clearance de inulina absoluto. (C) PC: peso corpóreo. (D) PRN: peso renal normalizado para o peso corpóreo, incluindo ambos os rins. (E) PR: peso renal absoluto, incluindo ambos os rins. (F) PAM: pressão arterial média. (G) Ht: hematócrito. (H) TC: tempo cirúrgico. n=7 por grupo. *** p<0,001; * p<0,05.

ANÁLISES DA CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO RENAL

Estudos Fundamentais

Experimentos iniciais revelaram que a diurese de 24 h não foi significativamente diferente entre camundongos machos $Pkd1^{+/+}$ and $Pkd1^{+/-}$ com livre acesso a água, dentro de uma faixa de idade de 249 a 323 dias. Animais selvagens apresentaram um volume urinário de 24 h de $1,23 \pm 0,18$ ml (n=9) e heterozigotos de $1,38 \pm 0,24$ ml (n=7; p=0,493; Figura 13).

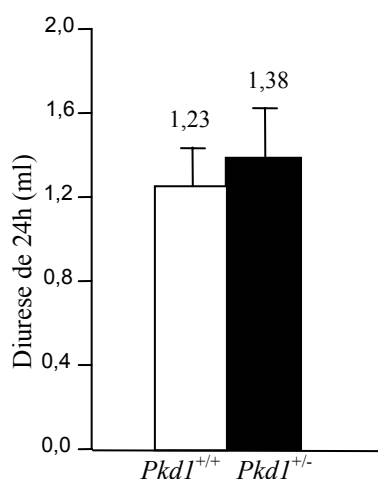


Figura 13 - Diurese de 24 horas para camundongos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$ com livre acesso à água.

As medidas de UosmMax obtidas nos estudos fundamentais sobre a capacidade de concentração renal foram realizadas seguindo protocolo de privação de água por 48 horas, seguido de coleta de urina por 12 horas ainda em privação hídrica. Os estudos iniciais foram realizados em animais machos e fêmeas, dentro da faixa de idade de 24 a 40 semanas. Este desenho experimental visou, uma vez mais,

estabelecer pareamento de idade entre os grupos de animais $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$, dentro de uma faixa etária adulta mas ainda distante da senilidade. Não se observou diferença significativa entre as osmolalidades urinárias máximas obtidas para animais heterozigotos e selvagens, tanto para machos como para fêmeas. Os animais machos $Pkd1^{+/+}$ apresentaram UosmMax de 3.523 ± 135 mOsm/kg H₂O (n=10), enquanto os camundongos $Pkd1^{+/-}$ apresentaram 3.540 ± 375 mOsm/kg H₂O (n=6; Figura 14A, Anexo D). As medidas de UosmMax para camundongos fêmeas, por sua vez, foram de 3.342 ± 284 mOsm/kg H₂O (n=5) para camundongos $Pkd1^{+/+}$, e de 3.247 ± 380 mOsm/kg H₂O (n=6; Figura 14B, Anexo E) para animais $Pkd1^{+/-}$.

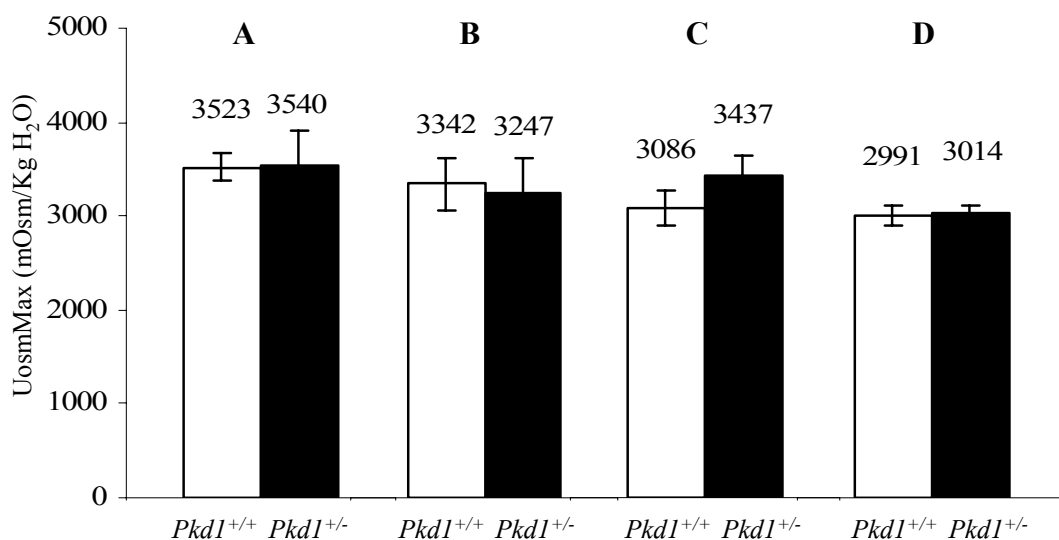


Figura 14 - Análise comparativa da osmolalidade urinária máxima em camundongos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$. (A) machos de 24-40 semanas; n=10 ($Pkd1^{+/+}$) e n=6 ($Pkd1^{+/-}$). (B) fêmeas de 24-40 semanas; n=5 ($Pkd1^{+/+}$) e n=6 ($Pkd1^{+/-}$). (C) fêmeas de 40-56 semanas; n=12 ($Pkd1^{+/+}$) e n=12 ($Pkd1^{+/-}$). (D) machos com mais de 56 semanas; n=20 ($Pkd1^{+/+}$) e n=23 ($Pkd1^{+/-}$).

Com o intuito de investigar a capacidade de concentração renal numa fase mais tardia da vida, analisamos UosmMax em dois grupos de 12 camundongos fêmeas pareados por idade, $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$, na faixa etária de 40 a 56 semanas.

Não houve diferença estatisticamente significativa; as fêmeas selvagens apresentaram UosmMax de 3.086 ± 183 mOsm/kg H₂O e as heterozigotas de 3.437 ± 217 mOsm/kg H₂O (Figura 14-C; Anexo F).

Avaliamos ainda UosmMax em camundongos machos dentro do período de senilidade. Vinte animais *Pkd1*^{+/+} e 23 *Pkd1*^{+/-} com idade superior a 56 semanas foram incluídos neste estudo, também pareado para a idade dos animais. Uma vez mais não detectamos diferença significativa entre os grupos. Os camundongos selvagens apresentaram UosmMax de 2.991 ± 116 mOsm/kg H₂O e os heterozigotos de 3.014 ± 85 mOsm/kg H₂O (Figura 14-D; Anexo G).

Análise de Osmolalidade Urinária Máxima Induzida por Privação Hídrica e Administração de Desmopressina

Com o objetivo de investigar se a administração de DDAVp poderia sensibilizar ainda mais a capacidade de concentração renal, analisamos UosmMax após privação hídrica de 48 h seguida de administração desta droga. Este estudo foi realizado com animais machos com mais de 40 semanas, incluindo 11 camundongos *Pkd1*^{+/+} e 11 *Pkd1*^{+/-} (Figura 15; Anexo H). A diferença de UosmMax também não foi significativa entre os grupos. Os valores obtidos, de 3.001 ± 262 mOsm/kg H₂O para os animais selvagens e de 3.067 ± 281 mOsm/kg H₂O para os heterozigotos, mostraram que a aplicação de DDAVp não aumentou a osmolalidade urinária em relação ao protocolo clássico anterior.

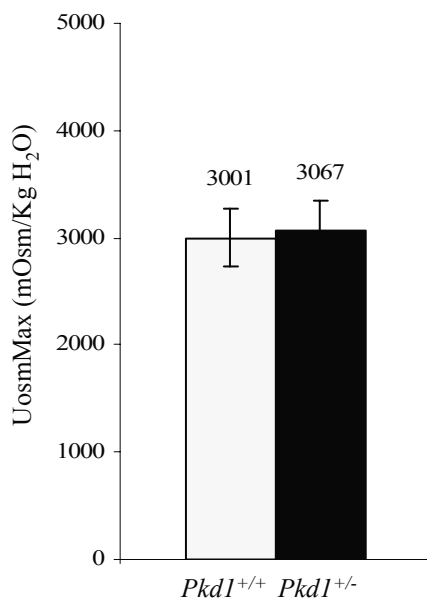


Figura 15 - Análise comparativa da osmolalidade urinária máxima em camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} com mais de 40 semanas, submetidos a privação hídrica e administração de desmopressina. n=11 (*Pkd1*^{+/+}) e n=11 (*Pkd1*^{+/-}).

Análise da Concentração Renal em Camundongos Submetidos a Administração de Desmopressina após Administração de Água por Gavagem

Uma das hipóteses levantadas para explicar o déficit de concentração renal observado em pacientes com DRPAD é de que tais indivíduos apresentam uma resposta reduzida à vasopressina²¹. A princípio, se o fenômeno proposto ocorrer nos camundongos heterozigotos, este déficit deveria se traduzir por uma UosmMax reduzida em comparação aos animais selvagens. Particularidades funcionais, porém, poderiam impedir tal observação. Dessa forma, como uma estratégia complementar à avaliação da resposta tubular à vasopressina em animais heterozigotos, analisamos a capacidade de concentração renal seguindo-se à administração de desmopressina após sobrecarga hídrica realizada por gavagem, em camundongos machos *Pkd1*^{+/+}

and $Pkd1^{+/-}$, dentro da faixa de idade de 46 a 68 semanas. Este estudo, contudo, não demonstrou diferença significativa de osmolalidade urinária (Uosm) entre os dois grupos de animais (Figura 16, Anexo I). Uosm atingiu 2.396 ± 246 mOsm/kg H_2O após sobrecarga hídrica e desmopressina em camundongos selvagens e 2448 ± 309 mOsm/kg H_2O em heterozigotos.

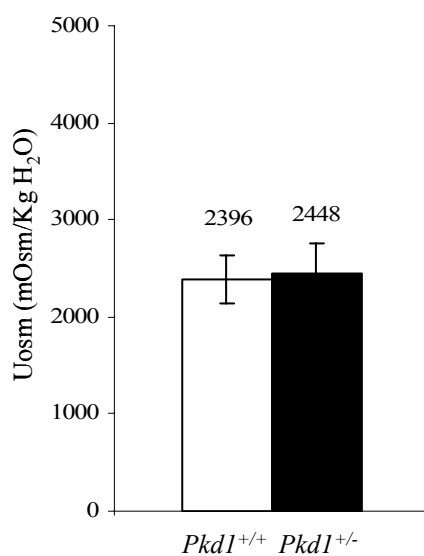


Figura 16 - Análise comparativa da osmolalidade urinária (Uosm) em camundongos machos submetidos à administração de desmopressina após sobrecarga hídrica por gavagem. $n=6$ ($Pkd1^{+/+}$) e $n=6$ ($Pkd1^{+/-}$).

ANÁLISES ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

Cistos renais macroscópicos não foram observados em camundongos selvagens, enquanto o foram em dois animais heterozigotos (9,1%; Figura 17-A). Análises histológicas revelaram 1-4 cistos renais em cinco camundongos *Pkd1*^{+/-} (22,7%; Figura 18-A), ao passo que nenhum cisto foi observado em animais *Pkd1*^{+/+} (Tabela 1).

Cistos hepáticos macroscópicos não foram observados em camundongos *Pkd1*^{+/+}, mas o foram em três animais *Pkd1*^{+/-} (13,7%; Figura 17-B). Oito heterozigotos (36,4%) apresentaram anormalidades hepáticas, incluindo ectasia biliar, cistos (Figura 18-B) e espaço portal com pequenos ductulos periféricos (Tabela 1). Nenhum dos animais selvagens apresentou anomalias histológicas similares.

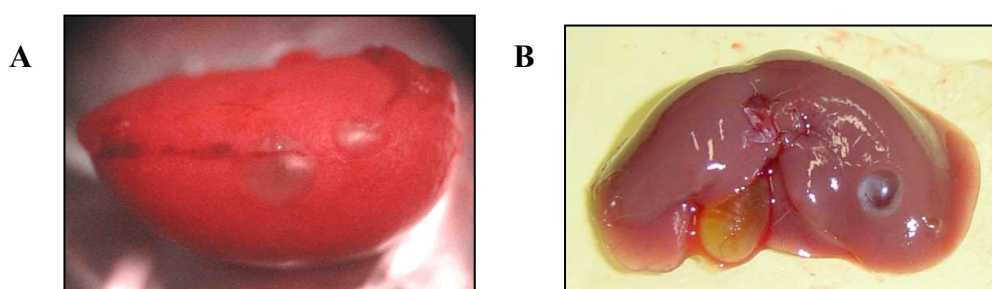


Figura 17 - Cistos macroscópicos renais (A) e hepáticos (B) encontrados em animais *Pkd1*^{+/-}.

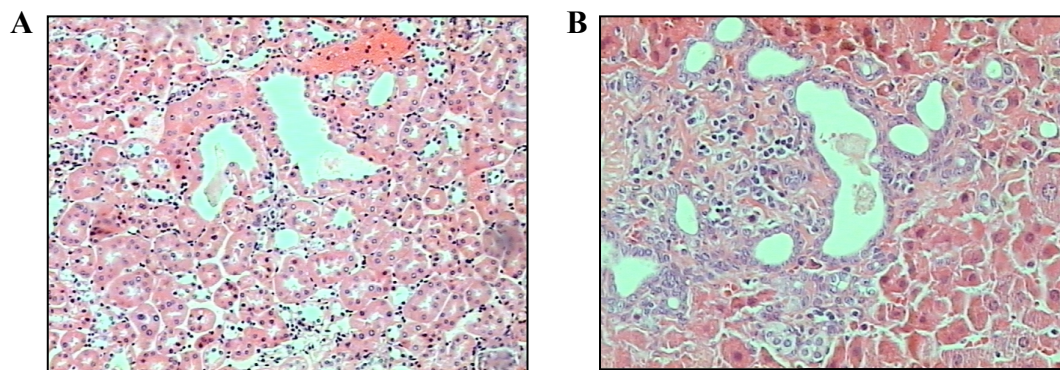


Figura 18 - Cistos microscópicos renais (A) e hepáticos (B) em camundongos *Pkd1*^{+/-}. Coloração HE; aumento original de 100x.

Tabela 1 – Análise quantitativa e qualitativa das alterações renais e hepáticas encontradas em camundongos machos *Pkd1*^{+/-}.

Pkd1^{+/-}	Idade (dias)	Achados patológicos renais	Achados patológicos hepáticos
HM01	198	4 DT	-
HM02	201	-	AEB - restrita a 1 trato portal
HM14	510	5 cistos: 550-4000 µm; 4 DT	EB - difusa
HM35	321	-	AEB; MDB; AEP – restrita a 1 trato portal
HM38	309	2 cistos: 650-710 µm; 1 DT	AEB; MDB – restrita a 1 trato portal
HM43	377	-	Cistos; EB - difusa
HM44	205	1 cisto: 600 µm; 1 DT	-
HM45	272	1 DT	EB – restrita a 5 tratos portais
HM46	275	-	MDB – restrita a 2 tratos portais
HM47	209	1 cisto: 650 µm; 4 DT	EB; MDB – restrita a 2 tratos portais

A primeira coluna identifica os dez animais heterozigotos, dos 22 camundongos analisados, com alterações renais e/ou hepáticas, enquanto a segunda apresenta suas idades. A terceira coluna descreve os achados renais, especificando o diâmetro dos cistos e/ou das dilatações tubulares. DT: dilatação tubular. Apenas um dos 16 animais *Pkd1*^{+/-} avaliados apresentou uma dilatação tubular isolada. A quarta coluna descreve os achados hepáticos, incluindo cistos e anomalias biliares e do espaço portal. AEB: alterações epiteliais biliares, incluindo hiperplasia e/ou células eosinofílicas colunares; MDB: malformação de ducto biliar; EB: ectasia biliar; AEP: alteração de espaço portal, incluindo expansão portal e/ou fibrose.

ANÁLISES DO NÚMERO DE UNIDADES GLOMERULARES E DO VOLUME GLOMERULAR

O procedimento de contagem glomerular por estereologia foi realizado para sete camundongos machos *Pkd1^{+/+}* e sete *Pkd1^{+/-}*, dentro da faixa etária de 186 a 236 dias. Os animais foram pareados para a idade. Não houve diferença significativa de peso corpóreo, peso renal e volume renal (VR) entre os dois grupos de animais (Figura 19-C e D; Anexo J). A proporção de córtex renal foi significativamente menor nos camundongos *Pkd1^{+/-}* ($73,71 \pm 1,13\%$) que nos animais *Pkd1^{+/+}* ($80,29 \pm 0,64\%$; $p=0,0003$; Figura 19-E; Anexo J).

