

Karin Carneiro de Oliveira

**Papel da imunidade inata na doença renal
crônica que se segue à recuperação da
nefropatia induzida pela inibição temporária do
óxido nítrico associada a uma sobrecarga salina**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo

2019

Karin Carneiro de Oliveira

**Papel da imunidade inata na doença renal
crônica que se segue à recuperação da
nefropatia induzida pela inibição temporária do
óxido nítrico associada a uma sobrecarga salina**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Karin Carneiro de
Papel da imunidade inata na doença renal crônica
que se segue à recuperação da nefropatia induzida
pela inibição temporária do óxido nítrico associada a
uma sobrecarga salina / Karin Carneiro de Oliveira.
-- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.N-omega-nitro-L-arginina metil
éster 2.Sobrecarga salina 3.Insuficiência renal
crônica 4.Imunidade inata 5.NF-kappa B

USP/FM/DBD-424/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM-16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro e bolsa de doutorado direto (2015/08253-0) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), bolsa de doutorado (1814/13-3).

Dedicatória

À Deus, pela certeza do seu cuidado. Aos meus pais Vragel e Miriam, meus irmãos Kandice, Igor, Lincoln e Karol e meu marido Bruno pelas orações e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Amo vocês!

Agradecimentos especiais

À Deus pelo dom da vida, pelo cuidado nos mais simples detalhes e pelo amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Zatz. Agradeço pela confiança, paciência, incentivo, apoio incondicional, pela liberdade das brincadeiras, por acreditar e confiar em mim! Obrigada por todas as oportunidades concedidas, por sua total disposição em me auxiliar cordialmente. Muito obrigada por sua amizade e por todos os ensinamentos.

À Dra. Clarice Kazue Fujihara, a quem devo muito de minha formação. Durante todo o tempo que permaneci no laboratório me acolheu. Pela colaboração e contribuição indispensável desde o início deste trabalho. Pela competência e dedicação na ajuda com os meus experimentos realizados e desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grata por tudo o que fez por mim.

A minha amiga Flávia Siqueira, pelo amor incondicional e parceria. A minha jornada aqui não teria sido leve se não fosse por você. Pessoa maravilhosa que admiro e considero. A sua ajuda, conselhos, força, incentivo, carinho, e principalmente por todos os momentos de descontração e muita alegria. Agradeço a Deus por tê-la como AMIGA.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Niels Câmara pelo convívio e disposição de ajudar em todos os momentos. Uma das pessoas fundamentais na colaboração deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e atenção.

Aos amigos e colegas que o doutorado me trouxe durante esses anos Lisy, Gyzeli, Viví, Simone, Víctor, Neto, Fernanda e Amanda. Obrigada pelo companheirismo, força e colaboração durante toda essa fase.

À Cláudia Sena que sempre me ajudou e ensinou.

À Janice Pião pela cuidadosa manutenção do biotério e valiosa ajuda todos os dias!

À querida Dra Vanda Jorgetti pela amizade, paciência, incansáveis aconselhamentos e por sua disponibilidade.

Ao Wagner Domingues pela amizade e disposição em ajudar em absolutamente tudo que fosse necessário.

Às queridas Ivone Braga de Oliveira e Luciene Machado pelo convívio diário, amizade e disposição de ajudar em todos os momentos.

Aos atenciosos e queridos secretários da pós-graduação Pedro Henrique Pereira e Eliana Gonçalves por toda atenção, colaboração e ajuda nos assuntos administrativos da pós-graduação.

A todos do LIM-16, pela companhia, colaboração e momentos juntos. Obrigada por poder fazer parte deste grupo especial.

As queridas secretárias do Lim-16 Denise Duarte e Solange Coutinho pelo auxílio constante.

Ao meu amado marido Bruno, que sempre me apoiou, me incentivou e torce por mim em cada passo que dou. Você é um exemplo de caráter e bondade. As minhas conquistas são mais completas por você estar ao meu lado. Te amo!

Aos meus pais Miriam e Vragel, meus irmãos Kandice, Igor, Lincoln e Karol pelo amor incondicional. Agradeço todos os dias pela alegria de ter vocês ao meu lado. Amo vocês!!!

As queridas tias Vanda e Ziza por me orientarem e me darem força nos momentos difíceis, pela paciência, auxílio, carinho e amor. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus queridos Jonas, Dalva e Nina, que estão sempre torcendo e vibrando por mim, a motivação, incentivo e força de vocês são essenciais para continuar lutando pelos meus ideais e nunca me deixar desanimar.

Aos meus amores, Isabella, Melissa, Camila e Larissa apesar da pouca idade sabem a hora certa de colocar um sorriso no meu rosto. O meu amor por vocês é incondicional!!!

Às instituições de fomento, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro, o qual permitiu o desenvolvimento deste estudo e

foram fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

“And as You speak

A hundred billion galaxies are born

In the vapor of Your breath the planets form

If the stars were made to worship so will I

*I can see Your heart in everything You've
made*

Every burning star

A signal fire of grace

If creation sings Your praises so will I”

Joel Houston/Benjamin Hastings /Michael Fatkin

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

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Doença renal crônica e fatores de risco.....	1
1.2 - Modelo de inibição temporária do óxido nítrico e DRC	2
1.3 - Imunidade inata e DRC.....	3
Via de sinalização que envolve TLRs- NF-κB (Sinal 1)	3
Via de sinalização que envolve inflamassoma (Sinal 2)	5
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 - Modelo Experimental e grupos de estudo.....	9
3.2 - Protocolo experimental	12
3.3 - Análises bioquímicas	12
3.4 - Análises histológicas.....	12
3.5 - Imuno-histoquímica.....	13
3.5.1 - Infiltração de Linfócitos (CD3).....	13
3.5.2 - Infiltração de Macrófagos (MØ) ED-1	14
3.5.3 - Identificação de células positivas para Angiotensina 2	15
3.5.4 - Identificação de Colágeno I.....	15
3.5.5 - Detecção de α-SMA.....	16
3.5.6 - Identificação de células positivas para NLRP3	17
3.6 - Análise do conteúdo proteico do tecido renal (Western Blot).....	18
3.6.1 - Isolamento de núcleos do tecido renal.....	18
3.7 - Análise do conteúdo proteico do tecido renal (ELISA).....	19

3.8 - Análise Estatística.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1 - 4 Semanas.....	20
4.2 - 8 Semanas.....	26
4.3 - 28 Semanas.....	32
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de sinalização do Sinal 1 e Sinal 2.....	7
Figura 2 - Esquema do protocolo experimental.....	12
Figura 3 - Peso corpóreo (A); pressão caudal (B) e albuminúria (C).....	20
Figura 4 - Creatinina sérica (A); glomeruloesclerose (B) e isquemia glomerular (C)	21
Figura 5 - Linfócitos (A); macrófagos (B) e AngII (C)	22
Figura 6 - α SMA (A) e colágeno 1 (B)	23
Figura 7 - Ácido úrico renal (A) e ácido úrico sérico (B)	24
Figura 8 - Quantificação da expressão proteica TLR4 (A), p65 (B), IL-6 (C) e imagem representativa de Western blot para TLR4, IL-6 e p65 (D)	25
Figura 9 - Quantificação da expressão proteica caspase-1 (A), NLRP3 (B), IL-1 β (C) e microfotografias representativas do NLRP3 (D)	26
Figura 10 - Peso corpóreo (A); pressão caudal (B) e albuminúria (C).....	27
Figura 11 - Creatinina sérica (A); glomeruloesclerose (B) e isquemia glomerular (C)	27
Figura 12 - Linfócitos (A); macrófagos (B), AngII (C) e microfotografias representativas de linfócitos (CD3), macrófagos (M \emptyset) e AngII (D)	28
Figura 13 - α -SMA (A), colágeno 1 (B) e microfotografias representativas de α -SMA e colágeno 1 (C)	29
Figura 14 - Ácido úrico renal (A) e ácido úrico sérico (B)	30
Figura 15 - Quantificação da expressão proteica TLR4 (A), p65 (B), IL-6 (C) e imagem representativa de Western blot para TLR4, IL-6 e p65 (D)	31
Figura 16 - Quantificação da expressão proteica caspase-1 (A), NLRP3 (B), IL-1 β (C) e microfotografias representativas do NLRP3 (D)	32
Figura 17 - Peso corpóreo (A); pressão caudal (B) e albuminúria (C).....	33
Figura 18 - Creatinina sérica (A); glomeruloesclerose (B) e isquemia glomerular (C)	33
Figura 19 - Linfócitos (A); macrófagos (B), AngII (C) e microfotografias representativas de linfócitos (CD3), macrófagos (M \emptyset) e AngII (D)	35
Figura 20 - α -SMA (A), colágeno 1 (B) e microfotografias representativas de α -SMA e colágeno 1 (C)	36
Figura 21 - Ácido úrico renal (A) e ácido úrico sérico (B)	37

Figura 22 - Quantificação da expressão proteica TLR4 (A), p65 (B), IL-6 (C) e imagem representativa de Western blot para TLR4, IL-6 e p65 (D)..... 38

Figura 23 - Quantificação da expressão proteica caspase-1 (A), NLRP3 (B), IL-1 β (C) e microfotografias representativas do NLRP3 (D)..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	α – actina de músculo liso
ALB	Albuminúria
Ang II	Angiotensina II
APAAP	Fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina
BSA	Soro fetal bovino
DAMP	Padrões moleculares associados a dano (<i>damage associated molecular pattern</i>)
DRC	Doença renal crônica
ECM	Matriz extracelular
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EG	Esclerose glomerular
HMGB1	<i>High mobility group box protein-1</i>
HS	<i>High salt</i>
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
ISQ	Isquemia glomerular
L-NAME	N ω -L-nitroarginina metiléster
M \emptyset	Macrófagos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NLR	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors</i>
NLRC	<i>NOD-Like Receptors, CARD domain containing</i>
NLRP	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine-rich Repeat and Pyrin domain containing</i>
NLRP3	Inflamassoma
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
Nx	Ablação renal de 5/6

PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PAS	Ácido Periódico-Shiff
PC	Pressão sistólica caudal
PDTC	Pirrolidina ditiocarbamato
Pro- IL-18	Pró Interleucina 18
Pro-IL-1 β	Pró Interleucina 1 β
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TBS	Solução salina tris-tamponada
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
ANOVA	análise de variância
°C	grau Celsius
Na ⁺	sódio
Cl ⁻	cloreto
d	dia
dL	decilitro
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
h	hora
kb	kilobase
kDa	quilo dalton
kg	quilograma
L	litro
min	minuto
mg	miligrama
mEq	miliequivalente
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
p	coeficiente de significância estatística
pb	par de base
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
sem	semana
x	vezes
µg	micrograma
µL	microlitro

Resumo

Oliveira KC. *Papel da imunidade inata na doença renal crônica que se segue à recuperação da nefropatia induzida pela inibição temporária do óxido nítrico associada a uma sobrecarga salina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A inibição temporária da síntese de NO através da administração de L-NAME associada a uma sobrecarga salina (HS) é um modelo de doença renal crônica caracterizado por hipertensão severa e lesão renal. Com a interrupção do tratamento a maioria das alterações se normaliza, porém o retorno à normalidade não é completo. Uma nefropatia progressiva se instala acompanhada por inflamação persistente. Investigamos se a imunidade inata, em particular o sistema NF- κ B, está envolvida nesse processo. Ratos Munich-Wistar machos receberam sobrecarga salina e L-NAME (32 mg/Kg/dia) e ratos controles receberam apenas sobrecarga salina. O tratamento foi cessado após 4 semanas e 30 animais foram avaliados. Ratos adicionais foram avaliados com 8 semanas (N=30) e 28 semanas (N=30). Como esperado, HS+L-NAME promoveu hipertensão severa, albuminúria e lesões renais, enquanto a ativação da imunidade inata foi evidente. Após a interrupção do tratamento ocorreu uma redução parcial das lesões renais e da inflamação, porém a imunidade inata permaneceu ativada. Ao final das 28 semanas as lesões glomerulares se agravaram e a inflamação e imunidade inata persistiram. A administração de pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), um inibidor do sistema NF- κ B, em concomitância com o tratamento temporário com HS+L-NAME preveniu o desenvolvimento de inflamação e lesões renais durante todo o estudo. A ativação precoce da imunidade inata pode ser crucial para o início das lesões renais no modelo HS+L-NAME e para a progressão autônoma da nefropatia crônica, mesmo após a interrupção do insulto inicial.

Descritores: N-omega-nitro-L-arginina metil éster; Sobrecarga salina; Insuficiência renal crônica; Imunidade inata; NF-kappa B.

SUMMARY

Oliveira KC. *Role of innate immunity in the progressive nephropathy that follows brief nitric oxide inhibition and salt overload* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

NO synthase inhibition by L-NAME plus high-salt diet (HS) is a model of Chronic Kidney Disease characterized by marked hypertension and renal injury. With the cessation of treatment, most of these changes subside, but progressive renal injury develops, associated with persistent low-grade renal inflammation. We investigated whether innate immunity, and in particular the NF- κ B system, is involved in this process. Male Munich-Wistar rats received HS and L-NAME, 32 mg/Kg/d, while control rats received HS only. Treatment was ceased after 4 weeks when 30 rats were studied. Additional rats were studied at 8 weeks (N=30) and 28 weeks (N=30). As expected, HS+L-NAME promoted severe hypertension, albuminuria, and renal injury after 4 weeks of treatment, whereas innate immunity activation was evident. After discontinuation of treatments, partial regression of renal injury and inflammation occurred, along with persistence of innate immunity activation. At 28 weeks, glomerular injury worsened, while renal inflammation persisted and renal innate immunity remained activated. Administration of the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in concomitancy with the four-week HS+L-NAME treatment prevented the development of renal injury and inflammation, an effect that lasted throughout the 28-week period of observation. Early activation of innate immunity may be crucial to the initiation of renal injury in the HS+L-NAME model, and to the autonomous progression of chronic nephropathy even after cessation of the original insult.

Descriptors: NG-nitroarginine methyl ester; Salt overload; Renal insufficiency, chronic; Immunity, innate; NF-kappa B.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Doença renal crônica e fatores de risco

A doença renal crônica (DRC) constitui hoje um sério problema de saúde pública, sendo considerada uma “epidemia” de crescimento alarmante (1-3). O censo de 2017 da Sociedade Brasileira de Nefrologia apontou que aproximadamente 127.000 pacientes estavam em tratamento dialítico (4).

A doença renal crônica tem como características patológicas perda progressiva da função renal, atrofia tubular, rarefação microvascular, infiltração de células inflamatórias dentro do glomérulo e do interstício e deposição de matriz extracelular (ECM) no espaço intersticial entre néfrons, levando à fibrose tecidual generalizada (5, 6). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento da doença, a compreensão dos mecanismos de lesão renal crônica, bem como as fórmulas para detê-los, continuam distantes. No entanto, estudos publicados nos últimos vinte anos revelam a participação de uma série de eventos inflamatórios na perda progressiva da função renal, como a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, a infiltração do parênquima renal por macrófagos e linfócitos e a fibrose do parênquima renal (7-10). O motivo que leva à ativação desses processos inflamatórios, mesmo na ausência de antígenos microbianos ou outras proteínas estranhas ao organismo, ainda não é claro, porém, fatores hemodinâmicos estão associados à presença desses eventos inflamatórios. Agindo de forma integrada, esses fatores levam, de um lado, ao desenvolvimento de glomerulosclerose e, de outro, à fibrose progressiva do interstício renal e à atrofia tubular (11). A inevitável perda de função renal associa-se intimamente à fibrose intersticial (12), com a qual mantém correlação mais estreita do que com a própria lesão glomerular. Por essa razão, o estudo da fibrose intersticial, dos mecanismos que a iniciam e, especialmente, dos que a podem interromper, tem atraído em anos recentes atenção especial da comunidade científica especializada.

