Tárcio Teodoro Braga

**Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a
contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4
e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da
fibrose renal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

Tárcio Teodoro Braga

**Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a
contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4
e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da
fibrose renal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Braga, Tércio Teodoro.

Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4 e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da fibrose renal / Tércio Teodoro Braga. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de fibrose após doença renal crônica.

Versão do título para o inglês: Involvement of different subtypes of macrophages and the contribution of soluble uric acid, the receptors TLR2 and TLR4 and MyD88 and NLRP3 molecules to the development of renal fibrosis.

1. Fibrose renal 2. Ácido úrico solúvel 3. Inflamassoma 4. Macrófagos 5. Resposta imune Th2 I. Câmara, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB070/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tércio Teodoro Braga.

Título da Tese: Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a
contribuição do ácido úrico solúvel , dos receptores TLR2 e TLR4
e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento
da fibrose renal.

Orientador(a): Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **45** nas fls. **69** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Niels Olsen Saraiva Câmara, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Balanço Th1/Th2 e o desenvolvimento de fibrose renal em modelos experimentais** do qual participou(aram) o(s) alunos **Tárcio Teodoro Braga**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **15.05.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de maio de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Ao vovô Laerte, quem sempre me incentivou a leitura!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo! Agradeço pela benção da vida. Agradeço por todas as oportunidades que se abrem para mim. Pela oportunidade de estar hoje aqui na Terra. E agradeço por todas as pessoas que Ele colocou no meu caminho.

Agradeço aos animais de laboratório, essenciais para o desenvolvimento da ciência nos dias de hoje. Espero que suas vidas sejam sempre tratadas com muito respeito.

Agradeço a toda minha família, que é minha base. A todos os meus antepassados. Sem eles, eu não estaria aqui. Agradeço, em especial, à memória de minha avó Virgínia, vovô Sinval e avó Leda. Agradeço à minha avó Diná e ao vovô Laerte, a quem mais me espelho na vida. Aos meus pais, meu maior exemplo de amor. Eles são, sem dúvida, os maiores responsáveis pela minha caminhada. Desde sempre! Eles são a minha maior torcida para eu ter chegado aqui onde estou. Agradeço a duas anjinhas na minha vida. Elas são o maior presente que eu tive. As maiores cúmplices e melhores amigas. Obrigado Lilian e Gísia! Meus agradecimentos aos sobrinhos Samuel e Helen, que trazem uma energia especial toda vez que volto para casa.

Agradeço aos meus amigos. Sem amizade nada faz sentido. Aos amigos que fiz em São Paulo e aqueles de mais tempo.

Agradeço ao meu grande amigo Matheus, sempre muito prestativo. A pessoa mais altruísta que já conheci. Foi ele quem me indicou o laboratório onde estou e me ajudou desde que cheguei. Pessoa com coração enorme e que, com certeza, continuará caminhando comigo.

Agradeço ao Reinaldo e sua família, sempre muito acolhedores e que sempre me apoiaram com sorrisos nos lábios. Obrigado pelos momentos divididos.

Agradeço à Claudinha, uma mãezona no nosso laboratório. Sempre disposta a nos ajudar. Obrigado pelos abraços em todas as manhãs. Os dias começam melhores assim.

Agradeço ao Professor Niels! Obrigado pelas portas abertas para o laboratório. Agradeço pelo incentivo à pesquisa. Pela confiança no desenvolvimento do meu projeto e pela troca de informações. Sempre o verei como um batalhador. Um sinônimo de trabalho.

Agradeço ao Candinho, Zidane, Ênio, Felizardo, Rodrigo Nalio, Mary, Cris, Matheus, Reinaldo e à Angela. Com vocês o tempo no laboratório sempre parece mais divertido. Vocês no laboratório sempre fizeram com que ciência pareça uma brincadeira gostosa, tanto pelas discussões científicas, quanto pela descontração.

