



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Medicina e Odontoiatria
Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione
Direttore: Prof. Marcello Arca

Tesi di Dottorato di ricerca in
TECNOLOGIE BIOMEDICHE INNOVATIVE IN MEDICINA CLINICA

Studio longitudinale prospettico
volto a valutare la relazione tra microRNA e fibrosi renale
nella malattia renale policistica autosomica dominante

Relatore:
Prof. Maurizio Muscaritoli

Candidato:
Daniela Mastroluca

Correlatore:
Prof.ssa Silvia Lai

Anno Accademico 2021/2022

A Edoardo

A Giorgia

A Itaca

Quando ti metti in viaggio per Itaca
augurati che la strada sia lunga, piena di esperienze e di avventure.
Non temere i Lestrigoni e i Ciclopi o la furia di Poseidone,
non sarà questo il genere di incontri se il pensiero resta alto
e un sentimento fermo guida il tuo spirito e il tuo corpo.

Augurati che la strada sia lunga.
Che i mattino d'estate siano tanti quando nei porti,
finalmente e con che gioia, entrerai per la prima volta:
negli empori fenici soffermati e acquista belle mercanzie
madreperle coralli ebano e ambre
anche profumi penetranti d'ogni sorta; più profumi inebrianti che puoi,
e va' in molte città d'Egitto, impara, impara da coloro che sanno.

Tienila sempre in mente Itaca. La tua meta è approdare là.
Ma non affrettare il tuo viaggio; fa che duri a lungo, per anni,
e che ormai vecchio tu metta piede sull'isola,
ricco dei tesori guadagnati per la via, senza aspettarti ricchezze da Itaca.
Itaca ti ha dato il bel viaggio, senza di lei mai ti saresti messo sulla via.

Nulla di più ha da darti.
E se la troverai povera, non per questo Itaca ti avrà deluso.
Perché saggio ti avrà fatto il cammino e avrai capito il significato di Itaca. ¹

¹ K. Kavafis, "Itaca"

INDICE

1. Introduzione	pag. 1
2. Cistogenesi	pag. 3
3. Fibrosi renale nell'ADPKD	pag. 11
4. MicroRNA e ADPKD	pag. 18
4.1 miR-17~92 e l'asse Wnt/ β catenina-cMyc-miR-17~92	pag. 22
4.2 miR-21 e l'asse AMPc-CREB-miR-21-PDC4	pag. 27
4.3 miR-199a-5p e il target CDKN1C/p57	pag. 31
5. Marker di progressione di malattia nell'ADPKD	pag. 32
6. Volume renale totale nei trial clinici	pag. 35
7. Scopo dello studio	pag. 39
8. Materiali e metodi	pag. 39
8.1 Tipo di studio	pag. 39
8.2 Popolazione di studio	pag. 39
8.3 Esami clinici	pag. 41
8.4 Esami ematochimici e urinari	pag. 41
8.5 Dosaggio MicroRNA	pag. 43
8.6 Risonanza Magnetica	pag. 44
8.7 Analisi statistica	pag. 46
9. Risultati	pag. 47
10. Discussione	pag. 57
11. Conclusioni	pag. 61
12. Bibliografia	pag. 63

1. Introduzione

La Malattia Renale Policistica Autosomica Dominante (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD) è una malattia ereditaria monogenica caratterizzata dalla formazione di dilatazioni cistiche dei tubuli renali, multiple e bilaterali, che portano ad un progressivo sovvertimento del parenchima renale, fino ad arrivare ad un'insufficienza d'organo.

È la più comune malattia ereditaria in ambito nefrologico la cui prevalenza è stimata tra 1:400 e 1:1000 nati vivi. Circa 12 milioni risultano i pazienti affetti nel mondo, di cui 60.000 solo in Italia. L'8-10% dei pazienti con malattia renale terminale (ESRD) sono ADPKD (1).

La mutazione responsabile può coinvolgere il gene PKD1 (ADPKD di tipo1, 80% dei casi), mappato sul cromosoma 16 (16p13.3), codificante per la proteina policistina 1 (PC1) o il gene PKD2 (ADPKD di tipo2, 15% dei casi), mappato sul cromosoma 4 (4p13q23) e codificante per la policistina 2 (PC2). Il restante 5% dai casi è rappresentato da mutazioni rare o geneticamente non determinate. L'ADPKD di tipo 1 si manifesta clinicamente con una prognosi peggiore, aspettativa di vita poco superiore ai 50 anni e raggiungimento in tempi brevi della fase terminale della malattia renale mentre l'ADPKD di tipo 2 presenta una prognosi migliore con una sintomatologia più tardiva (2).

Col tempo, la progressiva formazione delle cisti determina la totale distruzione del parenchima renale determinando la perdita dell'organo in maniera irreversibile. Tuttavia, una riduzione significativa della funzione renale non risulta evidente finché il volume renale totale (TKV) non è aumentato di cinque volte, o fino a che il 50% del parenchima renale non viene distrutto. Di conseguenza, circa il 70% dei pazienti ADPKD presenta ESRD all'età media di 58 anni, mentre lo

sviluppo delle cisti e le conseguenze distruttive ad esse connesse hanno inizio decenni prima (3). Questo sottolinea come sia necessario stabilire dei marker di progressione di malattia, differenti dal filtrato glomerulare (GFR), capaci di definire il livello di danno renale esistente e di predire la progressione della malattia in un periodo relativamente breve di tempo. L'identificazione di questi biomarcatori risulta fondamentale sia per il follow-up clinico di una malattia caratterizzata da un'elevata variabilità fenotipica sia per valutare l'efficacia di nuove strategie terapeutiche nel contesto di trial clinici, la cui ricerca risulta ostacolata dalla mancanza di marcatori surrogati a breve termine in grado di riflettere idealmente i cambiamenti nella velocità di sviluppo della cisti e prevedere i benefici a lungo termine della terapia farmacologica. Attualmente l'ADPKD manca di marker universalmente accettati. Sebbene esista un'associazione inversa tra GFR e volume renale totale, l'elevata variabilità fenotipica ne limita il suo ruolo come biomarcatore a livello individuale.

Grazie al contributo della genetica molecolare, negli ultimi anni è stato messo in evidenza il ruolo dei microRNA come regolatori epigenetici coinvolti nell'eziopatogenesi dell'ADPKD, in grado di modulare la crescita delle cisti attraverso la soppressione dell'espressione dei geni PKD, e di regolare la proliferazione delle cisti delle cellule epiteliali renali, il metabolismo mitocondriale, i meccanismi di apoptosi e di autofagia. Obiettivo dello studio è stato analizzare microRNA specifici coinvolti nella patogenesi dell'ADPKD e nello sviluppo della fibrosi, valutando il loro potenziale ruolo come predittori di perdita di funzione renale e correlare i dati alla presenza di tessuto fibrotico renale.

2. Cistogenesi

Il meccanismo primario della formazione cistica non è ancora perfettamente conosciuto ma è generalmente accettato che la perdita funzionale delle policistine trasformi le cellule epiteliali tubulari in cellule scarsamente differenziate e iperproliferanti che danno luogo alle cisti renali. Negli anni è stata documentata la disregolazione di molteplici pathway di segnale quali mTOR (mammalian target of rapamycin signaling), cMyc, JAK/STAT (Janus kinases/signal transducer and activator of transcription) e l'asse AMPc/CREB (adenosina 3', 5'-ciclico monofosfato/response element-binding protein) (Fig. 1). L'alterazione di questi processi cellulari determina la proliferazione dell'epitelio cistico, l'aumentata resistenza all'apoptosi, l'eccessiva secrezione di fluidi e l'alterazione del metabolismo mitocondriale e della risposta infiammatoria (4).

PC1 e PC2 sono glicoproteine transmembrana che si colocalizzano a livello del ciglio primario delle cellule renali tubulari. Una mutazione germinale in uno degli alleli PKD1 o PKD2 associata a inattivazione somatica dei due alleli restanti wild-type PKD1 o PKD2 o alla perdita di eterozigosi, risultano necessari affinché avvenga la cistogenesi (5). Sebbene varianti in altri geni legati a PKD o geni non identificati, così come fattori ambientali e danno renale acuto, possono modulare la formazione cistica e la progressione della malattia, la probabilità di formazione delle cisti aumenta sostanzialmente quando il livello di funzionalità di PC1 o PC2 scende al di sotto di una soglia critica. Di conseguenza, la quantità di PC1 o PC2 funzionale e, quindi, il tipo di mutazione (mutazioni inattivanti o mutazioni che riducono la funzione del prodotto genico (mutazioni ipomorfiche)) influenzano la probabilità di formazione delle cisti e la progressione della

malattia. In modelli murini, la delezione di PKD1 in un piccolo numero di cellule (10%), porta a un periodo dormiente di ~ 6 mesi in cui non vi è dilatazione tubulare renale, seguita da un periodo con una rapida formazione di cisti, suggerendo che sono necessari ulteriori trigger per avviare la formazione di cisti (6). La perdita di funzione del complesso PC1-PC2 determina una ridotta concentrazione dei livelli di calcio intracellulare e, di conseguenza, un aumento dei livelli di AMPc. Tuttavia, studi successivi hanno suggerito che sebbene le policistine inducano cambiamenti localizzati nella concentrazione del calcio a livello del ciglio, i livelli di calcio citoplasmatico non risultano essere globalmente alterati (7). L'AMPc gioca un ruolo stimolatorio sulla cistogenesi agendo su entrambe le tappe coinvolte nella formazione e accrescimento cistico, vale a dire sia sui fenomeni proliferativi delle cellule epiteliali tubulari che sulla secrezione transepiteliale di cloro (8).

L'incremento della proliferazione cellulare dà inizio allo sviluppo delle cisti renali e una volta formate, risulta stimolata la secrezione di cloro nel lume cistico attraverso il canale CFTR (cystic fibrosistrans-membrane conductance regulator), localizzato sulla membrana apicale delle cellule epiteliali cistiche; l'elettronegatività luminale così generata, permette il movimento di sodio e acqua dalla cellula nel lume cistico, secondo gradiente elettrico e osmotico rispettivamente, con progressivo ingrandimento cistico (9).

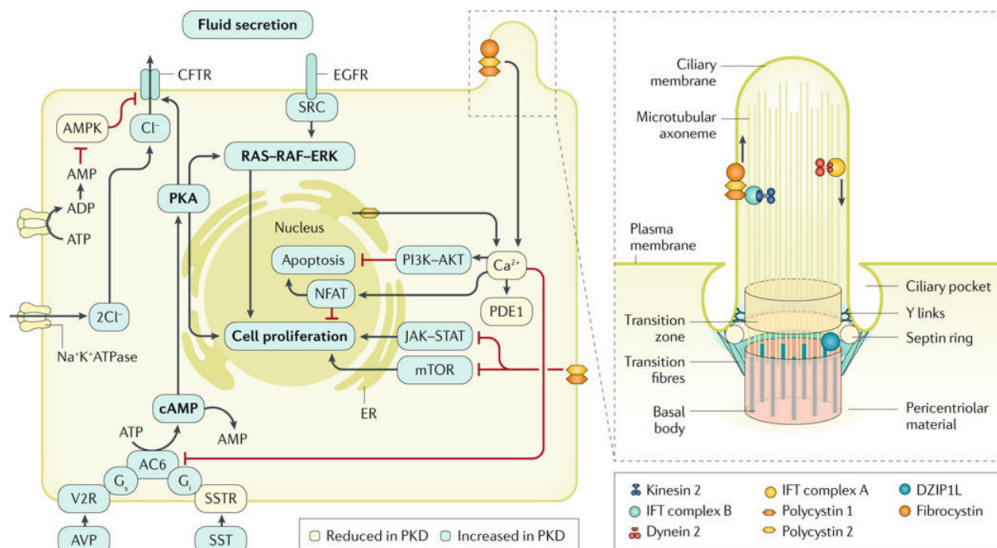


Figura 1: Meccanismi alla base della cistogenesi

L'AMPc nei meccanismi secretivi della crescita cistica interviene stimolando il canale CFTR sul versante apicale della membrana plasmatica; nella fattispecie, esso attiva la proteinchinasi A (PKA) che determina la fosforilazione del CFTR in corrispondenza di molti residui nel dominio citoplasmatico, permettendo la secrezione di cloro nel lume cistico secondo gradiente di concentrazione (10). Il movimento del cloro attraverso il CFTR è il primum movens per il passaggio di sodio e di acqua successivi, guidato il primo da gradiente elettrochimico e il secondo da quello osmotico. La secrezione transepiteliale di cloro è mediata, inoltre, anche da un cotrasportatore Na⁺- K⁺- 2Cl⁻-bumetanide-sensibile (BSC o NKCC) presente sul versante basolaterale della membrana della cisti. Il ridotto flusso di Ca²⁺, l'aumento dei livelli di AMPc e l'attivazione aberrante del pathway MAPK/ERK (noto anche come via Ras-Raf-

MEK-ERK) nelle cellule epiteliali renali rappresentano importanti mediatori della crescita cistica che è ulteriormente sostenuta dall'aumento del segnale dei fattori di crescita (11). In particolare, l'aumento dei livelli di EGFR (epidermal growth factor receptor) e la sua mislocalizzazione a livello della superficie apicale delle cellule epiteliali cistiche, insieme alla presenza dei ligandi EGF e TGF α (transforming growth factor- α), promuove la proliferazione dell'epitelio cellulare tubulare. Altri meccanismi disregolati nell'ADPKD che possono essere coinvolti nella crescita cellulare e nella resistenza all'apoptosi sono rappresentati dalla via di segnale PI3K-Akt (phosphatidylinositol 3-kinase e Akt/Protein Kinase B), coinvolta nella trasduzione di segnale intracellulare che promuove il metabolismo, la proliferazione, la sopravvivenza cellulare, la crescita e l'angiogenesi in risposta a segnali extracellulari; da AMPK (sistema delle proteine chinasi AMP dipendenti, proteine sensore dello stato energetico cellulare), da NFAT (nuclear factor of activated T cells) e NF- κ B (nuclear factor- κ B). Inoltre, l'espansione cistica è associata ad un alterato metabolismo cellulare con aumentato consumo di glucosio, indicativo di una sintesi di ATP attraverso la glicolisi aerobica, e un'alterata ossidazione degli acidi grassi (12).

Le cisti inducono uno stress (presumibilmente meccanico) sui nefroni circostanti, determinando apoptosi delle cellule epiteliali renali e aumentando verosimilmente la formazione di cisti. L'assenza del ciglio in modelli murini PPKD 1 e PKD 2 suggerisce che nei reni sani, le policistine inibiscono il pathway di segnale cistogenico cilia-regolato che controlla la proliferazione dell'epitelio cellulare renale. La simultanea ablazione di PKD1 e Itgb1 (che codifica per l'integrina β 1) in modelli murini determina un'inibizione della cistogenesi e soppressione della fibrosi, suggerendo che PC1 reprime le vie di segnale che

regolano il crosstalk tra la matrice extracellulare e le integrine (13). Sebbene una diretta associazione tra PC1 e $\beta 1$ integrine non è stata ancora documentata, PC1 interagisce con proteine adattatrici del citoscheletro quali vinculina e paxillina, essenziali per i meccanismi di adesione cellulare. L'anomala composizione e localizzazione di giunzioni adesive e desmosomi nell'ADPKD, suggerisce che le policistine regolano la dinamica dell'adesione cellulare per ridurre lo stress meccanico e permettere il rimodellamento citoscheletrico. Ne consegue che l'integrità della polarità cellulare apicale-basale viene meno.

Le cisti possono derivare da qualsiasi porzione tubulare ma originano principalmente dal dotto collettore. Col tempo, si distaccano dal tubulo parentale, divenendo delle strutture autonome, isolate, ripiene di fluido derivante dalla secrezione transepiteliale. Nell'espandersi tendono a perdere tale connessione, probabilmente a causa dello stato di fibrosi dell'interstizio circostante, e la secrezione intracistica diviene il solo meccanismo responsabile dell'accumulo di liquido nelle cisti. Nella crescita cistica oltre alla secrezione di fluido si accompagna l'iperplasia delle cellule epiteliali tubulari. L'accumulo di fluido potrebbe contribuire all'iperplasia per stimolazione della divisione cellulare attraverso lo stretching della parete cistica.

L'epitelio del tubulo renale perde la sua polarità, creando delle strutture sferiche piuttosto che tubulari, allungate e ramificate, esclusivamente durante la fase proliferativa e solo dopo che la dilatazione cistica è avvenuta; inoltre, perde la sua capacità assorbente a favore di quella secretiva costituendo delle cisti a contenuto fluido. Ne risulta che le cisti si sviluppano a causa di un'anomala differenziazione delle cellule dell'epitelio tubulare, associata ad elevata proliferazione, secrezione transepiteliale di liquidi e rimodellamento della matrice

extracellulare, alterata polarità cellulare e anomalia nella struttura e funzione ciliare (14).

Studi sperimentali dimostrano come la cistogenesi abbia inizio in utero, e come le fasi iniziali di sviluppo delle cisti sia presente già a partire dalla nona settimana di gestazione (15).