Uma série de fatores de risco para o desenvolvimento da DRC tem sido descrita na literatura, tais como doenças pré-existentes, histórico familiar, além

de variáveis demográficas e de comportamento. Uma vez desenvolvida a doença, a perda progressiva da filtração glomerular, principal marcador da DRC, é associada a um conjunto extenso e complexo de alterações fisiológicas, as quais resultam em um grande número de complicações e morbidades (13). Entre as patologias que podem conduzir à DRC, conhecidas como doenças de base, destacam-se o diabetes melitus, a hipertensão arterial e as glomerulonefrites (14-17).

1.2 - Modelo de inibição temporária do óxido nítrico e DRC

O óxido nítrico (NO), molécula gasosa capaz de livre difusão nas membranas celulares, é um radical livre que atua na sinalização de diferentes processos biológicos (18). Em 1980 o NO foi primariamente identificado por Furchogott e Zawadzki como um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*). Eles apontaram o endotélio como um componente indispensável na regulação do tono vascular através da ação do EDRF no relaxamento vascular induzido por acetilcolina (19). Alguns anos mais tarde, Ignarro et al. identificaram o EDRF como NO (20). Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado do aminoácido L-arginina produz o NO e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) (21). Existe um esforço da comunidade científica para elucidar o caráter progressivo da DRC e o desenvolvimento de inibidores da NOS se tornou uma ferramenta útil na busca de novas estratégias terapêuticas. Em 1992, nosso grupo (Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) publicou um artigo descrevendo um novo modelo de hipertensão arterial através da administração crônica de um inibidor de NOS, o N ω -L-nitroarginina metiléster (L-NAME) (22). Dois anos mais tarde mostramos que a associação de uma ingestão excessiva de sódio (HS – *high salt*) a esse tratamento não só agravava a hipertensão como causava danos renais importantes como albuminúria maciça (ALB), inflamação renal intensa, dano estrutural grave e declínio abrupto da função renal (23). Mais recentemente descrevemos um fenômeno intrigante associado a esse modelo: após a cessação do tratamento com L-NAME e sobrecarga salina, ocorria regressão da proteinúria, da

hipertensão arterial, da inflamação e da maior parte das lesões renais. No entanto, o retorno à normalidade nunca era completo: a proteinúria voltava a se elevar, assim como a pressão arterial e a inflamação. Ao final de 6 meses, a proteinúria havia novamente atingido níveis elevados, a pressão arterial estava novamente aumentada e um nítido processo de glomerulosclerose e, principalmente, de fibrose intersticial, se havia estabelecido caracterizando um novo modelo de DRC (24). Esse processo era prevenido quando ao tratamento temporário com L-NAME e sobrecarga salina se associava a administração de losartan. Esses resultados indicavam que o insulto inicial havia de alguma forma “ligado”, através de um processo que envolvia a angiotensina II, um processo inflamatório crônico, que agora progredia de modo autônomo e inexorável, como as nefropatias crônicas humanas. A associação entre a intensidade do dano renal e a densidade de infiltrado por células inflamatórias, ressalta a importância patogênica da inflamação nesse modelo (24). Porém, os mecanismos responsáveis pela evolução da nefropatia progressiva após a interrupção do insulto inicial não foram elucidados na época.

1.3 - Imunidade inata e DRC

Via de sinalização que envolve TLRs- NF-κB (Sinal 1)

A DRC apresenta um caráter inflamatório e a infiltração por células inflamatórias é tipicamente associada à fibrose tubulointersticial. Os mecanismos responsáveis por desencadear esse processo ainda não foram elucidados, porém evidências indicam que a ativação da imunidade inata seja um mediador importante da DRC (25-27).

Imunidade inata é um sistema complexo de defesa contra a invasão de tecidos por patógenos, extremamente conservado na evolução, que representa a primeira linha de defesa do corpo contra uma infecção. O sistema imune inato compreende desde simples barreiras físicas até a produção de mediadores químicos que recrutam células especializadas e ativam a imunidade adquirida (28). As principais células na ativação desse processo incluem macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, as quais possuem os *toll-*

like receptors, os TLRs. Inicialmente essas células vão ativar um processo intracelular resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias.

A partir de meados dos anos 1990 a descoberta dos TLRs trouxe uma avalanche de novos conhecimentos sobre a imunidade inata (29). Os TLRs constituem uma numerosa família de receptores celulares, superficiais ou intracitoplasmáticos localizados em células inflamatórias, como linfócitos e macrófagos, e de revestimento, como células epiteliais e endoteliais, entre outros tipos celulares (30, 31). Os TLRs são capazes de detectar moléculas, ou fragmentos moleculares comuns a um grande número de patógenos (*pathogen associated molecular pattern*, ou PAMP), como por exemplo, toxinas e fragmentos de DNA, ou detectar moléculas resultantes da destruição/estresse de células do próprio organismo (*damage associated molecular pattern*, ou DAMP), como a *high mobility group box protein-1* (HMGB1, uma proteína nuclear) e fragmentos de ácidos nucléicos. Os TLRs são ligados a proteínas de membrana ou intracelulares, como a MyD88, promovendo, quando ocupados, a estimulação do sistema NF- κ B e, conseqüentemente, a produção de uma série de mediadores que amplificam extraordinariamente a intensidade da resposta inflamatória, atraindo ao local células sanguíneas que, por sua vez, sintetizam novos mediadores, em um típico processo de realimentação positiva (30, 31).

O sistema NF- κ B é uma das vias intracelulares mais importantes associadas à imunidade inata e foi identificado inicialmente em linfócitos B. Esse sistema é constituído por vários heterodímeros estáveis. Para que o sistema NF- κ B seja ativado, é necessário que uma proteína conhecida como I- κ B α seja fosforilada por uma quinase especial, a IKK, o que a torna susceptível à ubiquitinação e posterior degradação pelo proteassoma, liberando assim o complexo p65/50, o heterodímero estável mais estudado, que é formado por duas subunidades, p50 e p65. Esse heterodímero é na verdade um fator de transcrição que, uma vez no interior do núcleo, ativa uma série de genes que codificam proteínas direta ou indiretamente envolvidas no processo inflamatório, como citocinas e quimiocinas. Por exemplo, o sistema NF- κ B é necessário à produção de pro-IL-1 β e pro-IL-18. Entretanto, essa translocação ao núcleo é normalmente impedida pela presença da I κ B α , que constitui assim um fator inibidor desse processo (32-35). O NF- κ B pode ser ativado em

diversos tipos de células expostas à ação de estímulos fisiológicos e patológicos, tais como citocinas, agentes mitogênicos, vírus, estresse mecânico ou oxidativo e a angiotensina II (Ang II) (34, 36). O sistema NF- κ B está ativado em doenças inflamatórias crônicas (32), assim como em doenças renais (37-40). Nosso grupo demonstrou recentemente que a imunidade inata está ativada nas fases iniciais de modelos experimentais de DRC como, por exemplo, o modelo de redução da massa renal de 5/6 (NX) (41), o modelo de sobrecarga de adenina (42), de nefropatia por adriamicina (43) e no modelo HS+L-NAME (44). Em particular, o sistema NF- κ B parece exercer um papel central na patogênese da lesão renal. Nosso laboratório demonstrou que a inibição da ativação do NF- κ B reduz a inflamação renal, lesões glomerulares e intersticiais em cada um desses modelos (41, 42, 44). O bloqueio do NF- κ B pode ocorrer pela prevenção da degradação da proteína inibitória I κ B α através do tratamento com proteases inibidoras ou com o composto sintético pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), inibidor do sistema NF- κ B, que possui propriedades farmacológicas antioxidantes e anti-inflamatórias (45-47). Esses achados sugerem um papel importante da via TLRs/NF- κ B na progressão das lesões renais e o efeito protetor da inibição do sistema NF- κ B com PDTC em diferentes modelos de DRC.

Via de sinalização que envolve inflamassoma (Sinal 2)

Os TLRs não são a única via através da qual as células manifestam sua capacidade inata de reagir a situações de estresse. Recentemente, foram descobertos outros receptores citosólicos também capazes de reconhecer DAMPs. Dentre esses receptores, os que mais se destacam atualmente são os NLR (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*). Esses receptores são capazes de reconhecer peptidoglicanos de paredes bacterianas (48), sinais endógenos de perigo como espécies reativas de oxigênio (ROS), acúmulo de cristais de ácido úrico (49) e baixas concentrações de potássio intracelular (50), dentre outros. Uma vez ativados, os receptores citosólicos ou alguns de seus constituintes, sofrem um processo de oligomerização, formando complexos moleculares conhecidos como inflamassomas, como NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain,*

Leucine-rich Repeat and Pyrin domain containing) (51). Esses agregados moleculares ativam enzimas como a caspase-1 que catalisam a síntese de potentes mediadores, como as interleucinas 1 β (IL-1 β) e 18 (IL-18), que desencadeiam uma sequência de eventos inflamatórios destinados, em princípio, a conter uma possível invasão microbiana e a remover o mais rápido possível os detritos resultantes da destruição de células. (52, 53). Dentre todos os NLRs, o NLRP3 é o mais bem estudado e caracterizado devido associação às doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como diabetes tipo II, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais (54). Os receptores NLRPs regulam processos pós-transcricionais que levam à formação do inflamassoma, composto pela caspase-1 ativa e proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like containing a CARD domain).(55). O NLRP3 funciona como um catalisador da produção da caspase-1 a partir de uma molécula precursora, a procaspase-1. A caspase-1 catalisa então a produção da IL-1 β e IL-18 a partir de seus respectivos precursores, proIL-1 β e proIL-18, ativadas pelo NF- κ B (26, 33).

As vias que envolvem os TLRs (sinal 1) e NLRs (sinal 2) não agem de maneira isolada e independente, existindo vários pontos de contato entre as sequências de eventos deflagradas por cada um deles (Figura 1).

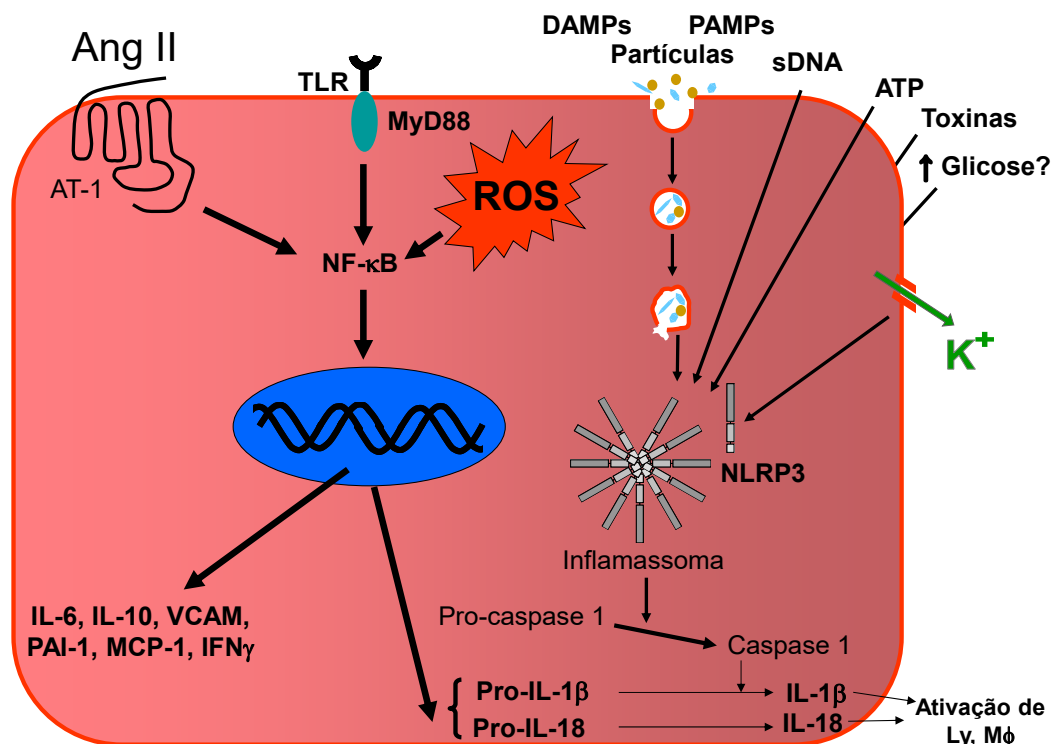


Figura 1 – Vias de sinalização do Sinal 1 e Sinal 2. Os TLRs (Sinal 1) e NLRs (Sinal 2) são ativados pelo reconhecimento de (PAMPs) ou (DAMPs), tais como espécies reativas de oxigênio (ROS), ácidos nucleicos, ATP extracelular, ácido úrico e proteinúria. A ligação com o TLR4 irá induzir a sinalização MyD88-NF-κB, que atua como um sinal de iniciação para montagem NLRP3, ASC e caspase-1. O processo de iniciação está associado à via NF-κB, permitindo a transcrição do mRNA Nlrp3 e a preparação de pró-citocinas. A ativação do inflamassoma NLRP3 cliva precursores de citocinas e secreta IL-1β e IL-18 para uma resposta inflamatória subsequente

No presente estudo, procuramos determinar se a inibição farmacológica do sistema NF-κB durante o tratamento temporário com HS + L-NAME impede o desenvolvimento tardio de inflamação renal e lesão estrutural progressiva associada a este modelo.

2. OBJETIVOS

I. Geral

Investigar o papel da imunidade inata na nefropatia progressiva induzida pela inibição temporária do óxido nítrico associada a uma sobrecarga salina.

II. Específicos

- a) Verificar se a ativação do sistema NF- κ B persiste após a cessação do tratamento com HS+L-NAME;
- b) Verificar se a inibição do sistema NF- κ B na fase inicial do modelo HS+L-NAME protege contra a instalação da nefropatia progressiva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos da linhagem Munich-Wistar obtidos de uma colônia estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos à temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h, tendo livre acesso à ração convencional para roedores (Nuvital, Curitiba, PR) e água. Os procedimentos utilizados nesse estudo seguiram as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo nº.0711/15) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como diretrizes internacionais para manutenção e cuidado de animais de laboratório.

3.1 - Modelo Experimental e grupos de estudo

Utilizamos ratos da cepa Munich-Wistar, pesando entre 250 – 300g (3-4 meses). O modelo experimental de DRC utilizado neste estudo consistiu na administração de L-NAME, Sigma-Aldrich, USA, na dose de 32 mg/Kg/dia dissolvido na água do bebedouro, associada à dieta hipersódica na concentração de 3,2% de NaCl na dieta e 0,5% de NaCl na água do bebedouro. A dose de L-NAME utilizada foi determinada baseada em estudos prévios (23, 24, 56). A dieta rica em sal foi preparada com ração farelada (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil), acrescida de caseína (Labsynth) na concentração de 15%. A inibição do sistema NF- κ B foi induzida pela administração de PDCT, (Sigma-Aldrich, USA), na dose de 15 mg/kg/dia dissolvida na água do bebedouro. Os animais que foram acompanhados por 8 e 28 semanas receberam uma dieta padrão acrescida de 15% de caseína após o término dos tratamentos com dieta hipersódica, L-NAME e PDTC.

Os seguintes grupos experimentais foram estudados:

4 semanas:

- HS: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) durante 4 semanas.
- HS+N: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) acrescida de L-NAME (32 mg/Kg/dia) na água do bebedouro durante 4 semanas.
- HS+N+PDTC: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) acrescida de L-NAME (32 mg/Kg/dia) e PDTC (15mg/kg/dia) na água do bebedouro durante 4 semanas.