O número de glomérulos por rim esquerdo também foi significativamente mais baixo nos camundongos heterozigotos que nos animais selvagens (20.039 ± 1.699 versus 26.923 ± 2.567 ; $p=0,045$; Figura 19-A; Anexo K). Estes resultados indicam uma redução de 25,57% no número de unidades glomerulares nos camundongos heterozigotos.

O volume médio de todos os glomérulos ($V_{[G]}$), por sua vez, foi maior em camundongos *Pkd1^{+/-}* que em animais *Pkd1^{+/+}* ($349.256 \pm 49.510 \mu\text{m}^3$ versus $249.133 \pm 22.310 \mu\text{m}^3$; Figure 19-C; $p = 0,045$; Anexo L).

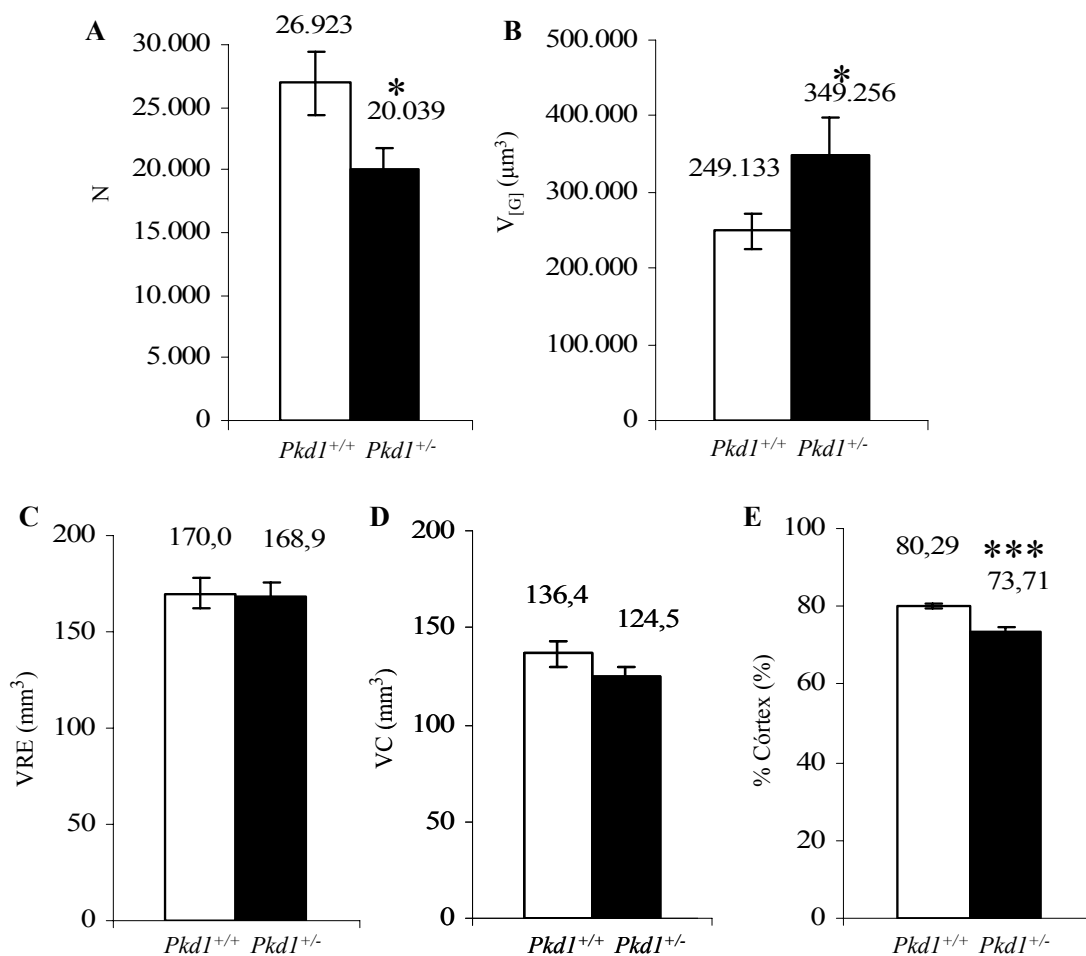


Figura 19 - Quantificação estereológica do número e do tamanho glomerular em camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}. (A) N: número total de glomérulos em rim esquerdo. (B) V_[G]: volume glomerular. (C) VRE: volume de rim esquerdo. (D) VC: volume do córtex renal. (E) % CórteX: taxa percentual cortical. n=7 por grupo. *** p<0,001; * p<0,05.

ANÁLISE DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITRITO/NITRATO

Não encontramos diferença significativa na excreção urinária de NO₂/NO₃ entre os grupos de camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+}, embora os valores absolutos sugiram tendência a menor excreção nos camundongos heterozigotos (0,30±0,04 μM/mg Cr versus 0,38±0,04 μM/mg Cr; p=0,184; Figura 20; Anexo M).

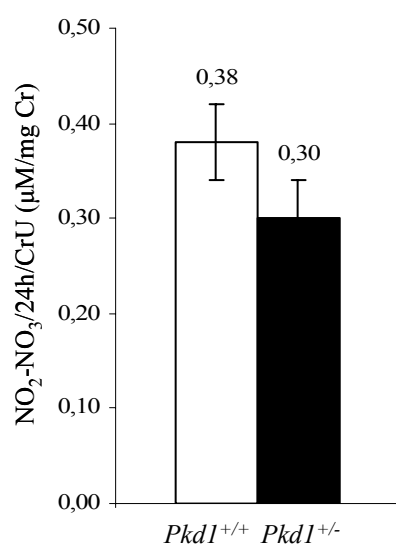


Figura 20 - Excreção urinária de NO₂-NO₃ em camundongos machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}. NO₂-NO₃/24h/CrU: Excreção urinária de 24 h de NO₂-NO₃/excreção urinária de creatinina. n=7 por grupo.

DISCUSSÃO

Embora a DRPAD constitua-se numa doença há muito conhecida e estudada, seu fenótipo complexo limitou importantemente a compreensão de sua patogênese até o início da década de 90. Até esta altura, o acúmulo de informações geradas por estudos de biologia celular, morfológicos e clínicos indicavam como características básicas da enfermidade aumento de proliferação de células epiteliais, alterações de matriz extracelular e secreção transepitelial de fluido². No entanto, a complexidade de sua expressão clínica, histológica e funcional impediam que se distinguisse o defeito bioquímico fundamental da moléstia de alterações biológicas secundárias. Esta realidade limitava, portanto, avanços seqüenciais em direção à compreensão do mecanismo da doença. Diante deste cenário e apoiados pela era recém iniciada de biologia e medicina molecular, esforços intensos foram feitos no sentido de se alcançar o objetivo que permitiria superar estas dificuldades e fluir rapidamente ao entendimento da patogênese e fisiopatologia da doença: identificar os genes *PKD1* e *PKD2*, os genes mutados na DRPAD. Assim, por meio da estratégia de clonagem posicional, *PKD1* e *PKD2* foram clonados e caracterizados, respectivamente, nos anos de 1994³⁸ e 1996³⁷.

A identificação desses genes e a progressiva caracterização de seus produtos permitiram contribuições sucessivas ao entendimento dos mecanismos alterados na DRPAD e das funções das policistinas 1 e 2. Um sistema de avaliação funcional *in vitro* da policistina-1 foi desenvolvido, permitindo abordar aspectos biológicos fundamentais relacionados à molécula⁴⁷. Este estudo revelou que a expressão estável de policistina-1 induz tubulogênese espontânea em células MDCK e inibe apoptose,

sugerindo que sua expressão reduza a taxa de proliferação de células epiteliais renais, o que permite às mesmas que se diferenciem sem sucumbir à apoptose. Estudos de transfecção também levaram a compreensões mecanísticas moleculares fundamentais. Hanaoka e cols. demonstraram que as policistinas 1 e 2 interagem no nível da membrana plasmática, onde a policistina-1 poderia atuar como receptor e/ou mecanossensor e a policistina-2, regulada pela policistina-1, como um canal catiônico não seletivo, permeável a Ca^{++} ⁴⁹. Como o cílio primário poderia potencialmente modular a função do centríolo, estes sinais transduzidos para o meio intracelular poderiam controlar a taxa de crescimento das células epiteliais tubulares renais, permitindo que evoluam à diferenciação terminal e à consequente formação de túbulos renais maduros⁸⁵.

Várias vias sinalizadoras não mutuamente exclusivas têm sido propostas para as policistinas 1 e 2. Como vimos, a policistina-1 pode funcionar como um receptor de superfície celular que, uma vez ativado, também ativaria a policistina-2, localizada na membrana plasmática ou no retículo endoplasmático, aumentando o Ca^{++} citosólico^{49, 86}. Esta sinalização regularia a expressão gênica e a exocitose/fusão vesicular. Faz-se importante mencionar que o desenvolvimento embrionário, um processo sobre o qual as policistinas atuam, é aparentemente dependente de sinalização por Ca^{++} , um sistema ubíquo e dinâmico. A policistina-1 pode também funcionar como um receptor acoplado a proteína G, regulando proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e secreção de fluido^{51, 87}. Finalmente, a ativação da policistina-1, seguindo um processo dependente da policistina-2, ativa JAK2, o que leva à fosforilação e ativação de STAT1 e geração de homodímeros STAT1 ⁷¹. Estes dímeros se translocam ao núcleo, onde se ligam ao promotor de *p21*, promovendo

sua regulação positiva e subsequente inibição de Cdk2. Este processo determina parada celular em G0/G1 e, portanto, pode explicar o efeito da policistina-1 na redução da taxa de proliferação celular.

A geração de modelos animais ortólogos à DRPAD1 e à DRPAD2 também contribuiu consideravelmente à compreensão progressiva da patogênese da doença e de mecanismos envolvidos na organogênese, particularmente na nefrogênese. A maior parte dos modelos ortólogos gerados dá suporte ao modelo de dois golpes, proposto como mecanismo molecular à formação de cistos na DRPAD, e ampliou substancialmente o leque de alterações sistêmicas consequentes à perda de função da policistina-1. Uma estratégia criativa para se analisar alguns aspectos da patogênese da DRPAD foi recentemente desenvolvida por Nishio e cols.⁸⁸. Estes pesquisadores agregaram células tronco embrionárias *Pkd1*^{-/-} a mórulas de camundongos *Pkd1*^{+/+} LacZ⁺ Rosa26, gerando um animal quimérico que sobreviveu além de um mês de idade. A geração desse animal permitiu caracterizar aspectos moleculares e celulares da cistogênese. Interessantemente, os investigadores mostraram que, neste modelo animal, os cistos são inicialmente compostos por uma população mista de células *Pkd1*^{-/-} e *Pkd1*^{+/+}, a qual é gradualmente substituída por uma população de células predominantemente *Pkd1*^{-/-}.

A caracterização de animais heterozigotos para uma cópia *knock-out* de *Pkd1*, no entanto, foi bem mais superficial que a caracterização de camundongos homozigotos *Pkd1*^{-/-}, centrando-se principalmente na observação do surgimento tardio de cistos renais e hepáticos. Assim, aspectos importantes associados a alterações funcionais observadas na doença humana, assim como o estudo de suas bases moleculares e estruturais, não foram incluídos nessas avaliações. É importante

frisar que são os animais heterozigotos os que se constituem no modelo ortólogo do paciente com DRPAD1 e, portanto, mesmo face às ressalvas feitas anteriormente, é neles que investigações funcionais e de patogênese potencialmente transponíveis ao paciente devem ser realizadas. Uma razão fundamental para a utilização de um modelo ortólogo para a caracterização de disfunções orgânicas, neste caso renais, é a homogeneidade de *background* genético, da mutação de linhagem germinativa e do controle ambiental dos animais, condições não encontradas em pacientes.

Conforme discutido previamente, resultados sólidos indicam que a maior parte, se não todos, dos cistos renais e hepáticos em ambas DRPAD1 e DRPAD2, dependem de um processo de dois golpes para serem formados^{44, 89, 90}. Estes estudos sugerem fortemente, portanto, que no nível molecular o mecanismo de formação de cistos seja recessivo na DRPAD. Entretanto, no momento ainda não sabemos se este mesmo processo é responsável pelas manifestações não císticas da doença, como a hipertensão arterial sistêmica, o déficit de concentração renal e a redução do ritmo de filtração glomerular. Assume-se que estas manifestações sejam secundárias às anormalidades estruturais e funcionais resultantes da formação de cistos, mas nenhuma evidência direta que suporte esta noção foi publicada até o momento.

Estudos realizados em camundongos trouxeram apoio para este modelo, uma vez que relataram que camundongos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd2*^{+/-} apresentavam alterações císticas leves de aparecimento apenas tardio^{59, 65}. No entanto, estes estudos não incluíram análises funcionais mais amplas e completas, de forma que diferenças sutis podem ter passado despercebidas. Baseados no fato de que nossos camundongos heterozigotos desenvolvem apenas cistos renais esporádicos durante a vida adulta, julgamos que este era um modelo apropriado para avaliar o impacto biológico da haploinsuficiência de

Pkd1. Nosso estudo atual sugere fortemente que a haploinsuficiência de *Pkd1* apresenta, de fato, efeitos prejudiciais mensuráveis em camundongos. Nossa análise de sobrevida atuarial mostrou que fêmeas *Pkd1*^{+/-} vivem menos que as normais. Resultados similares, embora mais intensos, também foram reportados para heterozigotos *Pkd2*⁹¹. Da mesma forma que nos outros estudos, nossa análise não foi capaz de definir as causas dessa diferença. A ausência de significância na diferença de sobrevida entre machos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} pode ter ocorrido devido ao menor número de animais analisados, visto que os valores absolutos sugerem uma tendência de redução da sobrevida em heterozigotos. Estes dados sugerem fortemente a existência de fenótipos sutis, mas relevantes, em animais heterozigotos.

A sobrevida dos camundongos selvagens gerados em nossa colônia foi superior à encontrada na literatura. Nossa análise atuarial mostrou expectativa de vida de 773 dias para as fêmeas, contra 679 relatado por Storer e cols., e de 807 dias para os machos, comparado a 648 segundo o mesmo estudo⁹². A diferença de sobrevida persiste mesmo para os animais heterozigotos, quando comparados aos resultados de Storer e cols. A interpretação mais plausível de tais resultados recai nas condições de criação e manutenção dos animais, em particular às associadas ao período de manutenção da prole e de animais em estoque em condições SPF.

Déficit de concentração renal e redução do RFG constituem-se nas disfunções renais mais clássicas da DRPAD. Segundo observações iniciais, o déficit de concentração renal observado em pacientes com DRPAD, ainda com o RFG preservado, poderia resultar do envolvimento cístico medular ou córtico-medular⁷⁰. O defeito de concentração, portanto, seria causado primariamente por alterações estruturais ou resposta prejudicada à vasopressina, esta associada às anormalidades

estruturais. Outros autores sugerem, além disso, que a distorção anatômica imposta por cistos renais poderia comprimir vasos intra-renais, induzir disfunção vascular e, finalmente, determinar o déficit de concentração urinária⁹³. Gabow e cols., no entanto, sugerem que em adição a estas perturbações anatômicas, o déficit de concentração renal da DRPAD poderia refletir disfunções sem causa estrutural, tal como resistência à vasopressina²¹.

Baseados na natureza de nosso modelo, fomos capazes de investigar o papel da haploinsuficiência de *Pkd1* sobre este fenótipo potencial. Não detectamos, contudo, diferença significativa na capacidade de concentração urinária entre camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}. É importante realçar que nossos estudos incluíram camundongos machos e fêmeas, em diferentes faixas de idade. Além disso, utilizamos dois protocolos distintos para avaliar a osmolalidade urinária máxima e um protocolo adicional que permitiu analisar a resposta à vasopressina em uma condição mais sensibilizada. Os resultados obtidos neste modelo animal, portanto, não suportam a hipótese de que o déficit de concentração urinária da DRPAD seja causado, mesmo parcialmente, por haploinsuficiência de *PKDI*. Por outro lado, sugerem que a disfunção de concentração, mesmo precocemente, esteja associada a alterações estruturais, aparentemente representadas pelas expansões císticas intra-renais. Estes dados sugerem, portanto, que esta anormalidade funcional, ainda que associada a um processo complexo, seja dependente de alterações focais induzidas por mutações somáticas no alelo previamente normal de *PKDI*. Esses resultados são consistentes com as observações em crianças reportadas por Fick e cols. , onde o déficit significativo de concentração renal surgiu apenas em crianças com mais de 10

cistos¹⁹, e por Seeman e cols. , onde a redução de concentração correlacionou-se com o número de cistos e com os níveis de pressão arterial²³.