L'aumento progressivo delle cisti, sia in volume che in numero, comporta nel tempo una distorsione e una compressione ab estrinseco della vascolatura renale, con stiramento dei vasi e conseguente cambiamento dell'emodinamica intrarenale che causa una iperattivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA), determinante nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa e del danno d'organo (16, 17) (Fig. 2). Nonostante la funzione renale rimanga nei limiti per decenni di vita, già nelle fasi iniziali di malattia è presente una vasocostrizione renale, un aumento delle resistenze vascolari, e una riduzione del flusso renale plasmatico. Si attiva così un aumento della frazione di filtrazione, indice dell'iperfiltrazione glomerulare a livello di ogni singolo nefrone (18). È stato dimostrato come l'iperfiltrazione glomerulare, già presente nei bambini ADPKD, sia associata ad un più alto rate di crescita del volume renale nel tempo (19). Lo stress che si manifesta a livello dei glomeruli sani conduce all'ipertensione glomerulare, che progressivamente colpisce i nefroni non ancora danneggiati (20). L'iperfiltrazione glomerulare può essere causata dai livelli elevati di angiotensina II, in grado di aumentare il tono vasale sia dell'arteriola afferente che efferente, e di modulare così la pressione capillare intraglomerulare e il GFR. L'effetto vasocostrittore di questo ormone agisce soprattutto a livello delle arteriole postglomerulari, aumentando la pressione idraulica glomerulare e la frazione di filtrazione (21). In particolare, l'iperattivazione del SRAA e gli aumentati livelli

di angiotensina II e dell'aldosterone possono, inoltre, determinare l'aumento del volume delle cisti attraverso l'incremento della proliferazione dell'epitelio cistico, dell'infiammazione, del danno ossidativo e della fibrosi (22, 23).

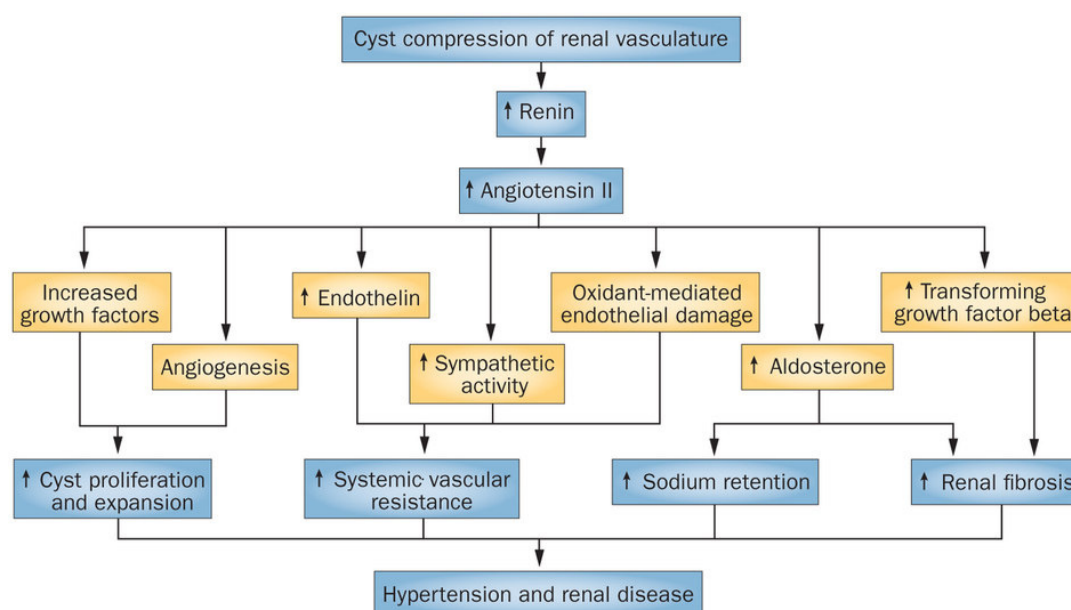


Figura 2: Ruolo eziopatogenetico del RAAS nell'ADPKD

L'aldosterone può determinare un danno a livello renale indipendentemente dai livelli di angiotensina II. Esso sembra avere un ruolo chiave nello sviluppo della fibrosi, nel rimodellamento tissutale e nell'aumentata espressione di molecole proinfiammatorie. È direttamente coinvolto nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sia attraverso la stimolazione della NADPH ossidasi sia attraverso la via mitocondriale. L'aumentata generazione di ROS causa apoptosi a livello delle cellule tubulari prossimali e induce un danno podocitario. Elevati livelli di aldosterone stimolano l'espressione di citochine proinfiammatorie, come l'osteopontina, la proteina 1 con azione

chemiotattica sui monociti (MCP-1) e l'interleuchina 6 e 1β (24). Più precisamente, attraverso la stimolazione dei recettori mineralcorticoidi, l'ormone induce la fosforilazione di Sgk1, che a sua volta fosforila e inattiva I κ B, con conseguente attivazione di NF κ B. NF κ B attiva la trascrizione di geni che codificano per citochine infiammatorie quali ICAM-1 e il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF). L'aldosterone sembra avere anche effetti proliferativi diretti, come dimostrato dall'attivazione delle "mitogen-activated protein kinases" (MAPKs), importanti mediatori di segnali di crescita e differenziazione cellulare, in ratti trattati con aldosterone e un'importante azione profibrotica (25).

3. Fibrosi renale nell'ADPKD

Nell'ADPKD l'espansione delle cisti e la perdita della funzione renale si associa allo sviluppo progressivo della fibrosi interstiziale. Sebbene in un gruppo ristretto di pazienti affetti da malattia renale policistica l'insorgenza precoce dell'ESRD è associata alla presenza della mutazione PKD1 localizzata in sede N-terminale (26), nella maggior parte dei casi non esiste un legame predittivo tra la progressione della malattia e la mutazione ad essa connessa (27). Così come avviene per la malattia renale cronica (CKD), anche nell'ADPKD il grado di fibrosi è stato identificato come la manifestazione più significativa e varia, associata ad un incremento del rate di progressione verso l'ESRD. Tuttavia, relativamente poco è noto circa i meccanismi alla base del processo di fibrosi che caratterizza la malattia renale policistica.

I dati attuali indicano che la fibrosi associata all'ADPKD è determinata sia da caratteristiche comuni ai processi fibrotici presenti nella malattia renale cronica quali l'iperspressione dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), del TGF β , le variazioni delle metalloproteinasi (MMP) e l'aumento del collagene interstiziale, sia da alcune caratteristiche uniche specifiche della malattia (28, 29).

I cambiamenti dell'epitelio precedono e guidano quelli dell'interstizio facendo supporre che il processo di fibrosi nell'ADPKD sia di tipo bifasico. La fibrosi interstiziale è probabilmente secondaria all'aumento delle cellule tubulari proliferanti o all'aumento dell'infiammazione interstiziale. Infatti, le alterazioni dell'epitelio cistico sono seguite da cambiamenti dei fibroblasti interstiziali e le reciproche interazioni tra questi differenti tipi cellulari determinano un accumulo di matrice extracellulare a livello dell'interstizio. I dati attuali suggeriscono che la

fibrosi associata all'ADPKD condivide alcuni dei meccanismi (classici) alla base dello sviluppo della fibrosi nella CKD (aumento del collagene interstiziale, cambiamento nelle MMP, iperespressione degli inibitori delle metalloproteinasi TIMP-1, iperespressione del PAI-1 e aumento del TGF β) ma che ci sono anche caratteristiche uniche e stadio-specifiche (30). I cambiamenti epiteliali appaiono precedere e guidare i cambiamenti a livello dell'interstizio arrivando alla conclusione che lo sviluppo della fibrosi nell'ADPKD è un processo bifasico con delle alterazioni nell'epitelio cistico seguite da cambiamenti a livello dei fibroblasti dell'interstizio e che le reciproche interazioni tra questi tipi di cellule conducono ad un progressivo accumulo della matrice extracellulare a livello del compartimento interstiziale. Una delle caratteristiche principali della fibrosi è la persistenza di un infiltrato infiammatorio, osservato nei reni ADPKD in associazione con le cisti in espansione. L'aumentata espressione del PAI-1 a livello dell'epitelio cistico può suggerire un aumento della risposta infiammatoria. Le alterazioni nella deposizione della matrice extracellulare pericistica a livello della membrana basale e dell'interstizio è stata documentata sia su modelli animali PKD che nell'uomo. I reni ADPKD in fase iniziale di malattia sono caratterizzati da una espansione proliferativa delle cellule epiteliali delle cisti, da un'alterata composizione della matrice extracellulare e dall'ispessimento della membrana basale. Nei reni ADPKD in fase terminale di malattia è presente, invece, un progressivo accumulo di cellule fibrogeniche (fibroblasti) e di fibrille di collagene. L'aumento globale del collagene di tipo I e di tipo III si localizza a livello interstiziale mentre il tipo IV a livello della membrana basale (31).

Lo sviluppo della fibrosi renale è caratterizzato da cambiamenti focali. E'

stato dimostrato negli zebrafish che le policistine possono direttamente regolare la produzione di collagene e che conseguentemente l'iperproduzione di collagene può dipendere dalla perdita di funzione delle policistine stesse. L'integrità e la quantità della matrice extracellulare è mantenuta almeno in parte dalla regolazione del turnover dell'ECM. Numerosi studi su modelli animali di ADPKD hanno dimostrato alterazioni sia nelle MMP che nelle TIMP. Hassane S. e Altri hanno dimostrato in modelli animali di PKD1 un aumento dei livelli di MMP-2 e MMP-14. I dati sul rimodellamento enzimatico della matrice e sui meccanismi inibitori sono vari. Rispetto ai controlli, i livelli sierici di MMP-1, MMP-9 e TIMP-1 risultano aumentati nei pazienti ADPKD. Un'analisi comparativa dei livelli di MMP-2, MMP-9, MMP-3, TIMP-1 e -2 e PAI-1 in sezioni di tessuto normale e di rene ADPKD in fase iniziale e in fase terminale di malattia hanno dimostrato un aumento dell'espressione di MMP nell'epitelio delle piccole cisti nei reni ADPKD in fase iniziale e nei fibroblasti interstiziali nei reni ADPKD in fase terminale. TIMP-1 risultava aumentato e localizzato nei fibroblasti interstiziali nei reni ADPKD in fase terminale, mentre l'aumento del PAI-1 si localizzava a livello dell'epitelio cistico (Fig. 3).

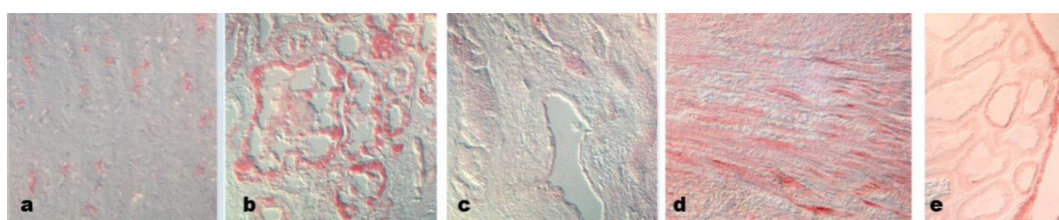


Figura 3. Immunoistochimica di MMP-2, TIMP-1 e PAI-1 nel rene ADPKD

- a. Espressione di MMP-2 nel rene adulto ADPKD (in rosso);
- b. ADPKD in fase iniziale di malattia con espressione di MMP-2 nell'epitelio cistico
- c. ADPKD in fase tardiva di malattia con espressione di MMP-2 nell'interstizio
- d. ADPKD in fase tardiva di malattia con espressione di TIMP-1 nei fibroblasti interstiziali;
- e. ADPKD in fase tardiva di malattia con espressione di PAI-1 nell'epitelio cistico

La dimostrazione dei frammenti di collagene di tipo I e III nelle urine di giovani ADPKD sottolinea l'importanza del rimodellamento extracellulare e può suggerire dei cambiamenti nelle proteasi specifici della malattia. Interessante è la presenza sia di una up-regolazione che di una down-regolazione di particolari frammenti che suggerisce una complessa interrelazione dell'accumulo di alcuni componenti della matrice e del turnover di altri (32).

Un numero di fattori di crescita implicati nel meccanismo dell'insorgenza della fibrosi risultano iperespressi nell'ADPKD. Il TGF β , la più importante citochina fibrogenica, è altamente espresso nell'epitelio cistico dei reni ADPKD (33). Il difetto primario dell'ADPKD è causato da alterazioni nello sviluppo e nella differenziazione dell'epitelio renale tubulare che determina una inappropriata e persistente proliferazione di queste cellule dopo la nascita con conseguente espansione cistica. Molti fattori possono influenzare la proliferazione cellulare epiteliale come la secrezione di fattori di crescita e l'accessibilità ai loro recettori funzionali così come alla composizione della membrana basale e della matrice extracellulare dalla quale gli epitelii cellulari ricevono specifici segnali. Segnali autocrini e paracrini generati dall'epitelio cistico proliferativo inducono verosimilmente risposte differenti e potenzialmente patologiche che possono avere effetti deleteri sull'epitelio cistico. La fibrosi si sviluppa secondariamente ai cambiamenti delle cisti suggerendo che se le alterazioni epiteliali sono corrette la fibrosi può essere evitata. Rispetto ai fibroblasti normali, i fibroblasti ADPKD sopprimono l'espressione della E-caderina, marker di differenziazione epiteliale e che nell'ADPKD risulta dalla N-caderina (34). Questi dati suggeriscono che la sola correzione del difetto epiteliale non può essere sufficiente a prevenire la fibrosi. Il ruolo della PC1 e PC2 a livello dei fibroblasti, l'effetto della funzione di

questi geni sulla funzione dei fibroblasti e se le mutazioni di per se conducono all'alterazione del fenotipo di fibroblasti o rendono i fibroblasti suscettibili a segnali profibrotici prodotti dalle cellule epiteliali rimane tutto ancora da chiarire.

Remuzzi et Al. hanno dimostrato che il volume tissutale “intermedio” identificato e quantificato mediante tomografia assiale computerizzata, corrispondente istologicamente ad aree di tubuli dilatati, microcisti e fibrosi interstiziale peritubulare (Fig. 4) (35).

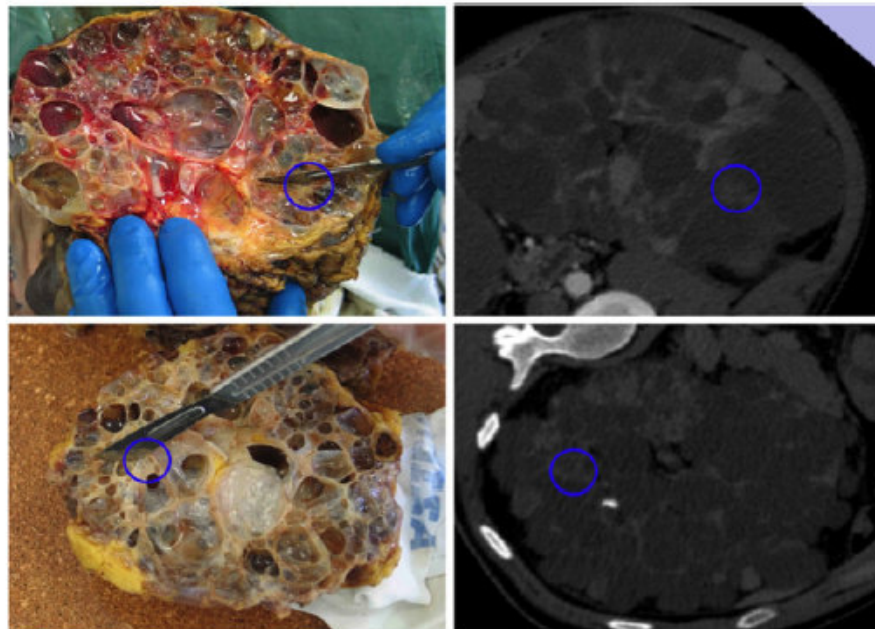


Figura 4. Reperto macroscopico di reni ADPKD sottoposti a ricostruzione 3D CT scans. I cerchi blue evidenziano le aree identificate come volume “intermedio” (destra) e corrispondente al reperto anatomico (sinistra).

La fibrosi interstiziale può derivare dall'ischemia corticale come suggerito dalla severità delle lesioni vascolari e dal restringimento del lume. La presenza di un marcato infiltrato di macrofagi a livello del tessuto fibrotico suggerisce che il danno tubulointerstiziale può essere una conseguenza del rilascio di

citochine/chemochine e fattori di crescita rilasciati dalle cellule infiammatorie, note per il loro contributo alla fibrosi interstiziale.

All'esame istologico un dato peculiare è la prominente deposizione di materiale fibrotico adiacente alle pareti delle piccole cisti e presente in maniera diffusa a livello dell'interstizio (Fig. 5). Come già evidenziato le cellule epiteliali delle cisti producono grandi quantità di proteine strutturali (collagene tipo I e III, laminina) e proteine solubili associate alla matrice extracellulare (TGF β , periostina) che si accumula intorno alle cisti.

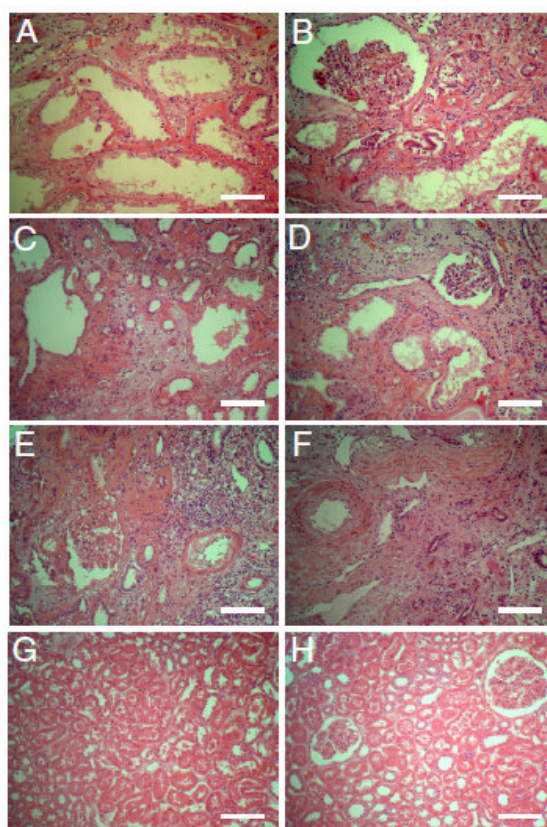


Figura 5. Immagini rappresentative dell'analisi morfologica effettuata su sezioni di tessuto renale in un paziente ADPKD (A-F) e in un paziente con una struttura renale normale (G e H). Scale bar 100 μ m.