8 semanas:

- HS: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina), durante 4 semanas. Após esse período a dieta hipersódica foi retirada e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais 4 semanas. Estes animais serviram como controle de tempo para verificar as alterações hemodinâmicas e morfológicas relacionadas ao envelhecimento.
- HS+N: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) acrescida de L-NAME (32 mg/Kg/dia) na água do bebedouro durante 4 semanas. Após esse período a dieta hipersódica e a oferta de L-NAME foram interrompidas e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais 4 semanas.
- HS+N+PDTC: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) acrescida de L-NAME (32 mg/Kg/dia) e PDTC (15mg/kg/dia) na água do bebedouro durante 4 semanas. Após esse período a dieta hipersódica e a oferta de L-NAME e PDTC foram interrompidas e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais 4 semanas.

28 semanas:

- HS: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina), durante 4 semanas. Após esse período a dieta hipersódica foi retirada e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais 24 semanas. Estes animais serviram como controle de tempo

para verificar as alterações hemodinâmicas e morfológicas relacionadas ao envelhecimento.

- HS+N: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) acrescida de L-NAME (32 mg/Kg/dia) na água do bebedouro durante 4 semanas. Após esse período a dieta hipersódica e a oferta de L-NAME foram interrompidas e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais 24 semanas.
- HS+N+PDTC: ratos que receberam sobrecarga salina (dieta com 3,2% de sódio e 0.5% de solução salina) acrescida de L-NAME (32 mg/Kg/dia) e PDTC (15mg/kg/dia) na água do bebedouro durante 4 semanas. Após esse período a dieta hipersódica e a oferta de L-NAME e PDTC foram interrompidas e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais 24 semanas.

- **Grupos 4 semanas:** 4 semanas após o início dos tratamentos, determinamos o peso corpóreo, a pressão caudal (PC) e ALB de 24 horas. A PC foi avaliada, após breve aquecimento dos animais, utilizando um método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, EUA). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina e determinação da ALB, através da técnica de imunodifusão radial, empregando anticorpo específico (anti-albumina de rato, MPBiomedicals LLC, EUA). Em seguida, os ratos foram anestesiados com Ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e Rompun (Bayer, 10 mg/kg) intramuscular. Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal para determinação das concentrações de creatinina. Após a perfusão dos dois rins com solução salina, a uma pressão igual à sistêmica, o rim direito foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido no freezer -80°C para análise da expressão de proteínas (Western-Blot e Elisa). Em seguida, o rim esquerdo foi fixado *in situ* com solução de Du Boscq-Brasil e preparado para exame histológico e imuno-histoquímico.

- **Grupos 8 semanas:** Ao término do protocolo experimental dos grupos 8 semanas, avaliamos os mesmos parâmetros descritos no protocolo anterior.

- **Grupos 28 semanas:** Ao término do protocolo experimental dos grupos 28 semanas, avaliamos os mesmos parâmetros descritos no protocolo anterior.

3.2 - Protocolo experimental

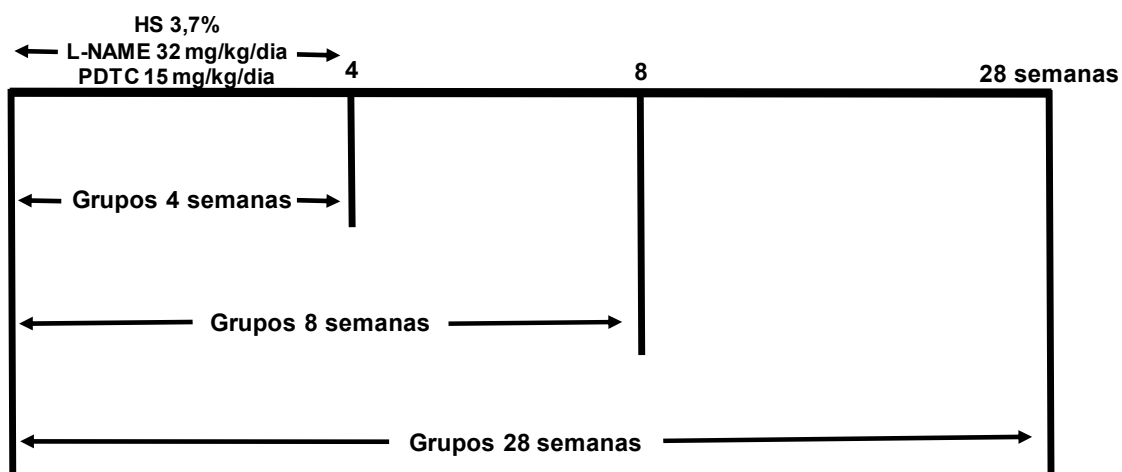


Figura 2 - Esquema do protocolo experimental

Na Figura 2 está exposto esquematicamente o protocolo experimental que foi seguido neste estudo.

3.3 - Análises bioquímicas

A dosagem de creatinina sérica foi realizada através de sistema colorimétrico disponível comercialmente (Kit Labtest Diagnóstica S.A.).

3.4 - Análises histológicas

Após a fixação *in situ* com uma solução de Du Boscq-Brasil, os rins foram pesados e fatiados em 2 segmentos coronais e pós-fixados em tampão fosfato com formaldeído a 10%. Os tecidos renais foram mantidos por 14 horas em processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Alemanha) para desidratação, diafanização e impregnação em parafina. Após inclusão em blocos de parafina, os tecidos foram cortados na espessura de 4 μ m e corados pela reação de Ácido Periódico-Shiff (PAS) para a análise de lesões glomerulares. A quantificação da porcentagem de

esclerose glomerular (%EG) e isquemia glomerular (%ISQ) foi realizada através da contagem do número de glomérulos com esclerose e glomérulos isquêmicos, independente da extensão da lesão. Para essa avaliação foram analisados 200 glomérulos por corte, sob aumento de 400x.

3.5 - Imuno-histoquímica

Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados em cortes histológicos de 4 µm de espessura colocados em lâminas previamente silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano, Sigma). Após 30 minutos em estufa a 60°C, os tecidos foram submetidos à desparafinização em 3 banhos de xilol e reidratados em etanol (concentrações decrescentes) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor por 30 minutos a temperatura de 98 °C, em solução de ácido cítrico 10 mM de pH 6,0. Para todos os marcadores utilizamos a solução salina tris-tamponada TBS (0,05 M de Tris e 0,15 M de cloreto de sódio pH 7,6) como tampão de lavagem. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

3.5.1 - Infiltração de Linfócitos (CD3)

Para a identificação de linfócitos foi empregada à técnica de Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em BSA a 5% em TBS por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário anti-CD3 (Dako #M7254) diluído em BSA 1% na proporção de 1:100, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-mouse biotinilado (Vector #BA2001) diluído em BSA 1% em TBS, na proporção de 1:200 à temperatura ambiente durante 45 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados

com solução pronta *Streptavidin-AP* (Dako #K0689) por 30 minutos. Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico *Permanent-Red*. As células positivas para o epítipo CD3 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do *Permanent-Red* presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de linfócitos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 20 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

3.5.2 - Infiltração de Macrófagos (MØ) ED-1

A identificação de macrófagos foi realizada pelo método de APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina). Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA), em concentração 1:20 por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com um anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-ED-1 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com um anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho - RAM (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:50 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados com o Complexo APAAP na diluição 1:70 por 30 minutos. Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico *Permanent-Red*. As células positivas para o epítipo ED-1 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do *Permanent-Red* presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer

(Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de macrófagos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

3.5.3 - Identificação de células positivas para Angiotensina 2

Para identificação de células contendo AngII foi empregada a técnica de Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em leite a 5% em TBS por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-AngII (Península Laboratories, San Carlos, CA), diluído em BSA 1% na proporção de 1:400. No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-coelho biotilado (Vector BA-1000), diluído em BSA 1% na proporção de 1:1000, durante 45 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo *Streptavidina-AP* (Vector Vectastain ABC-AP #AK5000) e por fim, revelados com substrato cromogênico *Fast Red* com tempo variável. A quantificação das células intersticiais positivas para AngII foi realizada através da contagem de células marcadas no córtex renal, ao microscópio com aumento de 400x. Foram analisados 20 campos para cada lâmina. Os resultados foram apresentados como células positivas por milímetro quadrado (cél/mm²).

3.5.4 - Identificação de Colágeno I

A identificação de colágeno 1 intersticial foi realizada utilizando o método da Peroxidase. Após a desparafinização e recuperação antigênica procedeu-se

o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Após serem lavadas com tampão TBS, os cortes foram incubados com soro não imune de cavalo na diluição de 1:50 para bloqueio de marcação inespecífica por 30 minutos. Retirou-se o excesso de soro e os tecidos renais foram incubados com o anticorpo primário anti-colageno tipo I (Abcam®, Cambridge, UK) diluído na proporção de 1:200 em solução de BSA a 1% em TBS, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-Merck) durante 2 minutos. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. Para a avaliação da porcentagem da área intersticial ocupada por colágeno tipo 1 utilizamos um método de contagem de pontos. Foram avaliados 20 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos.

3.5.5 - Detecção de α -SMA

A α -SMA está presente constitutivamente em artérias e arteríolas e, na vigência de inflamação crônica do interstício renal, passa a ser detectada também nesse compartimento, indicando a presença de miofibroblastos. Para a detecção da α -SMA, utilizou-se o método Estreptavidina-Fosfatase Alcalina. Após desparafinização e exposição dos epítomos por aquecimento, os cortes foram incubados com soluções para bloqueio da biotina endógena tecidual (Dako, Califórnia, EUA). Em seguida, as lâminas foram incubadas com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA), diluído a 2% em solução de leite desnatado a 2% em TBS, durante 30 minutos. Após a retirada do excesso de soro, os cortes foram incubados com o anticorpo anti- α -SMA de músculo liso (Sigma, St. Louis, EUA) 1:1000 produzido em camundongos, na proporção de 0,12% em BSA, à temperatura de 4°C, durante 18h. No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-camundongo produzido em cavalo (Vector Laboratories, Califórnia, EUA),

respectivamente, por 45 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com o complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Dako, Califórnia, EUA) durante 30 minutos, as marcações positivas para o α - SMA foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da 15 fosfatase alcalina do Complexo e do *Permanent-Red* presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. Para a avaliação da porcentagem da área intersticial ocupada por miofibroblastos utilizamos um método de contagem de pontos. Foram avaliados 20 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos.

3.5.6 - Identificação de células positivas para NLRP3

Para avaliação da expressão de NLRP3 foi empregada a técnica da Peroxidase. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio com peroxidase com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Depois, foram incubados com 80 μ l de solução Dako Protein Block (#X0909). Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-NLRP3 (Sigma, St Louis, EUA), diluído em BSA 1% na proporção de 1:400. No dia seguinte, os cortes foram incubados com 80 μ l de Envision Rabbit HRP (Dako, Carpinteria, EUA) durante 45 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-Merck) durante 2 minutos. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de células positivas para NLRP3 foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

3.6 - Análise do conteúdo proteico do tecido renal (Western Blot)

As proteínas dos tecidos renais foram extraídas usando o tampão de lise (RIPA) e inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche Applied Science). A concentração de proteína foi determinada utilizando o kit “Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit” seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra, 100 µg de proteínas totais foram misturados com 2x do tampão Laemmli e foram desnaturados a 96 °C durante 5 min. Para a análise específica da fração nuclear, as amostras pré-condicionadas não foram desnaturadas. A separação de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de *dodecyl sulphate-poliacrilamida* de sódio (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) e foram incubadas com 5% de leite ou 5% de BSA em TBS durante 1 hora à temperatura ambiente para o bloqueio de ligações não específicas. A membrana foi então incubada durante a noite a 4° C com anticorpos primários para: β-actina, 1: 5000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA); anti-TLR4 (Santa Cruz) 1:250, anti-IL-6 (Abcam) 1:1000 e anti-Caspase-1 (Santa Cruz) 1:1000. Após enxaguar com tampão (TBST), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários marcados com HRP. As bandas marcadas foram detectadas usando um kit de quimioluminescência (Thermo Scientific, Rockford, EUA), e foram analisadas adicionalmente por densitometria com um sistema de documentação de gel, o software Uvisoft-UvibandMax (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

3.6.1 - Isolamento de núcleos do tecido renal

Para o isolamento de núcleos, os tecidos renais foram homogeneizados em gelo com pilão de vidro especial (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) em tampão de lise e centrifugados a 1000 G durante 10 min a 4 ° C para obter um pellet nuclear bruto. O sobrenadante (fração citosólica) foi descartado. Além disso, o sedimento foi reconstituído em tampão Laemmli e centrifugado a 1500 G durante 10 min a 4°C para obter uma suspensão nuclear pura. A separação de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de *dodecyl sulphate-poliacrilamida* de sódio. As proteínas foram transferidas para membrana de

nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) e foram incubadas com 5% de leite ou 5% de BSA em TBS durante 1 hora à temperatura ambiente para o bloqueio de ligações não específicas. A membrana foi então incubada durante a noite a 4°C com anticorpo primário anti-p65 fosforilado (Cell Signaling #3033S), 1: 100 e anti-histona, 1: 1500 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Após enxaguar com tampão (TBST), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário marcado com HRP. As bandas marcadas foram detectadas usando um kit de quimioluminescência (Thermo Scientific, Rockford, EUA), e foram analisadas adicionalmente por densitometria com um sistema de documentação de gel o software Uvisoft-UvibandMax (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

3.7 - Análise do conteúdo proteico do tecido renal (ELISA)

A análise do conteúdo proteico de IL-1 β no tecido renal foi determinada através do método Elisa Sanduíche, utilizando o kit comercial (R&D Systems). Para cada amostra, foram utilizados 100 μ l de proteína do extrato tecidual. O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas seguiram as recomendações do fabricante.

3.8 - Análise Estatística

A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de um fator, com pós-testes de acordo com o método de Newman-Keulz, utilizando o software GraphPad Prism®. O nível de significância estatística foi definido como $P < 0,05$. Todos os resultados foram representados como Média \pm Erro Padrão (EP).

4. RESULTADOS

4.1 - 4 Semanas

A seguir serão apresentados os resultados obtidos após 4 semanas de tratamento nos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC.

De acordo com os dados relativos ao peso corpóreo (Figura 3a), observa-se que não houve diferença entre os três grupos. Conforme observado anteriormente, a sobrecarga salina associada à inibição de NO promoveu hipertensão severa e promoveu grave alteração na permeabilidade glomerular, resultando no aumento de 150 vezes na albuminúria. O tratamento com PDTC preveniu a albuminúria e o aumento exacerbado da pressão arterial (Figura 3b, c).