Agradeço aos funcionários do ICB-IV por todo o suporte diário. Obrigado ao Otacílio e ao Miltão da portaria, à Meire por toda a ajuda no laboratório, à Áurea pelos sorrisos no

corredor, à Paula, ao Rogerinho, Cris, Célia, Jotelma, Eni, Amanda, Márcio, Moisés, e a todos do biotério, como o Israel, o Valdo, Márcio, Raimundo e à Sílvia

Agradeço aos amigos do ICB-IV, em especial ao pessoal que já passou ou que ainda está no laboratório: Marcela, Marcelli, Guilherme, Marisinha, Carol, Denis, Felipe, Felipe Valença, Lis, Flávia, Caricilli, Pedro, Rafael, Bento, Alex Júnior, Carlinha, Maristella, Richardt, Gi, Rosinha, Marina, Fernanda, Fernanda Terra, Daniel, Jean, Tochiquinho... Agradeço também a todos do Laboratório da Unifesp pela amizade e pela troca de conhecimentos. Agradeço ao Marquinhos pelo exemplo a se seguir, pelo Rafael Topo, Juan, Patrícia Semedo, Cassiano, Bruna, Ana Paula, Vanessa, Alex, Janice, dentre tantos outros nomes.

Agradeço ao Bruno e ao Yuri pelos desafios e trocas de experiências. Torço muito pelo sucesso de vocês.

Agradeço a todos os mestres que encontrei durante o caminho. Obrigado a todos os professores, desde o jardim de infância até a pós-graduação. Obrigado pelos exemplos e pela vontade despertada em mim de me tornar um dia um professor.

Agradeço aos amigos de muitas datas: João, Tiago, Mari, Matheus, Lucinha, Lilian, Nina e Caligo. Saibam que meu coração bate diferente quando penso em cada um de vocês. É de encher os olhos de lágrimas!

Agradeço à minha melhor amiga: Mari. Uma anjinha na minha vida. Obrigado por me deixar sorrindo à toa. Só vibrando amor e paz. Obrigado pelas danças nas melhores músicas que já tocaram até hoje na minha vida. Obrigado pelo caminho que você me faz ver em minha frente. Obrigado por me deixar sonhando do jeito que estou e pela vontade de te fazer FELIZ. Desse jeito em maiúsculo.

Agradeço a todas as pessoas não citadas aqui, mas não menos importantes.

Enfim, agradeço a Deus por TUDO.

Obrigado, obrigado, obrigado!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia de Transplantes (LIT), do departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 552083/2009-7, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

“Haverá uma época em que a humanidade não mais precisará ir às igrejas e o culto a Deus será dentro de nós mesmos, sem imagens. E faremos de nosso corpo o templo de nossas orações num amor universal, fazendo-se, portanto, o templo vivo do Espírito Santo e igreja exemplar do Cristo.”

Laerte Teodoro de Andrade

RESUMO

Braga TT. Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4 e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da fibrose renal. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A doença renal crônica é uma doença mediada pelo sistema imune e caracterizada por fibrose. O tecido lesado libera moléculas, como o ácido úrico solúvel, resultantes da degradação da matriz extracelular ou células mortas, que podem ativar TLR e NLR, o que leva à translocação de MyD88 em muitos tipos de células. Esta modulação do sistema imune interfere na ativação de diferentes subtipos de macrófagos e na atividade das células TCD4⁺, com o paradigma Th1/Th2 considerado um possível mecanismo efetor de fibrose. Camundongos deficientes em TLR2, TLR4, MyD88 e NLRP3 se mostraram protegidos, quando comparados aos animais selvagens, frente ao dano renal e à deposição de colágeno após serem submetidos à obstrução unilateral do ureter (UUO). Além disso, os camundongos protegidos exibiram menor produção de citocinas relacionadas com um perfil imune Th2 e apresentaram menor acúmulo de macrófagos do subtipo M2. Verificamos que o desenvolvimento da fibrose correlaciona-se com a infiltração de células imunes e que os macrófagos possuem papel ativo em tal processo. Inicialmente, creditamos aos macrófagos M2 o papel de macrófagos formadores de fibrose uma vez que tal subpopulação é encontrada em maior número aos sete dias após a UUO em animais WT, porém, vimos que os personagens centrais no desenvolvimento da fibrose são macrófagos M1, encontrados no início da lesão renal, mesmo que tais células possam mudar seu fenótipo com a cronicidade da doença. A participação dos macrófagos M1 para o desenvolvimento da fibrose foi confirmada com a injeção de M1 deficientes em Stat6 em camundongos Rag KO anteriormente depletados com clodronato e submetidos à UUO, nos quais observamos maior proteinúria e maior deposição de colágeno. Além disso, vimos que o ácido úrico é a molécula capaz de induzir a troca de fenótipo de M1 para M2 ao longo da UUO, além de ser capaz de ativar a via do inflamassoma, com consequente produção de IL1 β . Animais selvagens cuja xantina desidrogenase foi inibida demonstram menor ativação da via do inflamassoma e menor fibrose, enquanto que animais injetados com ácido úrico demonstram piores prognósticos frente à UUO. O ácido úrico solúvel é liberado em um contexto de hipóxia subsequente à obstrução mecânica do ureter e ele é capaz de ativar o complexo do inflamassoma NLRP3 por mecanismos diferentes, mas complementares. Portanto, o dano renal observado com a sinalização do ácido úrico solúvel via receptores da imunidade inata presente em macrófagos infiltrantes traz como consequência a deposição de proteínas no interstício renal e formação de um quadro de fibrose.