Modelli animali e umani di ADPKD mostrano un'alterata espressione degli enzimi di degradazione della matrice e degli inibitori delle metalloproteinasi necessarie per il rimodellamento della matrice interstiziale extracellulare. L'anomala espressione dei fattori di crescita TGF β e PDGF dalle cellule epiteliali tubulari può stimolare la transizione da epitelio a mesenchima e, in ultimo, la generazione di fibroblasti a livello della parete delle cisti (36). La fibrosi presente a livello della parete delle cisti può anche essere indotta da una stimolazione meccanica delle cellule dovuta alla pressione idrostatica e allo sviluppo di strutture di parete organizzate in risposta ad un aumento della resistenza meccanica (37). L'atrofia tubulare e la fibrosi interstiziale conseguono allo sviluppo delle cisti anche nei pazienti ADPKD con funzione renale normale (38), suggerendo che la caratterizzazione e il monitoraggio di questo fenomeno potrebbero già avvenire nelle fasi iniziali di malattia. Studi cardine degli anni '60 sono stati i primi a documentare che il grado di fibrosi renale è il miglior reperto istologico che correla con il declino della funzione renale e con la prognosi a lungo termine (39, 40). La compressione da parte delle cisti in espansione sul parenchima tissutale residuo e lo stiramento dei microvasi renali con secondaria ipoperfusione suggeriscono un ruolo chiave nella distorsione della normale architettura del parenchima renale che sostiene eventualmente la progressiva perdita di funzione dell'organo.

4. MicroRNA e ADPKD

I microRNA (miRNA) sono molecole di RNA non codificante a singolo filamento, lunghi circa 22 nucleotidi, in grado di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale (41). Si localizzano in differenti regioni genomiche, tra cui introni di geni codificanti proteine, esoni ed introni di geni non codificanti, ed anche nelle regioni non tradotte al 3' di geni codificanti proteine (3' UTR). La biogenesi dei miRNA inizia a livello del nucleo dove viene trascritto un filamento di RNA primario, chiamato pri-miRNA, per mezzo delle RNA polimerasi II e III. Pri-miRNA viene a sua volta tagliato in un miRNA precursore, pre-miRNA, dal complesso microprocessore nucleare formato dall'enzima RNase III Drosha e dal suo cofattore Pasha noto anche come "Di George Syndrome Critical Region 8" (Fig. 6). Il pre-miRNA è caratterizzato da una struttura a forcina e viene esportato a livello citoplasmatico dal complesso Esportina 5 e Ran-GTP. Nel citoplasma, i pre-miRNA sono tagliati dal complesso formato dall'enzima RNase III Dicer e dal TAR RNA-binding protein (TRBP). Il taglio genera molecole di RNA a doppio filamento lunghe circa 22 basi, che interagiscono con le proteine Argonaute (Ago 2) e vengono incorporate in complessi di ribonucleoproteine effettrici dette RISC (RNA-induced silencing complex). Una volta che il miRISC è assemblato, il miRNA determina il silenziamento del mRNA target tramite la scissione del messaggero, la repressione della traduzione o la deadenilazione.

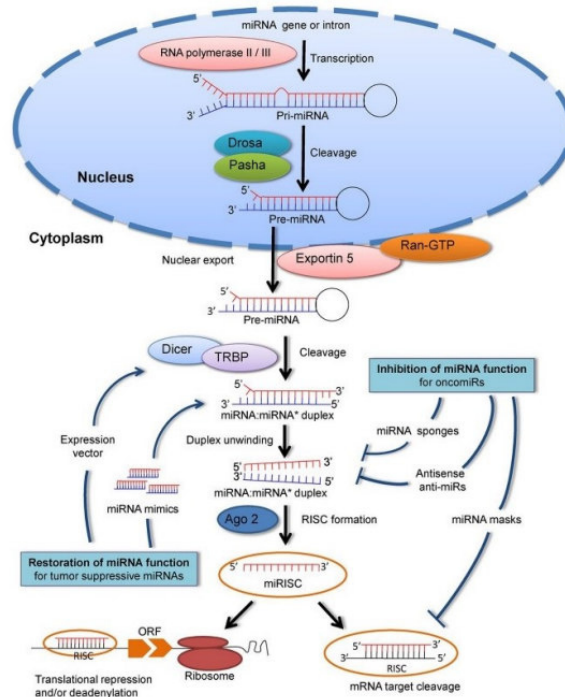


Figura 6. Biogenesi dei microRNA

I miRNA partecipano al controllo di molteplici processi biologici quali lo sviluppo embrionale, il controllo della crescita e il differenziamento cellulare, la regolazione di processi metabolici e l'apoptosi. I miRNA possono avere un effetto regolatore negativo o positivo, legando con complementarità parziale elementi regolatori del mRNA chiamati "seed sequence" collocati al 3'UTR, o a elementi specifici del mRNA chiamati MREs (miRNA response elements) causando la repressione della traduzione (42). Possono, inoltre, inibire l'interazione con i loro RNA bersaglio legando alcune classi proteiche come le RNA-binding proteins, e regolare l'espressione genica a livello trascrizionale legando direttamente elementi regolatori del DNA (43). A livello renale, i microRNA regolano la sopravvivenza cellulare, la proliferazione e l'apoptosi. È stato documentato come la delezione dell'enzima Dicer podocito-specifico determini la rottura del citoscheletro e le malattie glomerulari (44), un numero ridotto di cellule iuxtaglomerulari e una

riduzione dell'espressione genica della renina (Ren1 and Ren2) con conseguente anomalie della vascolatura renale e della fibrosi (45). Seppur ancora limitati gli studi che investigano il ruolo dei miRNA nell'eziopatogenesi dell'ADPKD, essi risultano implicati nel promuovere la crescita delle cisti e la fibrosi interstiziale attraverso la repressione dell'espressione dei geni PKD; nell'alterata proliferazione dell'epitelio cistico, dell'apoptosi e dell'autofagia; nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e nello sviluppo dell'infiammazione, con difetti nel metabolismo mitocondriale e nel citoscheletro (46) (Fig. 7).

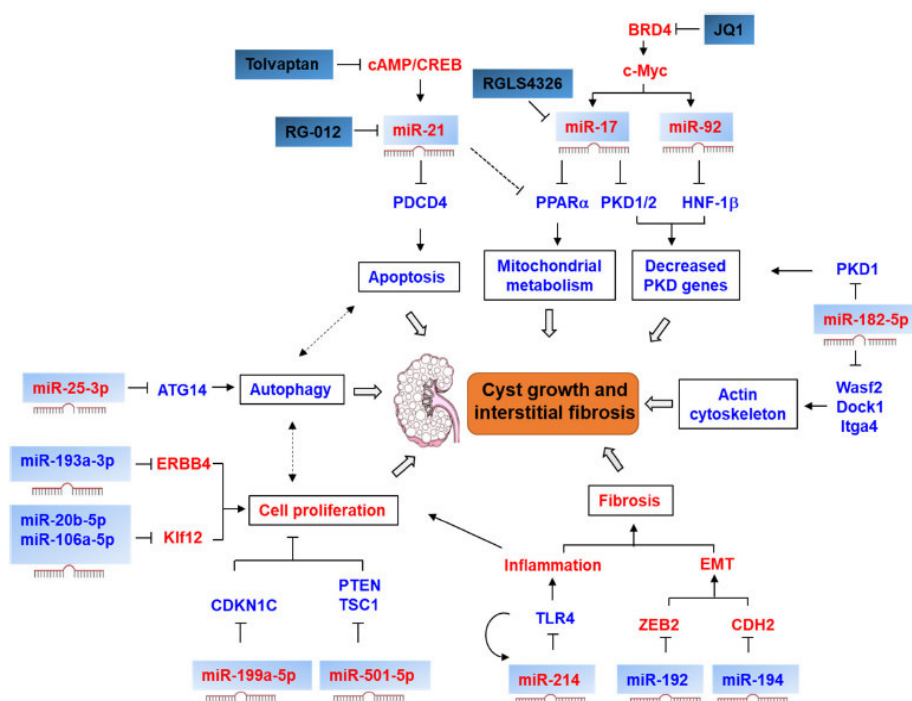


Figure 7. Pathway di segnali modulati dai miRNA nell'ADPKD

Studi recenti su modelli murini PKD e su tessuto cellulare ADPKD hanno documentato come la delezione del cluster miR-17~92 nei progenitori nefronici conduce a un'alterazione della proliferazione cellulare e della nefrogenesi (47).

L'espressione di miR-17 e miR-19 è attivata da cMyc, e l'up-regolazione di miR-17 risulta in un difetto del metabolismo mitocondriale. Inoltre, miR-17 reprime l'espressione di PKD1 e PKD2, mentre miR-92 reprime l'espressione di HNF-1b. MiR-21 risulta up-regolato attraverso il pathway di segnale AMPc/CREB, che reprime l'espressione di PDCD4 per l'apoptosi dell'epitelio cistico renale. Recentemente è stata documentata una significativa down-regolazione a livello renale di miR-192-5p, miR-194-5p, e membri della famiglia di miR-30 negli esosomi urinari di pazienti ADPKD, in modelli murini PKD e in colture cellulari cistiche rispetto al gruppo di controllo (48). Membri della famiglia miR-192 e miR-194 sono risultati ridotti nello sviluppo intermedio e tardivo della cistogenesi in modelli murini PKD. Questi due miRNA sono in grado di legare direttamente e sopprimere ZEB2 e CDH2 (i.e., N-cadherin), i quali sono strettamente connessi alla transizione epitelio-mesenchimale (49). L'iperespressione di miR-25-3p inibisce l'autofagia attraverso il target ATG14. L'iperespressione di miR-199a-5p e miR-501-5p promuove la proliferazione cellulare attraverso il target CDK1N1C, PTE e TSC1. L'iperespressione di miR-214 inibisce l'infiammazione attraverso TLR4. Mentre l'iperespressione di miR-182-5p riduce l'espressione di PKD1 e conduce ai difetti dell'actina citoscheletrica attraverso i target Wasf2, Dock1 e Itga4. La downregulation di miR-192 e miR-194 promuove la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) via ZEB2 e CDH2. MiR-193a-3p, down-regolato, promuove la proliferazione cellulare reprimendo l'espressione di ERB4. La down-regulation di miR-20b-5p and miR-106-5p aumenta la proliferazione cellulare reprimendo l'espressione di Kif12. L'analisi del profilo di miRNA in cellule urinarie di 20 pazienti ADPKD e 20 pazienti affetti da malattia renale cronica di altra eziopatogenesi ha rivelato un aumento dei livelli di miR-143, miR-223, miR-

199a e miR-199b, con la riduzione dei livelli di miR-133 e miR-1. Inoltre, miR-199a è risultato associato all'attivazione dei fibroblasti e alla fibrosi renale (50), ma il suo ruolo nel controllo della fibrosi renale nell'ADPKD risulta ancora inesplorato.

4.1 miR-17~92 e l'asse Wnt/ β catenina-cMyc-miR-17~92

Il cluster miR-17~92 svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo renale. Nell'ADPKD, risulta essere iperespresso e la sua delezione riduce la fibrosi interstiziale e la proliferazione dell'epitelio cistico. È un cluster oncogenico evolutivamente conservato che codifica per sei miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR20a, and miR-92a-1). La delezione di una regione del cromosoma 13 che include MIR17HG, codificante il cluster miR-17~92, causa la sindrome di Feingold di tipo 2 (51). La sindrome di Feingold di tipo 2 è autosomica dominante, ed è caratterizzata da anomalie delle dita di mani e piedi, perdita dell'udito, bassa statura, anomalie o del rene o del cuore. I topi con delezione nelle cellule germinali di miR-17~92 presentano mortalità perinatale con ipoplasia polmonare e difetto settale ventricolare, e un difetto maturativo della linea cellulare B (52). Modelli knock-out convenzionali per miR17~92 presentano un numero ridotto di nefroni in via di sviluppo, comparsa di albuminuria, perdita dei processi podocitari e glomerulosclerosi nei topi adulti (53).

È stato documentato che il cluster miR-17~92 risulta iperespresso a livello renale in numerosi modelli ortologhi PKD e in tessuto ADPKD, mediante la via di cMyc che si lega direttamente ai siti conservati di legame Myc che a sua volta lega il promoter del cluster miR-17~92 (54). L'oncogene cMyc, up-regolato, promuove lo sviluppo e la progressione delle cisti renali nei topi transgenici per cMyc. Questi risultati implicano un possibile ruolo dell'asse Wnt/ β -catenina-cMyc-miR-17~92 nella patogenesi dell'ADPKD (55) (Fig 8).

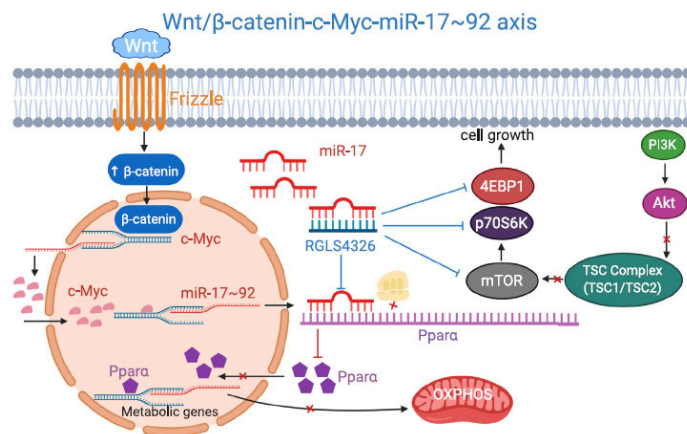


Figure 8. Asse Wnt/ β -catenina-cMyc-miR-17~92.

Nelle cellule renali cistiche, la β -catenina sfugge alla degradazione nello stato “Wnt signal-on”. La β -catenina citoplasmatica libera transloca nel nucleo e attiva la trascrizione del gene target incluso cMyc. La proteina cMyc transloca nel nucleo e si lega al promotore del cluster miR-17~92 determinandone la trascrizione. Nel citoplasma, miR-17 maturo lega l'RNA messaggero al Ppara (recettore α attivato dai proliferatori dei perossisomi), un fattore che regola l'espressione di geni chiave del metabolismo, che a sua volta riduce l'espressione

di Ppar α e quindi rallenta il metabolismo della fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS).

L'attività di mTOR è modulata da una serie di regolatori positivi e negativi, come il reclutamento di Akt attraverso la fosfoinositide 3-chinasi attiva (PI3K), che inibisce il complesso della sclerosi tuberosa (TSC1/TSC2), rimuovendo così successivamente l'effetto inibitorio del complesso TSC su mTOR ed eventualmente attivando mTOR.

L'overespressione transgenica rene-specifica di miR-17~92 promuove lo sviluppo di cisti renali. Modelli murini knockout PKD per miR-17~92 mostrano crescita delle cisti più lenta, funzionalità renale preservata, e inibizione della proliferazione cellulare con conseguente aumento della sopravvivenza. In aggiunta, anti-miR-17 diminuisce la crescita delle cisti in due modelli animali PKD, e riduce la crescita in vitro delle cisti in modelli umani PKD (Fig. 9).

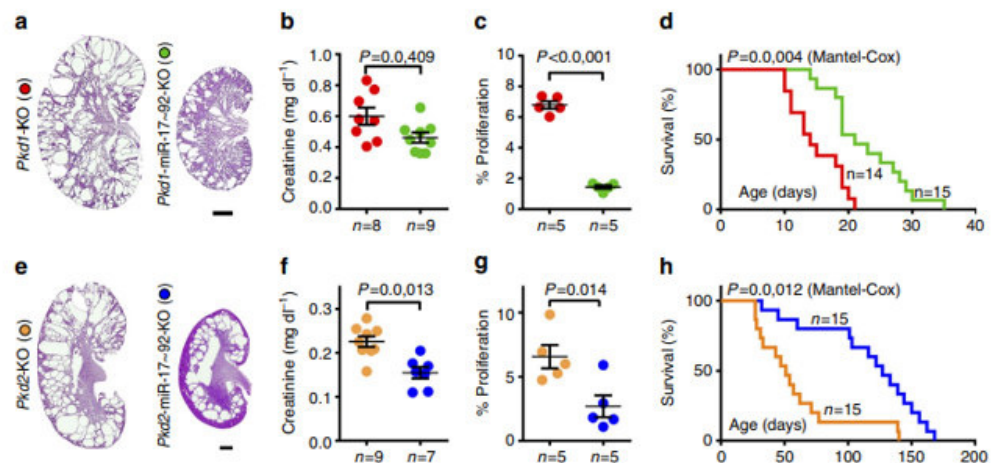


Figura 9. La delezione di miR17~92 attenua la crescita delle cisti in modelli murini PKD. (a) H&E staining (b) Livelli sierici di creatininae (c) quantificazione dell'epitelio cistico proliferante in reni di modelli murini Pkd1- miR17~92KO (d) Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier di Pkd1-KO (linea rossa) e Pkd1- miR17~92KO (linea verde) (e) H&E staining (f) Livelli sierici di creatininae (g) quantificazione dell'epitelio cistico proliferante in reni di modelli murini Pkd2-miR17~92KO (h) Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier di Pkd2-KO (linea arancione) e Pkd2-miR17~92KO (linea blu). Student's unpaired t-test (b,c,f,g) e Log rank (Mantel-Cox) test (d,h).