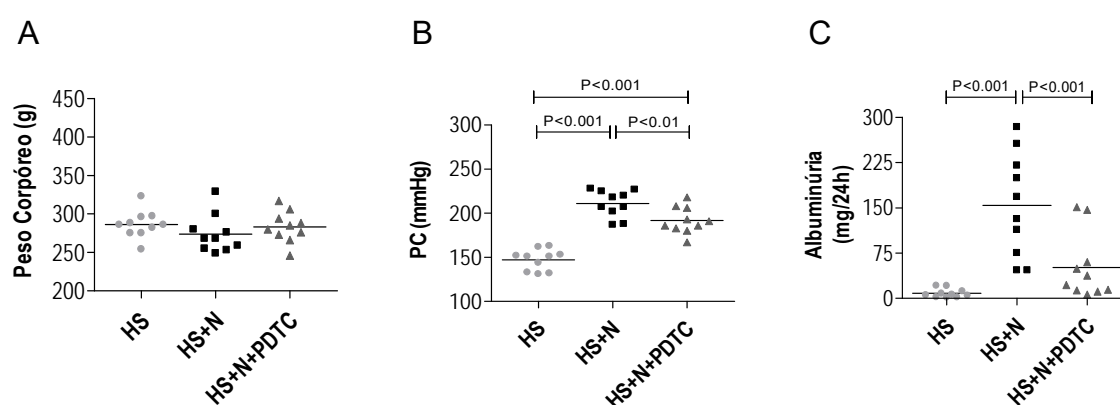


Figura 3 - Peso corpóreo (A); pressão caudal (B) e albuminúria (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

O grupo HS+N apresentou elevação das concentrações séricas de creatinina comparado ao grupo HS, indicando perda da função renal e o tratamento com PDTC preveniu o aumento da creatinina sérica (Figura 4a). A frequência de esclerose glomerular (Figura 4b) foi maior durante o tratamento com HS+L-NAME, assim como a isquemia glomerular (Figura 4c), uma das características do modelo de inibição de óxido nítrico. O tratamento com PDTC impediu o aparecimento dessas lesões glomerulares nos animais.

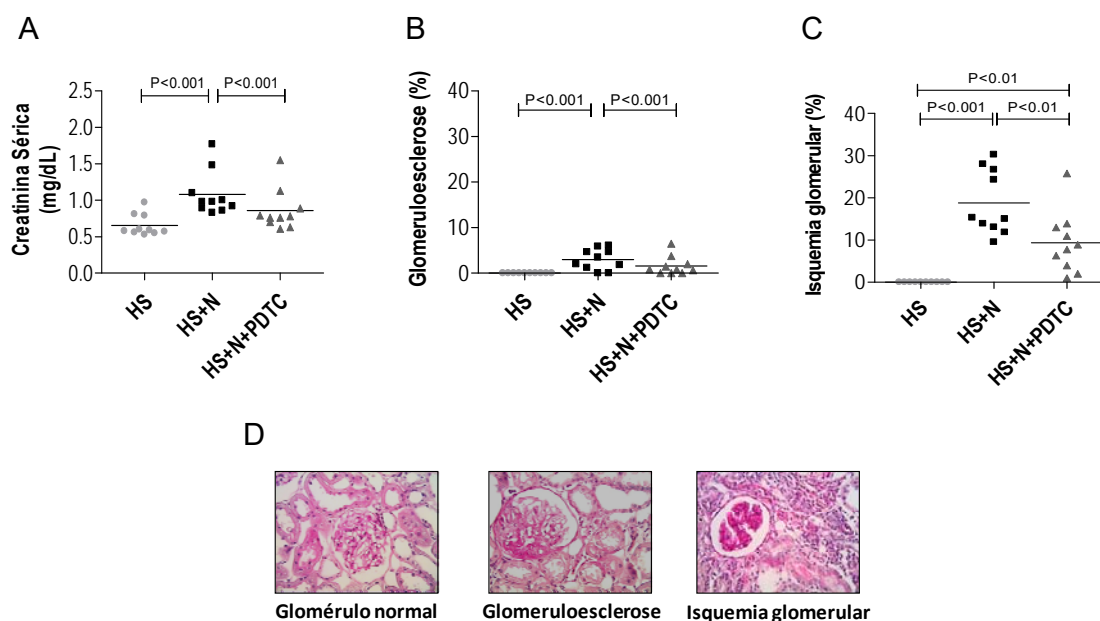


Figura 4 - Creatinina sérica (A); glomeruloesclerose (B) e isquemia glomerular (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Microfotografias representativas de glomérulo normal, glomeruloesclerose e isquemia glomerular (D). Resultados analisados como Média \pm EP

A administração de HS+L-NAME provocou infiltração intersticial precoce por células inflamatórias e fibrose intersticial. Os animais HS+N apresentaram intenso infiltrado linfocitário e macrófágico, assim como um aumento de células positivas para AngII+ no tecido renal e o tratamento com PDTC impediu o aumento da infiltração por células inflamatórias (Figura 5a-d). O tratamento com HS+L-NAME provocou aumento na expressão de colágeno 1 e α -SMA, indicando a presença de miofibroblastos já na fase precoce. O PDTC atenuou o depósito de α -SMA e de colágeno 1 nesses animais (Figura 6a-c). Esses resultados indicam que o bloqueio do sistema NF- κ B reduziu a infiltrado linfocitário e a fibrose intersticial na fase inicial do modelo HS+L-NAME.

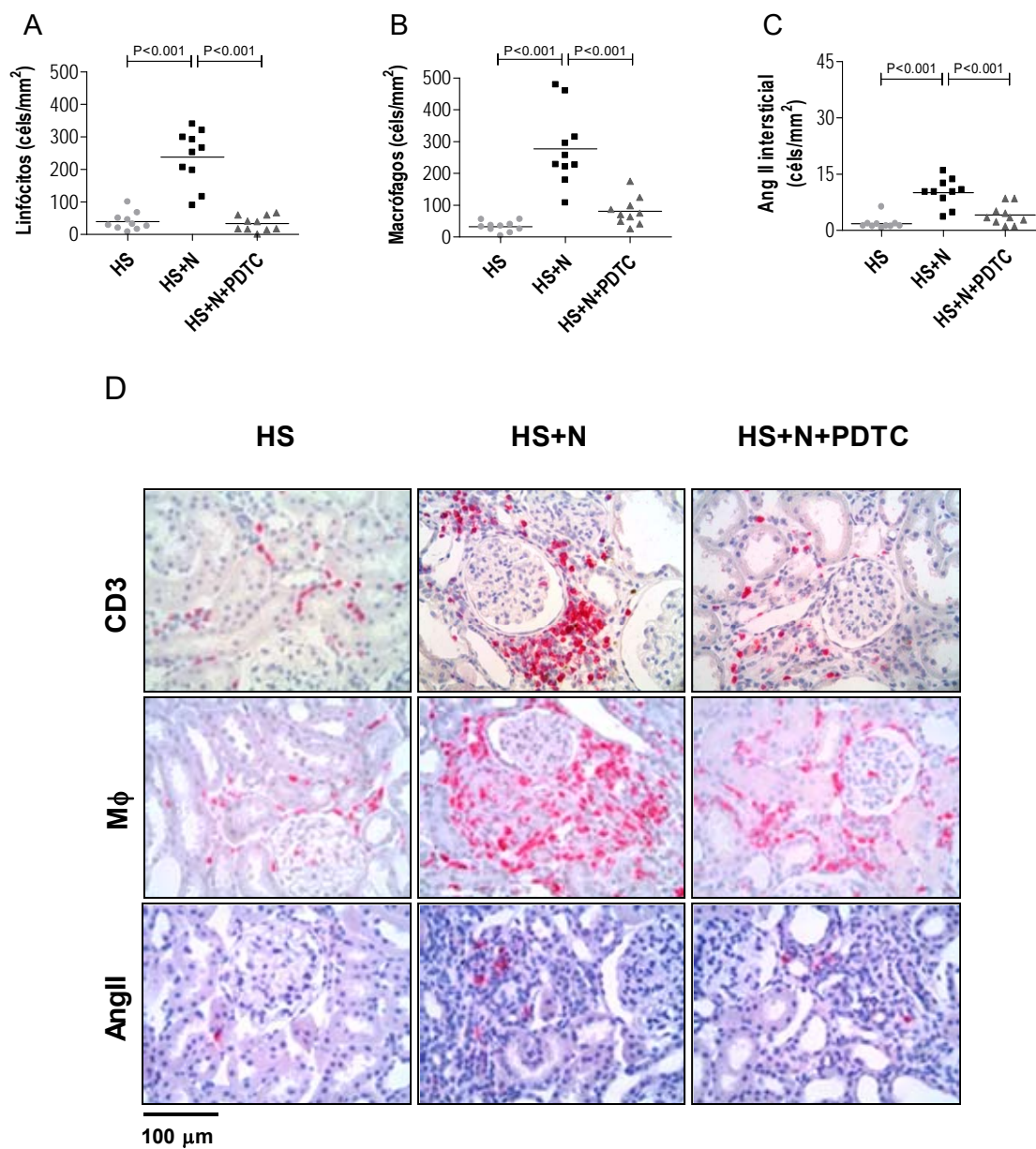


Figura 5 - Linfócitos (A); macrófagos (B) e AngII (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Microfotografias representativas de linfócitos (CD3), macrófagos (MØ) e AngII (D). Resultados analisados como Média ± EP

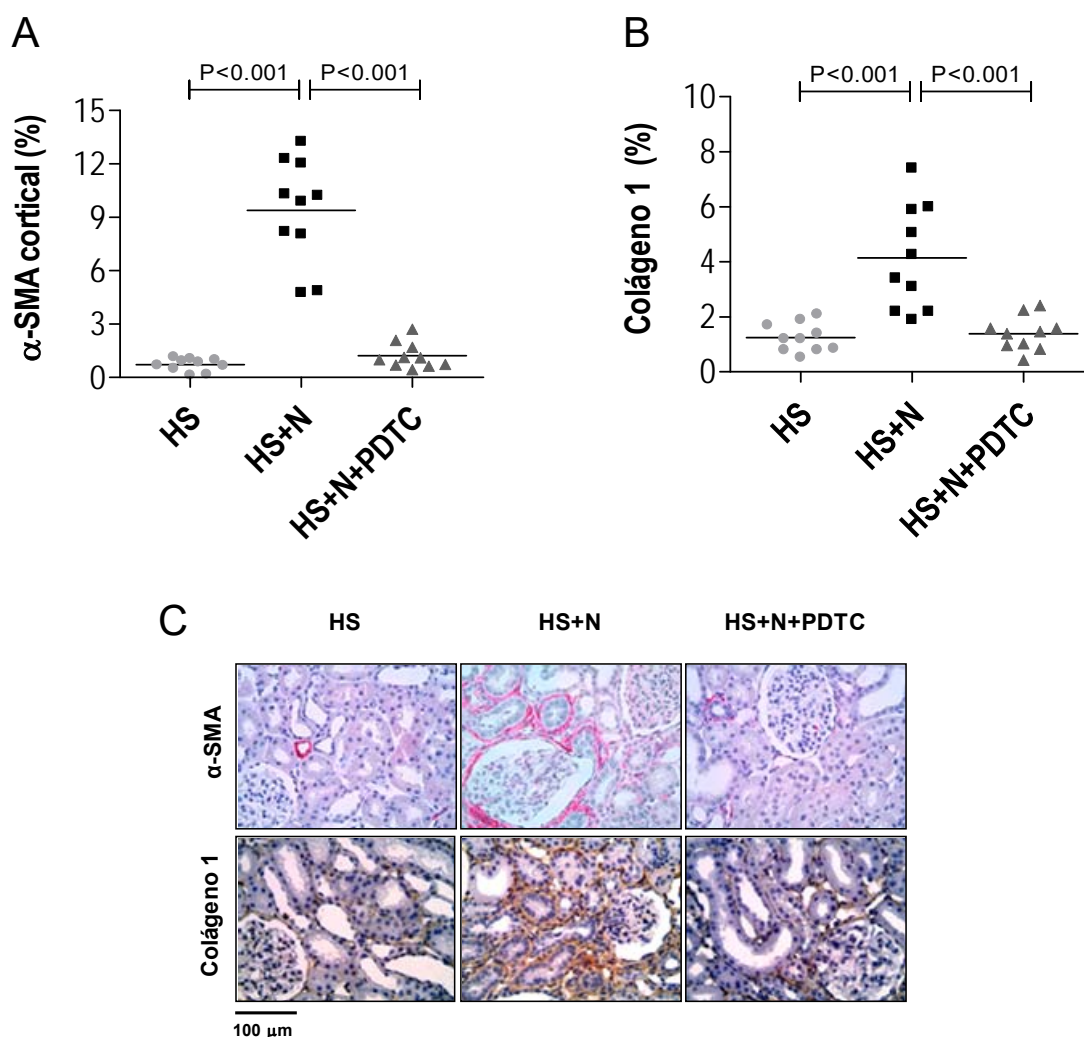


Figura 6 - α SMA (A) e colágeno 1 (B) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Microfotografias representativas de α SMA e colágeno 1 (C). Resultados analisados como Média \pm EP

O conteúdo renal de AU foi maior nos animais que foram tratados com HS+L-NAME comparados aos animais que receberam apenas a dieta HS. A administração concomitante de PDTC manteve os níveis de AU renal iguais aos dos animais HS (Figura 7a). Não houve diferença na concentração sérica de AU entre os três grupos (Figura 7b).

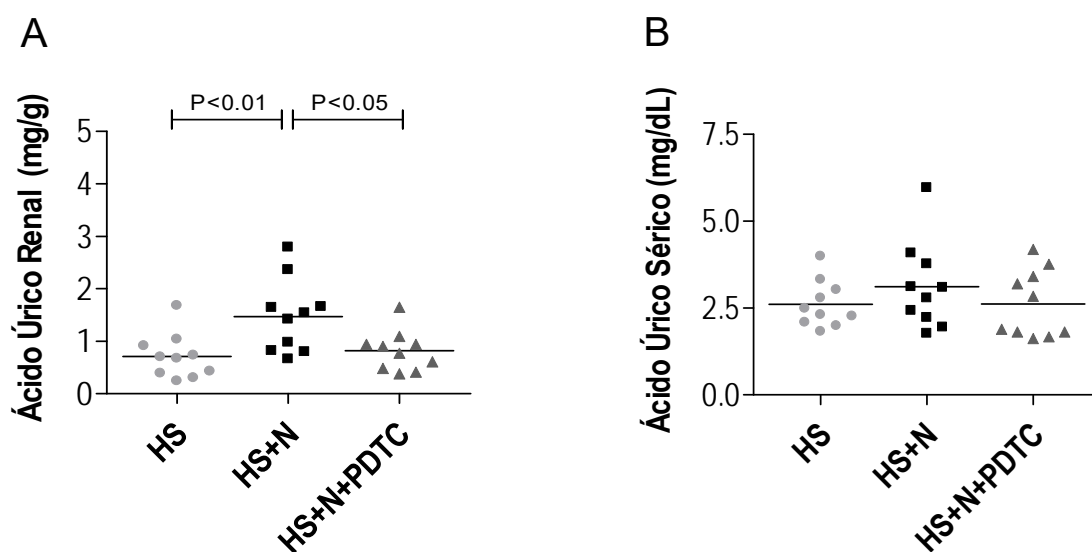


Figura 7 - Ácido úrico renal (A) e ácido úrico sérico (B) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

O tratamento com HS+L-NAME aumentou a abundância renal de TLR4 (Figura 8a), NF-kB (Figura 8b) e IL-6 (Figura 8c) porém, os animais que receberam o tratamento com PDTC apresentaram valores semelhantes aos do grupo HS. Além disso, o PDTC também foi capaz de prevenir o aumento do conteúdo proteico da caspase-1, do NLRP3 e da IL-1 β , indicando que a via do inflamassoma NLRP3 também foi inibida pelo PDTC.