Palavras-chave: Fibrose renal. Ácido úrico solúvel. Inflamassoma. Macrófagos. Resposta imune Th2.

ABSTRACT

Braga TT. Involvement of different subtypes of macrophages and the contribution of soluble uric acid, the receptors TLR2 and TLR4 and MyD88 and NLRP3 molecules to the development of renal fibrosis. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chronic kidney disease is an immune mediated disease characterized by fibrosis development. The damaged tissue releases molecules such as soluble uric acid resulting from the degradation of extracellular matrix or dead cells, which activate TLR and NLR, leading to the translocation of MyD88 in many cell types. This modulation of the immune system interferes with the activation of different subtypes of macrophages and activity of CD4⁺ T cells, with the Th1/Th2 paradigm as a possible effector mechanism of fibrosis. TLR2, TLR4, MyD88, and NLRP3 deficient mice are protected against renal damage and collagen deposition after being submitted to unilateral ureteral obstruction (UUO), when compared to wild type animals. Moreover, protected mice exhibited less production of Th2 related cytokines and reduced accumulation of M2 macrophages. We found that the development of fibrosis correlates with the infiltration of immune cells and macrophages possess an active role in this process. Initially, we hypothesized M2 macrophages are responsible for fibrosis formation since this subset is found in greater numbers seven days after UUO in WT mice, however, we observed the central characters on the development of fibrosis are M1 macrophages found in the onset of renal injury, even if such cells can change their phenotype through the chronicity of the disease. The participation of macrophages M1 for the development of fibrosis was confirmed by the injection of Stat6 KO M1 into Rag deficient mice previously depleted with clodronate and subjected to UUO, in which we observed higher proteinuria and increased collagen deposition. We also observed that uric acid is able to induce the exchange of phenotype from M1 to M2 along the UUO, besides being able to activate the inflammasome pathway. WT animals whose xanthine dehydrogenase was inhibited showed less activation of the inflammasome pathway and less fibrosis, whereas animals injected with uric acid demonstrate poorer prognosis opposite UUO. Soluble uric acid is released in the context of hypoxia and activates the NLRP3 inflammasome complex by different, but complementary mechanisms. Therefore, the renal damage releases soluble uric acid, which signals via innate immune receptors present in infiltrating macrophages, and the damage brings as a consequence the deposition of proteins in the renal interstitium, culminating in fibrosis.

Keywords: Renal fibrosis. Soluble uric acid. Inflammasome. Macrophages. Th2 immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC	Doença Renal Crônica
APC	Células apresentadoras de antígeno
α-sma	<i>α-smooth muscle actin</i>
BMP-7	<i>Bone morphogenic protein-7</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CFU-GM	<i>Colony former unity – Granulocyte/Monocyte</i>
DAMP	Padrão molecular relacionado ao perigo
ECM	Matriz extracelular
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IR	Isquemia e reperfusão
IRF	Fator regulador de interferon
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	Domínio C-terminal rico em repetições de leucina
LT	Leucotrieno
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MCSF	<i>Monocyte-colony stimulating factor</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	Receptor do tipo NOD
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMP	Padrão molecular relacionado à patógenos
PGE	Prostaglandina

PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
T3SS	<i>Type 3 Secretion System</i>
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF-β	<i>Tumor Growth Factor-β</i>
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
TRS	Terapia renal substitutiva
UUO	Obstrução Unilateral do Ureter
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ROS	Espécies reativas de oxigênio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – MyD88, TLR2 e TLR4 e a fibrose renal	49
Figura 2 – Padrão de resposta imune do tipo Th2 nos animais WT, TLR2, TLR4 e MyD88 KO submetidos à UUO	51
Figura 3 – Caracterização fenotípica das células renais em animais WT, TLR2, TLR4 e MyD88 KO após UUO	55
Figura 4 – Deficiência de IL4 prejudica a resposta imune Th2/M2 após UUO	53
Figura 5 – Resposta imune Th2 gera perda da função renal e aumento da fibrose	54
Figura 6 – Importância das células de origem hematopoiética para o desenvolvimento da fibrose renal	55
Figura 7 – Macrófagos influenciam diretamente o desenvolvimento da fibrose renal	56
Figura 8 – Caracterização morfológica das diferentes subpopulações de macrófagos ...	57
Figura 9 – Caracterização fenotípica das diferentes subpopulações de macrófagos	58
Figura 10 – Padrão de expressão de genes relacionados à matriz pelas diferentes subpopulações de macrófagos	59
Figura 11 – Remodelamento da matriz pelas diferentes subpopulações de macrófagos .	60
Figura 12 – Macrófagos M1 se tornam M2 e geram maior fibrose após sua transferência para camundongos Rag1 KO	61
Figura 13 – Transferência de macrófagos M1 leva a perfil mais inflamatório e mais fibrótico	64
Figura 14 – Caracterização fenotípica dos macrófagos não polarizáveis ao perfil M2 ...	65
Figura 15 – Macrófagos M1 são os causadores da fibrose renal	66
Figura 16 – Moléculas relacionadas com o inflamassoma e o ácido úrico oriundo de um ambiente de hipóxia são aumentados após a UUO	68

Figura 17 – Animais deficientes ou em MyD88 ou NLRP3 são protegidos contra fibrose renal	70
Figura 18 – A injeção de ácido úrico solúvel seguida pela UUO leva a um quadro de inflamação e fibrose	71
Figura 19 – A injeção de ácido úrico solúvel seguida pela UUO acarreta no acúmulo de macrófagos de perfil M2	72
Figura 20 – Inibição do ácido úrico resulta em melhor função renal, menor fibrose e diminuída resposta Th2	74
Figura 21 – O ácido úrico solúvel é responsável pela polarização dos macrófagos em M2 e pela ativação do inflamassoma <i>in vitro</i>	75
Figura 22 – O ácido úrico solúvel ativa o inflamassoma de maneira dependente de NLRP3	77
Figura 23 – Hipóxia induz ativação do inflamassoma	78
Figura 24 – O ácido úrico ativa a via do inflamassoma através de diferentes maneiras	80
Figura suplementar A.1 – Estratégia de seleção de células infiltrantes renais aos 7 dias após a cirurgia de UUO	99
Figura suplementar A.2 – Análise de macrófagos renais	100
Figura suplementar A.3 – Ativação da via do inflamassoma pelo ácido úrico solúvel	101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Doença Renal Crônica	19
1.2 Modelo Experimental da DRC	19
1.3 Fibrose	20
1.4 Imunidade Inata: TLR e NLR	22
<i>1.4.1 Receptores do tipo Toll (TLR)</i>	22
<i>1.4.2 Receptores do tipo Nod (NLR)</i>	23
1.4.2.1 Inflamassoma	24
1.5 Papel de TLR e NLR na Lesão Renal	26
1.6 Balanço Th1/Th2 no Desenvolvimento da Fibrose	27
1.7 Subtipos de Macrófagos	28
1.8 Contribuições de Macrófagos na DRC	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Modelo de Obstrução Unilateral do Ureter (UUO)	33
3.3 Tratamentos utilizados no modelo <i>in vivo</i> de UUO	33
3.4 Geração de camundongos quiméricos	34
3.5 Preparação de lipossomas e depleção de macrófagos	34
3.6 Células utilizadas <i>in vitro</i>	35
3.7 Tratamentos utilizados no modelo <i>in vitro</i>	36
3.8 Ensaio de migração em sistema transwell	36
3.9 Preparação da matriz tridimensional (3D) de colágeno tipo I e fibronectina	37
3.10 Análise ultra-estrutural dos macrófagos	37
3.11 Taxa de consumo de oxigênio	38
3.12 Transfecção celular e leitura da atividade da luciferase	39
3.13 Análises bioquímicas	39
3.14 RT-PCR em tempo real	40
3.15 Análise de expressão gênica por microarray	41