Analisi bioinformatiche hanno rivelato che l'mRNA al 3' UTR di PKD1 e di PKD2 contiene siti conservati di legame per miR-17, e l'mRNA di HNF-1b al 3' UTR contiene un sito di legame per miR-92. La trascrizione del fattore nucleare epatocitario fattore-1b (HNF-1 β) è codificato da HNF-1b che regola direttamente la trascrizione di PKD2 e PKHD1 (56). Il miR-17~92 iperespresso regola negativamente l'espressione dei geni PKD (PKD1, PKD2 e HNF-1b) per via post-trascrizionale. La severità della malattia risulta associata alla dose funzionale di PC1 che è suggerita dai risultati nei modelli murini ipomorfici PKD1 p.R3277C (57). Pertanto, il meccanismo potenziale con cui miR-17~92 promuoverebbe la crescita delle cisti potrebbe essere attraverso la riduzione dell'espressione dei geni PKD. Un recente studio ha ulteriormente identificato in miR-17 il primo miRNA patogeno nel promuovere la crescita delle cisti nella famiglia miR17~92 attraverso uno screening in vivo di anti-miRNA, targettando miR-17, miR-18, miR-19 o miR-25 separatamente (58). Il trattamento anti-miR-17 riduce il volume renale totale, l'indice cistico nei topi Pkd1^{flox/RC}:Ksp-Cre, un modello murino che porta un allele flox e un allele mutante R3277C del gene Pkd1, attraverso la regolazione del metabolismo mitocondriale, il pathway di segnale mTOR, e l'infiammazione. Inoltre, riduce l'espressione di marker di fibrosi quali ACTA2 (i.e., α -SMA) e CO1A1 (i.e., collagen I alpha 1) e inibisce l'espressione del PPAR α (recettore alfa attivato da proliferatori perossisomiali) con il legame al 3'UTR del suo mRNA. MiR-17 downregola l'espressione dei geni target di PPAR α nei reni cistici, inclusi Pparg, Ppargc1a, Sod2, Me, Oxct1, Pdk4, Etfa, Etfb, Etfdh, Cd36, Slc27a2, and Cpt2. PPAR α è il regolatore chiave della fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXOHOS) e della ossidazione degli acidi grassi (FAO), suggerendo che miR-17 promuove dunque la crescita delle

cisti deregolando il metabolismo mitocondriale nelle cellule epiteliali renali. Queste scoperte indicano, inoltre, che la disfunzione mitocondriale mediata dall'asse miR-17-PPAR α è una delle alterazioni che portano alla riprogrammazione a favore della proliferazione metabolica dell'epitelio delle cisti, in aggiunta all'alterato metabolismo glucidico e a quello disregolato lipidico e aminoacidico (59). Lee et al. hanno identificato l'antimir RGLS4326, uno short oligonucleotide a singolo filamento, chimicamente modificato, composto da nove nucleotidi, complementare alla sequenza di origine di miR-17 (60). La sicurezza di RGLS4326 è supportata dal fatto che nelle scimmie non è stata osservata alcuna tossicità emopoietica o renale. RGLS4326 presenta una distribuzione renale, preferenzialmente a livello dei tubuli prossimali e dei dotti collettori dei reni cistici di modelli murini PKD. Il trattamento con RGLS4326 sopprime la crescita delle cisti in vitro nei modelli umani ADPKD, e rallenta la crescita delle cisti nei topi condizionati knockout per Pkd2 (Pkd2^{flox/flox}; Pkhd1-Cre), così come nei topi Pcy/CD1 e Pcy/DBA i quali sviluppano la malattia renale policistica con le mutazioni in NPHP3 (nefronoftisi 3) e sono usati come modelli murini per il trattamento a lungo termine. Rimuovendo miR-17 dalle frazioni del polisoma trascrizionalmente attive, RGLS4326 deprime l'espressione dei geni target di miR-17, inclusi PKD1 e PKD2. Il trattamento con RGLS4326 normalizza il pathway disregolato del metabolismo e inibisce i pathway pro-proliferativi nei reni cistici. Risultando sicuro, stabile ed efficace, è attualmente in corso un trial clinico in fase 1b per valutare gli effetti, la sicurezza, la tollerabilità, la farmacocinetica e la farmacodinamica di RGLS4326 nei pazienti affetti da ADPKD (ClinicalTrials.gov identifier NCT04536688).

4.2 miR-21 e l'asse AMPc-CREB-miR-21-PDC4

MiR-21 è espresso come un miRNA oncogenico evolutivamente conservato, espresso in molti organi, come cuore, polmoni e rene. miR-21 è attivato nelle neoplasie maligne solide ed ematologiche, il che promuove la tumorigenesi regolando la proliferazione cellulare tumorale e l'apoptosi (61). È stato riportato anche che miR-21 inibisce l'apoptosi, e promuove l'infiammazione e la fibrosi renale (62). Sebbene miR-21 non risulti essere essenziale nella nefrogenesi, gioca un ruolo nella rigenerazione tissutale dopo il danno attraverso indirettamente promuovendo la proliferazione cellulare e inibendo l'apoptosi (63). Se elevato in maniera persistente, promuove la fibrosi renale attraverso la modulazione di diversi pathways metabolici (64). Risulta interessante come numerosi pathway di segnali cellulari che sono risultati implicati nell'ADPKD modulino o risultino essere modulati da miR-21 inclusi JAK/STAT, AMPc-CREB, MAPK-ERK, e TGF β -Smad (65). L'up-regolazione aberrante di miR-21 è stata osservata in modelli preclinici di PKD, nei quali è stata dimostrata una correlazione tra malattia cistica ed espressione di miR-21. MiR-21 è risultato iperespresso anche nei tubuli renali dei pazienti ADPKD (66). Nonostante l'iperpressione isolata di miR-21 non sia sufficiente a produrre cisti renali, miR-21 è risultato iperespresso nei reni cistici di topi condizionati knockout Pkd1 (Pkd1^{flox/flox}:Pkhd1-Cre mice), nei topi condizionati knockout Pkd2 (Pkd2^{flox/flox}:Pkhd1-Cre mice), nei topi condizionati knockout per HNF1B (Hnf-1 β ^{flox/flox}:Pkhd1-Cre mice), e nei reni umani ADPKD (Fig. 10).

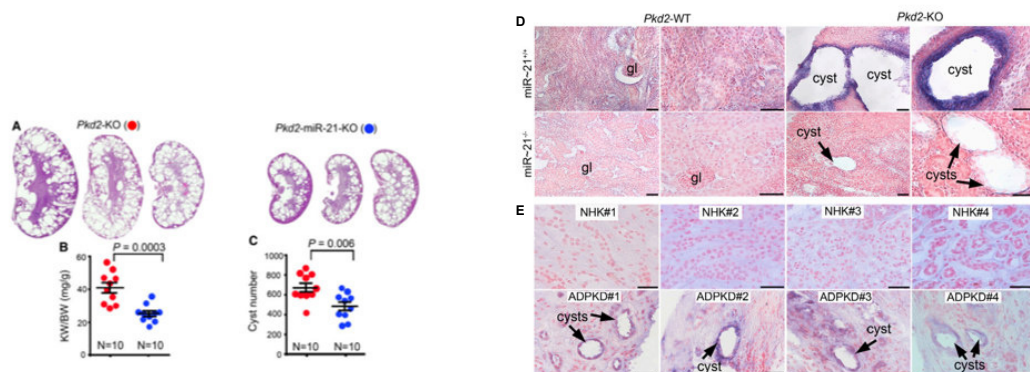


Figura 10. La delezione di miR-21 attenua la crescita cellulare in modelli ortologhi di ADPKD. (a) H&E staining di reni di tre differenti modelli murini PKD2-KO e PKD2-miR-21-KO (b) KidneyWeight/BodyWeight e (c) numero di cisti modelli murini PKD2-KO (rosso) e PKD2-miR-21-KO (blu) (d) ISH di reni di modelli murini wild-type, Pkd2-KO, miR-212/2, e Pkd2-miR-21-KO. L'espressione di miR-21 (blu) risulta aumentata nelle cisti dei topi Pkd2-KO rispetto al WT. MiR-21 risulta assente nei tubuli renali dei topi miR-212/2 e delle cisti renali dei topi Pkd2-miR-21-KO. (E) ISH su 4 campioni di tessuto renale normale (NHK#1– NHK#4) e ADPKD (ADPKD#1–ADPKD#4)

MiR-21 può essere attivato dal pathway AMPc/CREB, un ben noto driver per la crescita delle cisti, mentre nel cancro e nella fibrosi è comunemente regolato dal pathway TGF- β /SMAD. La delezione di miR-21 attenua la crescita delle cisti nei modelli murini PKD attraverso l'induzione dell'apoptosi nelle cellule epiteliali delle cisti. È stato riportato che Smac-mimetic riduce la crescita cistica in topi condizionati knockout Pkd1 (Pkd1^{flox/flox}; Pkhd1-Cre mice), inducendo solamente l'apoptosi delle cellule epiteliali cistiche, definendola una possibile strategia terapeutica nell' ADPKD (67). A livello renale sono espressi diversi inibitori dell'apoptosi (IAPs), inclusi Jag1, Pten, Spry, e Cdc25a, che risultano essere target di miR-21. Inoltre, il gene soppressore tumorale PDCD4 (programmed cell death) è stato identificato come nuovo target di miR-21

nell'ADPKD. La delezione di PDCD4 fa sviluppare spontaneamente le cisti renali nei topi PDCD4^{-/-}. Pertanto, l'espressione deregolata di miR-21 promuove la crescita delle cisti attraverso l'asse di segnale AMPc/CREB-miR-21-PDCD4, ed è divenuto un nuovo possibile target farmacologico nell'ADPKD (Fig. 11) (68).

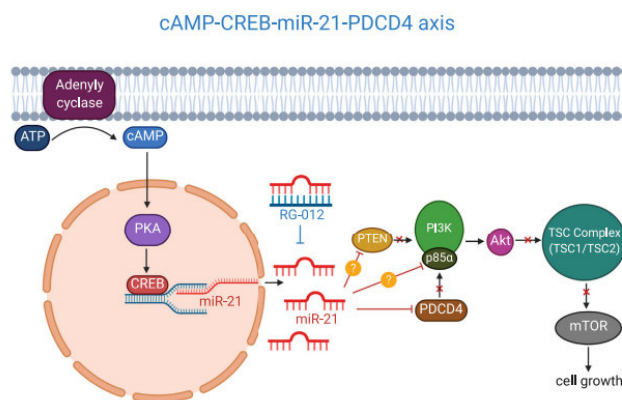


Figura 11. L'asse AMPc-CREB-miR-21-PDCD4

Nelle cellule renali cistiche, l'aumento della proteina CREB attraverso l'attivazione della PKA ha attività pleiotropiche. Il gene miR-21 è identificato come target di questa proteina, per la quale il sito di legame è all'interno del promotore prossimale, determinando così la trascrizione di miR-21. In quanto oncogene, miR-21 ha dimostrato di avere come bersaglio geni molteplici nel pathway mTOR per indurre la crescita delle cellule tumorali, incluso PTEN, PDCD4, e p85 α . Tuttavia, nelle cellule renali cistiche, risulta chiaro solo il ruolo di PDCD4. PTEN è una proteina con effetto regolatore negativo del pathway PTEN/PI3K/Akt/mTOR, mentre PDCD4 inattiva PI3K/Akt per regolare la crescita cellulare. P85 α è una subunità enzimatica regolatoria che può agire

negativamente su PI3K, inibendo l'attivazione di PI3K/Akt. RG-012 è un oligonucleotide chimicamente modificato che lega e inibisce la funzione di miR-21 ed è attualmente impiegato in un trial clinico in fase 2 per il trattamento della Sindrome di Alport. La dimostrazione che miR-21 inibisce l'apoptosi dell'epitelio cistico, verosimilmente attraverso la repressione del gene target PDCD4, rende RG-012 un possibile approccio terapeutico per l'ADPKD.

4.3 miR-199a-5p e il target CDKN1C/p57

MiR-199a-5p regola la cancerogenesi, la fibrosi, l'ipertrofia cardiaca e l'angiogenesi, e risulta iperespresso nei tessuti ADPKD (69) (Fig. 11). MiR-199a-5p reprime l'espressione di CDKN1C/p57 che è un regolatore negativo della proliferazione cellulare. L'inibizione di miR-199a-5p riduce la proliferazione cellulare e aumenta l'apoptosi dell'epitelio cistico targettando CDKN1C/p57. MiR-199a-5p è risultato iperespresso in linee cellulari cistiche (OX161), rispetto ad altre linee cellulari renali. L'inibitore miR-199a-5p sopprime la proliferazione di OX161, suggerendo il ruolo di miR-199a-5p nella proliferazione dell'epitelio cistico (Fig. 12, 13). La down-regulation di miR-199a-5p aumenta l'espressione genica di CDKN1C/p57, fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare, e cellule deficitarie per questo gene presentano un alto rate di crescita cellulare e ridotta differenziazione.

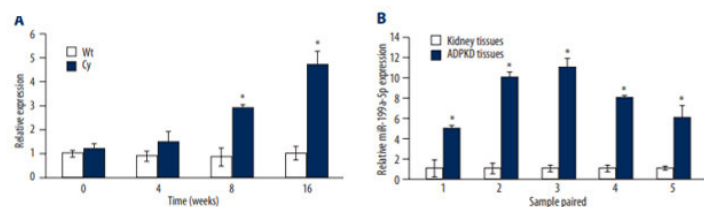


Figura 12. Iperespressione di miR-199a-5p in modelli animali (A) e tessuto di pazienti ADPKD (B)

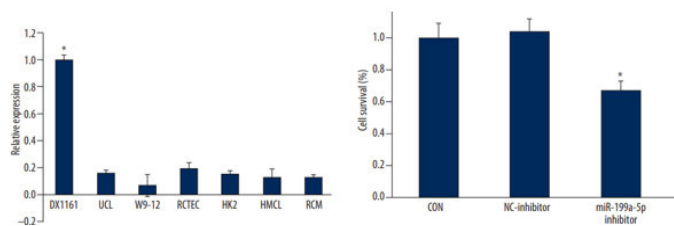


Figura 13. Espressione di miR-199a-5p in 7 tipi cellulari renali. L'inibitore miR-199a-5p inibisce significativamente la proliferazione cellulare di ox161.

5. Marker di progressione della malattia nell'ADPKD

Negli ultimi anni, la miglior comprensione dei meccanismi eziopatogenetici alla base della cistogenesi ha condotto ad un proliferare della ricerca clinica basata sull'impiego di nuove molecole. In considerazione di ciò è fondamentale stabilire misure di outcome comuni in grado di quantificare l'effetto terapeutico nel corso della malattia. Diversi sono gli studi che hanno dimostrato come la secrezione di fluidi e la proliferazione cellulare siano i meccanismi alla base dello sviluppo delle cisti e come la cistogenesi sia strettamente correlata all'aumento di volume delle cisti renali, e come quest'ultimo rifletta la progressione della malattia (70). Lo studio CRISP (Consortium for Radiologic Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease) (Fig. 14) (71), condotto su 241 pazienti ADPKD con funzione renale normale sottoposti a valutazione seriata mediante risonanza magnetica e (RM) e clearance plasmatica dello ioexolo, ha dimostrato che il volume renale totale (TKV) e il volume delle cisti (TCV) aumentano esponenzialmente con l'età e che l'RM può riprodurre fedelmente questi cambiamenti. La relazione tra il TKV e il GFR è risultata maggiore durante gli ultimi stadi della malattia, quando l'effetto compensatorio dell'iperfiltrazione glomerulare è già stato compromesso.

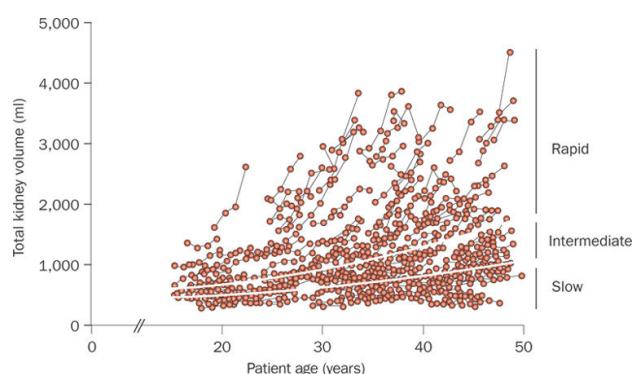


Figura 14. Valore prognostico del TKV sulla base dei risultati dello studio CRISP

Dallo studio è emerso che il volume renale totale corretto per l'altezza (hATKV) e determinato mediante metodo stereologico, è risultato essere associato più frequentemente alla comparsa di complicanze (ipertensione arteriosa, macroematuria e proteinuria) ed è in grado di predire il rischio di declino della funzione renale, qualificando l'hATKV come marker di progressione di malattia. (72, 73). In un sottogruppo di 201 pazienti dello studio CRISP seguiti per 8 anni, la correlazione tra hATKV e il GFR aumentava da -0.22 (valore basale) a -0.65 dopo 8 anni (74). Valori basali più elevati di hATKV permettono di predire lo sviluppo di insufficienza renale allo stadio 3 KDOQI entro 8 anni (odds ratio per 100 ml/min, 1.48; 95%, 1.29-1.70) (75). Questa associazione si è dimostrata maggiore rispetto ad altri fattori di rischio quali l'età, i livelli di creatinina sierica, l'albuminuria o la chemochina MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), e indipendente dal genotipo, dal sesso, dalla razza e dall'età. Nonostante l'associazione tra TKV e funzione renale sia stata dimostrata anche in altri studi (76, 77, 78), un rapporto causale diretto tra il TKV e il TCV e la progressione verso l'ESRD non è stata documentata. I cambiamenti nel volume non cistico, che dovrebbe essere razionalmente connesso al declino del GFR, non risultano necessariamente e direttamente dipendenti dai cambiamenti nel TKV e nel TCV.