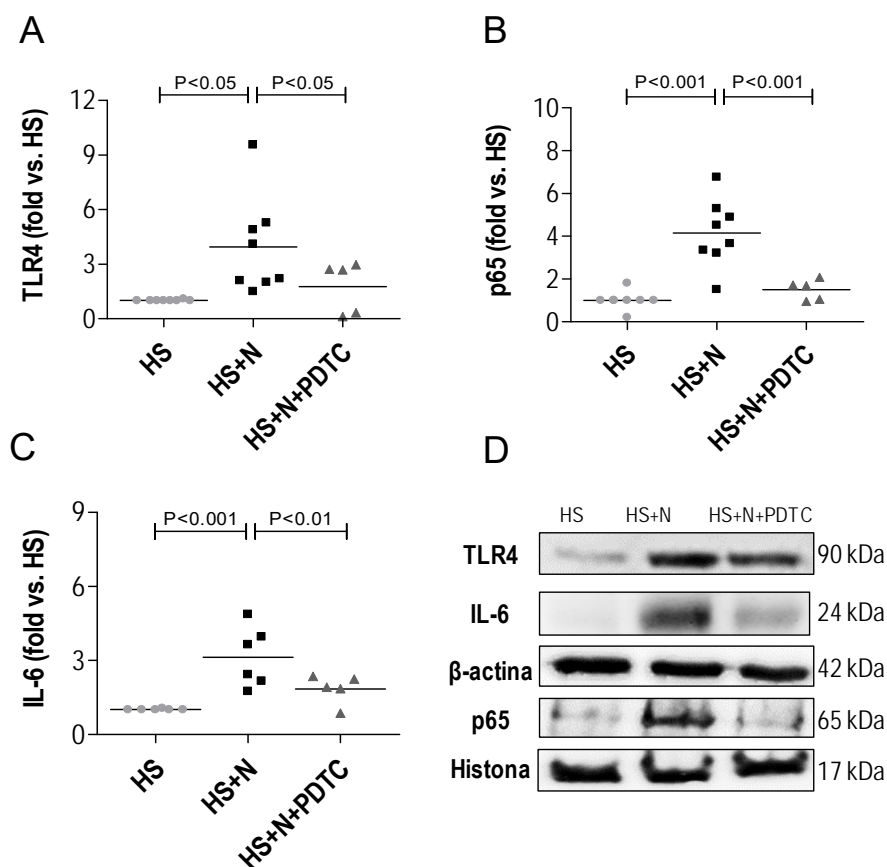


Figura 8 - Quantificação da expressão proteica TLR4 (A), p65 (B), IL-6 (C) e imagem representativa de Western blot para TLR4, IL-6 e p65 (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

Para verificar a ativação de componentes do inflamassoma NLRP3 foi realizada a análise do conteúdo proteico da caspase-1 (WB), do NLRP3 (imunohistoquímica) e da IL-1 β (ELISA) no tecido renal. Nos animais tratados com HS+L-NAME a via do inflamassoma NLRP3/Caspase-1 estava ativada, associada ao aumento do conteúdo protéico de IL-1 β . O tratamento com PDTC preveniu a ativação dessa via e também manteve os valores da IL-1 β semelhantes aos do grupo HS (Figura 9a-d).

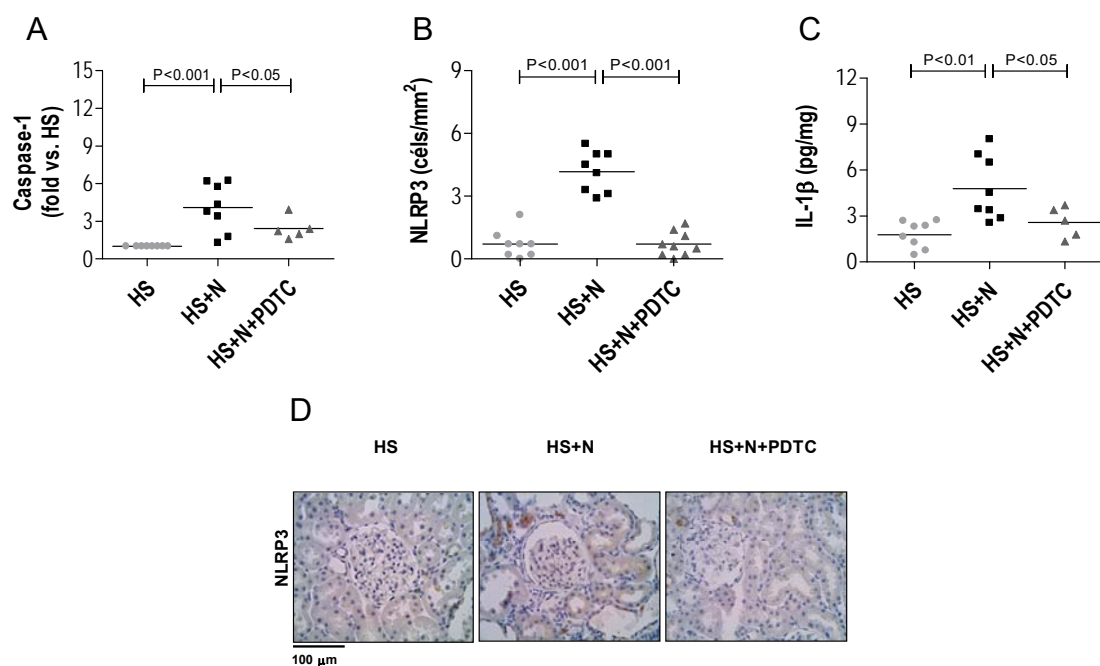


Figura 9 - Quantificação da expressão proteica caspase-1 (A), NLRP3 (B), IL-1 β (C) e microfotografias representativas do NLRP3 (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

4.2 - 8 Semanas

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC 8 semanas.

Nos dados relativos ao peso corpóreo (Figura 10a), observa-se que não houve diferença entre os três grupos. Conforme esperado, 4 semanas após o término do tratamento HS+L-NAME os animais apresentaram PC e ALB elevadas e o PDTC preveniu apenas o aumento da ALB (Figura 10b, c).

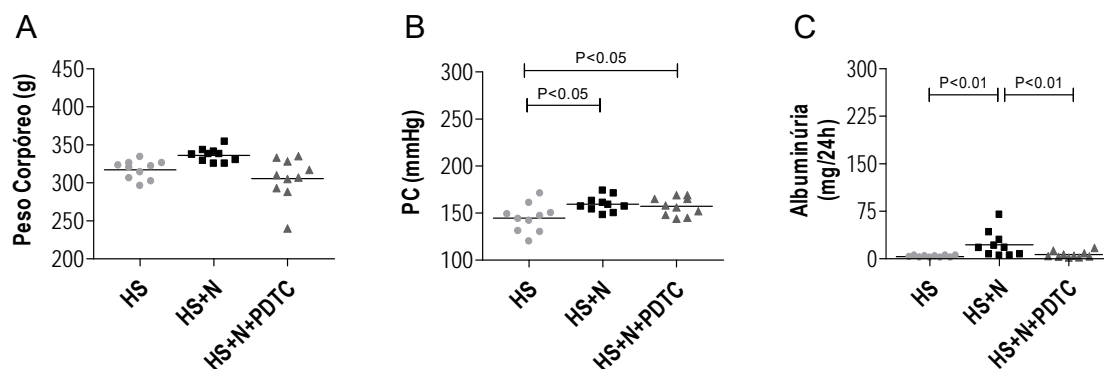


Figura 10 - Peso corpóreo (A); pressão caudal (B) e albuminúria (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

No grupo HS+N, as concentrações séricas de creatinina continuaram aumentadas em comparação ao grupo HS e o tratamento com PDTC impediu esse aumento (Figura 11a). Não houve diferença na frequência de esclerose glomerular entre os grupos (Figura 11b). Por outro lado, a frequência de glomérulos isquêmicos foi maior nos grupos HS+N e HS+N+PDTC em relação ao grupo HS

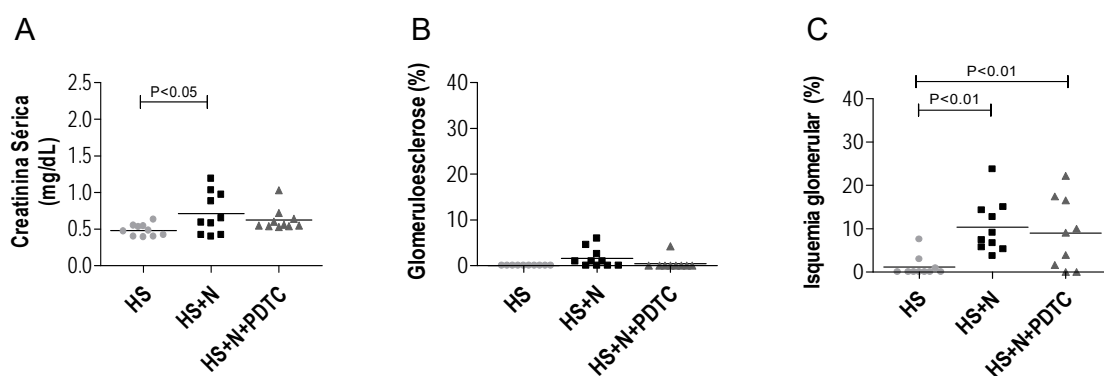


Figura 11 - Creatinina sérica (A); glomerulosclerose (B) e isquemia glomerular (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

A densidade de infiltração de linfócitos, macrófagos e células positivas para AngII continuou elevada no grupo HS+N em relação ao grupo HS. Porém, o PDTC foi capaz de prevenir o aumento do infiltrado de linfócitos e células positivas para AngII (Figura 12a-d). A expressão de colágeno 1 e α -SMA se manteve aumentada no grupo HS+N e o tratamento com PDTC atenuou o depósito de α -SMA e de colágeno 1 nesses animais (Figura 13a-c).

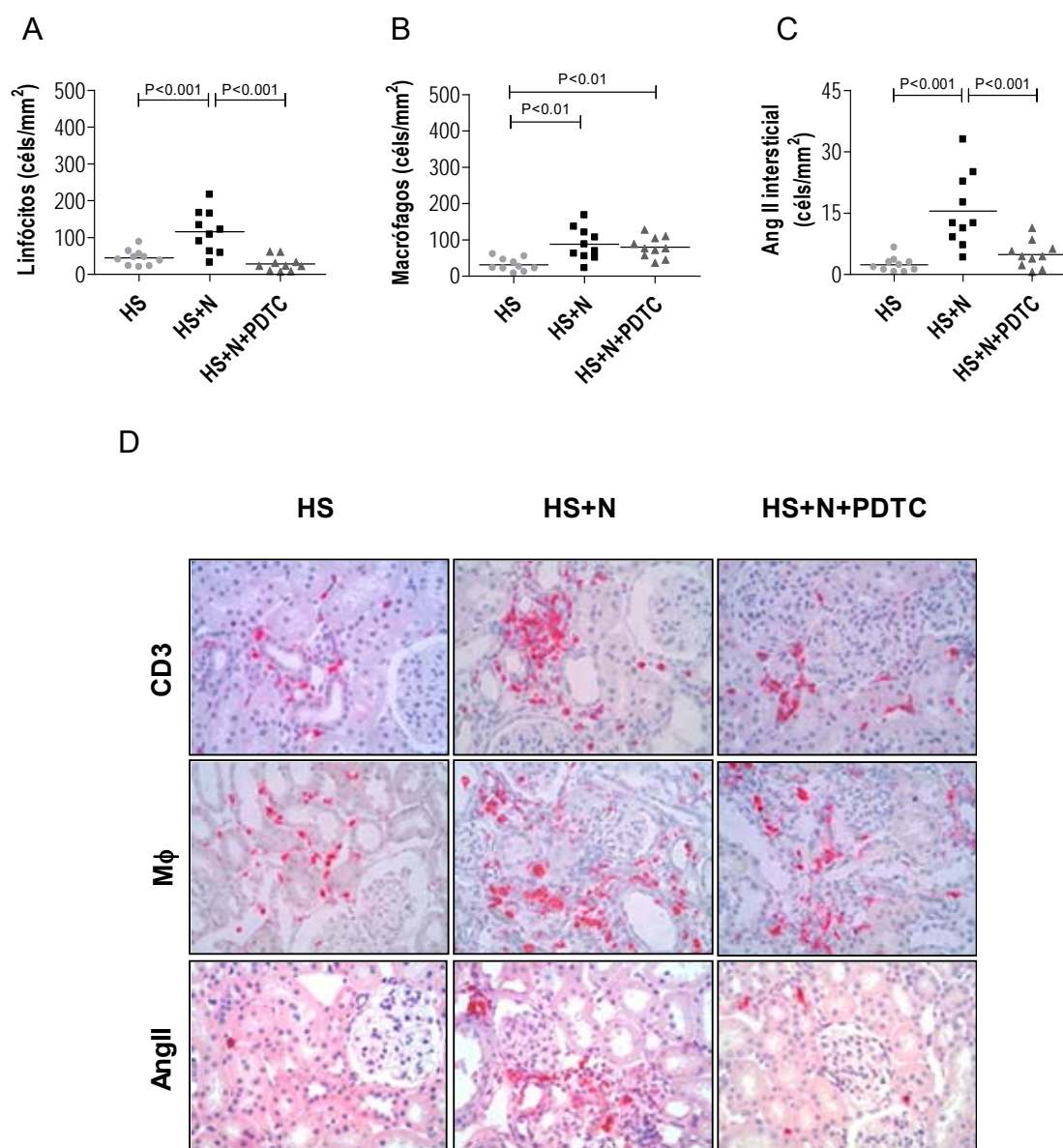


Figura 12 - Linfócitos (A); macrófagos (B), AngII (C) e microfotografias representativas de linfócitos (CD3), macrófagos (M ϕ) e AngII (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

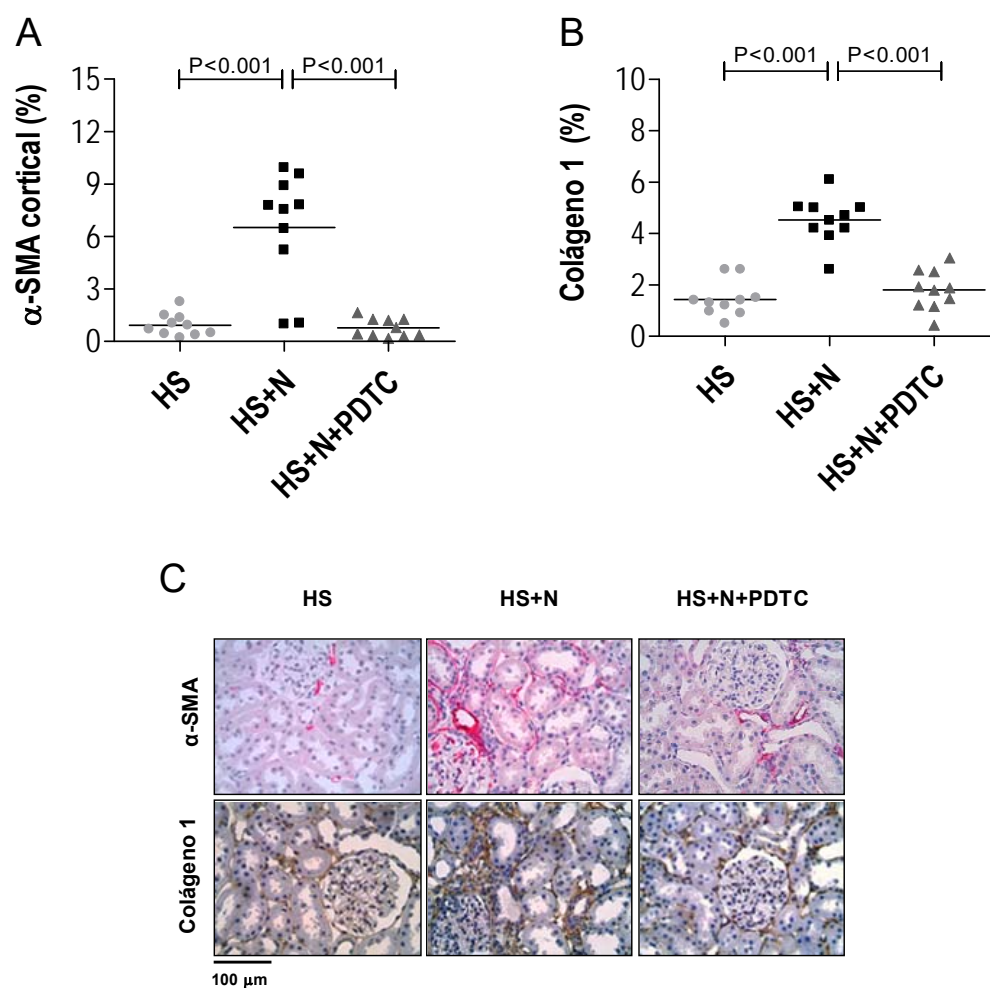


Figura 13 - α -SMA (A), colágeno 1 (B) e microfotografias representativas de α -SMA e colágeno 1 (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

Não houve diferença no conteúdo renal e na concentração sérica de AU entre os três grupos (Figura 14a, b).