Nossos estudos de clearance de inulina revelaram uma redução do RFG em camundongos *Pkd1*^{+/-}, numa faixa de idade adulta. Essa diferença foi significativa tanto quando avaliamos CIn normalizado para o peso do animal como para valores absolutos. Várias possibilidades potencialmente determinadas pela perda de função parcial de *Pkd1* poderiam contribuir para a redução do RFG. Entre elas, destacava-se uma possível produção defeituosa de NO. A liberação de NO por células endoteliais desempenha um papel fundamental no controle da hemodinâmica local renal. Faz-se importante mencionar que a hipertensão arterial ocorre antes do comprometimento de função renal em 50 a 70% dos pacientes com DRPAD e constitui-se num dos preditores de declínio do RFG². Além disso, a DRPAD se associa a uma alteração da vasodilatação dependente do endotélio, que tem sido atribuída a uma produção diminuída de NO pela NO sintase⁹⁴. Por fim, num modelo anterior mostrou-se que camundongos *Pkd1*^{+/-} excretam níveis mais baixos de metabólitos do NO na urina que animais *Pkd1*^{+/+} ⁶⁴.

Nossos resultados, contudo, não revelaram diferença significativa na excreção urinária de NO₂/NO₃ entre camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, embora uma provável tendência para baixa excreção urinária de nitrito/nitrato tenha sido observada em animais heterozigotos. Nossos resultados sugerem, portanto, que a redução do RFG encontrada nos camundongos heterozigotos é provavelmente não relacionada primariamente à produção e/ou liberação anormal de NO sistêmico, embora esses animais possam apresentar algum nível de anormalidade no sistema NO/NOS. Além disso, nossos dados não podem excluir diferenças fisiologicamente significantes na

geração e/ou liberação renal de NO entre animais *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}, suficientes para alterar o RFG. O fato de não termos detectado diferenças no sistema NO/NOS entre camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} no mesmo nível observado por Muto e cols. pode ser explicado pelas diferenças de linhagem genética ou pelo fato de seus heterozigotos apresentarem um número consideravelmente maior de cistos renais⁶⁴.

A tubulogênese tardia e a maturação tubular parecem depender de um nível crítico de expressão de policistina-1⁵⁸. Um processo de organização e diferenciação ainda mais complexo, como o controle da ramificação tubular e o estabelecimento do número de néfrons, por sua vez, poderia estar associado a um limiar de policistina-1 mais alto que o da maturação tubular. Nossos resultados revelaram uma diminuição significativa no número de néfrons em camundongos heterozigotos. A redução da razão córtex/medula em animais sem formação cística relevante enfatiza o papel da haploinsuficiência de *Pkd1* na diminuição do número total de néfrons. A frequência de cistos renais bastante baixa detectada em nossos heterozigotos e a ausência de diferença de pesos renais entre camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} sugerem fortemente que a redução de CIn observada não seja dependente de mutações somáticas, mas sim determinada pelo estado haploinsuficiente de *Pkd1*. Em suporte a nossos resultados, Wang e cols. também encontraram redução do RFG em outros modelos de camundongos ortólogos à DRPAD, incluindo animais *Pkd1*^{+/-}, *Pkd2*^{+/-} e *Pkd2*^{WS25/-}⁹⁵. Estudos incluindo crianças e adolescentes com DRPAD nas fases iniciais da doença, contudo, não mostraram resultados semelhantes²⁰.

Faz-se importante notar que outros modelos animais e estados humanos associados a diminuições similares ou maiores do número de néfrons são acompanhados por compensação virtualmente completa do RFG^{96, 97, 98, 99}. Em vários

desses modelos animais, a redução do número de néfrons também foi induzida durante o período de desenvolvimento embrionário, pela administração de gentamicina ou dexametasona, ou nocauteando um alelo do fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF; *glial cell line-derived neurotrophic factor*)^{96, 97, 98}. Deve-se mencionar, contudo, que em um outro modelo de rato, a remoção cirúrgica de 50% dos néfrons, realizada durante o desenvolvimento, causou redução da função renal e hipertensão arterial sensível a sal na vida adulta¹⁰⁰.

A razão pela qual a compensação do RFG não ocorreu em nosso modelo animal é desconhecida no momento. Poderíamos especular que a haploinsuficiência de *Pkd1* poderia determinar não apenas a redução da população de néfrons, mas também interferir no *feed-back* fisiológico que regula a compensação do RFG. Além disso, a perda de compensação do RFG poderia ser explicada com base numa disponibilidade inadequada de NO, assumindo-se uma tendência real de excreção urinária mais baixa ou diferenças renais locais não detectadas de NO₂/NO₃ em animais heterozigotos. Outras anormalidades ainda não conhecidas de sistemas vasodilatadores/vasoconstritores potencialmente associadas à haploinsuficiência de *Pkd1*, por seu lado, poderiam também comprometer o mecanismo de compensação do RFG. Por fim, variações espécie-específicas nesses sistemas, associadas à haploinsuficiência de *Pkd1*, poderiam explicar a razão pela qual humanos compensam o RFG até fases relativamente tardias da doença, enquanto camundongos *Pkd1*^{+/-} não o fazem. Também é possível que camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentem sensibilidade diferente dos controles normais a agentes anestésicos, resultando em hemodinâmica e/ou auto-regulação renal disfuncional e queda do RFG. Nossos dados, portanto, não são capazes de excluir completamente a possibilidade de que a redução do RFG se deva a um artefato experimental.

Os camundongos heterozigotos apresentaram um volume glomerular maior que os animais selvagens. Este fenótipo poderia ser causado diretamente pela haploinsuficiência de *Pkd1* ou ser secundário a um menor número de glomérulos, conforme observado em outros modelos e estados patológicos oligonéfricos^{96, 97}. Deve-se notar, entretanto, que os glomérulos não apresentaram sinais histológicos de glomeruloesclerose segmentar focal, o que é consistente com a ausência de hiperfiltração glomerular e a observada perda de compensação do RFG. Até o presente, contudo, não há estudos realizados em rins humanos com DRPAD em estágios bastante iniciais da doença. A extensão à qual estes novos conceitos poderiam ser integrados ao entendimento da nefrogênese humana e/ou da patogênese da DRPAD, portanto, deverá ser analisada em estudos futuros.

A ausência de defeitos glomerulares flagrantes ou de defeitos morfológicos tubulares em animais *Pkd1*^{+/-} foi documentada em modelos ortólogos prévios⁵⁸. A haploinsuficiência, portanto, parece não interferir na tubulogênese tardia/maturação tubular. Assim, o distúrbio associado à haploinsuficiência provavelmente ocorre nas fases precoces da nefrogênese, particularmente no período de ramificação da tubulogênese. Baixos níveis de policistina-1 poderiam diminuir o número de ramos derivados do broto ureteral ou impedir a indução mesenquimal normal em estágios precoces da organogênese, determinando um menor número de unidades de néfron. Deve-se destacar que um estudo recente mostrou que *Pkd1* é essencial para a morfogênese por ramificação normal da placenta cório-alantóide, através da modulação da função do trofoblasto¹⁰¹. Estes dados são consistentes com os resultados de dois estudos *in vitro*, que demonstraram que a expressão de toda ou de parte da policistina-1 é capaz de deflagrar morfogênese por ramificação em células

MDCK e IMCD (*inner medullary collecting duct*)^{47, 102}. Agindo de forma independente de ligante, a terminação carboxi da policistina-1 deflagra vias de sinalização específicas para morfogênese, incluindo a proteína quinase C- α . Estas observações sugerem um papel para a policistina-1 na regulação da morfogênese por ramificação renal, por meio da modulação potencial do Ca⁺⁺ citosólico e de vias a jusante. Faz-se interessante mencionar que, em outro modelo animal, um estudo recente realizado para identificar vias de sinalização potenciais influenciadas pela haploinsuficiência de *Foxf1* (*forkhead box f1*) mostrou que embriões *Foxf1*^{+/-} apresentam defeitos na ramificação e na formação de brotos pulmonares primários¹⁰³.

Nossos resultados sugerem uma grande complexidade na determinação fenotípica da doença, envolvendo mecanismos moleculares distintos e, possivelmente, dependência de diferentes níveis críticos de policistina-1 para diferentes aspectos de sua função biológica. Além disso, nossos dados indicam que os efeitos renais da policistina-1 não se restringem aos túbulos, envolvendo também os glomérulos. Por fim, nossos resultados sugerem que, em adição ao envolvimento tubular, vascular e intersticial, a DRPAD também possa apresentar um componente glomerular, embora aparentemente secundário.

Em resumo, nós propomos um modelo no qual a policistina-1 desempenha um papel importante no estabelecimento do número de néfrons, precocemente na nefrogênese, e onde seu estado haploinsuficiente é suficiente para prejudicar o processo de ramificação e resultar num número reduzido de néfrons. Estes resultados trazem informações fundamentais sobre a inativação de *Pkd1* em animais heterozigotos, abrindo novos conceitos potencialmente associados à nefrogênese e à patogênese da DRPAD.

CONCLUSÕES

Camundongos machos $Pkd1^{+/-}$ apresentam um menor número de néfrons e uma menor razão córtex/medula que animais $Pkd1^{+/+}$ neste modelo. Nossos resultados sugerem que a haploinsuficiência de $Pkd1$ determine a redução do número total de néfrons nos animais heterozigotos.

Camundongos machos $Pkd1^{+/-}$ apresentam ritmo de filtração glomerular diminuído em relação a controles $Pkd1^{+/+}$, neste modelo animal e dentro da faixa de idade de 26 a 33 semanas. Nossos resultados sugerem que a redução do RFG observada neste modelo de camundongo não seja dependente de mutações somáticas, mas sim determinada pela haploinsuficiência de $Pkd1$.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na capacidade de concentração renal entre camundongos $Pkd1^{+/-}$ e $Pkd1^{+/+}$, tanto para animais machos como fêmeas, nas diferentes faixas de idade estudadas. Nossos resultados, portanto, não suportam a hipótese de que o déficit de concentração urinária da DRPAD seja causado, mesmo parcialmente, por haploinsuficiência de $PKDI$; sugerem, isto sim, que esta disfunção esteja associada a alterações estruturais, representadas pelos cistos renais.

Camundongos machos $Pkd1^{+/-}$ apresentam maior volume glomerular que animais $Pkd1^{+/+}$ neste modelo animal.

A análise de sobrevida atuarial demonstra que camundongos fêmeas *Pkd1*^{+/-} apresentam menor sobrevida que as controles normais. Os valores absolutos sugerem ainda uma tendência de redução na sobrevida de camundongos machos *Pkd1*^{+/-}. Em conjunto, estes resultados sugerem a existência de fenótipos relevantes, associados a efeitos prejudiciais, em animais heterozigotos.

A excreção urinária de NO₂/NO₃ não difere significativamente entre animais machos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} neste modelo animal.

Camundongos *Pkd1*^{+/-} apresentam cistogênese renal mínima e esporádica entre 24 e 40 semanas de idade neste modelo animal.

Não foi detectada diferença significativa entre os pesos renais de animais machos *Pkd1*^{+/-} e *Pkd1*^{+/+} dentro da faixa etária estudada.

Nossos resultados levam à proposição de um modelo no qual a policistina-1 desempenha um papel importante no estabelecimento do número de néfrons, numa fase precoce da nefrogênese, e no qual a haploinsuficiência gênica é suficiente para comprometer o processo de ramificação, resultando num número reduzido de néfrons.

Anexo A:



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados

APROVAÇÃO

A Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados – CIBio em OGM's da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05-07-2002, **APROVOU** para o Nível de Biossegurança (NB1) o Protocolo de Pesquisa nº 008/02-CIBio, intitulado: **"Determinantes da Severidade da doença renal no Camundongo heterozigoto para mutação nula em mPKD1: Avaliação Funcional e Morfológica"**. apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Luiz Fernando Onuchic**, do Departamento de Clínica Médica – Laboratório de Investigações Médicas – LIM 12.

CIBio em OGM's, 16 de dezembro de 2003.


PROF. DR. JOSÉ EDUARDO KRIEGER
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
em Organismos Geneticamente Modificados

Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,
Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 3085 4263 fax : 011 3069 6492 - e-mail : diretoria.clinica@hcnet.usp.br

Anexo B – Análise comparativa do CIn em camundongos *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}*.

<i>Pkd1^{+/+}</i>	WM01	WM02	WM03	WM04	WM05	WM06	WM07	Média	EP	p
CIn (ml/min/100g PC)	0,84	1,26	1,05	1,06	1,26	0,85	1,12	1,06	0,06	
Período 1										
CIn (ml/min/100g PC)	1,24	0,84	1,05	1,17	1,27	1,07	1,27	1,13	0,06	
Período 2										
CIn (ml/min/100g PC)	1,32	1,30	1,61	0,87	1,34	0,90	1,16	1,21	0,10	
Período 3										
CIn (ml/min/100g PC)	1,13	1,13	1,24	1,03	1,29	0,94	1,18	1,13	0,05	0,0002***
Média										
CIn média (ml/min)	0,28	0,31	0,36	0,26	0,39	0,29	0,37	0,32	0,02	0,0145*
Peso (g)	25,10	27,00	29,20	25,60	30,00	31,10	31,00	28,43	0,95	
PAM (mmHg)	100	95	125	105	78	105	105	101,9	5,3	0,2551
Hematócrito (%)	50,0	58,0	48,5	51,0	50,0	48,0	48,0	50,5	1,7	0,4442
Tempo de cirurgia (min)	280	250	210	305	232	291	230	257	13	0,5381
Idade (dias)	198	197	231	207	206	208	236	212	6	0,3591
<i>Pkd1^{+/-}</i>	HM01	HM02	HM03	HM04	HM05	HM06	HM07	Média	EP	
CIn (ml/min/100g PC)	1,04	1,21	0,77	0,97	0,93	0,84	0,92	0,95	0,05	
Período 1										
CIn (ml/min/100g PC)	0,96	0,66	0,85	1,03	1,12	0,67	0,85	0,88	0,07	
Período 2										
CIn (ml/min/100g PC)	0,81	1,00	0,84	0,60	0,63	1,05	0,69	0,80	0,07	
Período 3										
CIn (ml/min/100g PC)	0,93	0,95	0,82	0,87	0,89	0,85	0,82	0,88	0,02	
Média										
CIn média (ml/min)	0,27	0,30	0,24	0,26	0,29	0,24	0,23	0,26	0,02	
Peso (g)	28,50	31,90	29,20	29,50	32,20	27,60	28,50	29,63	0,66	
PAM (mmHg)	100	90	89	70	78	110	110	92,0	5,8	
Hematócrito (%)	59,5	48,8	50,0	48,0	43,6	38,0	50,0	48,3	2,5	
Tempo de cirurgia (min)	255	290	230	253	250	261	337	269	13	
Idade (dias)	198	201	187	187	207	237	208	204	6	

Os valores correspondentes a cada período avaliado precedem os valores das médias do CIn normalizados para PC e absolutos. Os pesos de cada animal são mostrados a seguir. Estes valores foram utilizados para a normalização das medidas de CIn. As respectivas medidas de PAM, hematócrito e tempo de cirurgia são referidas nas linhas abaixo. As idades correspondentes a cada animal são reportadas na última linha, demonstrando pareamento de idade entre os grupos. A identificação individual dos animais é mostrada na primeira linha da tabela. EP: erro padrão da média; p: valor de p para comparação *Pkd1^{+/+}* x *Pkd1^{+/-}*. *** p<0.001; * p<0.05.

Anexo C - Análise comparativa do peso corporal e do peso renal de camundongos *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}*

<i>Pkd1^{+/+}</i>	WM01	WM02	WM03	WM04	WM05	WM06	WM07	Média	EP	p
PC (g)	25,1	27	29,2	25,6	30	31,1	31	28,43	0,95	0,4
PR1 (g)	0,2	0,21	0,21	0,2	0,21	0,24	0,22	0,21		
PR2 (g)	0,2	0,2	0,24	0,18	0,21	0,25	0,23	0,22		
PR total (g)	0,4	0,41	0,45	0,38	0,42	0,49	0,45	0,43	0,01	0,3
PR/100g PC	1,61	1,5	1,54	1,49	1,4	1,56	1,44	1,51	0,03	0,4
<i>Pkd1^{+/-}</i>	HM01	HM02	HM03	HM04	HM05	HM06	HM07	Média	EP	
PC (g)	28,5	31,9	29,2	29,5	32,2	27,6	28,5	29,63	0,67	
PR1 (g)	0,27		0,19	0,26	0,29	0,17	0,25	0,24		
PR2 (g)	0,25		0,2	0,26	0,28	0,18	0,23	0,23		
PR total (g)	0,52		0,39	0,52	0,57	0,35	0,48	0,47	0,03	
PR/100g PC	1,81		1,33	1,78	1,76	1,26	1,7	1,61	0,10	

Os valores correspondentes a cada rim (PR1 e PR2) precedem os valores totais de peso. Os valores normalizados do peso renal são mostrados na última linha. Não foi possível obter o valor de PR para o animal HM02. p: valor de p para comparação *Pkd1^{+/+}* x *Pkd1^{+/-}*.