Dall'analisi dei dati di 590 pazienti ADPKD della Mayo Clinic Translational PKD center, sottoposti a valutazione RM/TC e a tre o più valutazioni del eGFR per un follow-up di almeno 6 mesi, è stata realizzata una classificazione che stratifica i pazienti in cinque classi di rischio differenti. I pazienti sono stati classificati "radiologicamente" come tipici (classe 1, n=538) e atipici (classe 2, n= 52), dove "tipico" significa caratterizzato da una distribuzione delle cisti bilaterale e diffusa che coinvolge entrambi i reni, con un sovvertimento

del parenchima renale di grado moderato o severo, dove tutte le cisti contribuiscono al TKV. I pazienti con malattia “atipica” sono quelli che non soddisfano i criteri per la forma “tipica” e rappresentano circa il 5-10% di tutti gli ADPKD. Questa classificazione (dalla classe 1A alla classe 1E) è stata realizzata sulla base dei valori dell’hATKV e dell’età e permette di predire i differenti rate di declino della funzione renale (Fig. 15) (79).

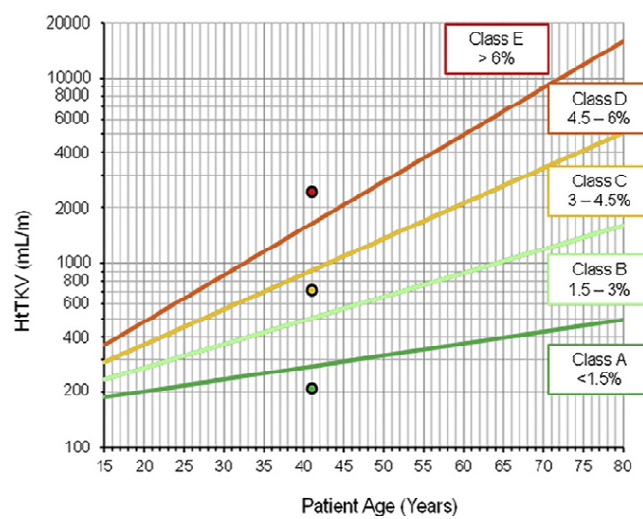


Figura 15. Classificazione Mayo per predire il rischio di progressione di malattia nell’ADPKD

Ponendo a confronto le sottoclassi 1E e 1A la possibilità di raggiungere l’ESRD in 10 anni varia notevolmente (66.9% vs 2.4%). Questa classificazione permette di stimare l’età alla quale il paziente svilupperà l’ESRD e di identificare gli individui a più elevato rischio di progressione di malattia, idonei al trattamento terapeutico, rispetto a quelli a lenta progressione per i quali una terapia può essere

controindicata, quando i dati anamnestici sul rate di progressione di malattia possono mancare.

La qualità e l'ampiezza di questi studi varia considerevolmente e l'evidenza dimostrata necessita di essere interpretata e valutata in maniera consensuale. In considerazione del fatto che l'incremento del volume renale abitualmente precede lo sviluppo di insufficienza renale di quattro decadi o più, il valore prognostico del TKV è stato oggetto di particolare interesse.

Recentemente, attraverso l'uso della tomografia assiale computerizzata (TC) e di sistemi d'imaging avanzati, è stato identificato e quantificato nel rene ADPKD un'area di tessuto renale definito "intermedio", corrispondente a regioni di fibrosi interstiziale e che risulta essere strettamente connesso al GFR e al suo declino nel lungo termine (80). Cambiamenti nella quota di parenchima renale non cistico, che possono essere inizialmente e strettamente connessi al declino del GFR nell'ADPKD, non sono necessariamente e direttamente dipendenti dal volume renale totale o dal volume cistico.

6. Volume renale totale nei trial clinici

Prima dell'“era tolvaptan”, non esistevano terapie in grado di rallentare la progressione dell'ADPKD verso l'ESRD. La gestione della malattia si basava solo sulla terapia sintomatica, allo scopo di ridurre la morbidità e la mortalità associati alle manifestazioni cliniche dell'ADPKD. Lo studio TEMPO 3:4 (81) basato sull'uso del Tolvaptan, antagonista recettoriale V2 della vasopressina, ha dimostrato di rallentare il rate di crescita del TKV (end-point primario) del 49%,

da 5.5 a 2.8% per anno, e il rate di perdita dell'eGFR (end-point secondario) del 26%, da 3.70 a 2.72 mL/min/1.73 m² per anno nel periodo di osservazione di 3 anni. 1445 pazienti ADPKD sono stati randomizzati a ricevere placebo o una dose refratta di 45 mg di Tolvaptan al mattino e 15 mg nel pomeriggio, fino al raggiungimento di un dosaggio massimo di 90 mg/die se ben tollerati. La durata del trial è stata di 3 anni, durata tipica di trial basati sull'effetto renoprotettivo di nuove terapie mediche. Sulla base dei risultati ottenuti, l'uso del Tolvaptan (Jinarc®) per il trattamento dell'ADPKD è stato approvato in Giappone, Canada e in Europa. Negli Stati Uniti la Food and Drug Administration (FDA) ha richiesto nel 2014 ulteriori dati in grado di dimostrare sia l'efficacia che la sicurezza del farmaco.

Tradizionalmente, l'endpoint primario nei trials clinici che si basano sull'effetto renoprotettivo di un farmaco è rappresentato dall'incidenza dell'ESRD o dal raddoppio della creatinina sierica che correla col 57% della riduzione nel eGFR. Come già sopra descritto, l'ADPKD è una malattia a lenta evoluzione. In una popolazione come quella dello studio TEMPO 3:4, basato su pazienti ADPKD in fase iniziale di malattia (eGFR $\geq$ 60 mL/min), non è possibile aspettarsi che si raggiunga l'endpoint primario con un tempo di durata del trial clinico relativamente breve.

Numerosi studi clinici hanno provato a identificare dei markers in grado di predire la progressione verso l'ESRD nella malattia renale policistica. Il più importante marker fino ad oggi considerato è stato il TKV. Mentre l'eGFR rimane stabile nelle fasi iniziali di malattia, il TKV aumenta precocemente fin dalla giovane età. È stato dimostrato, come sopra descritto, che i cambiamenti nel TKV predicono i cambiamenti nel eGFR, e che sia i cambiamenti nel TKV nel tempo e

sia il TKV basale sono in grado di predire il rate di perdita di funzione renale. Nonostante la mancanza di una chiara associazione tra il TKV e il declino della funzione renale in gruppi di pazienti, esiste una significativa variabilità interindividuale, e la funzione renale rimane il parametro più rilevante per stabilire la severità della malattia e la prognosi.

Nonostante siano ancora numerosi gli studi già conclusi e altri ancora “ongoing” che usano il TKV come endpoint primario per dimostrare l’efficacia terapeutica di un farmaco, il ruolo del TKV come markers di progressione di malattia e di efficacia terapeutica rimane ancora dibattuto e non ancora universalmente accettato. Dati da studi clinici randomizzati basati sull’uso dell’inibitore del mTOR, degli analoghi della somatostatina e inibitori del RAAS (82, 83) hanno dimostrato che la relazione tra le cisti e la perdita di funzione renale non sia lineare, suggerendo che due outcome non sono sempre connessi. Diversi sono i fattori che possono spiegare questa discordanza, incluso il disegno del trial stesso (popolazione eterogenea, stadio tardivo di malattia renale, relativamente piccolo sample size e durata del trial breve) o dosi subottimali dei farmaci. Un contributo ulteriore può dipendere dal meccanismo di azione di queste molecole. Grantham e Altri hanno sottolineato l’importanza di utilizzare il eGFR per stadi avanzati di malattia con endpoint mirati che permettano di stabilire gli effetti antinfiammatori, antiangiogenici e antifibrotici. Mentre rispetto ai trial basati sull’impiego di farmaci che hanno come target la proliferazione cellulare e/o la secrezione di fluido nei pazienti ADPKD in fase iniziale di malattia, il cambiamento nel TKV rimane l’endpoint di scelta (84).

Sebbene sia intuitivo considerare che esista un legame tra il progressivo aumento del numero e di volume delle cisti e la perdita di funzione renale, la

relazione non è lineare, così come dimostrato dalla grande diversità nel TKV e nel TCV rispetto ai singoli eGFR. Inoltre, la capacità dimostrata di rallentare la crescita renale in assenza di un effetto stabilizzatore sul declino del GFR nei pazienti ADPKD sottoposti a trattamento con everolimus evidenzia ulteriormente i limiti dei cambiamenti del TKV come marker surrogato di perdita di funzione renale. La perdita della funzione renale nei pazienti ADPKD rimane insidiosa, poiché come già spiegato, può rimanere inosservata per diverse decadi.

7. Scopo dello studio

Analizzare microRNA specifici coinvolti nei pathway di segnale chiave dell'ADPKD e nello sviluppo della fibrosi, valutando il loro potenziale ruolo come predittori di perdita di funzione renale e correlare i dati alla presenza di tessuto fibrotico renale.

8. Materiali e Metodi

8.1 Tipo di studio

Abbiamo eseguito uno studio longitudinale prospettico su una popolazione di pazienti ADPKD afferenti all'Ambulatorio dedicato alla malattia renale policistica autosomica dominante, presso l'Unità di Nefrologia del Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione dell'Ospedale Universitario "Policlinico Umberto I", Sapienza Università di Roma. Il periodo di follow-up è stato di 24 mesi.

8.2 Popolazione di studio

Abbiamo arruolato 32 pazienti ADPKD con diverso grado di funzione renale. L'eGFR (ml/min/1.73 m^2) è stato valutato a T0 (62.4 ± 21.6) e T1 (49.45 ± 19.28) (24 mesi). L'ADPKD è stato definito secondo i criteri unificati di Pei-Ravine (Fig. 16) (85, 86). Il filtrato glomerulare è stato valutato secondo la formula CKD-EPI. I pz ADPKD sono stati suddivisi in due gruppi: Rapida

progressione di malattia (15, RP) e Non rapida progressione malattia (17, NRP), secondo i criteri della Mayo Clinic classification (79).

ETA'	CRITERIO
15-29 aa	≥ 3 cisti uni- o bilateralmente
30-39 aa	≥ 3 cisti uni- o bilateralmente
40-59 aa	≥ 2 cisti in ciascun rene

Figura 16. Criteri ultrasonografici unificati Pei-Ravine per la diagnosi di ADPKD in pazienti con storia familiare positiva per malattia policistica autosomica dominante

Sono stati arruolati pazienti sia normotesi che ipertesi. Lo stato di ipertensione arteriosa è stato definito dall'uso di farmaci ipotensivi (ACEis, ARBs, beta-bloccanti, calcio antagonisti, alfa-litici e/o diuretici) o dalla presenza di una pressione superiore a 140/90 mmHg in tre controlli consecutivi.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti ADPKD con $eGFR \leq 30 \text{ ml/min/1.73 m}^2$; pazienti precedentemente sottoposti a chirurgia renale o procedure di drenaggio delle cisti o che presentavano altre patologie potenzialmente in grado di influenzare la funzione renale; donne in stato di gravidanza; pazienti in terapia farmacologica con tolvaptan; pazienti con storia clinica di neoplasie nei 5 anni precedenti.

8.3 Esami clinici

8.3.1 Valutazioni antropometriche

L'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato ponendo al numeratore il peso espresso in Kg e al denominatore l'altezza espressa in metri quadri. Il "range" di normalità è stato fissato tra 18,5 e 24,99 Kg/m².

8.3.2 Misurazione della pressione arteriosa

La pressione arteriosa è stata misurata, con uno sfigmomanometro standard e con un bracciale adatto alla circonferenza del braccio, all'arto superiore destro e sinistro, a paziente seduto da almeno cinque minuti, per tre volte consecutive, a distanza di 3 minuti l'una dall'altra, secondo le linee guida British Hypertension Society (87). I livelli di pressione arteriosa sistolica e diastolica sono stati presi come punti di comparsa e scomparsa dei toni di Korotkoff, rispettivamente. L'ipertensione è stata definita come PAS > 140 mmHg e PAD > 90 mmHg per misurazioni ripetute.

8.4 Esami ematochimici ed urinari

È stato eseguito un prelievo a digiuno da almeno 12 ore per il dosaggio dei livelli ematici di creatinina (mg/dL), urea (mg/dL), sodio (mEq/L), potassio (mEq/L), acido urico (mg/dL), calcio (mg/dL), fosforo (mg/dL), GOT (U/L), GPT

(U/L), gamma GT (U/L), bilirubina totale e diretta (mg/dl), colesterolo totale (mg/dL), HDL (mg/dL), trigliceridi (mg/dL), glucosio (mg/dl), insulina (μ U/ml), albumina (g/dL), omocisteina (mmol/L), proteina C-reattiva (CRP) (mcg/L), fibrinogeno (mg/dL), ferritina (ng/ml), linfociti e neutrofili (cell/mL) con calcolo del relativo rapporto neutrofili/linfociti. Il paratormone intatto iPTH (pg/mL) è stato misurato utilizzando una tecnica immunometrica, e la 25OH-VIT D (ng/mL) mediante dosaggio radioimmunologico.

È stato inoltre eseguito un esame delle urine semplice, il dosaggio dell'osmolarità urinaria (mOsm/kg), della microalbuminuria (mg/24h) e della proteinuria (g/24h) nel campione delle urine delle 24h.

L'insulino resistenza è stata valutata utilizzando il modello di valutazione dell'omeostasi (HOMA-IR) originariamente descritto da Mathew et al. (88). Il calcolo è stato effettuato secondo la seguente formula (Fig. 17):

$$\text{HOMA - IR (mmol/L} \times \mu\text{U/ml)} = \text{glicemia a digiuno (mmol/L)} \times \text{insulina a digiuno (}\mu\text{U/ml)} / 22.5$$

Figura 17. Homeostatic model assessment (HOMA)

8.5 Dosaggio MicroRNA

È stato eseguito un prelievo di campione di plasma a T0 per la valutazione quantitativa di h-miR17-5p, h-miR21-5p e h-miR199a-5p mediante metodica qRT-PCR con saggio singolo miRNA-specifico (miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)). H-miR16-5p è stato utilizzato come normalizzatore.

Partendo da aliquote del plasma congelato, l'RNA totale (inclusa la frazione di microRNA) è stato estratto utilizzando Qiagen miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore (supplementary protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit) e con utilizzo di oligonucleotidi sintetici cel-miR-39, come spike-in. 10ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) secondo le istruzioni del produttore a cui fa seguito la reazione di pre-Amplificazione (stesso kit) che consente una amplificazione uniforme di tutti i miRNA prima della quantizzazione attraverso Real-Time PCR. Per la qPCR i campioni pre-Amplificati, diluiti 1/5, vengono preparati utilizzando TaqMan ADV MIRNA ASSY (sonde miRNA) e TaqMan Fast Advance MMIX (entrambi Applied Biosystems) come da istruzioni del produttore.

La quantificazione relativa è stata effettuata tramite il metodo del 2-ddCT normalizzando i dati rispetto a miR16-5p come controllo endogeno ed utilizzando il campione NT3 (non a rapida progressione) come calibratore.

8.6 Risonanza Magnetica

La risonanza magnetica (RM) è stata effettuata tramite magnete 3T (Discovery MR 750, 3T, GE Healthcare), previo posizionamento di bobina superficiale a 32 canali. Il protocollo di acquisizione ha incluso sequenze morfologiche single shot T2-pesate (SSFS) (TR 850 ms; TE 105 ms; Flip Angle 90°; FoV 320x320; Matrice 320x224) acquisite sui piani assiale, sagittale e coronale e sequenze Gradient Echo (GRE) T1 pesate (TR 5 ms; TE 1ms; Flip Angle 15°; FoV 420x420; Matrice 288x192).

Per la valutazione della perfusione parenchimale sono state utilizzate sequenze ultraveloci GRE T1-pesate, acquisite sul piano coronale (TR 2 mS; TE 1 mS; Flip Angle 13°; Thickness 200 mm; FoV 300 x 300 mm; Matrice 192 x 138) durante somministrazione dinamica e.v. di contrasto (Gadobutrolo 1 mmol/ml, Gadovist, Bayern), utilizzando una tecnica perfusionale ad alta risoluzione temporale di 4 secondi per una durata complessiva di circa 8 minuti. La partenza della sequenza dinamica è stata fatta coincidere con l'inizio della somministrazione di mdc e.v.