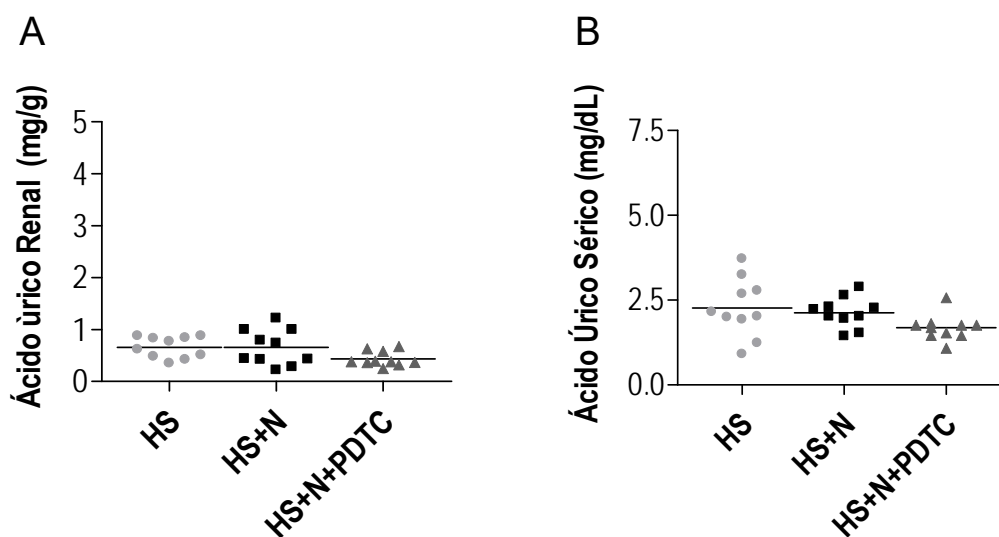


Figura 14 - Ácido úrico renal (A) e ácido úrico sérico (B) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

Os animais HS+N continuaram apresentando aumento na abundância renal de TLR4 (Figura 15a), NF-kB (Figura 15b) e IL-6 (Figura 15c) mesmo 4 semanas após a interrupção do insulto inicial. Os animais que receberam o tratamento com PDTC apresentaram valores semelhantes aos do grupo HS. Além disso, o PDTC também foi capaz de prevenir o aumento do conteúdo proteico da caspase-1 e do NLRP3, indicando que a via do inflamassoma NLRP3 também foi inibida pelo PDTC 4 semanas depois da interrupção do tratamento (Figura 16a-d).

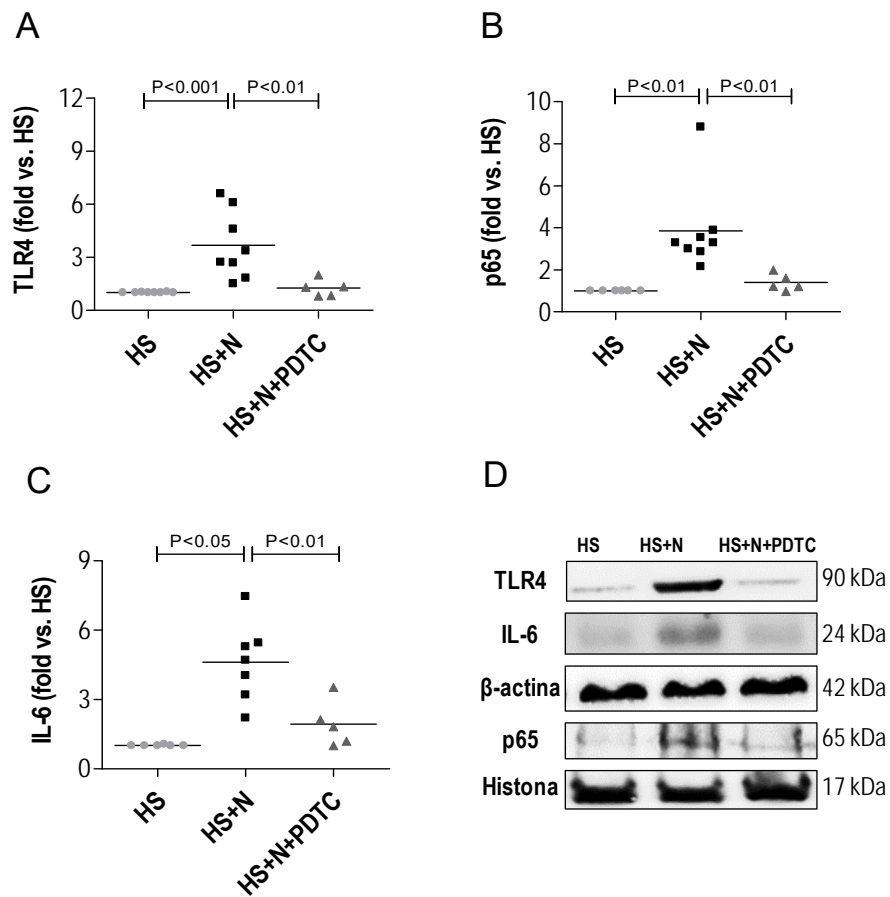


Figura 15 - Quantificação da expressão proteica TLR4 (A), p65 (B), IL-6 (C) e imagem representativa de Western blot para TLR4, IL-6 e p65 (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

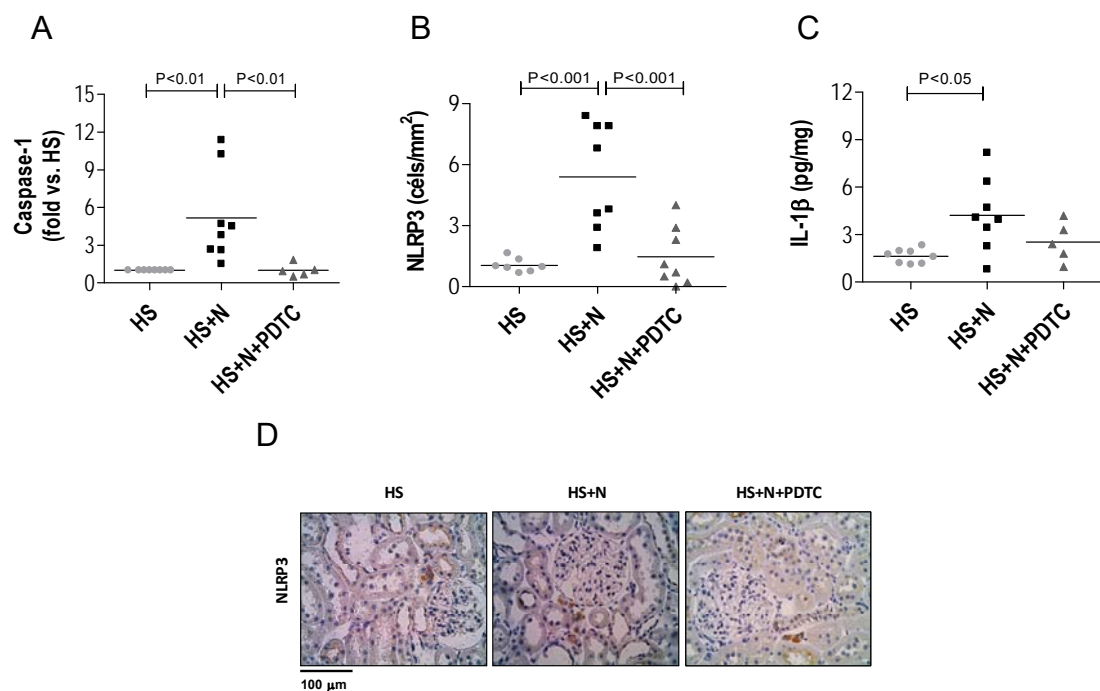


Figura 16 - Quantificação da expressão proteica caspase-1 (A), NLRP3 (B), IL-1 β (C) e microfotografias representativas do NLRP3 (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

4.3 - 28 Semanas

A seguir serão apresentados os resultados obtidos dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC 28 semanas.

Os dados relativos ao peso corpóreo (Figura 17a) mostram que não houve diferença entre os grupos. Corroborando dados dos trabalhos anteriores do nosso laboratório, ao final das 28 semanas a PC e ALB aumentaram acentuadamente nos animais do grupo HS+N. O tratamento com PDTC atenuou a hipertensão sistêmica e excreção urinária de albumina, sugerindo o envolvimento do sistema NF-kB nos mecanismos de HA e da permeabilidade da barreira glomerular nesse modelo (Figura 17b, c).

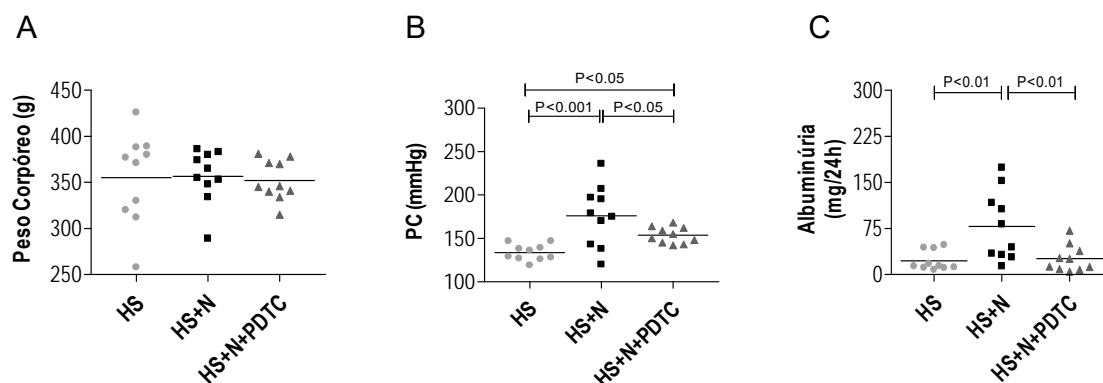


Figura 17 - Peso corpóreo (A); pressão caudal (B) e albuminúria (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

As concentrações séricas de creatinina não foram diferentes entre os grupos (Figura 18a). Como demonstrado previamente em nosso laboratório, a lesão glomerular predominante nos animais HS+N 28 semanas é a glomeruloesclerose e o tratamento com PDTC preveniu o desenvolvimento desse tipo de lesão glomerular. Esse resultado sugere a participação fundamental do sistema NF-kB na progressão da glomeruloesclerose nesse modelo experimental. Por outro lado, o tratamento com PDTC não interferiu no aumento da frequência de isquemia glomerular (Figura 18b, c).

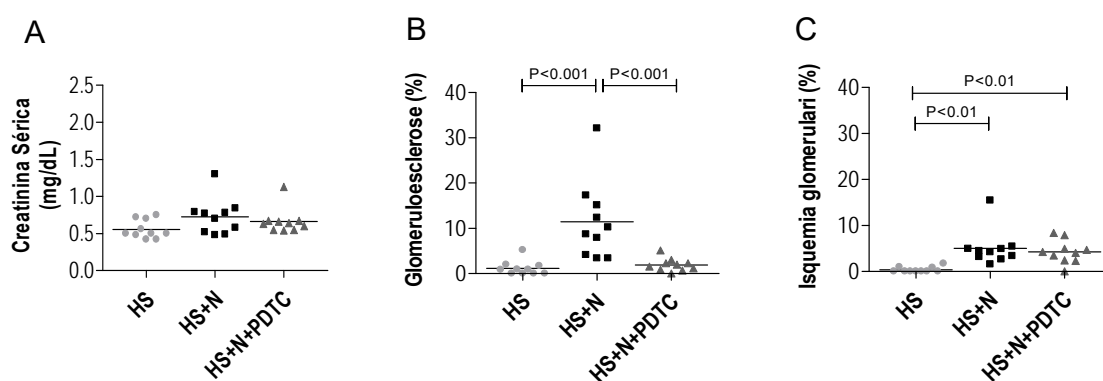


Figura 18 - Creatinina sérica (A); glomeruloesclerose (B) e isquemia glomerular (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

Como descrevemos previamente, os animais HS+N apresentaram maior infiltrado linfocitário, macrófágico e de células positivas para AngII, indicando acentuado processo inflamatório. O tratamento com PDTC foi eficiente em prevenir a infiltração de células inflamatórias (Figura 19a-d). Ao final das 28 semanas os animais HS+N ainda apresentavam acentuada expressão intersticial de α -actina, indicando presença marcante de miofibroblastos. O tratamento com PDTC preveniu o aumento da expressão de α -actina, protegendo do desenvolvimento de fibrose intersticial. O depósito de colágeno 1 foi maior nos animais HS+N em relação aos animais HS e o bloqueio inicial do sistema NF- κ B foi capaz de prevenir o desenvolvimento de fibrose nesses animais (Figura 20a-c).