Anexo D – Análise comparativa de osmolalidade urinária máxima (UosmMax) em camundongos machos de 24 a 40 semanas

	<i>Pkd1</i> ^{+/+}	UosmMax (mOsm/kg H ₂ O)	Idade (dias)	<i>Pkd1</i> ^{+/-}	UosmMax (mOsm/kg H ₂ O)	Idade (dias)
	WM08	3643	241	HM11	3684	215
	WM09	3468	232	HM12	3988	214
	WM10	3408	232	HM13	5000	212
	WM11	3156	241	HM14	2786	282
	WM12	3152	215	HM15	2414	240
	WM13	4124	215	HM16	3367	197
	WM14	3893	214			
	WM15	3273	212			
	WM16	4176	212			
	WM17	2936	197			
Média		3523	211		3540	227
EP		135	5		375	12
p		0,968	0,626			

As colunas abaixo das designações *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} identificam individualmente os animais. p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}.

Anexo E - Análise comparativa de UosmMax em camundongos fêmeas de 24 a 40 semanas

	<i>Pkd1</i> ^{+/+}	UosmMax (mOsm/kg H ₂ O)	Idade (dias)	<i>Pkd1</i> ^{+/-}	UosmMax (mOsm/kg H ₂ O)	Idade (dias)
	WF01	3837	241	HF02	2425	247
	WF04	3109	241	HF03	2936	247
	WF13	4162	234	HF04	2861	247
	WF14	2962	277	HF07	3388	282
	WF15	2639	248	HF08	5042	213
				HF13	2830	277
Média		3342	248		3247	252
EP		284	8		380	10
p		0,852	0,770			

As colunas abaixo das designações *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-} identificam individualmente os animais. p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}.

Anexo F - Análise comparativa de UosmMax em camundongos fêmeas de 40 a 56 semanas

	<i>Pkd1</i> ^{+/+}	UosmMax (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)	<i>Pkd1</i> ^{+/-}	UosmMax (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)
	WF14	4708	284	HF16	4302	284
	WF15	3038	284	HF17	4383	285
	WF16	2675	285	HF04	3225	323
	WF01	2958	310	HF02	3372	323
	WF17	3664	317	HF03	3990	323
	WF18	2397	318	HF07	3423	325
	WF19	3264	353	HF08	3991	325
	WF04	2564	327	HF18	3792	328
	WF20	3046	327	HF19	3197	327
	WF21	3222	353	HF20	2795	372
	WF22	2393	366	HF21	1645	372
	WF23	3106	366	HF22	3128	372
Média		3086	324		3437	330
EP		183	9		217	9
p		0,230	0,644			

p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}.

Anexo G - Análise comparativa de UosmMax em camundongos machos com mais de 56 semanas

	<i>Pkd1</i> ^{+/+}	UosmMax (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)	<i>Pkd1</i> ^{+/-}	UosmMax (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)
	WM08	3140	716	HM08	3428	412
	WM09	2313	701	HM09	2514	682
	WM10	2956	412	HM10	3084	555
	WM11	3950	701	HM12	3438	583
	WM12	2412	419	HM13	2634	630
	WM13	3284	764	HM17	3423	409
	WM15	3702	409	HM18	3372	411
	WM16	3843	409	HM19	2818	514
	WM18	3123	419	HM20	3157	519
	WM19	3155	524	HM21	3067	519
	WM20	3003	538	HM22	3296	555
	WM21	2383	552	HM23	3391	569
	WM22	3265	688	HM24	3413	569
	WM23	2514	687	HM25	2651	583
	WM24	2396	687	HM26	3341	597
	WM25	3264	702	HM27	3505	597
	WM26	2895	715	HM28	3341	602
	WM27	2109	715	HM29	2305	619
	WM28	2782	750	HM30	2691	616
	WM29	3338	778	HM31	2459	633
				HM32	3098	647
				HM33	2541	668
				HM34	2363	696
Média		2991	614		3014	573
EP		116	31		85	17
p		0,250	0,874			

p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}.

Anexo H - Análise comparativa de UosmMax em camundongos machos com mais de 40 semanas submetidos a privação hídrica e administração de desmopressina

	<i>Pkd1</i> ^{+/+}	UosmMax (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)	<i>Pkd1</i> ^{+/-}	UosmMax (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)
	WM09	2960	491	HM26	1999	679
	WM52	3750	370	HM25	3711	338
	WM19	3200	410	HM55	1891	331
	WM21	3881	410	HM28	4080	282
	WM23	1887	601	HM31	3708	410
	WM55	4297	599	HM13	3523	437
	WM56	2111	599	HM23	1971	646
	WM57	2401	506	HM08	4105	646
	WM18	3950	370	HM09	3971	611
	WM27	1987	370	HM21	2559	611
	WM53	2586	370	HM27	2215	601
Média		3001	463		3067	508
EP		262	30		281	45
p		0,865	0,415			

p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}.

Anexo I - Análise comparativa da osmolalidade urinária (Uosm) em camundongos machos submetidos à administração de desmopressina após administração de água por gavagem

<i>Pkd1</i> ^{+/+}	Uosm após 2,4ml de H ₂ O por gavagem (mOsm/Kg H ₂ O)	Uosm após 8,5h da dose de DDAVp (mOsm/Kg H ₂ O)	Diferença de Uosm entre gavagem e DDAVp (mOsm/Kg H ₂ O)	Idade (dias)
WM21	467	2936	2469	452
WM19	578	2331	1753	452
WM52	280	1440	1160	412
WM53	269	2048	1779	412
WM18	502	3075	2573	412
WM27	687	2543	1856	412
Média	464	2396	1932	425
EP	67	246	213	8
<i>Pkd1</i>^{+/-}				
HM18	634	3004	2370	412
HM25	274	2545	2271	380
HM55	270	960	690	373
HM28	972	2687	1715	324
HM13	455	2970	2515	479
HM31	453	2524	2071	452
Média	510	2448	1939	403
EP	108	309	274	23
p		0,728	0,404	

p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}.

Anexo J – Peso corpóreo, peso de rim esquerdo, volume de rim esquerdo (VRE), percentual de córtex e idade dos camundongos *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}* submetidos à análise estereológica

<i>Pkd1^{+/+}</i>	PC (g)	PRE (g)	VRE (mm ³)	% Córtex	Idade (dias)
WM50	25,34	0,222	200	81	209
WM49	22,30	0,156	148	83	186
WM48	22,70	0,179	161	79	221
WM51	21,40	0,157	151	82	186
WM46	25,90	0,215	198	79	235
WM45	21,85	0,170	158	79	186
WM47	29,31	0,188	174	79	236
Média	24,11	0,184	170	80,29	208,43
EP	1,09	0,010	8	0,64	8,64
p	0,133	0,798	0,908	0,0003	0,44
<i>Pkd1^{+/-}</i>	PC (g)	PRE (g)	VRE (mm ³)	% Córtex	Idade (dias)
HM53	21,34	0,165	149	76	186
HM48	22,20	0,164	145	72	209
HM49	22,56	0,213	193	76	186
HM50	23,00	0,185	180	76	209
HM51	21,70	0,191	169	71	186
HM52	22,20	0,206	176	69	221
HM54	27,85	0,179	170	76	261
Média	22,17	0,187	169	73,71	199,50
EP	0,240	0,008	8	1,13	6,30

A primeira coluna à esquerda refere-se à identificação individual dos animais. p: valor de p para comparação *Pkd1^{+/+}* x *Pkd1^{+/-}*.

Anexo K – Determinação do número de glomérulos em rim esquerdo por estereologia em camundongos *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}*

<i>Pkd1^{+/+}</i>										
Disector	WM45	WM46	WM47	WM48	WM49	WM50	WM51	Média	EP	p
Disector 1	1	4	1	1	0	2	2			
Disector 2	1	2	0	2	5	1	1			
Disector 3	1	3	4	2	1	0	3			
Disector 4	1	3	5	1	3	0	1			
Disector 5	4	1	1	1	5	1	1			
Disector 6	2	4	2	2	1	4	1			
Disector 7	2	5	2	0	2	1	1			
Disector 8	3	1	1	1	4	5	2			
Disector 9	2	2	0	2	3	1	0			
Disector 10	1	0	0	3	2	0	1			
Disector 11	1	1	8	2	2	0	2			
Disector 12	2	1	3	2	2	2	0			
Disector 13	1	1	6	4	4	5	3			
Disector 14	0	0	4	2	1	1	2			
Disector 15	3	2	4	2	1	0	3			
Disector 16	2	1	4	2	3	1	2			
VRE (mm3)	158	198	174	161	148	200	151			
Nv	170	196	284	183	246	151	158			
N	21265	30596	39030	23274	30229	24532	19532	26923	2567	0,045*
<i>Pkd1^{+/-}</i>										
Disector	HM48	HM49	HM50	HM51	HM52	HM53	HM54			
Disector 1	0	1	2	3	1	1	1			
Disector 2	4	0	0	2	5	4	2			
Disector 3	0	1	0	2	2	1	1			
Disector 4	3	4	0	2	1	1	1			
Disector 5	2	1	2	2	3	3	2			
Disector 6	3	1	2	2	0	1	0			
Disector 7	2	0	4	2	3	4	3			
Disector 8	0	1	2	3	0	5	4			
Disector 9	2	0	1	2	1	1	3			
Disector 10	2	0	3	1	2	0	1			
Disector 11	1	1	0	1	2	0	1			
Disector 12	4	1	3	0	0	1	2			
Disector 13	3	1	3	1	1	1	1			
Disector 14	2	0	3	0	1	0	3			
Disector 15	2	1	4	1	2	1	2			
Disector 16	3	1	3	1	1	1	0			
VRE (mm3)	145	193	180	169	176	149	170			
Nv	208	88	202	158	158	158	170			
N	21738	12957	27622	18928	19156	17863	22011	20039	1699	

As linhas superiores identificam os camundongos submetidos ao estudo. As linhas *disector* referem-se à contagem correspondente a cada camada tecidual analisada. VRE = volume renal esquerdo; Nv = número de glomérulos por mm³ de bloco; N = número de glomérulos. p: valor de p para comparação *Pkd1^{+/+}* x *Pkd1^{+/-}*.

Anexo L – Determinação do volume médio de todos os glomérulos ($V_{[G]}$) por estereologia em camundongos $Pkd1^{+/+}$ e $Pkd1^{+/-}$

<i>Pkd1^{+/+}</i>										
P/G	WM45	WM46	WM47	WM48	WM49	WM50	WM51	Média	EP	p
P/G 1	40	55	36	54	80	39	45			
P/G 2	42	53	36	44	50	64	33			
P/G 3	53	32	107	69	52	43	54			
P/G 4	51	48	83	96	55	35	49			
P/G 5	70	29	106	71	64	66	52			
P/G 6	74	17	53	74	94	43	60			
P/G 7	43	22	47	86	61	62	98			
P/G 8	43	50	38	61	56	20	101			
P/G 9	25	58	81	53	89	43	99			
P/G 10	46	61	77	36	78	45	78			
médias	48,7	42,5	66,4	64,4	67,9	46	66,9	57,54	4,25	
$V_{[G]} (\mu\text{m}^3)$	2,38E+05	1,81E+05	1,95E+05	2,93E+05	2,30E+05	2,53E+05	3,53E+05	249.133	22.310	0,045*
<i>Pkd1^{+/-}</i>										
P/G	HM48	HM49	HM50	HM51	HM52	HM53	HM54			
P/G 1	64	58	62	67	48	65	57			
P/G 2	67	68	53	92	18	77	97			
P/G 3	73	95	76	73	62	77	83			
P/G 4	77	91	115	48	81	51	43			
P/G 5	72	41	34	83	29	81	85			
P/G 6	58	34	44	63	59	82	61			
P/G 7	79	95	44	75	29	71	80			
P/G 8	37	56	57	45	42	62	20			
P/G 9	49	59	47	82	62	86	85			
P/G 10	55	54	47	68	50	81	65			
médias	63,1	65,1	57,9	69,6	48	73,3	67,6	63,514286	3,178756	
$V_{[G]} (\mu\text{m}^3)$	2,53E+05	6,14E+05	2,39E+05	3,68E+05	2,54E+05	3,87E+05	3,31E+05	349.256	49.510	

As linhas P/G referem-se ao número de pontos sobre o glomérulo em uma tela com 1200 pontos. $V_{[G]}$ = volume glomerular médio. p: valor de p para comparação $Pkd1^{+/+}$ x $Pkd1^{+/-}$.

Anexo M – Excreção urinária de NO₂/NO₃ em camundongos *Pkd1*^{+/+} e *Pkd1*^{+/-}

Camundongo <i>Pkd1</i> ^{+/+}	NO ₂ -NO ₃ /24h/CrU (μM/mgCr)	Camundongo <i>Pkd1</i> ^{+/-}	NO ₂ -NO ₃ /24h/CrU (μM/mgCr)
WM37	0,61	HM35	0,38
WM38	0,36	HM37	0,21
WM39	0,44	HM38	0,13
WM40	0,35	HM39	0,47
WM41	0,36	HM36	0,28
WM44	0,23	HM42	0,30
WM42	0,39	HM40	0,33
WM43	0,27	HM41	0,30
média	0,38		0,30
EP	0,04		0,04
p	0,184		

p: valor de p para comparação *Pkd1*^{+/+} x *Pkd1*^{+/-}. CrU: creatinina em urina de 24 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(9):2384-98.
2. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 1993;329:332-42.
3. Reeders ST. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Q J Med.* 1991;79:459-60.
4. Davies F, Coles GA, Harper PS, Williams AJ, Evans C, Cochlin D. Polycystic kidney disease re-evaluated: a population-based study. *Q J Med.* 1991;79:477-85.
5. U.S. Renal Data System, *USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2003.
6. Grantham JJ, Calvet JP. Polycystic kidney disease: In danger of being X-rated? *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2001;98:790-2.
7. Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, Jones RH. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 1992;41: 1311-9.
8. Hateboer N. Clinical management of polycystic kidney disease. *Clin Med.* 2003;3:509-12.

9. Johnson AM, Gabow PA. Identification of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease at highest risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:1560-7.
10. Paterson AD, Pei Y. PKD3-to be or not to be? *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:2965-6.
11. Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggar-Malik AK, San Millan JL, Torra R, Breuning M, Ravine D. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet.* 1999; 353:103-7.
12. Barrett BJ, Foley R, Morgan J, Hefferton D, Parfrey P. Differences in hormonal and renal vascular responses between normotensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease and unaffected family members. *Kidney Int.* 1994; 46:1118-23.
13. King BF, Torres VE, Brummer ME, Chapman AB, Bae KT, Glockner JF, Arya K, Felmlee JP, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, Bennett WM, Klahr S, Hirschman GH, Kimmel PL, Thompson PA, Miller JP; Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP). Magnetic resonance measurements of renal blood flow as a marker of disease severity in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2003;64:2214-21.
14. Cerasola G, Vecchi M, Mule G, Cottone S, Mangano MT, Andronico G, Contorno A, Parrino I, Renda F, Pavone G. Sympathetic activity and blood pressure pattern in autosomal dominant polycystic kidney disease hypertensives. *Am J Nephrol.* 1998;18:391-8.