Analisi delle immagini: Valutazione morfologica

Nelle immagini morfologiche HASTE T2 e 3D GRE T1 pesate sono stati valutati i seguenti parametri:

- dimensione dei reni sui 3 piani di acquisizione (assiale sagittale e coronale)

- spessore corticale
- differenziazione cortico-midollare
- volume delle cisti

Nelle sequenze 3D GRE T1 pesata sono state valutate le caratteristiche morfologiche e l'intensità di segnale (SI) relativa alla presenza o meno di un alto contenuto proteico, permettendo l'identificazione di cisti a contenuto emorragico, cisti infette e cisti degenerate.

Analisi delle immagini: Valutazione qualitativa e quantitativa

La tecnica di perfusione è stata valutata in 21 pazienti ADPKD sia con approccio qualitativo che quantitativo. Nel primo caso sono stati ottenuti due tipi di mappe colorimetriche, ricostruite sia in una fase precoce che in una fase tardiva. La mappa colorimetrica elaborata nella fase precoce, rispecchia un enhancement di tipo arterioso ricavato dall'analisi delle prime fasi, che identificano le zone di parenchima normalmente perfuso e che possono essere definite "funzionali". La mappa colorimetrica elaborata in fase tardiva mostra il potenziamento di focali aree di parenchima renale che in alcuni casi identifica aree di fibrosi parenchimale. In alcuni casi può essere attribuita alla fisiologica concentrazione del mezzo di contrasto. Le mappe colorimetriche rappresentano, inoltre, la base anatomica per la contornazione del profilo renale e la conseguente ricostruzione tridimensionale 3D (Volume Rendering ottenuto con software GE, Workstation vers. 4,6) allo scopo di evidenziare la quota di parenchima renale perfuso, definito "volume perfusionale". Tale risultato è stato ottenuto utilizzando

la mappa colorimetrica derivata dalle acquisizioni in fase precoce che corrisponde a circa 35 secondi dall'inizio dell'iniezione del m.d.c., e dalle mappe colorimetriche ottenute in fase tardiva che corrisponde a circa 8 minuti dall'inizio dell'iniezione del m.d.c.; quest'ultima ha reso possibile la valutazione della stima della fibrosi parenchimale, definita "volume fibrotico".

8.7 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante software SPSS® Statistics versione 20.0 per Windows® (IBM Corporation, New Orchard Road Armonk, New York, Stati Uniti). La normalità delle variabili è stata testata usando il metodo Shapiro-Wilk per le distribuzioni normali. Le variabili normali continue sono state espresse come media $\pm$ la deviazione standard di tutte; le variabili categoriche sono state espresse in percentuale. Il test t di Student è stato utilizzato per determinare la differenza tra i gruppi ed il test binomiale o Chi-quadrato per la comparazione dei dati categorici. Le correlazioni bivariate ed il grado di associazione tra le variabili sono state ottenute con il test di Pearson. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

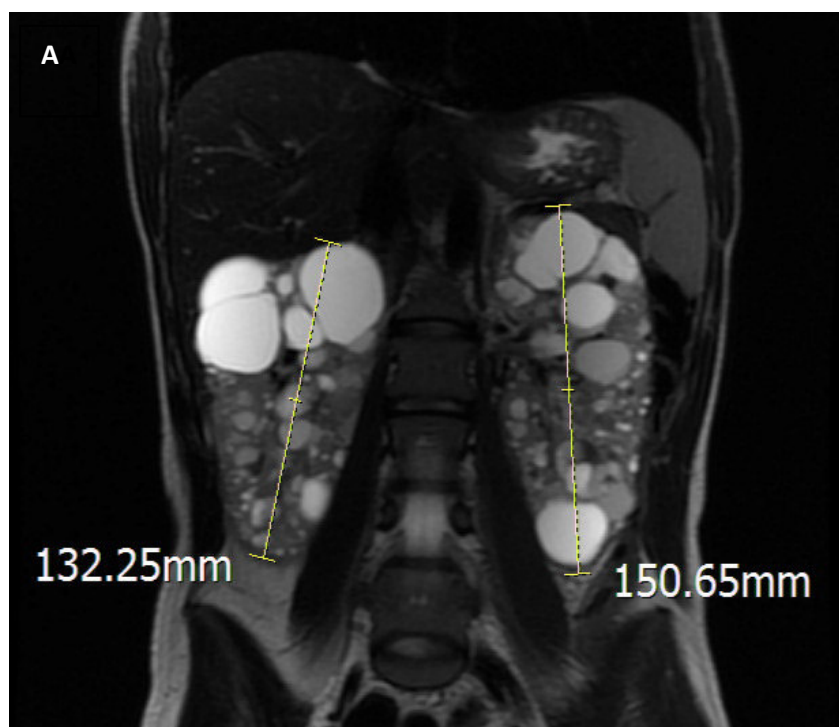
9. Risultati

La Tabella 1 mostra le caratteristiche individuali dei pazienti ADPKD inclusi nello studio divisi in due gruppi: rapida progressione di malattia (RP) e non rapida progressione di malattia (NRP). I risultati sono riportati in media $\pm$ DS.

	RP	NRP	P value
Età	43,7 $\pm$ 8,51	48,65 $\pm$ 10,77	n.s.
M:F	10:5	6:11	<0.03
PA	15 (100%)	17 (100%)	n.s.
ACEi/ARBs	12 (80%)	17 (100%)	n.s.
eGFR CKD-EPI T0 (ml/min/1.73 m ²)	55 $\pm$ 16	67,2 $\pm$ 25,6	n.s.
slope eGFR (mL/min/1.73 m ² /anno)	6,1 $\pm$ 2,8	3,87 $\pm$ 1,53	<0.008
Dati RM			
TKV tot (cm ³)	2016,9 $\pm$ 761,92	1101,42 $\pm$ 416,18	<0.0002
hATKV (cm ³ /m)	1205,75 $\pm$ 404,97	631,72 $\pm$ 229,96	<0.0001
TFV tot (cm ³)	357,78 $\pm$ 175,64	380,58 $\pm$ 387,89	n.s.
hATFV (cm ³ /m)	203,40 $\pm$ 102,03	215,19 $\pm$ 206,73	n.s.

Tabella 1. Dati relativi ai pazienti ADPKD inclusi nello studio divisi in due gruppi: RP (rapida progressione di malattia) e NRP (non rapida progressione di malattia). Risultati riportati in media $\pm$ DS, analizzati con t-test di Student e Chi-quadrato

La valutazione RM dei diametri renali in coronale, assiale e sagittale ha permesso di calcolare l'hATKV e classificare ciascun paziente secondo la classe di rischio di progressione di malattia della classificazione Mayo (<http://www.mayo.edu/research/documents/pkd-center-adpkd-classification/doc>) (79). I pazienti ADPKD a rapida progressione di malattia (RP) hanno mostrato come atteso valori di TKV tot (cm³) e hATKV (cm³/m) maggiore rispetto ai pazienti a non rapida progressione di malattia (NRP) (rispettivamente $p<0.0002$ e $p<0.0001$). Lo slope del eGFR è risultato maggiore nei pazienti ADPKD a rapida progressione di malattia ($p<0.0008$).



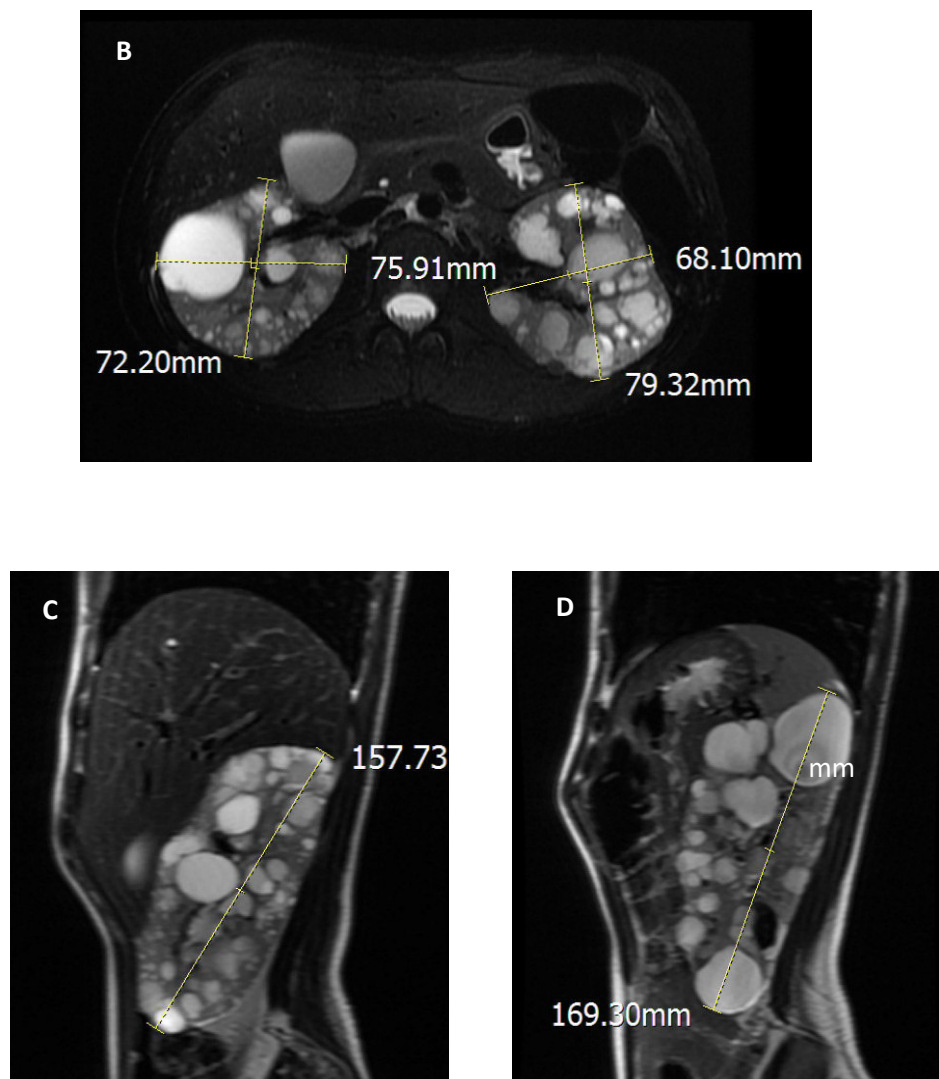
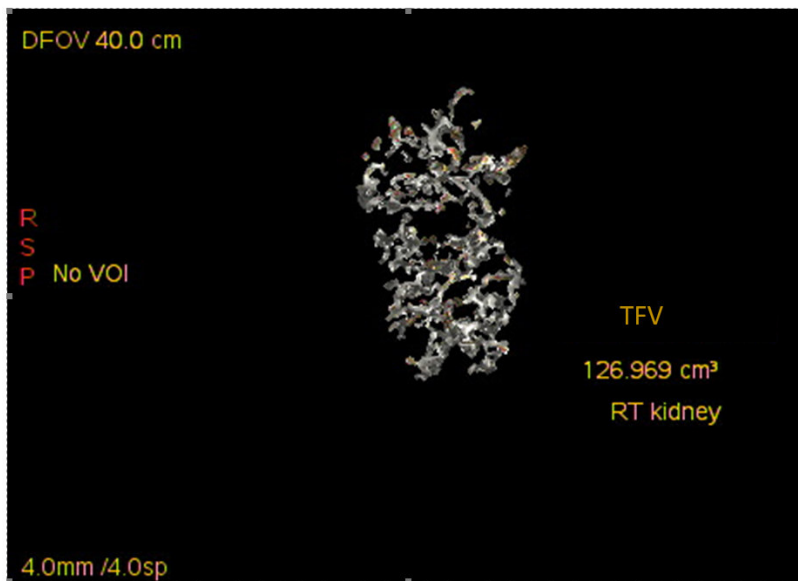
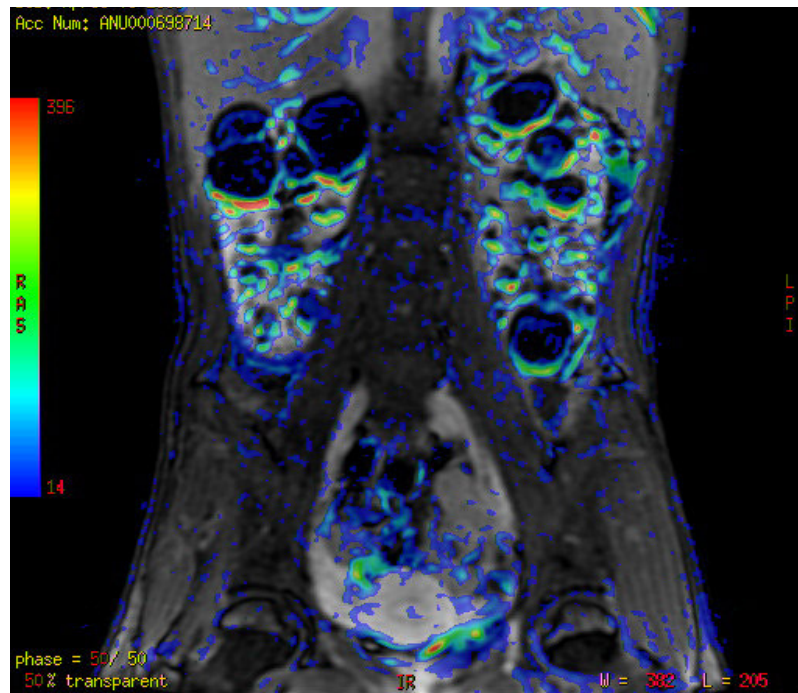


Figura 18. (A-D). Pattern RM 3 Tesla. Sequenza HASTE T2 pesata in sezione assiale, coronale e sagittale in paziente ADPKD, donna, 30 anni, eGFR (CKD-EPI) 98 ml/min, hATKV 527.1 cm³, Classe MAYO 3

Dalle mappe colorimetriche ottenute in fase precoce e in fase tardiva la valutazione della quota di fibrosi parenchimale, definita come “volume fibrotico” TFV tot (cm³) e del volume fibrotico corretto per l’altezza hATFV (cm³/m) è risultata non statisticamente significativa nei pazienti ADPKD a RP rispetto a NRP (rispettivamente TFV tot (cm³) 357,78±175,64 e 380,58±387,89) (hATFV (cm³/m) 203,40±102 e 215,19±206,73).



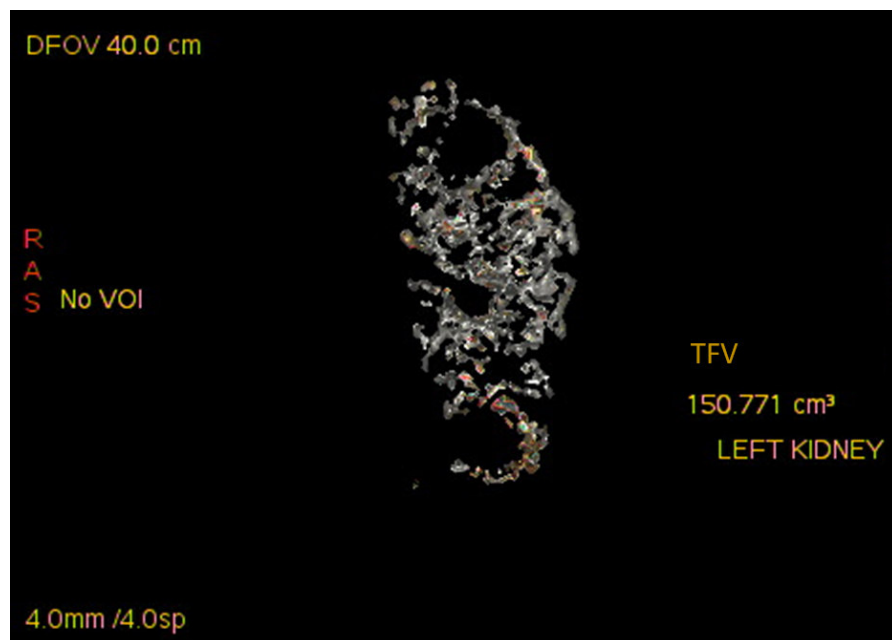


Figura 19. Pattern RM 3 Tesla. Mappa colorimetrica Late Enhancement e ricostruzione 3D del volume fibrotico del rene destro (126.969 cm^3) e sinistro (150.771 cm^3) in paziente ADPKD, donna, 30 anni. eGFR (CKD-EPI) 98 ml/min .

Il TFV tot (cm^3) e l'hATFV (cm^3/m) hanno mostrato una correlazione significativa con l'eGFR Slope ($\text{mL/min/1.73 m}^2/\text{anno}$) (rispettivamente $r=0.32$ e $r=0.36$, $p<0.05$). Nessuna correlazione è risultata tra i volumi fibrotici, i volumi renali totali analizzati e l'eGFR sia a T0 che T1.