3.16	Western Blot	42
3.17	Dosagem de citocinas.....	43
3.18	Análises histológicas	44
3.19	Imunohistoquímica.....	44
3.20	Quantificação da fibrose túbulo-intersticial	44
3.21	Determinação da presença de hipóxia	45
3.22	Quantificação de hidroxiprolina	46
3.23	Atividade da arginase.....	46
3.24	Citometria de Fluxo.....	46
3.25	Análise estatística dos dados.....	47
4	RESULTADOS	48
4.1	TLR2, TLR4 e MyD88 estão envolvidos no desenvolvimento da fibrose tecidual ...	48
4.2	Sinalização via MyD88 favorece um perfil de resposta imune do tipo Th2 no contexto renal.....	48
4.3	Perfil de resposta imune do tipo Th2 no desenvolvimento da fibrose	52
4.4	Células de origem hematopoiética são as responsáveis pelo desenvolvimento da fibrose renal	54
4.5	Macrófagos M0 apresentam maior capacidade de migração quando comparados com macrófagos M1 e M2	57
4.6	Macrófagos do subtipo M1 repopulam os rins submetidos à UUO e passam a apresentar marcadores relacionados ao perfil M2	61
4.7	A transferência de macrófagos com perfil M1 leva a uma piora no quadro fibrótico	63
4.8	O ácido úrico é liberado após um quadro de hipóxia e é capaz de ativar a via do inflamassoma.....	66
4.9	A ativação do inflamassoma NLRP3 via ácido úrico é responsável pelo dano renal	69
4.10	O bloqueio do ácido úrico leva a um melhor prognóstico frente à UUO	73
4.11	O ácido úrico é o responsável pela polarização de macrófagos para um perfil M2..	73
4.12	A hipóxia das células leva à ativação do inflamassoma	77
4.13	O ácido úrico ativa a via do inflamassoma através de diferentes sinais.....	78
5	DISCUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÕES.....	88
6.1	Quanto à participação das moléculas TLR2, TLR4 e MyD88 no desenvolvimento da fibrose	88

6.2 Quanto à participação de diferentes subpopulações de macrófagos no desenvolvimento da fibrose.....	88
6.3 Quanto à participação do ácido úrico solúvel na ativação do inflamassoma NLRP3 e posterior desenvolvimento da fibrose	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE - Figuras suplementares	99
Figura Suplementar A1.....	99
Figura Suplementar A2.....	100
Figura Suplementar A3.....	101
ANEXO - Tabelas de genes analisados por PCR Array	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica

A incidência de Doença Renal Crônica terminal (DRC) está aumentando em todo mundo (1). A constatação, a partir da década passada, da alta incidência e prevalência da DRC, que necessitam de tratamento pela diálise e ou pelo transplante renal, vem mobilizando a comunidade científica mundial e autoridades de Saúde Pública, na busca de estratégias adequadas de prevenção da doença. Em 1994, 24.000 pacientes eram mantidos em diálise e em 2004 esse número atingiu 59.153 (dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia). De acordo com a SBN, em 2002 o Brasil mantinha 54.523 pacientes em diálise, com prevalência média no país de 312 pacientes pmp (www.saude.gov.br/svs). O custo anual do Ministério da Saúde, com o programa de terapia renal substitutiva (TRS) no Brasil, foi de 663.200.400,00 reais em 2000 e atualmente está em torno de 1,4 bilhões de reais ao ano. O custo médio mensal de um paciente renal crônico em TRS está em torno de 1.800,00 reais (1).

A DRC é um problema de saúde altamente prevalente na população geral, sendo associada a uma alta taxa de mortalidade, principalmente em decorrência de complicações cardiovasculares (2). Vários modelos animais têm sido utilizados para estudar diferentes características de DRC (3), ao passo que o uso de camundongos geneticamente modificados tem expandido muito a utilidade deste modelo em estudar os mecanismos moleculares subjacentes à resposta renal aos insultos crônicos (4). Especificamente, a DRC induz a infiltração celular para o rim principalmente de macrófagos, que produzem fatores de crescimento e citocinas, que em última análise, induzem o desequilíbrio entre a apoptose e a proliferação das células tubulares, o que favorece a ativação e proliferação de fibroblastos. Fibroblastos ativados produzem componentes da matriz extracelular (ECM) que se acumulam no interstício, e caso o dano seja contínuo, a deposição de ECM torna-se massiva, e a apoptose descontrolada das células resulta na atrofia tubular (4). Este remodelamento da matriz e o estresse celular podem liberar moléculas que finalmente instigam uma resposta inflamatória.