15. Ettinger A, Kahn PC, Wise HM Jr. The importance of selective renal angiography in the diagnosis of polycystic disease. *J Urol.* 1969;102:156-61.
16. Zeier M, Fehrenbach P, Geberth S, Mohring K, Waldherr R, Ritz E. Renal histology in polycystic kidney disease with incipient and advanced renal failure. *Kidney Int.* 1992;42:1259-65.
17. Schacht F. Hypertension in cases of congenital polycystic kidney. *Arch Intern Med.* 1931;47:500-509.
18. Grampsas SA, Chandhoke PS, Fan J, Glass MA, Townsend R, Johnson AM, Gabow P. Anatomic and metabolic risk factors for nephrolithiasis in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2000;36:53-7.
19. Fick GM, Duley IT, Johnson AM, Strain JD, Manco-Johnson ML, Gabow PA. The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:1654-60.
20. Wong H, Vivian L, Weiler G, Filler G. Patients with autosomal dominant polycystic kidney disease hyperfiltrate early in their disease. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:624-8.
21. Gabow PA, Kaehny WD, Johnson AM, Duley IT, Manco-Johnson M, Lezotte DC, Schrier RW. The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 1989;35:675-80.
22. Pabico RC, McKenna BA, Freeman RB. Renal tubular dysfunction in patients with cystic disease of the kidneys. *Urology.* 1998;51:156-60.
23. Seeman T, Dusek J, Vondrak K, Blahova K, Simkova E, Kreisinger J, Dvorak P, Kyncl M, Hribal Z, Janda J. Renal concentrating capacity is linked

- to blood pressure in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol Res.* 2004;53:629-34.
24. Perrone RD. Extrarenal manifestations of ADPKD. *Kidney Int.* 1997;51:2022-36.
 25. Schrier RW, Belz MM, Johnson AM, Kaehny WD, Hughes RL, Rubinstein D, Gabow PA. Repeat imaging for intracranial aneurysms in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease with initially negative studies: a prospective ten-year follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1023-8.
 26. Kaehny WD, Everson GT. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Nephrol.* 1991;11(6):661-70.
 27. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, Mourad M, Horie S, Feron O, Balligand JL, Wattiez R, Pirson Y, Chauveau D, Lens XM, Devuyst O. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2002;11:229-41.
 28. Devuyst O. Variable renal disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: A role for nitric oxide? *J Nephrol.* 2003;16:449-52.
 29. Walker D, Consugar M, Slezak J, Rossetti S, Torres VE, Winearls CG, Harris PC. The ENOS polymorphism is not associated with severity of renal disease in polycystic kidney disease 1. *Am J Kidney Dis.* 2003;41:90-4.
 30. Fain PR, McFann KK, Taylor MR, Tison M, Johnson AM, Reed B, Schrier RW. Modifier genes play a significant role in the phenotypic expression of PKD1. *Kidney Int.* 2005;67:1256-67.

31. Perez-Oller L, Torra R, Badenas C, Mila M, Darnell A. Influence of the ACE gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 1999;34:273-8.
32. Persu A, El-Khattabi O, Messiaen T, Pirson Y, Chauveau D, Devuyst O. Influence of ACE (I/D) and G460W polymorphism of alpha-adducin in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:2032-8.
33. Ecker T, McFann KK, Reynolds MV, Schrier RW. No effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on disease progression and left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2003;23:466-70.
34. van Dijk MA, Breuning MH, Duiser R, van Es LA, Westendorp RG. No effect of enalapril on progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:2314-20.
35. Merta M, Reiterova J, Stekrova J, Rysava R, Rihova Z, Tesar V, Viklicky O, Kmentova D. Influence of the alpha-adducin and ACE gene polymorphism on the progression of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2003;26:42-9.
36. Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarman AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature.* 1985;317:542-4.
37. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH,

- Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*. 1996;272:1339-42.
38. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell*. 1994;77:881-94.
39. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell*. 1995;81:289-98.
40. Burn TC, Connors TD, Dackowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Millholland JM, Venet M, Miller G, Hakim RH, Landes GM, Klinger KW, Qian F, Onuchic LF, Watnick T, Germino GG, Doggett N. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium). *Hum Mol Genet*. 1995;4:575-82.
41. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gamble V, Harris PC. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*. 1995;10:151-60.
42. Bogdanova N, Markoff A, Gerke V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B. Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics*. 2001;74:333-41.
43. Sutters M, Germino GG. Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med*. 2003;141:91-101.

44. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet.* 1997;16:179-83.
45. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell.* 1996;87:979-87.
46. Pritchard L, Sloane-Stanley JA, Sharpe JA, Aspinwall R, Lu W, Buckle V, Strmecki L, Walker D, Ward CJ, Alpers CE, Zhou J, Wood WG, Harris PC. A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2617-27.
47. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K, Guggino W, Monaco L, Germino GG. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Molec Cel.* 2000;6:1267-73.
48. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med.* 1995;333:18-25.
49. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia A, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG. Co-assembly of polycystin 1 and 2 produces unique cation permeable currents. *Nature.* 2000;408:990-4.
50. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AEH, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genet.* 2003;33:129-37.

51. Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*. 2004;118:145-8.
52. Ong AC, Wheatley DN. Polycystic kidney disease--the ciliary connection. *Lancet*. 2003;361:774-6.
53. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, Igarashi P. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:5286-91.
54. Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong AC. Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1804-15.
55. Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R. The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2000;97:4017-22.
56. Huan Y, van Adelsberg J. Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest*. 1999;104:1459-68.
57. Charron AJ, Bacallao RL, Wandinger-Ness A. ADPKD: a human disease altering Golgi function and basolateral exocytosis in renal epithelia. *Traffic*. 2000;1:675-86.
58. Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, Zhou J. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted PKD1 mutation. *Nat Genet*. 1997;17:179-81.

59. Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, Harris PC, Perez-Atayde AR, Rennke HG, Zhou J. Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet.* 1999;21:160-1.
60. Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell.* 1998;93:177-88.
61. Kim K, Drummond I, Ibraghimov-Beskrovbaya O, Klinger K, Arnaout M A. Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2000;97:1731-6.
62. 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 (USA).* 2001;98:12174-9.
63. Lu W, Shen X, Pavlova A, Lakkis M, Ward CJ, Pritchard L, Harris PC, Genest DR, Perez-Atayde AR, Zhou J. Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2385-96.
64. Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao K, Nakamura K, Tomita K, Kitamura T, Kurabayashi M, Nagai R, Higashihara E, Harris PC, Katsuki M, Horie S. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1731-42.
65. Wu G, Tian X, Nishimura S, Markowitz GS, D'Agati V, Park JH, Yao L, Li L, Geng L, Zhao H, Edelmann W, Somlo S. Trans-heterozygous *Pkd1* and

- Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1845-54.
66. Lantinga-van Leeuwen IS, Dauwerse JG, Baelde HJ, Leonhard WN, van de Wal A, Ward CJ, Verbeek S, Deruiter MC, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2004 Dec 15;13:3069-77.
67. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG. A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:3035-43.
68. Van Raay TJ, Burn TC, Connors TD, Petry LR, Germino GG, Klinger KW, Landes GM. A 2.5kb polypyrimidine tract in the PKD1 gene contains at least 23 H-DNA forming sequences. *Microb Comp Genomics.* 1996;1:317-27.
69. McLaughlin K, Neilly JB, Fox JG, Boulton-Jones JM. The hypertensive young lady with renal cysts - it is not always polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1245-7.
70. Martinez-Maldonado M, Yium JJ, Eknayan G, Suki WN. Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int.* 1972;2:107-13.
71. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell.* 2002;109:157-68.
72. Piontek K, Germino GG. Comunicação pessoal.

73. Piontek KB, Germino GG. Murine PKD1 Introns 21 and 22 lack the extreme polypyrimidine bias present in human PKD1. *Mammalian Genome* 1999;10:194-6.
74. Andersen ML. *Princípios éticos e práticos de animais de experimentos*. Unifesp, Dept. de Psicobiologia. Ed. Cromonete Gráfica e Editora, 2004.
75. Cowley BD Jr, Rupp JC, Muessel MJ, Gattone VH 2nd. Gender and the effect of gonadal hormones on the progression of inherited polycystic kidney disease in rats. *Am J Kidney Dis*. 1997;29:265-72.
76. Gretz N, Ceccherini I, Kranzlin B, Kloting I, Devoto M, Rohmeiss P, Hocher B, Waldherr R, Romeo G. Gender-dependent disease severity in autosomal polycystic kidney disease of rats. *Kidney Int*. 1995;48:496-500.
77. Oliverio MI, Delnomdedieu M, Best CF, Li P, Morris M, Callahan MF, Johnson GA, Smithies O & Coffman TM. Abnormal water metabolism in mice lacking the type 1A receptor for ANG II. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278, F75-F82.
78. Fleming EF, Athirakul K, Oliverio MI, Key M, Goulet J, Koller BH, Coffman TM. Urinary concentrating function in mice lacking EP3 receptors for prostaglandin E2. *Am J Physiol*. 1998;275:F955-61.
79. Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*. 2004;65:1339-48.
80. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57-60.

81. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134:127-36.
82. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1100-23.
83. Conrad ZP, Joffe GM, Kruszyna H, Rochelle LG, Chaves JE, Masher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rat. *Faseb J.* 1993;7:566-71.
84. Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC, Fogo AB, Breyer MD. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F590-6.
85. Watnick T, Germino G. From cilia to cyst. *Nat Genet.* 2003;34:355-6.
86. Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol.* 2002;4:191-7.
87. Delmas P, Nomura H, Li X, Lakkis M, Luo Y, Segal Y, Fernandez-Fernandez JM, Harris P, Frischauf AM, Brown DA, Zhou J. Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem.* 2002;277:11276-83.
88. Nishio S, Hatano M, Nagata M, Horie S, Koike T, Tokuhisa T, Mochizuki T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest.* 2005;115:910-8.
89. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a

- two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell*. 1998;2:247-51.
90. Pei Y, Watnick T, He N, Wang K, Liang Y, Parfrey P, Germino G, St George-Hyslop P. Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1524-9.
91. Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet*. 2000;24:75-8.
92. Storer J. B. Longevity and gross pathology at death in 22 inbred strains of mice. *J Gerontol*. 1996;21,404-9.
93. D'Angelo A, Mioni G, Ossi E, Lupo A, Valvo E, Maschio G. Alterations in renal tubular sodium and water transport in polycystic kidney disease. *Clin Nephrol*. 1975;3:99-105.
94. Wang D, Iversen J, Wilcox CS, Strandgaard S. Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2003;64:1381-8.
95. Wang T, Tian Xin, Bailey MA, Shibazaki S, Somlo S, Aronso OS. Impaired Glomerular Filtration Rate in Pkd2 and Pkd1 Heterozygote Mice. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:F-P0279.
96. Gilbert T, Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C. Long-term effects of mild oligonephronia induced in utero by gentamicin in the rat. *Pediatr Res*. 1991;30:450-6.

97. Cullen-McEwen LA, Kett MM, Dowling J, Anderson WP, Bertram JF. Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. *Hypertension*. 2003;41:335-40.
98. Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension*. 2003;41:328-34.
99. Regazzoni BM, Genton N, Pelet J, Drukker A, Guignard JP. Long-term followup of renal functional reserve capacity after unilateral nephrectomy in childhood. *J Urol*. 1998;160(3 Pt 1):844-8.
100. Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Hypertension after neonatal uninephrectomy in rats precedes glomerular damage. *Hypertension*. 2001;38(3):337-42.
101. Piontek K, Huso D, Deng J, Hawkins C, Cowan M, Germino GG. Manuscript in preparation.
102. Nickel C, Benzing T, Sellin L, Gerke P, Karihaloo A, Liu ZX, Cantley LG, Walz G. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest*. 2002;109:481-9.
103. Lim L, Kalinichenko VV, Whitsett JA, Costa RH. Fusion of lung lobes and vessels in mouse embryos heterozygous for the forkhead box f1 targeted allele. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L1012-22.

APÊNDICE

Artigo submetido ao periódico Human Molecular Genetics

Sousa MF, Piontek K, Almeida JR, Menezes LFC, Araújo MA, Ortiz SCBC, Mandarin-de-Lacerda CA, Germino GG, Onuchic LF. *Pkd1* haploinsufficiency results in reduced nephron number but not in reduced concentrating ability in mice.

***Pkd1* haploinsufficiency results in reduced nephron number but not in reduced concentrating ability in mice**

**Mauri F. Sousa¹, Klaus Piontek², Jorge R. Almeida³, Luis F. C. Menezes¹,
Magali Araujo¹, Silvia C. B. C. Ortiz¹, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda³,
Gregory G. Germino², Luiz F. Onuchic^{1,*}**

¹Department of Medicine/Division of Nephrology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, 01246-903, Brazil; ²Departments of Medicine and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 21205, USA; ³Laboratory of Morphometry and Cardiovascular Morphology, State University of Rio de Janeiro Institute of Biology, Rio de Janeiro, 20551-030, Brazil

*Corresponding author:

Fax: 55-11-3088-2267

Telephone: 55-11-3066-7342

E-mail: lonuchic@lim12.fm.usp.br

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease is a common disorder characterized by cystic replacement of normal renal tubules in a process that results in end stage kidney disease in up to 50% of the patients. Abnormalities in renal concentrating ability have been described as one of its earliest clinical manifestations, presenting in children with few macroscopic cysts. While a number of lines of evidence have shown that cysts arise through a “two-hit” mechanism, the pathogenesis of non-cystic features has been poorly understood. We have used an inbred (129Sv) mouse line with a null mutation of *Pkd1* to study this problem. Heterozygotes had minimal and sporadic renal cyst formation below 40 weeks of age. We analyzed inulin clearance in *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} males at 187-237 days of age and showed that it was significantly reduced in heterozygotes (0.88±0.02 vs 1.13±0.05 ml/min/100g BW). The number of glomeruli was significantly lower in *Pkd1*^{+/-} than in *Pkd1*^{+/+} males (20,039±1,699 vs 26,923±2,567/left kidney), while a higher average volume of all glomeruli was observed in heterozygotes (349,256±49,510 vs 249,133±22,310 μm³). The urinary excretion of NO₂/NO₃ and the kidney weight did not significantly differ between the two groups. No significant difference in maximal urinary osmolality was detected between *Pkd1*^{+/-} and *Pkd1*^{+/+} males and females within the 212-282-day age range. These findings provide the first direct evidence that haploinsufficiency for *Pkd1* results in subtle anatomic and functional abnormalities of the kidney. Our data suggest that *Pkd1* haploinsufficiency may result in a reduced number of nephrons by diminishing renal tubule branching during nephrogenesis.

Introduction

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common monogenic renal disease, with a prevalence of 1:400 to 1:1000 in populations of European descent or ethnicity. Mutations of the *PKD1* gene are responsible for ~85% of the disease cases, while ~15% are caused by mutations in *PKD2* (1). Only half of the patients reach the age of 58 without end stage renal disease (2). Though most patients seek medical attention due to renal manifestations, ADPKD is a systemic disorder, including extra-renal involvement, typically represented by liver cysts, intra-cranial aneurysms and heart valve alterations.

The *PKD1* gene encodes polycystin-1, a large glycoprotein with an ~3,000-aa extra-cellular portion comprising domains apparently involved in protein-protein and protein-carbohydrate interactions (3). A number of recent studies support the involvement of primary apical cilium in the pathogenesis of polycystic kidney disease. The primary cilium may sense physical stimuli, particularly tubular fluid flux, and transduce signals via intracellular Ca^{++} transients (4). Polycystins 1 and 2 have been reported to actively participate in this process (4, 5). The cellular effects of polycystins also appear to rely on interaction with the cytoskeleton and mediation of cell-cell adhesion (4, 6, 7).

Several signaling pathways have been proposed for polycystins 1 and 2. Polycystin-1 may function as a cell surface receptor that, once activated, would also activate polycystin-2, located in the plasma membrane or in the endoplasmic reticulum, increasing cytosolic Ca^{++} (8, 9). This signal transduction would then regulate gene expression and exocytosis/vesicle fusion. Polycystin-1 may also

function as a G-protein coupled receptor, regulating cell proliferation, differentiation, apoptosis and fluid secretion (4, 10). Finally, the activation of polycystin-1, following a process dependent on polycystin-2, activates JAK2, leading to phosphorylation and activation of STAT1 and generation of STAT1 homodimers (11). These dimers translocate to the nucleus, where they bind to the *p21* promoter, promoting its upregulation and subsequent inhibition of Cdk2. This process determines cell arrest in G0/G1 and, therefore, may explain the effect of polycystin-1 on decreasing cell proliferation rate.

Most studies that address the molecular mechanisms involved in ADPKD renal cystogenesis support the proposed two-hit model (3, 12). According to it, the formation of ADPKD cysts, a process focal in nature, follows a Knudsonian pattern, where the first hit consists of the germline mutation and the second of a somatic mutation that inactivates the previously normal gene copy. Based on stable expression of polycystin-1 in MDCK (Madin-Derby canine kidney) cells, it has been hypothesized that polycystin-1 may reduce the growth of developing renal epithelial cells, allowing them to terminally differentiate and form mature renal tubules (13). According to this model, a low threshold of polycystin-1 function would be required to achieve normal tubulogenesis. In this scenario, a *PKDI* haploinsufficient state should not be sufficient to determine cyst formation.