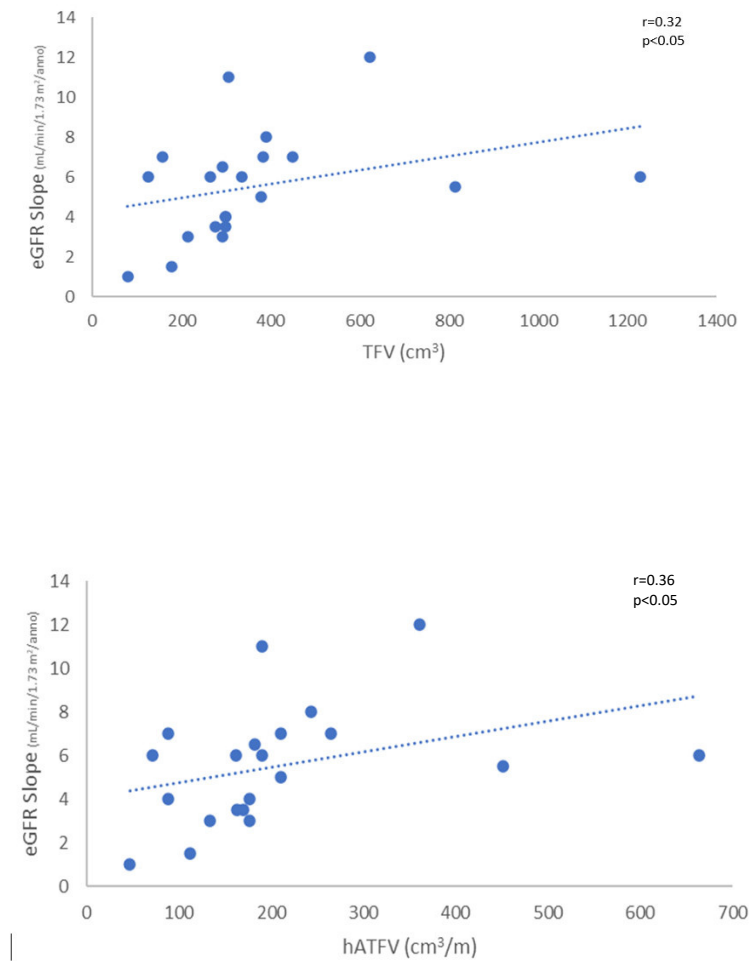


Figura 20. Analisi di correlazione tra TFV tot (cm³) e l'hATFV (cm³/m) e l'eGFR Slope (mL/min/1.73 m²/anno)

I microRNA analizzati sono risultati correlati tra loro ($r=0.51$ per h-miR-17-5p e h-miR-21-5p; $r=0.43$ per h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p; $r=0.31$ per h-miR-17-5p e h-miR-199a-5p, $p<0.05$).

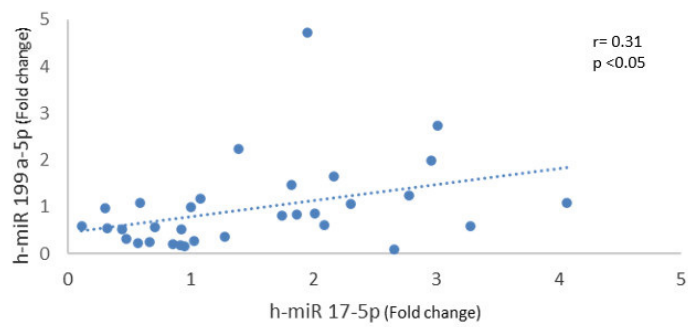
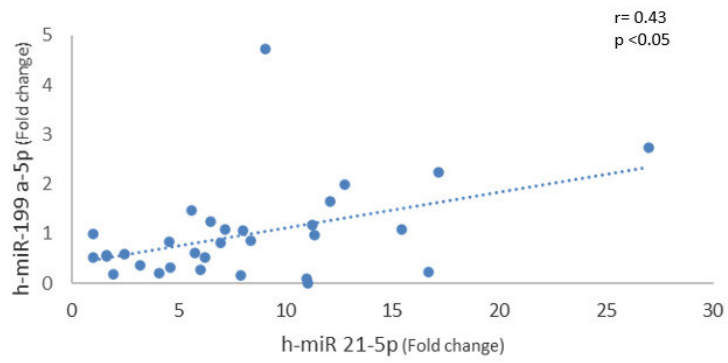
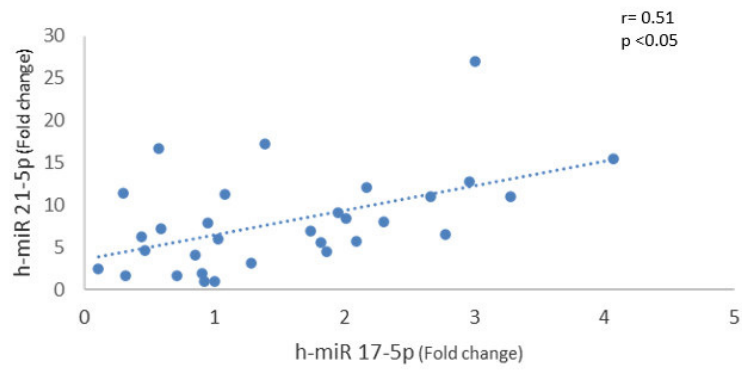


Figura 21. Correlazione tra i miRNA analizzati ($r=0.51$ per h-miR-17-5p e h-miR-21-5p; $r=0.43$ per h-miR21-5p e h-miR-199a-5p; $r=0.31$ per h-miR-17-5p e h-miR-199a-5p, $p<0.05$) (Spearman test).

H-miR-17-5p è risultato maggiormente espresso nei pazienti ADPKD a rapida progressione di malattia.

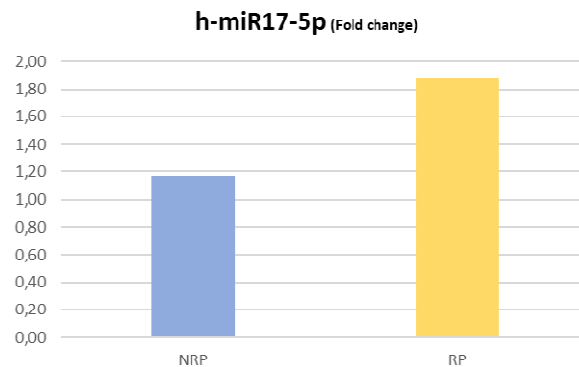


Figura 22. Espressione di h-miR-17-5p nei pazienti ADPKD a RP (rapida progressione di malattia) e NRP (non rapida progressione di malattia) (RP 1,88±1,04; NRP 1,17±0,87 p<0.05). Risultati riportati in media ±DS, Test Chi-quadrato.

Non è risultata una differenza statisticamente significativa valutando l'espressione dei miRNA analizzati relativi ai pazienti ADPKD inclusi nello studio divisi per sesso (Tab. 2).

	M (n=15)	F (n=17)	P value
h-miR-17-5p (Fold change)	1,49±0,85	1,52±1,15	n.s.
h-miR- 21-5p (Fold change)	7,29±4,47	8,33±6,78	n.s.
h-miR -199a-5p (Fold change)	1,08±1,19	0,86±0,64	n.s.

Tabella 2. Espressione dei miRNA analizzati relativi ai pazienti ADPKD inclusi nello studio divisi per sesso. Risultati riportati in media $\pm$ DS, analizzati con t-test di Student

H-miR-17-5p, h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p hanno mostrato una correlazione positiva e significativa con l'eGFR Slope (mL/min/1.73 m²/anno) (rispettivamente $r=0.34$, $r=0.41$, $r=0.37$, $p<0.05$). Nessuna correlazione è risultata tra i miRNA analizzata e l'eGFR sia a T0 che T1.

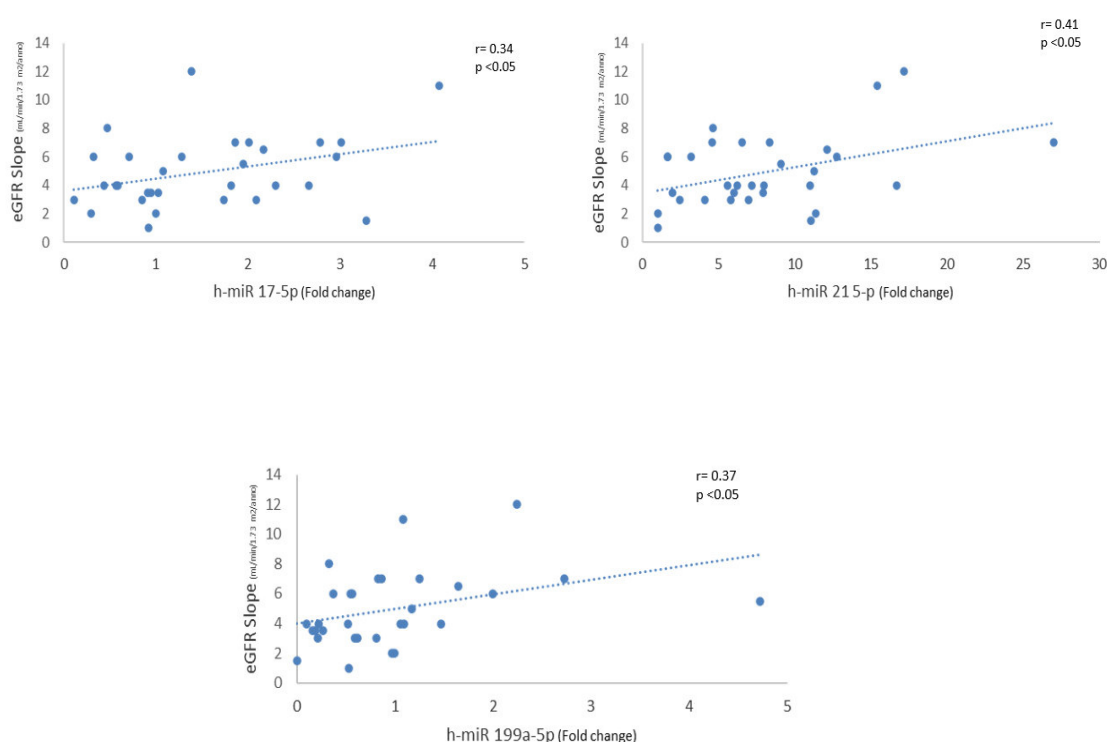


Figura 23. Analisi di correlazione tra h-miR-17-5p, h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p e l'eGFR Slope (mL/min/1.73 m²/anno)

Sia h-miR-21-5p che h-miR-199a-5p, riconosciuti fibroMir, sono risultati correlati sia al volume fibrotico totale (TFV cm³) sia al volume fibrotico totale corretto per l'altezza (hATFV cm³/m). Come mostrato nella figura 17, sono risultati positivamente e significativamente correlati a h-miR-21-5p sia il volume

fibrotico totale (TFV cm^3) ($r=0.38$, $p<0.05$) sia il volume fibrotico totale corretto per l'altezza (hATFV cm^3/m) ($r=0.40$, $p<0.05$) ma non il TKV (cm^3) e l'hATKV (cm^3/m).

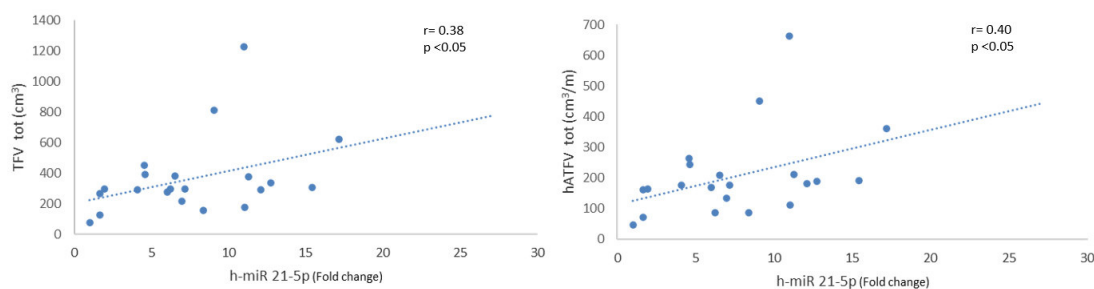


Figura 24. Correlazione tra h-miR-21-5p e volume fibrotico totale (TFV cm^3) e volume fibrotico totale corretto per l'altezza (hATFV cm^3/m)

Sono risultati correlati a h-miR-199a-5p sia il volume fibrotico totale (TFV cm^3) ($r=0.34$, $p<0.05$) sia il volume fibrotico totale corretto per l'altezza (hATFV cm^3/m) ($r=0.36$, $p<0.05$) ma non il TKV (cm^3) e l'hATKV (cm^3/m).

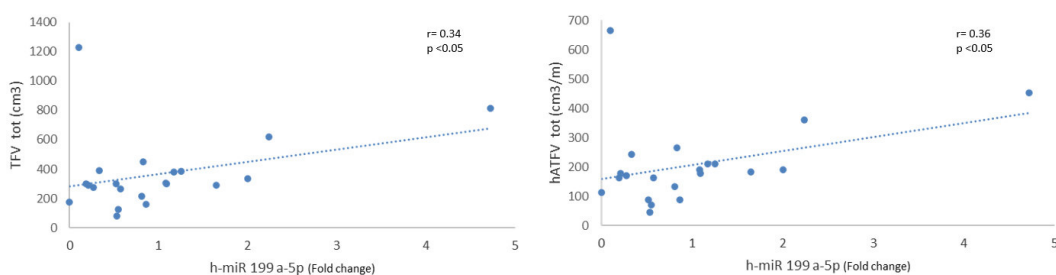


Figura 25. Correlazione tra h-miR-199 a-5p e volume fibrotico totale (TFV cm^3) e volume fibrotico totale corretto per l'altezza (hATFV cm^3/m)

L'analisi delle correlazioni tra h-miR-17-5p, TFV tot (cm^3) e hATFV (cm^3/m) non è risultata essere statisticamente significativa.

10. DISCUSSIONE

I miRNA circolanti possono rappresentare il “*biomarker* ideale” poiché variano poco nella popolazione generale e sono ottenibili in modo non invasivo. Si possono estrarre dalle cellule, dai tessuti e dai fluidi corporei e sono presenti nel siero umano in forma stabile. Tutte queste caratteristiche li rendono dei potenziali biomarcatori in molteplici condizioni fisio-patologiche, in particolare per malattie come l’ADPKD. Da un lato la perdita di funzione del complesso PC1-PC2 che determina un aumento dei livelli intracellulari di AMPc, che causa la disregolazione di pathway di segnale quali cMyc, mTOR e l’asse AMPc/CREB e dall’altro l’alterata vascolatura renale che determina attivazione del SRAA, ischemia, infiammazione interstiziale e fibrosi hanno portato a voler analizzare miRNA specifici quali h-miR1-7-5p poiché legato all’asse Wnt/ β -catenin-cMyc, e due ben definiti miRNA profibrotici, miR-21-5p e miR-199a-5p, la cui espressione è consistentemente elevata durante la fibrogenesi. Sebbene l’espressione aberrante dei miRNA esercita un ruolo patogenetico causale nella maggior parte se non in tutte le malattie complesse, la loro implicazione nell’ADPKD è ancora limitatamente documentata. Ad oggi, la maggior parte degli studi hanno focalizzato i loro sforzi sulla comprensione dei meccanismi molecolari che conducono all’iniziazione dell’ADPKD ma i dati sul ruolo dei miRNA coinvolti nella patogenesi e nella fibrinogenesi risultano ancora limitati. Il nostro studio è il primo a valutare h-miR-17-5p, h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p a livello circolante nel paziente affetto da malattia policistica autosomica dominante. Sia nei trial clinici che nella pratica clinica è noto come l’ADPKD risulti essere una malattia di difficile gestione, mancando di marker

universalmente accettati. Essendo una patologia caratterizzata da un'elevata variabilità fenotipica sia intra- che interfamiliare indipendentemente dalla mutazione sottostante, con una funzione renale che risulta preservata finché almeno il 50% del parenchima renale non viene distrutto, non esistono biomarcatori in grado di definire il livello di danno renale esistente e di predire la progressione della malattia. Il fenotipo renale nell'ADPKD può variare da pazienti con età avanzata e funzione renale conservata a rari casi di reni ADPKD già presenti in utero e la mutazione del gene sottostante può spiegare questo fenomeno solo in parte. Studi condotti su gemelli ADPKD e sulle cause di variabilità inter- e intrafamiliare suggeriscono che altri fattori genetici contribuiscono sostanzialmente alla severità della malattia (89).

Nonostante sia stato documentato che il TKV sia in grado di predire la perdita di funzione renale, la loro correlazione risulta essere non lineare e causale se non negli ultimi stadi della malattia renale cronica e il suo ruolo come marcatore di progressione di malattia e di efficacia terapeutica rimane ancora dibattuto e non universalmente accettato. Dai dati ottenuti dal nostro studio il TKV e l'hATKV sono risultati maggiori nei pazienti ADPKD a rapida progressione di malattia, tuttavia, non sono risultati correlati né all'eGFR né allo slope dell'eGFR a differenza del TFV e del hATFV che, nonostante i numeri limitati, sono risultati correlati entrambi allo slope dell'eGFR. I miRNA analizzati, h-miR-17-5p, h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p sono risultati positivamente correlati alla perdita annuale del filtrato glomerulare e non all'eGFR. Inoltre, h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p, noti "fibromiR" sono risultati correlati sia al volume fibrotico totale sia al volume fibrotico totale corretto per l'altezza. Questi risultati sono particolarmente rilevanti sia perché identificano il

rischio di progressione di malattia al tempo T del paziente ADPKD a fronte di un filtrato glomerulare che può risultare normale sia perché possono essere una guida nell'approccio clinico-terapeutico nel paziente a rischio di rapida progressione di malattia e quindi meritevole di terapia farmacologica. I risultati ottenuti sembrano confermare l'ipotesi di una correlazione tra h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p e il livello tissutale di fibrosi renale, danno che inizia già in fase iniziale di malattia quando la funzione renale risulta ancora preservata e che conduce progressivamente alla perdita irreversibile del parenchima residuo funzionante. Inoltre, pazienti ADPKD con rapida progressione di malattia hanno mostrato valori più elevati di h-miR-17-5p e la maggior espressione di h-miR-17-5p, h-miR-21-5p e h-miR-199a-5p sono risultati correlati a una peggiore sopravvivenza renale. La migliore comprensione del ruolo dei miRNA analizzati può condurre ad una migliore comprensione dell'eziopatogenesi dell'ADPKD e allo sviluppo di terapie mirate. Considerando il verosimile ruolo di h-miR-17-5p nelle principali vie di segnale coinvolte nella malattia policistica e i dati già osservati circa il ruolo di miR-21-5p nelle altre patologie renali fibrotiche quali il rigetto cronico o la nefropatia diabetica, risultano entrambi essere giocatori chiave nella proliferazione cellulare e nella fibrosi renale, indipendentemente dalla malattia renale sottostante. Sebbene la disregolazione di h-miR-17-5p e h-miR-21-5p non risulta essere specifica dell'ADPKD, questi risultati possono aprire nuove promettenti opzioni diagnostiche e terapeutiche per una patologia per la quale ancora non esiste una terapia definitiva. L'uso di antagonisti di questi miRNA potrebbe dimostrarsi una valida opzione terapeutica. Inoltre, RGLS4326 si è già dimostrato un potenziale farmaco per il trattamento dell'ADPKD, sicuro, stabile ed efficace nel rallentare la crescita delle cisti nei modelli murini PKD. Ed è

attualmente in corso un trial clinico in fase 1b per valutare la sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica e farmacodinamica dell'impiego di questo antiMIR17 in 19 pazienti ADPKD (ClinicalTrials.gov identifier NCT04536688).