1.2 Modelo Experimental da DRC

Um modelo muito popular e de uso crescente (principalmente em ratos e camundongos) para o estudo de fibrose renal é o da obstrução completa e unilateral do ureter (*unilateral*

ureteral obstruction, UUO). A UUO obstrui completa e agudamente o ureter. Esse quadro é dificilmente encontrado em humanos, mas apresenta a vantagem de mimetizar de uma maneira acelerada os diferentes estágios da fibrose intersticial. Algumas características desse modelo começam a partir de uma semana após a ligadura do ureter. A UUO resulta em diversos eventos celulares e moleculares característicos do processo inicial de fibrose e de sua progressão, sendo assim um ideal modelo de estudo de doenças renais crônicas. Nesse modelo podemos encontrar: infiltração celular ao parênquima renal, proliferação e apoptose tubular, transição epitélio-mesenquimal (TEM), acumulação de miofibroblastos no parênquima renal, aumento do depósito da ECM e atrofia tubular. Essas características patológicas aparecem rapidamente e são altamente reprodutíveis entre os experimentos.

A inflamação do compartimento túbulo-intersticial, que resulta na fibrose, é um dos principais fatores da perda progressiva da função renal. Aproximadamente 80% do volume renal são constituídos de células epiteliais tubulares e de células do espaço intersticial. A maioria das células não-epiteliais é associada a rica vasculatura renal. Existe também um pequeno número de células mononucleares e de fibroblastos. Após a lesão renal, na tentativa de manter a integridade dos túbulos, há uma ativação da proliferação das células epiteliais (1, 5, 6). Uma vez que as respostas proliferativas ou os fatores homeostáticos desaparecem, as vias de apoptose são ativadas e sobrepõem-se à capacidade das células tubulares de sobreviverem e assim, a atrofia tubular começa.

1.3 Fibrose

O reparo de danos teciduais é um processo biológico fundamental que permite a reposição ordenada de células mortas ou danificadas devido a alguma lesão, mecanismo essencial à sobrevivência. Os danos aos tecidos podem resultar de vários estímulos, agudos ou crônicos, incluindo infecções, reações autoimunes, injúria mecânica ou qualquer estimulação da resposta imunológica. O processo de reparo envolve, tipicamente, dois estágios distintos: uma fase regenerativa, na qual as células lesadas são trocadas por células do mesmo tipo, sem acarretar evidência do dano; e uma fase conhecida como fibroplasia, ou mais comumente chamada de fibrose, na qual o tecido conjuntivo substitui o tecido parenquimatoso normal. Embora inicialmente benéfico, o processo de cicatrização se torna patológico quando se torna contínuo, resultando em substancial remodelamento da ECM e formação da cicatriz permanente. Em alguns casos, isso pode levar à falha ou à falência do órgão (7).

Ao contrário das reações inflamatórias agudas, que são caracterizadas por rápidas mudanças vasculares, edema e infiltração de neutrófilos, a fibrose se origina geralmente de reações inflamatórias crônicas, definida como resposta que persiste por várias semanas ou meses e cuja inflamação, destruição tecidual e processo de reparo ocorrem simultaneamente. Apesar de diferentes etiologias e distinções clínicas, a maioria das doenças fibróticas tem em comum uma inflamação persistente que mantém a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas pró-fibróticas que, juntas, estimulam a deposição de elementos teciduais conjuntivos que remodelam ou destroem progressivamente a arquitetura tecidual normal (8, 9).