Reduced glomerular filtration rate (GFR) and renal concentrating deficit have been described in ADPKD, the latter often predating the former by several years (14). The pathogenesis of such dysfunctions, however, remains largely unknown. It is unclear whether these non-focal abnormalities follow a distinct molecular mechanism or are secondary to kidney architectural disruption induced by progressive cyst expansion. In fact, while a severe reduction in polycystin-1

expression appears to prevent maturation of renal tubules and the loss of function of both alleles to induce cyst formation, the potential roles of *PKDI* haploinsufficiency upon kidney development and function is essentially unknown. In this study we have used a 129Sv inbred mouse line with a null mutation of *Pkd1* to address these questions, since in this animal line we showed that heterozygous mice have negligible renal cyst formation up to nine months of age. Our findings of decreased number of nephrons and reduced GFR in heterozygous animals suggest a significant role for *Pkd1* haploinsufficiency in kidney development and function.

Results

Animal survival

We have submitted 247 mice, 93 males and 154 females, to a survival analysis. The survival median was 716 days for the heterozygous males (n=36) and 807 days for the wild-type males (n=57), but this difference was not statistically significant. Among the females, the survival medians were 713 days for heterozygotes (n=74) and 773 days for wild types (n=80), determining a significant difference. In this case, the observed risk rate was 1.6, with a 95% confidence interval of 1.04-2.73. The survival actuarial curves for males and females are shown in Figure 1.

Inulin clearance analyses

CIn was significantly decreased in *Pkd1*^{+/-} mice compared to *Pkd1*^{+/+} animals. The results are presented as values normalized for 100 g of body weight (BW) and as absolute values (Figure 2). *Pkd1*^{+/+} mice showed CIn of 1.13±0.05 ml/min/100g BW, while *Pkd1*^{+/-} animals showed 0.88±0.02 ml/min/100g BW. The CIn difference between heterozygotes and wild types remains significant when analyzed for absolute values.

No significant differences in MAP were detected between heterozygotes and wild types (Figure 2). Hematocrit measurements did not differ between the two groups either (50.5±1.7% in *Pkd1*^{+/+} mice and 48.3±2.5% in *Pkd1*^{+/-} animals; p=0.444).

No significant differences in BW or kidney weight (KW) were detected between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} animals (Figure 2). KW measurements included both kidneys and are presented as values normalized for 100 g BW and as absolute values (Figure 2).

Renal concentrating capacity analyses

Initial experiments revealed that 24-h diuresis was not significantly different between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice, within the age range of 249-323 days and with free access to water. Wild types presented a 24-h urine volume of 1.23±0.18 ml (n=9) and heterozygotes 1.38±0.24 ml (n=7; p=0.493).

The first studies evaluating renal concentrating capacity were conducted in male and female mice aged 24-40 weeks. No significant difference in UosmMax was detected between heterozygous and wild-type mice, both in males and females (Figure 3-A and B). With the aim to investigate renal concentration in later phases of life, we evaluated UosmMax in males and females within the age interval of 40-56 weeks. No significant difference was detected between heterozygous and wild types, both in males and females (data not shown). UosmMax was lastly evaluated in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice above 56 weeks of age, to extend the phenotype characterization up to senility. No significant difference was observed between the groups (Figure 3-C).

Absence of difference in UosmMax between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice was confirmed using the alternative protocol including 48-h water deprivation and desmopressin administration. This study was carried out in male mice with ages above 52 weeks and confirmed that both protocols were equally effective to evaluate UosmMax. *Pkd1*^{+/+} mice revealed UosmMax of 3,001±262 mOsm/kg H₂O (n=11) and UosmMas was 3,067±281 mOsm/kg H₂O in *Pkd1*^{+/-} animals (n=11; p=0.865).

As a complementary strategy to assess tubular response to vasopressin in heterozygotes, we evaluated the renal concentrating capacity following desmopressin

administration after water overload, in male *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice within the age range of 46-68 weeks. No significant urinary osmolality difference (Uosm), however, was observed between the groups. Uosm reached 2,396±246 mOsm/kg H₂O following water load and desmopressin in wild types (n=6) and 2,448±309 mOsm/kg H₂O in heterozygotes (n=6; p=0.728).

Pathology analyses

Macroscopic renal cysts were not observed in wild-type mice, whereas they were observed in two heterozygous animals (9.1%). Histological analyses revealed 1-4 renal cysts in five *Pkd1*^{+/-} mice (22.7%), while no cysts were observed in *Pkd1*^{+/+} animals (Table 1).

Macroscopic hepatic cysts were not observed in *Pkd1*^{+/+} mice while could be observed in three *Pkd1*^{+/-} mice (13.7%). Eight heterozygotes (36.4%) showed hepatic abnormalities, including biliary ectasia, cysts, and portal space with peripheral small ductules (Table 1). None of the wild-type animals presented similar histological anomalies.

Glomerular unit number and glomerular volume analyses

The renal cortex proportion was significantly reduced in *Pkd1*^{+/-} mice (73.71±1.13%) compared to *Pkd1*^{+/+} animals (80.29±0.64%) (Figure 4). The number of glomeruli in left kidneys was also significantly lower in heterozygous mice than in wild-type animals (20,039±1,699 vs 26,923±2,567; Figure 4). These results indicate

a 25.57% glomerular unit reduction in the heterozygotes. In addition, $V_{[G]}$ was higher in the $Pkd1^{+/-}$ mice than in the $Pkd1^{+/+}$ animals ($349,256 \pm 49,510 \mu\text{m}^3$ vs $249,133 \pm 22,310 \mu\text{m}^3$; Figure 4).

Nitrite/nitrate urinary excretion analysis

No significant difference was detected in urinary NO_2/NO_3 excretion between $Pkd1^{+/-}$ and $Pkd1^{+/+}$ mice, although the absolute values suggest a trend for smaller urine NO_2/NO_3 in heterozygotes ($0.30 \pm 0.04 \mu\text{M}/\text{mg Cr}$ vs $0.38 \pm 0.04 \mu\text{M}/\text{mg Cr}$; $p=0.184$; Figure 5).

Discussion

The identification of the *PKD1* and *PKD2* genes and the progressive characterization of their respective products have allowed successive contributions to the understanding of ADPKD pathogenesis and the functions of polycystins 1 and 2. For example, robust data indicate that the majority if not all kidney and liver cysts, in both ADPKD1 and ADPKD2, rely on a two-hit process to be formed (12, 15, 16). However, it is not currently known whether this same process is responsible for the non-cystic manifestations of the disease such as hypertension, impaired renal concentrating ability and reduced glomerular filtration rate. It is widely assumed that these features are secondary to the structural and functional abnormalities that result from the cysts but no direct evidence has yet been published that supports this notion.

Indirect support for this model was provided by mouse studies, since they reported that *Pkd1*^{+/-} and *Pkd2*^{+/-} mice appeared normal (16, 17, 18). However, comprehensive functional studies have not been performed as part of these studies and thus subtle differences may have been overlooked. Based on the fact that our heterozygous mice develop only sporadic renal cysts in adult life, we reasoned that this was an appropriate model to evaluate the biological impact of *Pkd1* haploinsufficiency. Our current studies strongly suggest that *Pkd1* haploinsufficiency does, in fact, have measurable detrimental effects in mice. Our actuarial survival analysis showed that *Pkd1*^{+/-} females do not live as long as their normal counterparts. Similar though more dramatic results had been reported for *Pkd2* heterozygotes (19). As in the other studies, our analysis was unable to define the causes of such a difference. The absence of significance in survival difference between *Pkd1*^{+/+} and

Pkd1^{+/-} in males may have been related to a lower number of animals, since the absolute values suggest a trend for survival decrease in heterozygotes. These data strongly suggest subtle but relevant phenotype in heterozygous animals.

A renal concentrating deficit and reduced GFR are the most classical kidney dysfunctions in ADPKD. Since in other PKD animal models males can develop a more severe renal disease, the GFR analyses were carried out in male heterozygotes. The renal concentration studies, on the other hand, were performed in both males and females. According to initial observations, the renal concentrating deficit observed in ADPKD patients with still preserved GFR might result from medullar or cortical-medullar cystic involvement (20). The concentrating disorder, therefore, would be caused primarily by structural alterations or impaired response to vasopressin associated with these structural abnormalities. Other authors, in addition, suggest that the anatomic distortion imposed by the renal cysts could compress intra-renal vessels, induce vascular dysfunction, and ultimately lead to the urinary concentrating deficit (21). Gabow et al, however, suggest that, in addition to the anatomical disruptions, the ADPKD renal concentrating deficit might reflect non-structural dysfunctions, such as resistance to vasopressin (22).

Based on the nature of our model, we were able to investigate the role of *Pkd1* haploinsufficiency upon this potential phenotype. No significant difference in renal concentrating capacity, however, was detected between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice. It should be mentioned that our studies included male and female mice, in different age ranges. In addition, we have applied two distinct protocols to evaluate maximal urinary concentration and an additional protocol to allow the analysis of vasopressin response in a more sensitized condition. Our results, therefore, do not

support the hypothesis that the renal concentrating deficit in ADPKD is determined, even partially, by *PKDI* haploinsufficiency. In contrary, they suggest that the concentrating dysfunction, even at early stages, is associated with structural alterations, apparently represented by intra-renal cystic expansions. These findings are consistent with observations in children by Gabow et al (22), where significant renal concentrating deficit was only detected in children with more than ten cysts, and by Seeman et al (23), where concentrating ability correlated with the number of cysts and the level of blood pressure.

Our CIn studies revealed a significant decrease in GFR in *Pkd1*^{+/-} mice, within an adult age range. Several possibilities potentially determined by *Pkd1* partial loss of function might contribute to the decrease in GFR. Among them, a defective NO generation stood out. ADPKD has been shown to be associated with altered endothelium-dependent vasodilatation, which has been attributed to reduced NO production by NO synthase (24). In addition, in a previous model *Pkd1*^{+/-} mice have been shown to excrete lower levels of NO metabolites in urine than *Pkd1*^{+/+} animals (25). Our results, however, revealed no significant difference in urine excretion of NO₂/NO₃ between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice, though a likely trend for lower nitrite/nitrate urine excretion could be observed in heterozygous animals. These findings suggest, therefore, that the GFR reduction verified in heterozygotes is likely not primarily related to abnormal systemic NO generation and/or release, although these animals may present some level of abnormality in the NO/NOS system. In addition, our data cannot exclude physiologically significant differences in renal NO generation and/or release between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} animals, enough to impact GFR. The fact that we could not detect differences in the NO/NOS system

between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice to the same level observed by Muto et al (25) may be explained by genetic strain differences or by the fact that their heterozygotes presented considerably more cystic kidneys.

Late tubulogenesis and tubular maturation seem to depend on a critical level of polycystin-1 expression (17). A process of organization and differentiation yet more complex, such as the control of tubular branching and establishment of nephron number, on its turn, might be associated with a higher polycystin-1 threshold than tubular maturation. Our data revealed significant reduction in nephron number in heterozygous mice. The reduction of the cortex/medulla ratio in animals without significant cyst formation emphasizes the role of *Pkd1* haploinsufficiency in diminishing the total number of nephron units. The very low renal cyst frequency detected in our heterozygotes and the absence of difference in kidney weights between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice strongly suggest that the observed CIn reduction is not dependent on somatic mutations, but yet determined by the *Pkd1* haploinsufficient state. In support to our CIn findings, Wang et al have also detected reduction in GFR in other ADPKD orthologous mouse models (26). Studies including ADPKD children and young adults in the initial phases of the disease, however, have not shown similar results (27).

It is important to note that other animal models and human states associated with similar or higher reduction in nephron number are accompanied by virtually complete GFR compensation (28, 29, 30, 31). In several of these animal models, in fact, nephron number reduction was also induced during embryonic development, by administration of gentamicin or dexamethasone, or knocking out one glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) allele (28, 29, 30). The reason why no GFR

compensation occurred in our animal model is presently unknown. One could speculate that *Pkd1* haploinsufficiency might determine not only reduction in nephron population but also interfere with the physiologic feed-back that regulates GFR compensation. In addition, the lack of GFR compensation might be explained on the basis of inadequate NO availability, assuming a true trend of lower NO₂/NO₃ excretion or undetected local renal differences. In fact, other yet unknown vasodilator/vasoconstrictor system abnormalities potentially associated with *Pkd1* haploinsufficiency might also impair the GFR compensation mechanism. Species-specific variations in these systems, on their turn, associated with *PKDI* haploinsufficiency, might explain the reason why humans compensate GFR until relatively late in the disease course while *Pkd1*^{+/-} mice do not. It is also possible that *Pkd1*^{+/-} mice have different sensitivity to the anesthetic agents than normal controls, possibly resulting in dysfunctional renal hemodynamics/autoregulation and decreased GFR. Our data, therefore, cannot completely exclude the finding of lower GFR as an experimental artifact.

Heterozygous mice showed a higher glomerular volume than the wild-type animals. This phenotype might be directly caused by *Pkd1* haploinsufficiency or secondary to a lower number of glomeruli, as observed in other oligonephric models and disease states (28, 29). It must be noted, however, that the glomeruli did not show histological signs of focal segmental glomerulosclerosis, what is consistent with the absence of glomerular hyperfiltration and the observed lack of GFR compensation. No study has been yet performed with very-early-stage ADPKD human kidneys, however. The extension to which these new concepts could be integrated to the understanding of human nephrogenesis and/or ADPKD pathogenesis, therefore, should be addressed by future studies.

It has been documented in previous orthologous models the absence of gross glomerular or tubular morphological defects in *Pkd1*^{+/-} animals (17). Haploinsufficiency, therefore, appears not to interfere with late tubulogenesis/tubule maturation. The haploinsufficiency-associated disturbance, thus, is likely to occur in earlier phases of nephrogenesis, particularly in the stage of branching tubulogenesis. Low levels of polycystin-1 might decrease the number of ureteric-bud-derived branches or disrupt the normal mesenchymal induction in early stages of organogenesis, determining a lower number of future nephron units. In fact, a recent study has shown that *Pkd1* is essential for normal branching morphogenesis of the chorioallantoic placenta by modulating trophoblast function (K.Piontek, D.Huso, J.Deng, C.Hawkins, M.Cowan and G.G.Germino, manuscript in preparation). These data are consistent with the results of *in vitro* studies that have shown that expression of all or part of polycystin-1 is able to trigger branching morphogenesis in MDCK and IMCD (inner medullary collecting duct) cells (13, 32). These observations suggest a role for polycystin-1 in regulating renal branching morphogenesis, by potentially modulating cytosolic Ca⁺⁺ and downstream pathways. It is interesting to note that, in another animal model, a recent study conducted to identify potential signaling pathways influenced by *Foxf1* (forkhead box f1) haploinsufficiency showed that *Foxf1*^{+/-} embryos exhibit defects in branching and formation of primary lung buds (33).

In summary, we propose a model where polycystin-1 plays a significant role in establishing the number of nephrons early in nephrogenesis, and where its haploinsufficient state is sufficient to disrupt the branching process and result in reduced nephron number. These results bring insightful information on *Pkd1* inactivation in heterozygous animals, opening new concepts potentially associated with nephrogenesis and ADPKD pathogenesis.

Materials and Methods

Animal model

We have previously reported the generation of a 129Sv mouse line with a *Pkd1* null allele (11). This animal model was based on a construct that had part of exon 2 and the entire exon 3 replaced with a reporter gene (*lacZ*) cloned in frame to the remainder of exon 2, and followed by a positive marker, the neomycin resistance gene (*neor*). The *lacZ-neor* 5' segment includes stop codons that prevent the full gene expression, leading to *Pkd1* transcriptional termination.

Our research plan was approved by the University of São Paulo School of Medicine Ethical Committee, in accordance with national and international standards of animal care and experimentation. The animals were genotyped using a three-primer PCR strategy. Reproduction was conducted in specific pathogen-free environment. The mice were maintained in this condition up to four months of age, when they were moved to a standard animal care facility. Following the aim to analyze the biological consequences of *Pkd1* haploinsufficiency, this study was directed to heterozygous mice for the null mutation. Wild-type animals were used as controls.

Inulin clearance protocol

Inulin clearance (CIn) analyses were performed in male mice to achieve uniform experimental conditions. In addition, the high animal genetic homogeneity significantly contributed to increase the discriminating power of the studies. CIn

analysis was performed in seven *Pkd1*^{+/+} and seven *Pkd1*^{+/-} age-paired male mice within an age interval of 187-237 days. Animals were weighed and anesthetized with intra-peritoneal 10 mg/100g BW sodium pentobarbital. Mice were then submitted to tracheostomy with a T20 tube and had the left internal jugular vein dissected using a T10 tube. For blood pressure evaluation and blood sample drawing, one of the femoral arteries was also dissected. A cystostomy was placed thereafter using a T40 tube. The animals were kept on a heated plate during the entire procedure.