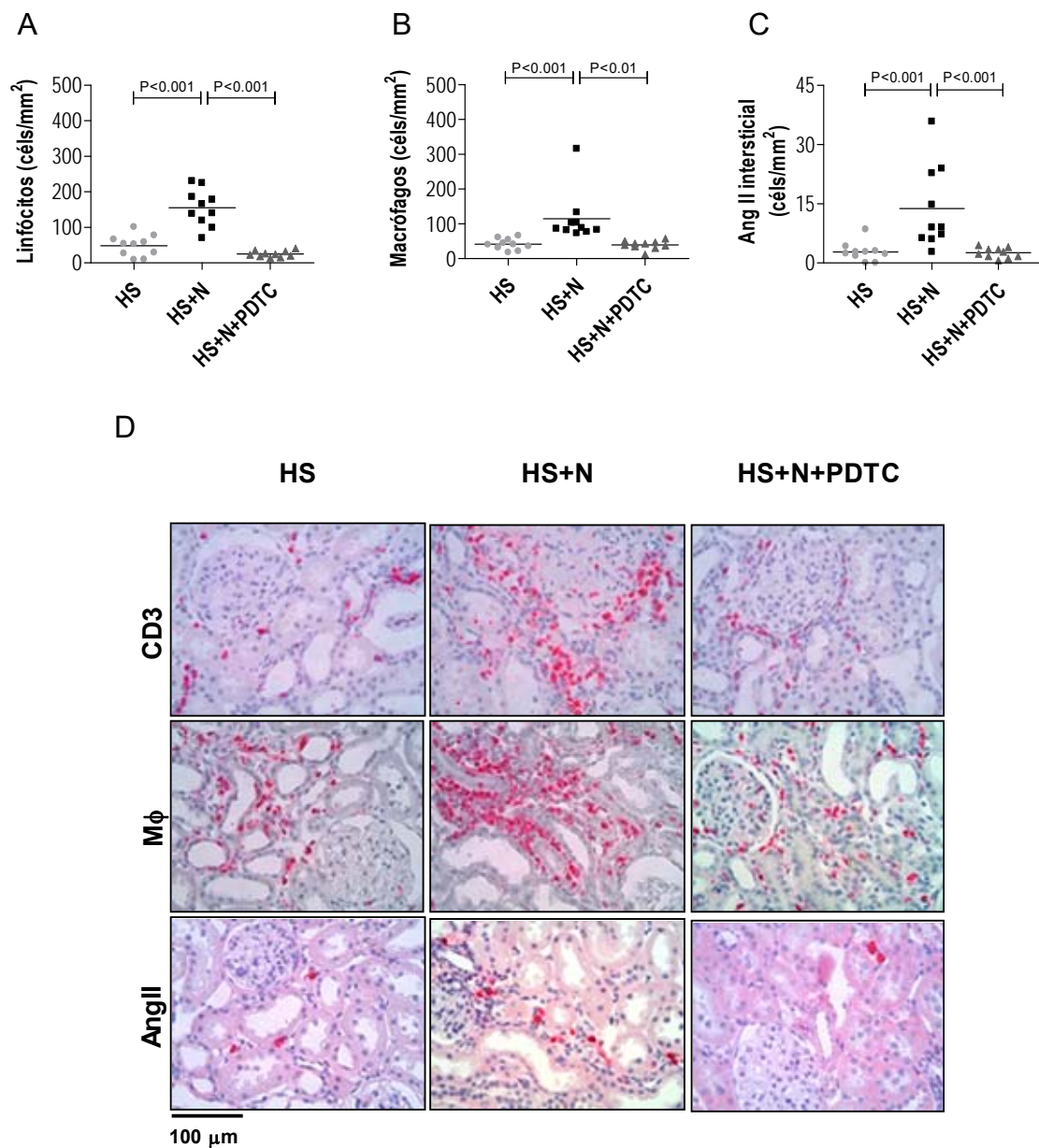


Figura 19 - Linfócitos (A); macrófagos (B), AngII (C) e microfotografias representativas de linfócitos (CD3), macrófagos (MØ) e AngII (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média ± EP

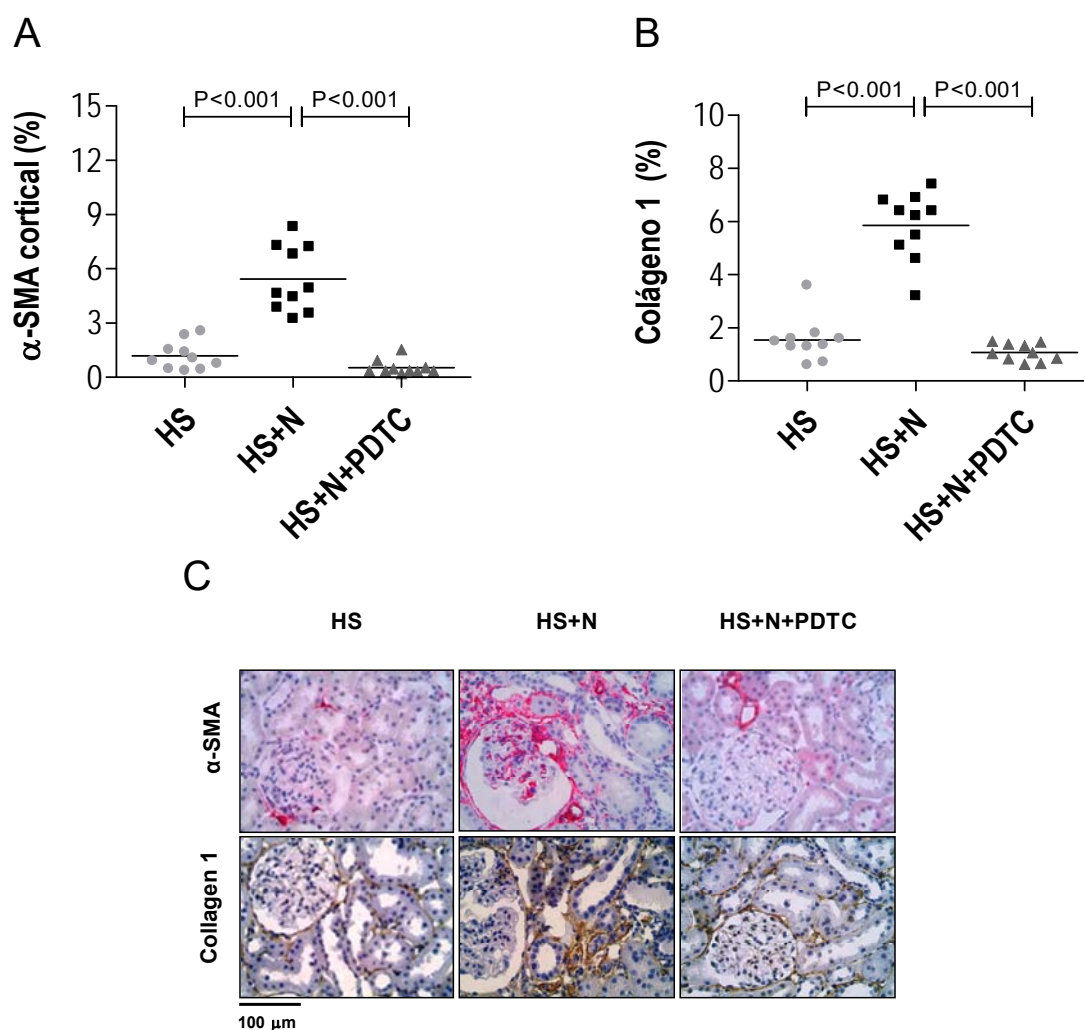


Figura 20 - α-SMA (A), colágeno 1 (B) e microfotografias representativas de α-SMA e colágeno 1 (C) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média ± EP

O conteúdo renal de AU voltou a aumentar nos animais HS+N e o bloqueio inicial temporário do sistema NF-kB preveniu esse aumento na fase tardia do modelo. Não houve diferença na concentração sérica de AU entre os grupos (Figura 21a, b).

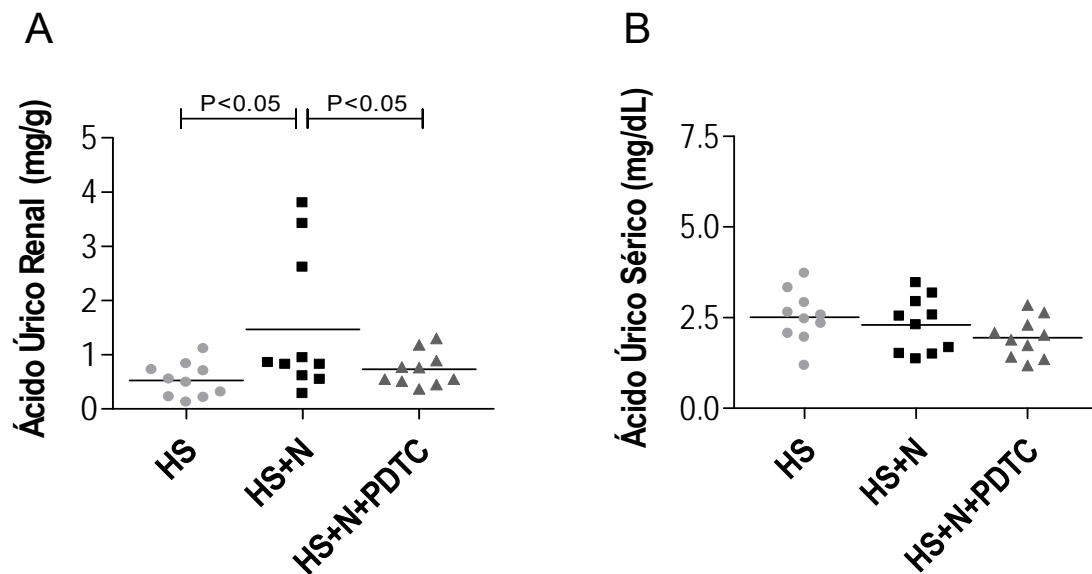


Figura 21 - Ácido úrico renal (A) e ácido úrico sérico (B) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

A expressão proteica do TLR4 e da subunidade p65 fosforilada na fração nuclear no tecido renal permaneceram aumentadas ao final das 28 semanas. Considerando que a IL-6 é um dos produtos finais da ativação do sistema NF- κ B, o aumento da expressão proteica renal da IL-6 era esperado. O tratamento com PDTC preveniu a ativação do sistema NF- κ B (Figura 22a-d).

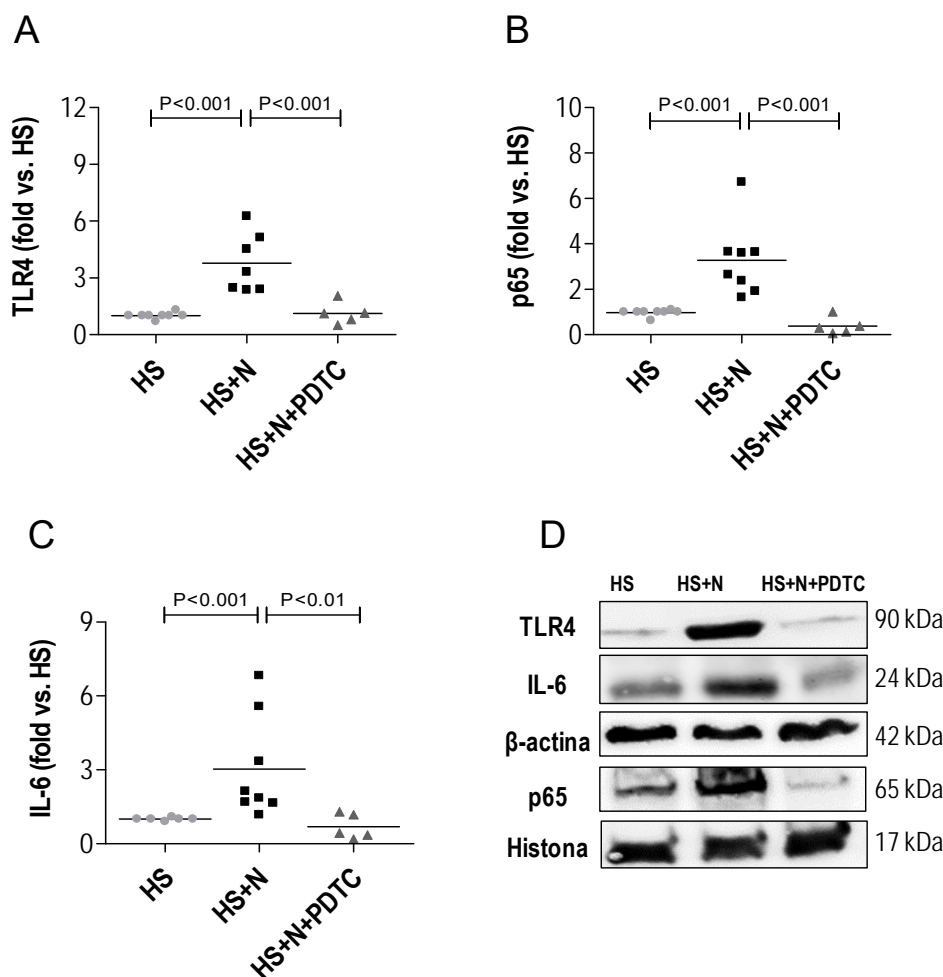


Figura 22 - Quantificação da expressão proteica TLR4 (A), p65 (B), IL-6 (C) e imagem representativa de Western blot para TLR4, IL-6 e p65 (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média \pm EP

Uma vez que houve a ativação do sistema NF- κ B, a formação do inflamassoma NLRP3 era esperada. Ao final das 28 semanas, a expressão proteica de caspase-1, NLRP3 e IL1 β também estava aumentada. Os animais que foram tratados com PDTC não apresentaram diferença nos valores de expressão proteica dos componentes do inflamassoma NLRP3 em relação ao grupo HS (Figura 23a-d).

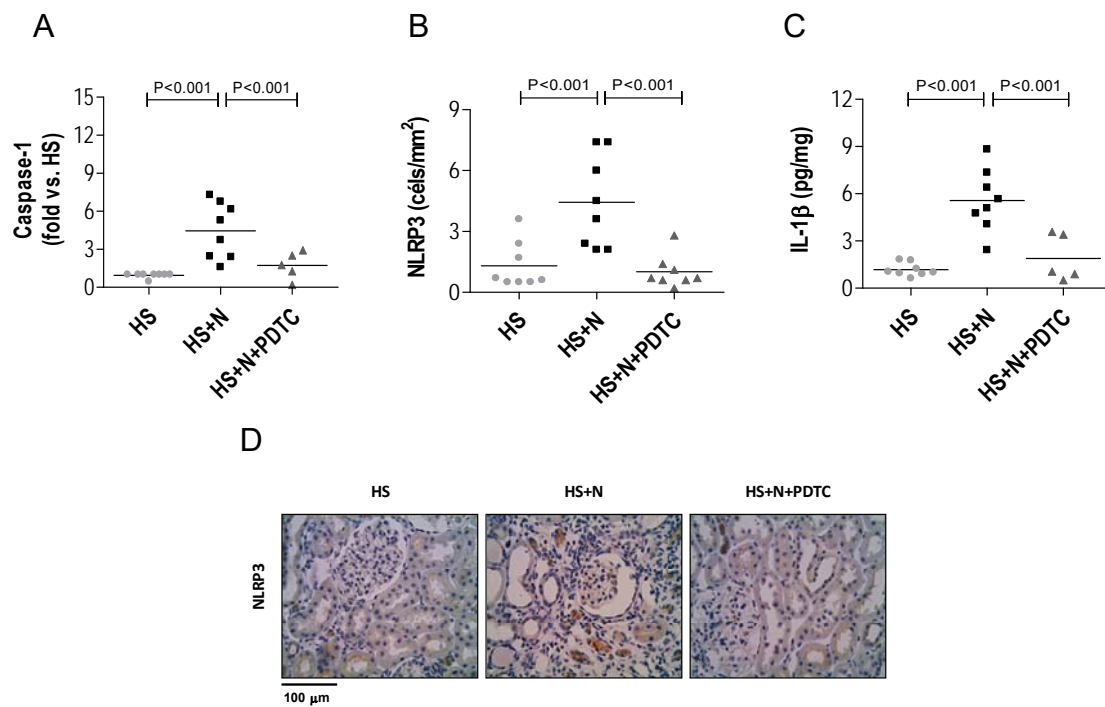


Figura 23 - Quantificação da expressão proteica caspase-1 (A), NLRP3 (B), IL-1β (C) e microfotografias representativas do NLRP3 (D) dos grupos HS, HS+N e HS+N+PDTC. Resultados analisados como Média ± EP

5. DISCUSSÃO

Conforme demonstrado anteriormente (23, 24, 44), a inibição temporária do óxido nítrico e sobrecarga salina promoveu hipertensão severa e albuminúria maciça, além de esclerose e isquemia glomerular. Também consistente com achados anteriores (8, 44), esses ratos exibiram intensa inflamação intersticial renal, indicada por infiltração por macrófagos, linfócitos e células positivas para AngII, em associação com deposição intersticial extensa de colágeno-1. No presente estudo, mostramos que essas manifestações de inflamação renal foram associadas e provavelmente desencadeadas pela ativação da imunidade inata, corroborando achados obtidos com outros modelos de DRC (41, 42). Duas vias principais de imunidade inata foram ativadas em ratos HS+N: o sistema NF- κ B, aqui representado pelo componente p65, com conseqüente regulação positiva da IL-6 e IL-1 β , dois mediadores inflamatórios bem conhecidos; e a via do inflamassoma caspase-1 / NLRP3.