Irrelevante da causa inicial, o desenvolvimento da fibrose intersticial é caracterizado pelo aparecimento de fibroblastos ativados positivos para α -actina de músculo liso (*α -smooth muscle actin*, α -SMA), também denominados de miofibroblastos. No parênquima renal, a deposição de produtos da ECM é amplamente atribuída a essas células (10). Interessantemente, enquanto o papel pró-fibrótico dos miofibroblastos é amplamente aceitável, a sua origem ainda é obscura. Três hipóteses foram formuladas a respeito de sua origem (11): 1) as células estromais seriam as células progenitoras desses fibroblastos que através da circulação poderiam migrar e povoar órgãos periféricos (12); 2) os miofibroblastos seriam derivados da ativação de fibroblastos previamente residentes no espaço intersticial, que se proliferam após o dano (10); e 3) os fibroblastos intersticiais seriam gerados a partir da TEM (13).

Um estudo usando quimeras demonstrou que todos esses processos descritos acima estão envolvidos no aparecimento dos fibroblastos intersticiais. Num modelo experimental com UUO, foi observada que 36% desses fibroblastos eram provenientes da TEM, entre 14 a 15% vieram da medula óssea e o restante era provavelmente um resultado da proliferação dos fibroblastos previamente residentes no interstício (14).

A TEM tubular é o processo no qual as células renais tubulares perdem o seu fenótipo epitelial e adquirem características de células mesenquimais, podendo assim se rediferenciar em células miofibroblásticas, passando a expressar α -sma e o colágeno do tipo I. O processo da TEM envolve quatro eventos-chaves: (1) perda de propriedades da adesão epitelial, (2) expressão de novo de α -sma e reorganização da actina, (3) aumento da permeabilidade da membrana basal tubular, e (4) aumento da migração e capacidade de invasão celular. Um importante impulsor desse processo de transdiferenciação é o TGF- β (15).

O TGF- β é o único fator descrito como participante nos quatro eventos da TEM (16) e duas moléculas: o fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*, HGF) (16) e a proteína morfogênica de osso 7 (*bone morphogenic protein-7*, BMP-7) (17) foram demonstradas como capazes de reverter o processo de TEM devido à inibição do TGF- β e, conseqüentemente, são capazes de diminuir a fibrose renal.

1.4 Imunidade Inata: TLR e NLR

1.4.1 Receptores do tipo Toll (TLR)

O sistema imune inato é filogeneticamente conservado e está presente em quase todos os organismos multicelulares. Esta primeira linha de defesa se dá através de receptores expressos por macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células “natural killer”, entre outras células (18). A função destes receptores é reconhecer padrões moleculares, muitos dos quais conservados por patógenos, e por isso são designados Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs, do inglês “Pattern Recognition Receptors”). Existem várias classes de PRRs, e entre elas, a família TLR, caracterizadas como glicoproteínas do tipo I integrantes de membranas. Esses receptores transmembrana podem detectar uma grande variedade de moléculas conservadas evolutivamente presentes em patógenos como em vírus, bactérias, fungos, e em parasitas, e são conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês “Pathogen-Associated Molecular Patterns”). Além de PAMPs, vários estudos têm demonstrado que os TLRs também são capazes de reconhecer substâncias endógenas liberadas durante a lesão tecidual, definidas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs, do inglês “Danger-Associated Molecular Patterns”) (18). Os DAMPs incluem a HMGB1, hialuronanas, fibronectina A, e a proteína de choque térmico 70, entre outros. A ativação dos TLRs desencadeia uma série de eventos que levam à expressão de genes com potencial pró-inflamatório. A ligação de agonistas aos TLRs induz a maturação das células dendríticas, que é essencial para a indução da resposta imune adaptativa específica ao patógeno.

Até o momento, foram descritos doze membros da família dos TLRs em mamíferos sendo todos receptores transmembrana com um grande domínio extracelular e um domínio intracelular conhecido como *Toll-interleukin-1 resistance* (TIR), devido a sua similaridade com o receptor de IL-1. O domínio extracelular contém aproximadamente 16 a 28 repetições ricas em leucina (LRR, do inglês “leucine-rich repeats”), e cada LRR consiste de 20 a 30

aminoácidos, envolvidos na ligação ao PAMP ou DAMP. Os TLRs são divididos em dois grupos, baseados em sua localização: aqueles expressos exclusivamente na superfície celular e que reconhecem componentes da membrana microbiana como lipídeos, lipoproteínas e proteínas (TLR1, TLR2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, e TLR-11); e aqueles localizados em vesículas intracelulares como os endossomos, e que reconhecem predominantemente diferentes padrões de ácidos nucleicos (TLR-3, TLR-7, TLR-8, e TLR-9)(19).