Ad oggi la caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base dell'espressione aberrante dei microRNA risulta necessaria sia per una migliore comprensione della malattia sia per la possibile identificazione di nuovi bersagli terapeutici.

Ci sono delle limitazioni da considerare nell'interpretazione dei risultati ottenuti. I dati presentati riguardano un numero ridotto di pazienti e vanno quindi considerati come dati generatori di ipotesi, che necessitano di essere confermati da ulteriori studi clinici. Ad oggi il dosaggio dei microRNA risulta avere costi elevati e la tecnica utilizzata per quantificare il volume fibrotico è "time consuming", e può essere valutato limitatamente a centri specializzati con tecniche d'imaging avanzate.

11. CONCLUSIONI

I microRNA analizzati sono risultati associati alla fibrosi e alla sopravvivenza renale, confermando il loro possibile ruolo come biomarcatori, in grado di identificare pazienti ADPKD ad alto rischio di progressione di malattia indipendentemente dal grado di funzione renale e quindi idonei ad una terapia medica, rappresentando un target terapeutico volto all'utilizzo di antimir e definendo nuovi possibili meccanismi molecolari alla base della cistogenesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007;369:1287–1301.
2. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, et al: Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2143–2160.
3. Torres VE, Harris PC.: Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Jan;25(1):18-32.
4. Fain PR et al. Modifier genes play a significant role in the phenotypic expression of PKD1. *Kidney Int*. 2005, 67, 1256–1267.
5. Hopp K et al. Functional polycystin-1 dosage govern: autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J. Clin. Invest*. 2012, 122, 4257–4273.
6. Cornec-Le Gall E et al. Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2013, 24, 1006–1013.
7. Rowe I, Boletta A.: Defective metabolism in polycystic kidney disease: potential for therapy and open questions. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Aug;29(8):1480-6.
8. Wallace DP Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochimica et biophysica acta* 2011 Oct;1812(10):1291-300.
9. Carsten Bergmann, Lisa M. Guay-Woodford, Peter C. Harris, Shigeo Horie, Dorian J. M. Peters, and Vicente E. Torres: Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2019 ; 4(1): 50.

10. Seung Hun Lee and Stefan Somlo: Cyst growth, polycystins, and primary cilia in autosomal dominant polycystic kidney disease *Kidney Res Clin Pract.* 2014 Jun; 33(2): 73–78.
11. Elisa Agnese Nigro, Maddalena Castelli and Alessandra Boletta: Role of the Polycystins in Cell Migration, Polarity, and Tissue Morphogenesis. *Cells* 2015, 4, 687-705; doi:10.3390/cells 4040687.
12. ARowe I et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat. Med.* 2013, 19, 488–493.
13. Grantham JJ1, Mulamalla S, Swenson-Fields KI: Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011 Aug 23;7(10):556-66.
14. Ong AC, Devuyst O, et Al. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management. *Kidney Int* 2014; 86: 1244-1013.
15. Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T, Cassis L.: The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Oct;287(4):F775-88.
16. Takamitsu Saigusa, P. Darwin Bell: Molecular Pathways and Therapies in Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *APS Physiology* 2015 Vol. 30 no. 3, 195-207.
17. Meijer, E. et al. Early renal abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010. 5, 1091–1098.
18. Imed Helal, Godela M. Fick-Brosnahan, Berenice Reed-Gitomer and Robert W. Schrier: Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Nephrol.* 2012. 8, 293–300.

19. Hubert Wong, MD, Laura Vivian, BSc, Gabrielle Weiler, MD, and Guido Filler, MD, PhD: Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Hyperfiltrate Early in Their Disease. *American Journal of Kidney Diseases* 2004. Vol 43, No 4 pp 624-628.
20. Volpe, M. et al. The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. 13 (Suppl. 3), S173–S178
21. Schrier, R. W. Renal volume, renin-angiotensin-aldosterone system, hypertension, and left ventricular hypertrophy in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 2009. 20, 1888–1893.
22. Robert W. Schrier: Decade in review—polycystic kidney disease: Slowing progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2015. 11, 638–639.
23. Miyata K, Rahman M, Shokoji T, et al. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2906-12.
24. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003; 63: 1791-800.
25. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 43: 841-8.
26. Rossetti S, Chauveau D, et al. Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. *Lancet.* 2003; 361:2196–2201.

27. Antiga L, Piccinelli M, Fasolini G, Ene-Iordache B, Ondeï P, Bruno S, Remuzzi G, Remuzzi A. Computed tomography evaluation of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: a progress report. *Clin. Am. J. Soc. Nephrol.* 2006; 1:754–770.
28. Jill Norman: Fibrosis and progression of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD): *Biochim Biophys Acta.* 2011 October; 1812(10): 1327–1336.
29. Liu Y. Renal fibrosis: New insights into pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006; 69:213–217.
30. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Elevation of serum levels of metalloproteinase-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen, and plasma levels of metalloproteinase-9 in polycystic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 2000; 20:32–36.
31. Mangos S, Lam P-Y, Zhao A, Liu Y, Mudumana S, Vasilyev A, Liu A, Drummond IA. The ADPKD genes *pkd1a/b* and *pkd2* regulate extracellular matrix formation. *Dis. Models & Mech.* 2010; 3:354–365.
32. Kistler AD, Mischak H, Poster D, Dakna M, Wuethrich RP, Serra AL. Identification of unique urinary biomarker profile in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2009; 76:86–96.
33. Song X, Di Giovanni V, He N, Wang K, Ingram A, Rosenblum ND, Pei Y. Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational integration of gene expression pathways and integrated networks. *Hu. Mol. Genet.* 2009; 18:2328–2343.
34. Roitbak T, Ward CJ, Harris PC, Bacallao R, Ness SA, Wandinger-Ness A. A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15:1334–1346.

35. Perico N, Benigni A, Remuzzi G: Present and future drug treatments for chronic kidney diseases: evolving targets in renoprotection. *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7:936–953.
36. Wilson PD, Du J, Norman JT: Autocrine, endocrine and paracrine regulation of growth abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Eur J Cell Biol* 1993, 61:131–138.
37. Gupta V, Grande-Allen KJ: Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res* 2006, 72:375–383.
38. 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, 42:1259–1265.
39. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE: Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 1968, 2:363–366.
40. Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt EP: Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. *Hum Pathol* 1970, 1:631–641.
41. Baek, D.; Villén, J.; Shin, C.; Camargo, F.D.; Gygi, S.P.; Bartel, D.P. The impact of microRNAs on protein output. *Nat. Cell Biol.* 2008, 455, 64–71.
42. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2011, 12, 861–874.
43. Patel, V.; Hajarnis, S.; Williams, D.; Hunter, R.; Huynh, D.; Igarashi, P. MicroRNAs Regulate Renal Tubule Maturation through Modulation of Pkd1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012, 23, 1941–1948.

44. Harvey, S.J.; Jarad, G.; Cunningham, J.; Goldberg, S.; Schermer, B.; Harfe, B.D.; McManus, M.T.; Benzing, T.; Miner, J.H. Podocyte-Specific Deletion of Dicer Alters Cytoskeletal Dynamics and Causes Glomerular Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, 19, 2150–2158.
45. Lopez, M.L.S.S.; Weatherford, E.T.; Borges, G.R.; Monteagudo, M.C.; Pentz, E.S.; Harfe, B.D.; Carretero, O.; Sigmund, C.D.; Gomez, R.A. The MicroRNA-Processing Enzyme Dicer Maintains Juxtaglomerular Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010, 21, 460–467.
46. Pandey, P.; Brors, B.; Srivastava, P.K.; Bott, A.; Boehn, S.N.; Gröne, H.-J.; Gretz, N. Microarray-based approach identifies microRNAs and their target functional patterns in polycystic kidney disease. *BMC Genom.* 2008, 9, 624.
47. Marrone, A.K.; Stolz, N.B.; Bastacky, S.I.; Kostka, D.; Bodnar, A.J.; Ho, J. MicroRNA-17~92 Is Required for Nephrogenesis and Renal Function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014, 25, 1440–1452.
48. Magayr, T.; Streets, A.; Ong, A. Global microrna profiling in human urinary exosomes reveals new disease biomarkers and cellular pathways for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol. Dial. Transplant.* 2019, 34.
49. Kim, D.Y.; Woo, Y.M.; Lee, S.; Oh, S.; Shin, Y.; Shin, J.-O.; Park, E.Y.; Ko, J.Y.; Lee, E.J.; Bok, J.; et al. Impact of miR-192 and miR-194 on cyst enlargement through EMT in autosomal dominant polycystic kidney disease. *FASEB J.* 2019, 33, 2870–2884.
50. Cardenas, C.L.L.; Henaoui, I.S.; Courcot, E.; Roderburg, C.; Cauffiez, C.; Aubert, S.; Copin, M.-C.; Wallaert, B.; Glowacki, F.; Dewaeles, E.; et al. miR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin. *PLoS Genet.* 2013, 9, e100329.

51. de Pontual, L.; Yao, E.; Callier, P.; Faivre, L.; Drouin, V.; Cariou, S.; Van Haeringen, A.; Geneviève, D.; Goldenberg, A.; Oufadem, M.; et al. Germline deletion of the miR-17 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nat. Genet.* 2011, 43, 1026–1030.

52. Ventura, A.; Young, A.G.; Winslow, M.M.; Lintault, L.; Meissner, A.; Erkeland, S.J.; Newman, J.; Bronson, R.T.; Crowley, D.; Stone, J.R.; et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008, 132, 875–886.

53. Marrone, A.K.; Stolz, D.B.; Bastacky, S.I.; Kostka, D.; Bodnar, A.J.; Ho, J. MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014, 25, 1440–1452.

54. Patel, V.; Williams, D.; Hajarnis, S.; Hunter, R.; Pontoglio, M.; Somlo, S.; Igarashi, P. miR-17~92 miRNA cluster promotes kidney cyst growth in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 10765–10770.

55. Dantong Li and Liangzhong Sun: MicroRNAs and Polycystic Kidney Disease. *Kidney Med.* 2020, 2(6):762-770.

56. Shao, A.; Chan, S.C.; Igarashi, P. Role of transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 β in polycystic kidney disease. *Cell Signal.* 2020, 71, 109568.

57. Hopp, K.; Ward, C.J.; Hommerding, C.J.; Nasr, S.H.; Tuan, H.F.; Gainullin, V.G.; Rossetti, S.; Torres, V.E.; Harris, P.C. Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J. Clin. Investig.* 2012, 122, 4257–4273.

58. Yheskel, M.; Lakhia, R.; Cobo-Stark, P.; Flaten, A.; Patel, V. Anti-microRNA screen uncovers miR-17 family within miR-17~92 cluster as the primary driver of kidney cyst growth. *Sci. Rep.* 2019, 9, 1920.

59. Rowe, I.; Chiaravalli, M.; Mannella, V.; Ulisse, V.; Quilici, G.; Pema, M.; Song, X.W.; Xu, H.; Mari, S.; Qian, F.; et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat. Med.* 2013, 19, 488–493.
60. Lee, E.C.; Valencia, T.; Allerson, C.; Schairer, A.; Flaten, A.; Yheskel, M.; Kersjes, K.; Li, J.; Gatto, S.; Takhar, M.; et al. Discovery and preclinical evaluation of anti-miR-17 oligonucleotide RGLS4326 for the treatment of polycystic kidney disease. *Nat. Commun.* 2019, 10, 4148.
61. Peters, L.J.F.; Floege, J.; Biessen, E.A.L.; Jankowski, J.; van der Vorst, E.P.C. MicroRNAs in Chronic Kidney Disease: Four Candidates for Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6547.
62. Brandenburger, T.; Salgado Somoza, A.; Devaux, Y.; Lorenzen, J.M. Noncoding RNAs in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2018, 94, 870–881.
63. Chau, B.N.; Xin, C.; Hartner, J.; Ren, S.; Castano, A.P.; Linn, G.; Li, J.; Tran, P.T.; Kaimal, V.; Huang, X.; et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4, 121ra18.
64. Sun, I.O.; Lerman, L.O. Urinary microRNA in kidney disease: Utility and roles. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2019, 316, F785–F793.
65. Chau, B. N. et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci. Transl. Med.* 2012, 4, 121ra18.
66. Pottier, N.; Cauffiez, C.; Perrais, M.; Barbry, P. & Mari, B. FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 2014, 35, 119–26.
67. Lakhia, R.; Hajarnis, S.; Williams, D.; Aboudehen, K.; Yheskel, M.; Xing, C.; Hatley, M.E.; Torres, V.E.; Wallace, D.P.; Patel, V. MicroRNA-21 Aggravates

Cyst Growth in a Model of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016, 27, 2319–2330.

68. Buscaglia, L.E.; Li, Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin. J. Cancer* 2011, 30, 371–380.

69. Sun, L.; Zhu, J.; Wu, M.; Sun, H.; Zhou, C.; Fu, L.; Xu, C.; Mei, C. Inhibition of MiR-199a-5p reduced cell proliferation in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeting CDKN1C. *Med. Sci. Monit.* 2015, 21, 195–200.

70. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(10):556-566.

71. Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, et al. Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): the Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int.* 2003;64(3):1035-1045.

72. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, et al. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2006;354(20):2122-2130; Grantham JJ, Chapman AB, Torres VE. Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(1):148-157.

73. Chapman AB, Bost JE, Torres VE, et al. Kidney volume and functional outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(3):479-486.

74. Torres VE, King BF, Chapman AB et al. Magnetic resonance measurements of renal blood flow and disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 112–120.

75. Chapman AB, Bost JE, Torres VE, et al. Kidney volume and functional outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 479–86.

76. Fick-Brosnahan GM, Belz MM, McFann KK, Johnson AM, Schrier RW. Relationship between renal volume growth and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: a longitudinal study. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(6): 1127-1134.

77. Perrone RD, Chapman AB, Czerwiec FS, et al. Correlation of total kidney volume and eGFR in patients with ADPKD: results from the TEMPO 3:4 trial. Presented at Kidney Week 2013; November 5-10, 2013; Atlanta, GA [abstract]. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:687.

78. Torres VE, King BF, Chapman AB, et al. Magnetic resonance measurements of renal blood flow and disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(1):112-120.

79. María V. Irazabal et Al. Imaging Classification of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Simple Model for Selecting Patients for Clinical Trials. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jan; 26(1): 160–172.

80. Antiga L, Piccinelli M, Fasolini G, Ene-Iordache B, Ondeï P, Bruno S, Remuzzi G, Remuzzi A: Computed tomography evaluation of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: a progress report. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006, 1:754–760.

81. Vicente E. Torres, M.D., Ph.D., Arlene B. Chapman, M.D. et Al: Tolvaptan in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2012;367:2407-18.

82. Perico N, Antiga L, Caroli A, Ruggenenti P, Fasolini G, Cafaro M, Ondeï P, Rubis N, Diadei O, Gherardi G, Prandini S, Panozo A, Bravo RF, Carminati S, De Leon FR, Gaspari F, Cortinovis M, Motterlini N, Ene-Iordache B, Remuzzi A,

Remuzzi G: Sirolimus therapy to halt the progression of ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21:1031–1040.

83. Schrier R. et Al: Blood Pressure in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2014;371:2255-66.

84. Gansevoort R. T. et Al: Recommendations for the use of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: a position statement on behalf of the ERA-EDTA Working Groups on Inherited Kidney Disorders and European Renal Best Practice. *Nephrol Dial Transplant* (2016) 31: 337–348.

85. Ravine D. et Al: Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *Lancet*. 1994, 343(8901):824-7.

86. Pei Y1, Obaji J, Dupuis A, Paterson AD, Magistroni R, Dicks E, Parfrey P, Cramer B, Coto E, Torra R, San Millan JL, Gibson R, Breuning M, Peters D, Ravine D. Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009, 20(1):205-12.

87. Williams B. et Al: British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. *BMJ*. 2004 Mar 13;328(7440):634-40.

88. Matthews DR et Al: Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28: 412–419.

89. Persu A et al. Comparison between siblings and twins supports a role for modifier genes in ADPKD. *Kidney Int*. 2004, 66, 2132–2136.