Também consistente com nossos achados anteriores (24), quatro semanas após a interrupção do tratamento com HS+L-NAME (8 semanas), a magnitude da hipertensão e ALB foi acentuadamente atenuada, embora PC e ALB tenham permanecido significativamente maiores do que no grupo HS. Da mesma forma, a frequência dos glomérulos isquêmicos foi praticamente a metade da observada no final de quatro semanas de tratamento com HS+L-NAME (4 semanas). No entanto, a porcentagem de lesões glomeruloscleróticas caiu para níveis indistinguíveis do controle. Enquanto a regressão parcial da isquemia glomerular pode ser atribuída à melhora de fatores hemodinâmicos, como vasoconstrição aferente, a involução mais acentuada das lesões escleróticas sugere que o envolvimento glomerular observado na semana 4 consistiu basicamente na deposição de material extracelular, como matriz mesangial, sem comprometimento sério com qualquer parte da estrutura do tufo.

Em contraste com a regressão da lesão glomerular 4 semanas após a descontinuação do HS+L-NAME (8 semanas), a deposição intersticial de

colágeno permaneceu elevada em comparação com o grupo HS, indicando a persistência da fibrose intersticial. Esse achado poderia refletir apenas o fato de que o colágeno-1 é um pouco mais difícil de ser clivado do que os proteoglicanos e outros componentes de alta rotatividade da matriz extracelular (57). No entanto, a infiltração intersticial por linfócitos, macrófagos e miofibroblastos, denotada pela presença de α -SMA, ainda estava presente nesse momento, embora menos intensa do que imediatamente após o tratamento com HS+L-NAME, indicando a persistência de inflamação. Nota-se que a infiltração intersticial por células marcadas positivamente para AngII era ainda pior nesse momento do que imediatamente após a interrupção do tratamento com HS+L-NAME, corroborando nossa observação anterior (24). Esses achados indicam que, apesar da cicatrização aparente da lesão glomerular, a inflamação intersticial permaneceu ativa e que o acúmulo de colágeno nesse momento pode ter refletido a produção continuada.

A ativação da imunidade inata também persistiu 4 semanas após o término do tratamento com HS+L-NAME (8 semanas), envolvendo o Sinal 1 (via NF- κ B) e o Sinal 2 (via inflamassoma). Como várias citocinas pró-inflamatórias são liberadas nesse processo, com o conseqüente recrutamento de células inflamatórias para o rim, a ativação da imunidade inata pode ser o fator responsável pela manutenção da inflamação renal, mesmo após o término do tratamento com HS+L-NAME. A razão pela qual a imunidade inata permaneceu ativada não é clara. A imunidade inata pode interagir junto e por um longo tempo com imunidade adaptativa, conforme mostrado anteriormente para o modelo renal de ablação de 5/6 (27). No presente estudo, a ativação da imunidade adaptativa é sugerida pela infiltração renal observada pelos linfócitos; esse estímulo recíproco entre imunidade inata e adaptativa pode ter contribuído para perpetuar a inflamação em ratos HS+N. Outro *loop* de *feedback* positivo é representado pela proteína HMGB1, um ligante para TLR4 que pode ser liberado por células danificadas (funcionando assim como um DAMP auto estimador) (58). Uma outra possibilidade é representada pela ativação de NF- κ B por AngII, talvez através da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio. Como o número de células positivas para AngII permaneceu aumentado, esse pode ser um fator que leva à estimulação

contínua de NF- κ B (34, 59, 60). Por outro lado, a ativação de NF- κ B pode aumentar a produção de AngII via IL-6 (61), fechando assim outro ciclo de *feedback* positivo. Juntos, esses mecanismos complexos podem explicar a persistência da inflamação renal no cenário de regressão aparente da lesão estrutural.

A persistência da infiltração de células inflamatórias e deposição de colágeno no tecido renal na semana 8 pode refletir apenas uma involução incompleta, mas em andamento, de modo que, com tempo suficiente, ocorreria uma melhora completa do processo inflamatório. No entanto, quando examinamos os dados obtidos na semana 28, fica claro que um novo processo de lesão/inflamação renal ocorreu, com uma grande frequência de glomérulos passando por lesão esclerótica e uma área substancial do córtex renal absorvida pelo colágeno, enquanto a densidade de linfócitos intersticiais e macrófagos permaneceu elevada de maneira acentuada. Em um estudo anterior (24), mostramos que esse cenário estava associado à infiltração intersticial renal por células AngII positivas persistente, e que o tratamento com losartan durante o tratamento com HS+L-NAME preveniu o desenvolvimento subsequente de glomerulosclerose e fibrose intersticial, indicando que a ativação precoce e duradoura do RAS determinou o estabelecimento de uma nefropatia progressiva a longo prazo. Outros pesquisadores descobriram que uma consequência a longo prazo do tratamento temporário com L-NAME foi o desenvolvimento de inflamação renal leve associada à hipertensão sensível ao sal (62). Da mesma forma, o desenvolvimento a longo prazo da doença renal progressiva foi demonstrado após estresse renal de curta duração com aminonucleosídeo de puromicina (63), com sobrecarga de proteínas (64) e infusão de AngII (65).

A razão pela qual o RAS local permanece ativado por muito tempo após o término do tratamento com HS+L-NAME não é clara, mas pode ser explicada pela ativação contínua da imunidade inata. No presente estudo, o agravamento progressivo da albuminúria e o desenvolvimento de glomerulosclerose e fibrose intersticial após o tratamento com HS+L-NAME foram associados não apenas à infiltração duradoura por células positivas para AngII, mas também à ativação contínua da imunidade inata. O aumento da expressão da porção p65 indica a

ativação do Sinal 1 (a via NF- κ B), um achado corroborado pelo aumento da abundância de IL-6 e TLR4, enquanto que a ativação do Sinal 2 foi novamente indicada pela expressão de NLRP3, Caspase-1 e IL-1 β . A ativação concomitante da imunidade inata e do RAS neste momento indica que a interação dos dois sistemas persistiu, ajudando a explicar a perpetuação da lesão renal nesses animais.

O conteúdo renal da AU aumentou acentuadamente após o tratamento com HS+L-NAME (4 semanas). O AU tem sido apontado como um possível estimulante da imunidade inata, como resultado de um efeito direto e/ou por precipitação de cristais (66-68), atuando como um DAMP. O aumento do conteúdo renal de AU pode ter resultado da retenção devido à insuficiência da função renal. No entanto, os níveis circulantes de AU nunca foram aumentados em ratos HS+N, indicando que os rins têm pouca influência no *clearance* do AU, o que também pode ser pela presença generalizada de uricase (69). Essas observações sugerem que o aumento dos níveis renais de AU resultou da produção local. No entanto, a relevância patogênica do AU renal neste modelo é questionável, pois, embora os níveis de UA renal tenham sido elevados nas 4 e 28 semanas, eles estavam perto dos níveis dos animais controle na com 8 semanas, em um momento em que a imunidade inata permaneceu totalmente ativada.

O PDTC tem sido amplamente empregado como inibidor do sistema NF- κ B (41, 46, 47). Como esperado (44), a administração de PDTC durante o tratamento com HS+L-NAME bloqueou a ativação da via do NF- κ B. Conseqüentemente, o bloqueio do sistema NF- κ B impediu o desenvolvimento de inflamação renal durante este período inicial de quatro semanas. Como resultado, a albuminúria, juntamente com a lesão glomerular e intersticial, foi igualmente limitada. Além disso, o PDTC também impediu a ativação da via do inflamassoma NLRP3. Esse efeito pode ter contribuído para a renoproteção proporcionada pelo tratamento com PDTC, embora possa ser uma mera consequência da preservação renal e da interrupção do ciclo de retroalimentação positiva que liga o dano celular e a ativação da imunidade inata por DAMPs (70). Quatro semanas após o término do tratamento com HS+L-NAME (8 semanas), as vias do inflamassoma NLRP3 e do NF- κ B

permaneceram inativas em ratos que receberam tratamento concomitante com PDTC. A densidade de linfócitos intersticiais e células positivas para AngII foi semelhante à encontrada em ratos HS, embora a intensidade da infiltração por macrófagos ainda estivesse levemente elevada. Consequentemente, a glomerulosclerose e a deposição intersticial de colágeno eram indistinguíveis daquelas observadas nos animais HS. Um quadro semelhante foi observado nos ratos com 28 semanas, quando até a densidade de macrófagos renais estava próxima do controle, mostrando que o tratamento com PDTC proporcionou proteção duradoura contra o desenvolvimento de lesão renal progressiva e inflamação resultantes do tratamento com HS+L-NAME.

6. CONCLUSÕES

Juntos, os achados do presente estudo reforçam a noção de que eventos intra-renais imediatamente após um insulto inicial são cruciais para o desenvolvimento posterior de lesão renal progressiva. Em estudos anteriores (4), mostramos que essas etapas iniciais envolviam a participação do sistema local renina-angiotensina. O presente estudo traz evidências de que a ativação renal da imunidade inata e, em particular, do sistema NF- κ B, também é um componente importante dessa sequência precoce. A intervenção agressiva desses eventos iniciais, inibindo o sistema RAS e/ou NF- κ B, pode se tornar um ativo terapêutico eficaz para deter a lesão renal antes que a função renal se torne severa e irreversivelmente comprometida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hallan SI, Ovrehus MA, Romundstad S, Rifkin D, Langhammer A, Stevens PE, et al. Long-term trends in the prevalence of chronic kidney disease and the influence of cardiovascular risk factors in Norway. *Kidney Int.* 2016;90(3):665-73.
2. Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS, et al. Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *Ann Intern Med.* 2016;165(7):473-81.
3. Shin HY, Kang HT. Recent trends in the prevalence of chronic kidney disease in Korean adults: Korean National Health and Nutrition Examination Survey from 1998 to 2013. *J Nephrol.* 2016;29(6):799-807.
4. Thome FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol.* 2019;41(2):208-14.
5. Lan HY, Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease. *Semin Nephrol.* 2012;32(3):236-43.
6. Kida Y, Duffield JS. Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38(7):467-73.
7. Floege J, Burns MW, Alpers CE, Yoshimura A, Pritzl P, Gordon K, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int.* 1992;41(2):297-309.
8. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha, De Nucci G, Zatz R. Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension.* 2001;37(1):170-5.
9. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease--are interventions possible? *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(3):363-8.
10. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1819-34.
11. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Exp Nephrol.* 1996;4 Suppl 1:34-40.

12. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1991;39(3):550-6.
13. Bastos MG CW, Abrita RR, Almeida EC, Mafra D, Costa DMN,, Golçasves JA OL, Santos FR, and Paula RB. Doença renal crônica: problemas e soluções 2004; 26:[202-15 pp.].
14. Cherchiglia M ME, Szuster DAC, Andrade EIG,, Acúrcio FA CW, Sesso R, Guerra Júnior AA, Queiroz OV, Gomes IC. Perfil Epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil. *Revista de Saúde Pública (USP Impresso) [Internet]*. 2010; 44:[639-49 pp.].
15. VS E. Avaliação da Assistência e da Qualidade de Vida do Paciente de Hemodiálise na Região Metropolitana do Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro; 2009.
16. Junior JER. A Doença Renal Crônica: do Diagnóstico ao tratamento. *Prática Hospitalar [Internet]*. 2007; Ano IX.(52).
17. Silva G. Avaliação dos gastos realizados pelo Ministério da Saúde com medicamentos de alto custo utilizados no tratamento da DRC por pacientes do SUS no Estado de Minas Gerais – 2000 a 2004: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
18. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83-94.
19. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-6.
20. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9.
21. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.* 1995;221(3):220-35.
22. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992;20(3):298-303.

23. Fujihara CK, Michellazzo SM, de Nucci G, Zatz R. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):F697-705.
24. Fujihara CK, Sena CR, Malheiros DM, Mattar AL, Zatz R. Short-term nitric oxide inhibition induces progressive nephropathy after regression of initial renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(3):F632-40.
25. Anders HJ, Schlondorff D. Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007;16(3):177-83.
26. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(1):41-8.
27. Fanelli C, Arias SCA, Machado FG, Okuma JK, Malheiros DMAC, Azevedo H, et al. Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. *Sci Rep*. 2017;7(1):3192.
28. Gomolak JR, Didion SP. A role for innate immunity in the development of hypertension. *Med Hypotheses*. 2014;83(6):640-3.
29. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
30. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(3):381-99.
31. Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, Câmara NO. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):428-35.
32. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1066-71.
33. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int*. 1995;48(4):1263-71.
34. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B

activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol.* 1998;161(1):430-9.

35. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature.* 1993;365(6442):182-5.

36. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1254-62.

37. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(10):2505-12.

38. Mezzano SA, Barría M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, et al. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int.* 2001;60(4):1366-77.

39. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, Lang P, Valanciué A, Remy P, et al. Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(8):1648-58.

40. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia.* 1999;42(2):222-32.

41. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DM, Vieira JM, Zatz R. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):F92-9.

42. Okabe C, Borges RL, de Almeida DC, Fanelli C, Barlette GP, Machado FG, et al. NF-kB activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305(2):F155-63.

43. Faustino VD, Arias SCA, Ferreira Ávila V, Foresto-Neto O, Zambom FFF, Machado FG, et al. Simultaneous activation of innate and adaptive immunity participates in the development of renal injury in a model of heavy proteinuria. *Biosci Rep.* 2018;38(4).

44. Zambom FFF, Oliveira KC, Foresto-Neto O, Faustino VD, Ávila VF, Albino AH, et al. Pathogenic role of innate immunity in a model of chronic NO inhibition associated with salt overload. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019.
45. Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med*. 1992;175(5):1181-94.
46. Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Br J Pharmacol*. 2002;135(2):496-510.
47. Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Nephron Physiol*. 2004;98(4):p97-106.
48. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*. 2004;14(21):1929-34.
49. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003;425(6957):516-21.
50. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-26.
51. Taniguchi S, Sagara J. Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Semin Immunopathol*. 2007;29(3):231-8.
52. Anders HJ, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(6):1007-18.
53. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137-61.
54. Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol*. 2012;13(4):352-7.
55. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007;27(4):549-59.

56. Mattar AL, Machado FG, Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R. Persistent hypertension and progressive renal injury induced by salt overload after short term nitric oxide inhibition. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62(6):749-56.
57. Sprangers S, Everts V. Molecular pathways of cell-mediated degradation of fibrillar collagen. *Matrix Biol*. 2019;75-76:190-200.
58. Goligorsky MS. TLR4 and HMGB1: partners in crime? *Kidney Int*. 2011;80(5):450-2.
59. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int*. 2002;61(6):1986-95.
60. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 1999;84(6):695-703.
61. O'Leary R, Penrose H, Miyata K, Satou R. Macrophage-derived IL-6 contributes to ANG II-mediated angiotensinogen stimulation in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(10):F1000-7.
62. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincón J, Chávez M, Parra G, et al. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281(1):F38-47.
63. Anderson S, Diamond JR, Karnovsky MJ, Brenner BM. Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 1988;82(5):1757-68.
64. Alvarez V, Quiroz Y, Nava M, Pons H, Rodríguez-Iturbe B. Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283(5):F1132-41.
65. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Gordon K, Rincón J, Chávez M, et al. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. *Kidney Int*. 2001;59(6):2222-32.
66. Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018;18(11):63.
67. Romero CA, Remor A, Latini A, De Paul AL, Torres AI, Mukdsi JH. Uric acid activates NLRP3 inflammasome in an in-vivo model of epithelial to mesenchymal transition in the kidney. *J Mol Histol*. 2017;48(3):209-18.

68. Liu H, Xiong J, He T, Xiao T, Li Y, Yu Y, et al. High Uric Acid-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells via the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Am J Nephrol*. 2017;46(4):333-42.
69. Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol*. 1992;34(1):78-84.
70. Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(3):416-25.