The experiment was started with an intra-venous inulin priming of 10 mg/100g BW, followed by a 0.37 mg/min infusion. Urine collection started after 30 min and included three 30-min periods. Blood samples were collected in the beginning of the first period and in the end of the last period. Hematocrit was evaluated with the first sample and the withdrawn blood volume replaced with saline. This parameter was also assessed in the end of the experiments. Inulin clearance was calculated using the equation $CI_{in} = U_{in} \times V / P_{in}$, where U_{in} is the inulin urine concentration, V is the urine flow, and P_{in} the inulin plasma concentration. Mean arterial blood pressure (MAP), taken at the beginning of the experiments, was measured using the mercury column technique.

Renal concentrating capacity analysis

Renal concentrating capacity was analyzed by measuring maximal urinary osmolality (U_{osmMax}) in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} age-paired mice. A new model of urine collecting cage was developed for this purpose, based on the construction of a thin unidirectional fishing-yarn network that allowed appropriate feces retention and

complete urine release. The animals were submitted to water deprivation for 48 h in the cage, weighed and returned to it, following a previous protocol (34). Urine was immediately collected for the following 12-h period. Urine volume was noted and urine osmolality measured using a *Vapro 5500* vapor osmometer (Wescor, Logan, UT).

Two alternative protocols were also applied. In the first, mice were water deprived for 48 h, weighed, submitted to subcutaneous administration of desmopressin 0.1 $\mu\text{g}/100\text{g BW}$ and returned to the cage after 2 h, according to another previously established protocol (35). Urine was then collected for the next 12 h and its osmolality measured as above. In the second protocol, response to desmopressin was evaluated after water administration via gastrointestinal tract. After 24 h with free water access in the metabolic cage, urine osmolality was measured. Two 1.2-ml water infusions were then carried out, following 1-h intervals. After dropping urinary osmolality to below 1,000 mOsm/kg H_2O , the animals were submitted to desmopressin 0.1 $\mu\text{g}/100\text{g BW}$, and after 2 h urine was collected for 3 h and had its osmolality measured.

Kidney and liver pathology

Morphological kidney and liver analyses were performed in 16 *Pkd1*^{+/+} and 22 *Pkd1*^{+/-} male mice within the age range of 20-72 weeks. Extracted kidneys were longitudinally cut and placed in buffered formalin. After at least 48 h specimens were paraffin-embedded, and 3-4- μm sections were mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin. The same procedure was applied to the livers, cut in four transversal sections. Two longitudinal sections of each kidney were analyzed for the

presence of cysts. We used a screen with dots distant one from another by 50 μm to quantify the cystic structures. Dilatations above 500 μm were defined as cysts, following previously suggested criteria (36). Liver analyses comprised identification of portal tract abnormalities and biliary duct dilatations.

Glomerular stereology

We used the physical disector method, also used by Woods et al (37), to quantify the glomerular number in seven *Pkd1*^{+/+} and seven *Pkd1*^{+/-} age-paired male mice, within the age range of 186-236 days. In brief, the animals were submitted to thorachotomy, followed by a catheter insertion in the left ventricle and a right atrial cut to drain the blood. They were then perfused with saline until complete exsanguination. Immediate perfusion with Millonig formalin, modified by Carlson, followed this step. The left kidneys were extracted, weighed, had their volumes measured using Scherle's method (38), and were processed for stereological analyses. The left kidneys were embedded in paraffin, completely sectioned at 5- μm intervals and stained with hematoxylin-eosin. Following appropriate numbering, five slides were randomly chosen and defined as look-up plane. Sequential sections 15 μm apart from these levels corresponded to each of these slides and were named look-down plane. This analysis was performed with a Leica light microscope coupled to a CF15/15 Kappa video-camera, and a Triniton Sony monitor, considering a frame of 3,260 μm^2 .

The numerical density of glomeruli, $N_{V[G]}$, was determined by 15 random disector pairs for each specimen. $Q_{[-]}$ was the number of glomeruli seen in focus only

in the look-up plane, when they were partly or totally inside the frame and did not intersect the forbidden line. The product of the thickness (t) and the total area (A_T) estimated the disector test-volume, leading to the equation $N_{V[G]}=Q_{[-]}/t.A_T$ (39).

The cortico/medullary ratio and the glomerular volume density ($V_{V[G]}=P_{p[G]}/P_T$, where $P_{p[G]}$ is the points hitting glomeruli and P_T the total points into the test-system – 36 points in the present case) were estimated by point counting and Cavalieri's method (40). These parameters allowed estimating the volume occupied by glomeruli ($Volume_{[G]}$) in the renal cortex ($Volume_{[G]}=Volume[cortex] \times V_{V[G]}$). The average volume of all glomeruli (V_G) was calculated for both *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice, using the $V_{V[G]}/N_{V[G]}$ ratio.

Nitrite/nitrate urinary excretion protocol

The quantification of NO_2/NO_3 urinary excretion was performed in eight *Pkd1*^{+/+} and eight *Pkd1*^{+/-} age-paired male mice within the age range of 244-323 days. The animals were placed in a metabolic cage for urine collection for 24 h. Creatinine concentration was determined in urine using a modified Jaffé's method. Urinary NO_2/NO_3 was measured using Conrad's method (41). To a 200- μ l sample we added 200 μ l of 0.1 M phosphate buffer pH 7.2, 100 μ l of 43 mU/ml nitrate reductase, 100 μ l of 0.28 mM NADPH, and 100 μ l of 35 mM FAD (Sigma, St. Louis, MO). The sample was then incubated at 25 °C for 2 h to reduce nitrite to nitrate, and the reaction finalized by incubation at 98 °C.

The colorimetric reaction was carried out by adding 700 μ l of 2% Griess reagent B in 0.2% Griess reagent A, following a 60 °C incubation for 10 min. The

colorimetric reading was performed using the Hitachi U2000 spectrophotometer at 546 nm. The values were adjusted according to control sodium nitrate and sodium nitrite reduction curves. The NO_2/NO_3 excretion was finally corrected to total urinary creatinine excretion.

Statistical analysis

The values related to the quantitative experimental groups were expressed as mean and standard error of the mean. We applied the non-paired Student's t test, using Welch's correction if necessary. Glomerular volume analysis was carried out using one-tailed test, based on the original hypothesis that it was higher in heterozygotes. The survival analyses were performed using the Kaplan-Meier's test with Log-Rank discriminating post-test. We have accepted an α error below or equal 5% to reject the null hypothesis. These tests were applied using the Prism 4.00 software (GraphPad Software, CA).

Acknowledgments

We thank Antonio C. Seguro, M.D., Ph.D., for protocol suggestions, and Isac de Castro, Ph.D., for technical help and suggestions. We also thank Cristina Tanikawa, Ph.D., Cyntia M. S. Godoy, Sônia A. Coutinho and Tallita M. S. Pires for the animal care facility support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2000/00280-3 to LFO), Coordenação de Aprimoramento de Ensino Superior (PICDT 0075-03 to MFS), and the National Institutes of Health (DK48006 and DK57325 to GGG). GGG is the Irving Blum Scholar of the Johns Hopkins University School of Medicine. GGG/KP are members of the JHU NIDDK_PKD Center of Excellence.

References

1. Igarashi,P. and Somlo,S. (2002) Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 2384-2398.
2. Gabow,P.A., Johnson,A.M., Kaehny,W.D., Kimberling,W.J., Lezotte,D.C., Duley,I.T. and Jones,R.H. (1992) Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.*, **41**, 1311-1319.
3. Sutters,M. and Germino,G.G. (2003) Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and pathophysiology. *J. Lab. Clin. Med.*, **141**, 91-101.
4. Delmas,P. (2004) Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*, **118**, 145-148.
5. Nauli,S.M., Alenghat,F.J., Luo,Y., Williams,E., Vassilev,P., Li,X., Elia,A.E., Lu,W., Brown,E.M., Quinn,S.J. et al. (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.*, **33**, 129-137.
6. Streets,A.J., Newby,L.J., O'Hare,M.J., Bukanov,N.O., Ibraghimov-Beskrovnaya,O. and Ong,A.C. (2003) Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1804-1815.

7. Gallagher,A.R., Cedzich,A., Gretz,N., Somlo,S. and Witzgall,R. (2000) The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 4017-4022.
8. Hanaoka,K., Qian,F., Boletta,A., Bhunia,A.K., Piontek,K., Tsiokas,L., Sukhatme,V.P., Guggino,W.B. and Germino,G.G. (2000) Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*, **408**, 990-994.
9. Koulen,P., Cai,Y., Geng,L., Maeda,Y., Nishimura,S., Witzgall,R., Ehrlich,B.E. and Somlo,S. (2002) Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 191-197.
10. Delmas,P., Nomura,H., Li,X., Lakkis,M., Luo,Y., Segal,Y., Fernandez-Fernandez,J.M., Harris,P., Frischauf,A.M., Brown,D.A. and Zhou,J. (2002) Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11276-11283.
11. Bhunia,A.K., Piontek,K., Boletta,A., Liu,L., Qian,F., Xu,P.N., Germino,F.J. and Germino,G.G. (2002) 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*, **109**, 157-168.

12. Qian,F., Watnick,T.J., Onuchic,L.F. and Germino,G.G. (1996) The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell*, **87**, 979-987.
13. Boletta,A., Qian,F., Onuchic,L.F., Bhunia,A.K., Phakdeekitcharoen,B., Hanaoka,K., Guggino,W., Monaco,L. and Germino,G.G. (2000) Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol. Cell*, **6**, 1267-1273.
14. Fick,G.M., Duley,I.T., Johnson,A.M., Strain,J.D., Manco-Johnson,M.L. and Gabow,P.A. (1994) The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **4**, 1654-1660.
15. Watnick,T.J., Torres,V.E., Gandolph,M.A., Qian,F., Onuchic,L.F., Klinger,K.W., Landes,G. and Germino,G.G. (1998) Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol. Cell*, **2**, 247-251.
16. Wu,G., D'Agati,V., Cai,Y., Markowitz,G., Park,J.H., Reynolds,D.M., Maeda,Y., Le,T.C., Hou,H.Jr., Kucherlapati,R. et al. (1998) Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell*, **93**, 177-188.
17. Lu,W., Peissel,B., Babakhanlou,H., Pavlova,A., Geng,L., Fan,X., Larson,C., Brent,G. and Zhou,J. (1997) Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat. Genet.*, **17**, 179-181.

18. Lu,W., Shen,X., Pavlova,A., Lakkis,M., Ward,C.J., Pritchard,L., Harris,P.C., Genest,D.R., Perez-Atayde,A.R. and Zhou,J. (2001) Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2385-2396.
19. Wu,G., Markowitz,G.S., Li,L., D'Agati,V.D, Factor,S.M., Geng,L., Tibara,S., Tuchman,J., Cai,Y., Park,J.H. et al. (2000) Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat. Genet.*, **24**, 75-78.
20. Martinez-Maldonado,M., Yium,J.J., Eknoyan,G. and Suki,W.N. (1972) Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int.*, **2**, 107-113.
21. D'Angelo,A., Mioni,G., Ossi,E., Lupo,A., Valvo,E. and Maschio,G. (1975) Alterations in renal tubular sodium and water transport in polycystic kidney disease. *Clin. Nephrol.*, **3**:99-105.
22. Gabow,P.A., Kaehny,W.D., Johnson,A.M., Duley,I.T., Manco-Johnson,M., Lezotte,D.C. and Schrier,R.W. (1989) The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney Int.*, **35**, 675-680.
23. Seeman,T., Dusek,J., Vondrak,K., Blahova,K., Simkova,E., Kreisinger,J., Dvorak,P., Kyncl,M., Hribal,Z. and Janda,J. (2004) Renal concentrating capacity is linked to blood pressure in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Physiol. Res.*, **53**, 629-634.

24. Wang,D., Iversen,J., Wilcox,C.S. and Strandgaard,S. (2003) Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.*, **64**, 1381-1388.
25. Muto,S., Aiba,A., Saito,Y., Nakao,K., Nakamura,K., Tomita,K., Kitamura,T., Kurabayashi,M., Nagai,R., Higashihara,E. et al. (2002) Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1731-1742.
26. Wang,T., Tian,X., Bailey,M.A., Shibazaki,S., Somlo,S. and Aronson,P.S. (2002) Impaired glomerular filtration rate in Pkd2 and Pkd1 heterozygote mice (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**,116A.
27. Wong,H., Vivian,L., Weiler,G. and Filler,G. (2004) Patients with autosomal dominant polycystic kidney disease hyperfiltrate early in their disease. *Am. J. Kidney Dis.*, **43**, 624-628.
28. Gilbert,T., Lelievre-Pegorier,M. and Merlet-Benichou,C. (1991) Long-term effects of mild oligonephronia induced in utero by gentamicin in the rat. *Pediatr. Res.*, **30**, 450-456.
29. Cullen-McEwen,L.A., Kett,M.M., Dowling,J., Anderson,W.P. and Bertram,J.F. (2003) Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. *Hypertension*, **41**, 335-340.

30. Ortiz,L.A., Quan,A., Zarzar,F., Weinberg,A. and Baum,M. (2003) Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension*, **41**, 328-334.
31. Regazzoni,B.M., Genton,N., Pelet,J., Drukker,A. and Guignard,J.P. (1998) Long-term followup of renal functional reserve capacity after unilateral nephrectomy in childhood. *J. Urol.*, **160(3 Pt 1)**, 844-848.
32. Nickel,C., Benzing,T., Sellin,L., Gerke,P., Karihaloo,A., Liu,Z.X., Cantley,L.G. and Walz,G. (2002) The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, **109**, 481-489.
33. Lim,L., Kalinichenko,V.V., Whitsett,J.A. and Costa.R.H. (2002) Fusion of lung lobes and vessels in mouse embryos heterozygous for the forkhead box f1 targeted allele. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **282**, L1012-L1022.
34. Oliverio,M.I., Delnomdedieu,M., Best,C.F., Li,P., Morris,M., Callahan,M.F., Johnson,G.A., Smithies,O. and Coffman,T.M. (2000) Abnormal water metabolism in mice lacking the type 1A receptor for ANG II. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **278**, F75-F82.

35. Fleming,E.F., Athirakul,K., Oliverio,M.I., Key,M., Goulet,J., Koller,B.H. and Coffman,T.M. (1998) Urinary concentrating function in mice lacking EP3 receptors for prostaglandin E2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **275**: F955-F961.
36. Lu,W., Fan,X., Basora,N., Babakhanlou,H., Law,T., Rifai,N., Harris,P.C., Perez-Atayde,A.R., Rennke,H.G. and Zhou,J. (1999) Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat. Genet.*, **21**, 160-161.
37. Woods,L.L., Weeks,D.A. and Rash,R. (2004) Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int.*, **65**, 1339-1348.
38. Scherle,W. (1970) A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, **26**, 57-60.
39. Sterio,D.C. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.*, **134(Pt 2)**, 127-136.
40. Nyengaard,J.R. (1999) Stereologic methods and their application in kidney research. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 1100-1123.
41. Conrad,K.P., Joffe,G.M., Kruszyna,H., Kruszyna,R., Rochelle,L.G., Smith,R.P., Chavez,J.E. and Mosher,M.D. (1993) Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.*, **7**, 566-571.

Legends to Figures

Figure 1. Actuarial survival curves and comparative analysis between *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} males (A; p=0.361) and females (B; p<0.05).

Figure 2. Comparative analysis of inulin clearance in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice. (A) CInN: inulin clearance normalized for body weight. (B) CIn: absolute inulin clearance. (C) BW: body weight. (D) KWN: kidney weight normalized for body weight, including both kidneys. (E) KW: absolute kidney weight, including both kidneys. (F) MAP: mean arterial pressure. n=7 per group. *** p<0.001; * p<0.05. Age - *Pkd1*^{+/+}: 211.9±5.8 days, *Pkd1*^{+/-}: 203.6±6.4 days (p=0.359).

Figure 3. Comparative analysis of maximal urinary osmolality in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} mice. (A) 24-40-week aged males; n=10 (*Pkd1*^{+/+}) and n=6 (*Pkd1*^{+/-}); age - *Pkd1*^{+/+}: 211.1±4.6 days, *Pkd1*^{+/-}: 226.7±12.4 days (p=0.626). (B) 24-40-week aged females; n=5 (*Pkd1*^{+/+}) and n=6 (*Pkd1*^{+/-}); age - *Pkd1*^{+/+}: 248.2±8.0, *Pkd1*^{+/-}: 252.2±10.0 days (p=0.770). (C) above-56 week aged males; n=20 (*Pkd1*^{+/+}) and n=23 (*Pkd1*^{+/-}); age - *Pkd1*^{+/+}: 614.3±31.0, *Pkd1*^{+/-}: 573.3±17.0 days (p=0.874).

Figure 4. Stereological quantification of glomerular number and size in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice. (A) N: total number of glomeruli in left kidney. (B) V_[G]: glomerular volume. (C) LKV: left kidney volume. (D) CV: cortex

volume. (E) % Cortex: cortex percent ratio. n=7 per group. *** p<0.001;
* p<0.05. Age - *Pkd1*^{+/+}: 208.4±8.6 days, *Pkd1*^{+/-}: 208.3±10.3 days
(p=0.992).

Figure 5. NO₂-NO₃ urinary excretion in *Pkd1*^{+/+} and *Pkd1*^{+/-} male mice. 24h NO₂-
NO₃/UCr: 24-h NO₂-NO₃ urinary excretion/creatinine urinary excretion.
n=7 per group; age - *Pkd1*^{+/+}: 295.0±7.8 days, *Pkd1*^{+/-}: 300.0±9.0 days
(p=0.664).

Table 1. Quantitative and qualitative analyses of renal and hepatic alterations found in *Pkd1*^{+/-} male mice

<i>Pkd1</i> ^{+/-}	Age (days)	Renal Pathological Findings	Hepatic Pathological Findings
HM01	198	4 TD	-
HM02	201	-	BEA - restricted to 1 portal tract
HM14	510	5 Cysts: 550-4000 mm; 4 TD	BE - diffuse
HM35	321	-	BEA; BDM; PSA - restricted to 1 portal tract
HM38	309	2 Cysts: 650-710 mm; 1 TD	BEA; BDM - restricted to 1 portal tract
HM43	377	-	Cysts; BE - diffuse
HM44	205	1 Cyst: 600 mm; 1 TD	-
HM45	272	1 TD	BE - restricted to 5 portal tracts
HM46	275	-	BDM - restricted to 2 portal tracts
HM47	209	1 Cyst: 650 mm; 4 TD	BE; BDM - restricted to 2 portal tracts

The first column identifies the ten heterozygous animals, out of the 22 analyzed mice, with renal or hepatic abnormalities, while the second shows their age. The third column describes the renal findings, specifying the cyst diameter and/or tubular dilatation. TD: tubular dilatation. Only one out of 16 *Pkd1*^{+/+} evaluated animals showed a single tubular dilatation. The fourth column describes the liver findings, including cysts and biliary and portal space anomalies. BEA: biliary epithelial alterations, including hyperplasia and/or column eosinophilic cells; BDM: biliary duct malformation; BE: biliary ectasia; PSA: portal space alterations, including portal expansion and/or fibrosis.

Figure 1

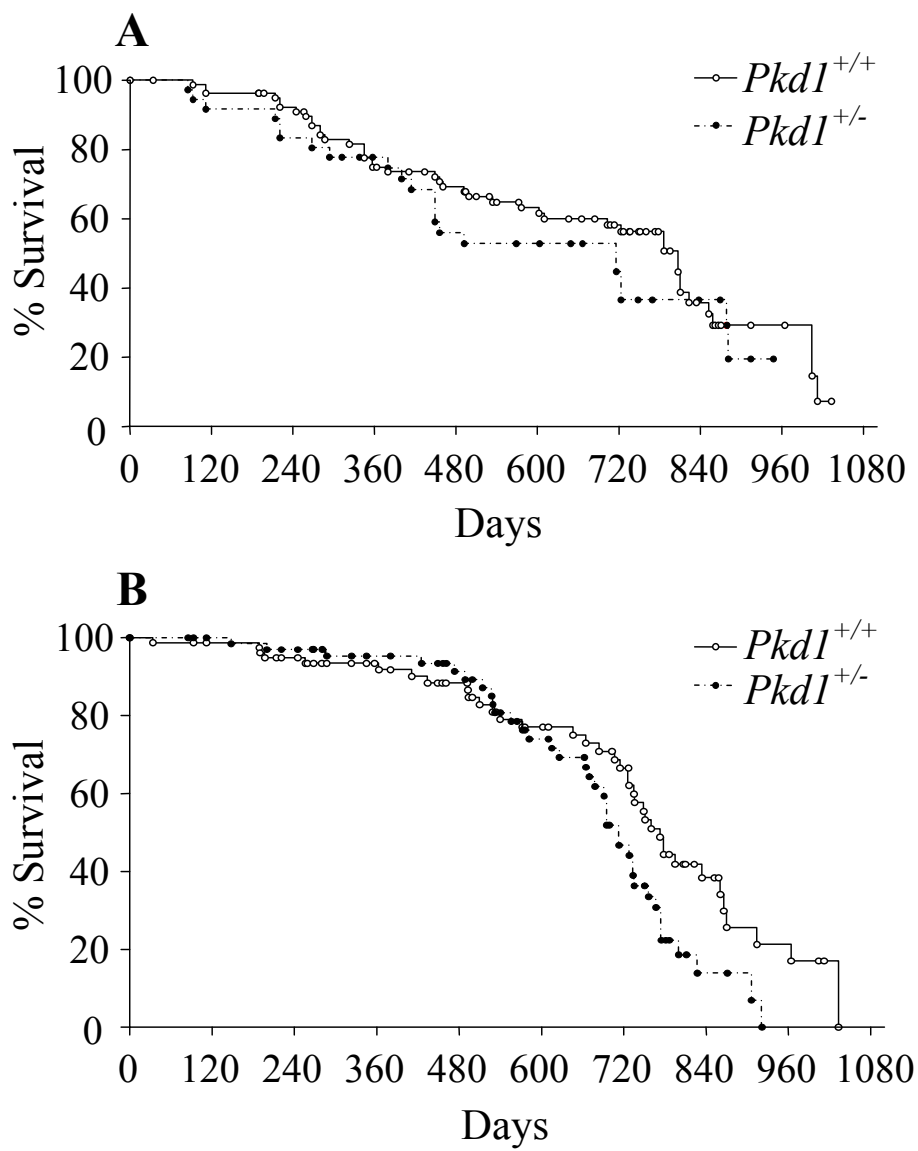


Figure 2

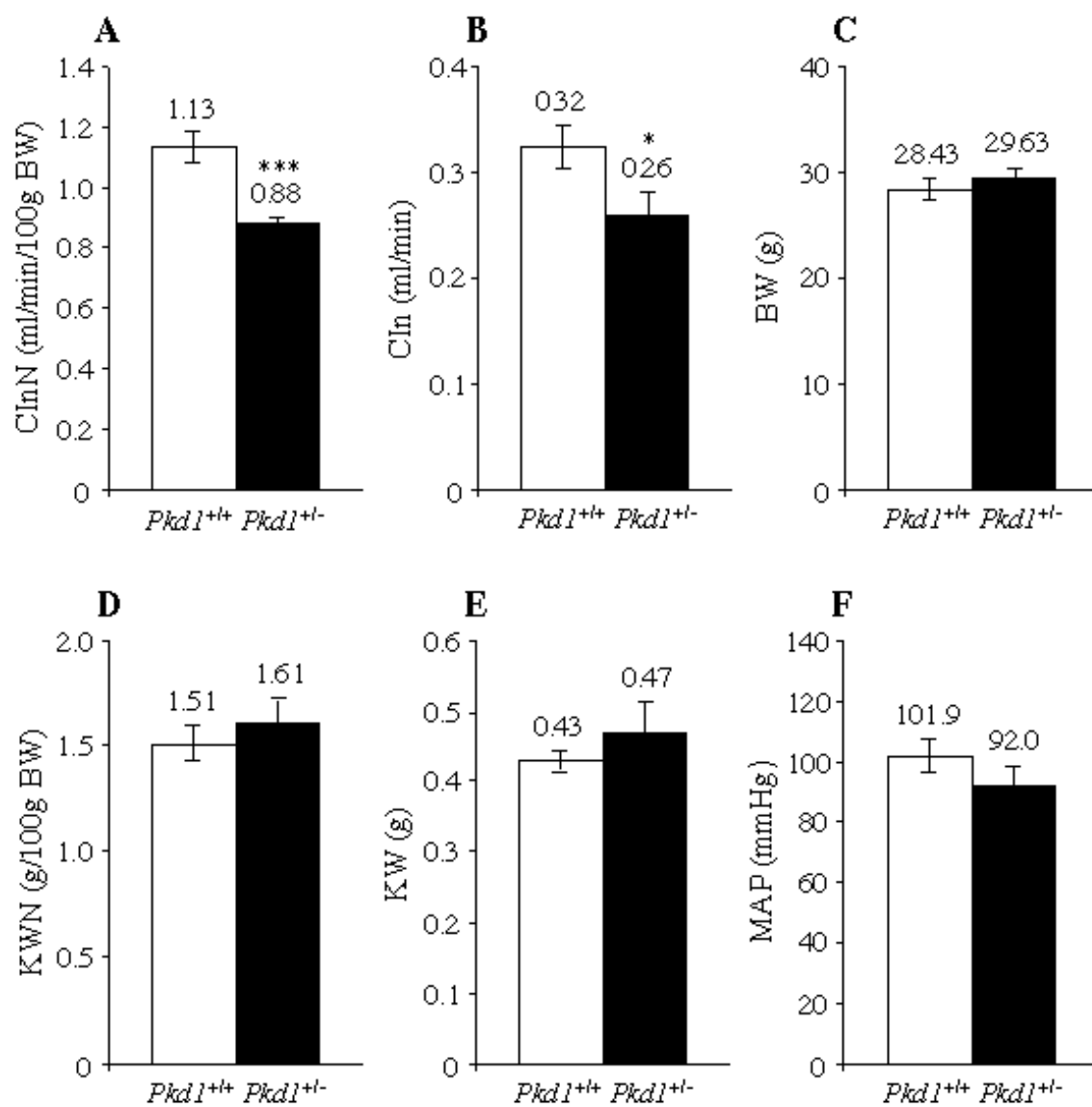


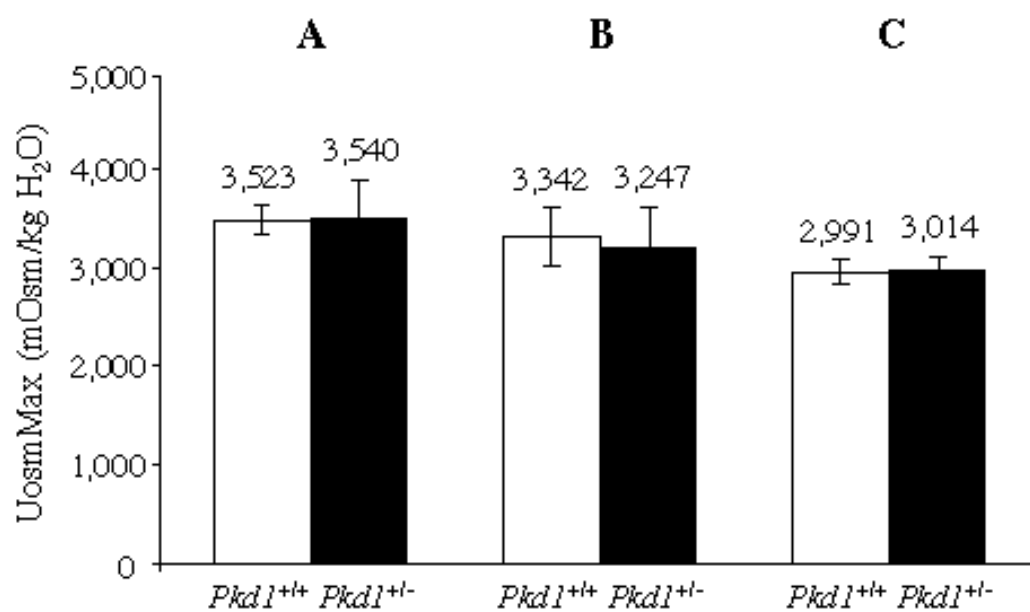
Figure 3

Figure 4

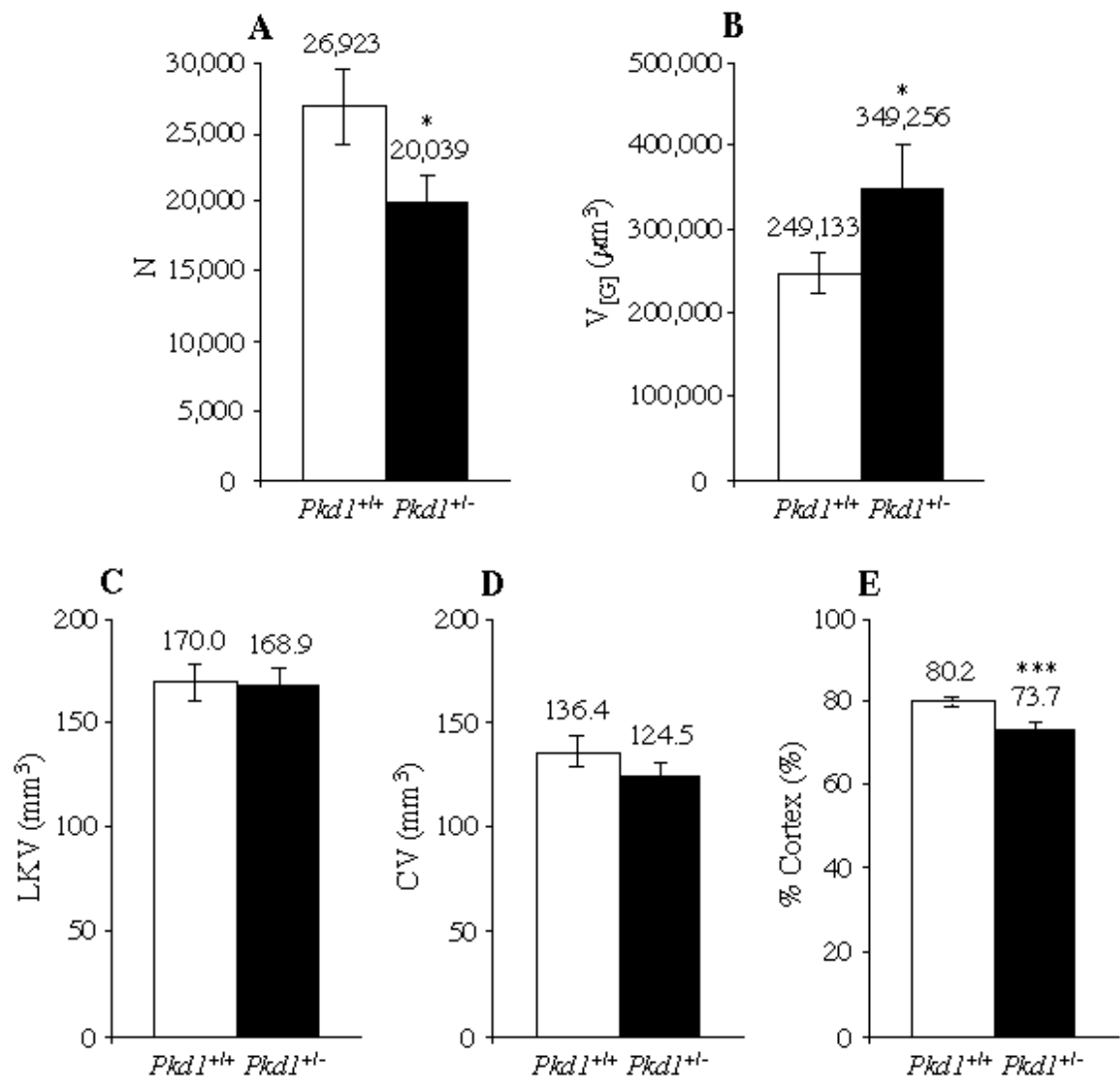
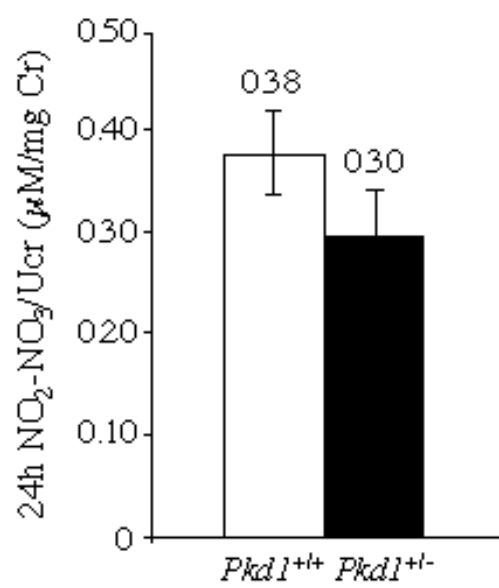


Figure 5

Abbreviations

ADPKD: Autosomal dominant polycystic kidney disease

Pkd1: Mouse polycystic kidney disease 1 gene

GFR: Glomerular filtration rate

CIn: Inulin clearance

UosmMax: Maximal urinary osmolality

BW: Body weight

KW: Kidney weight

NO: Nitric oxide

NO₂/NO₃: Nitrite/nitrate

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)