Há duas principais vias que podem ser ativadas por TLRs: a via dependente de MyD88, que resulta na ativação do NF- κ B e AP-1, e a via dependente de TRIF, resulta na ativação de interferons do tipo I (IFNs α/β)(20). Todos os TLRs, exceto o TLR3, recrutam MyD88. A ligação de TLR5, TLR7, TLR9 e TLR11 à molécula de MyD88 se forma diretamente, enquanto TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 recrutam a proteína adaptadora TIRAP (também chamada de MAL - MyD88 *adaptor-like protein*), que une o MyD88 ao domínio TIR do TLR. O TLR3 recruta somente a proteína TRIF, e o TLR4 também o faz. Além disso, o TLR4 utiliza da molécula adaptadora TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) para comunicar o domínio TIR do TLR4 com o TRIF. Portanto, TLR4 inicia ambas as vias, dependente de MyD88 e dependente de TRIF. O MyD88 recruta proteínas da família IRAK e TRAF 6, o que acaba por desencadear uma sinalização ativadora do complexo IKK, e consequentemente, do fator de transcrição NF- κ B. Tal sinalização também ativa a via da MAPK. A via de sinalização dependente de TRIF também ativa TRAF 6, e por consequência, induz a ativação de MAPK e a fosforilação de NF- κ B. Além disso, na sinalização por TRIF há interação com TRAF 3 e posterior ativação de IRF (*Interferon regulatory factor*). NF- κ B e MAPK iniciam a transcrição de genes codificadores de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, enquanto IRF inicia a transcrição de interferon do tipo I. Há possibilidade de uma comunicação entre as vias dependente de MyD88 e de TRIF uma vez que MyD88 pode, por exemplo, ativar TRAF 3, com posterior expressão de interferon do tipo I (21).

1.4.2 Receptores do tipo Nod (NLR)

Recentemente, os receptores do tipo NOD (NLR, do inglês *Nod like receptors*) foram identificados como um grupo citoplasmático de receptores de reconhecimento de patógenos. Até então, 23 membros da família foram identificados em humanos, apesar de seus ligantes e funções não estarem bem esclarecidos. Mesmo assim, há um consenso de que o principal papel desses receptores é reconhecer, dentro da célula, PAMPs e/ou outros “sinais de perigo” endógenos para iniciar uma resposta imune. Nos NLRs, estão incluídos os NODs (domínio-I

de oligomerização ligador de nucleotídeos), os NALPs (proteínas contendo domínios NACHT, LRR e PYD), IPAF (fator ativador de protease-ICE), NAIPs (fator inibidor de apoptose neuronal) e CIITA. A família dos NLRs é caracterizada por um domínio C-terminal LRR; um domínio central NACHT, e ainda um domínio N-terminal. Baseado no tipo de domínio N-terminal, os NLRs são atualmente classificados como NLRC (domínio CARD), NLRP (domínio PIRINA), NRLB (domínio BIR) e NLRX (domínio desconhecido) (22). Os NLRs podem ser agrupados de acordo com seus domínios efetores, sendo que os NODs e IPAF possuem domínios efetores CARD, os NLRPs contêm domínios PYD, e os NAIPs têm domínios BIR (23).

O mecanismo que permite que os NLRs reconheçam componentes de bactérias não é totalmente compreendido. Os receptores NOD1 e NOD2, os primeiros NLRs identificados, reconhecem peptídeos produzidos durante a degradação de peptidoglicanos (PGN), um componente da parede celular bacteriana. O NOD1 reconhece o ácido γ -D-glutamil-mesodiaminopimélico (iE-DAP), enquanto NOD2 reconhece dipeptídeo muramil (MPD). Quando os NODs detectam os PGN eles rapidamente se oligomerizam, o que promove o recrutamento de uma quinase, a proteína-2 de interação com receptor (RIP-2). Esse complexo NOD-1/RIP-2 ou NOD-2/RIP-2 recruta então o complexo de quinase do inibidor do NF κ B (IKK), levando à sua translocação para o núcleo. A ativação do NOD-1 e do NOD-2 também leva à sinalização via ERK e p38. A sinalização do NOD-1 também promove ativação da JNK (24).

1.4.2.1 Inflamassoma

O termo “inflamassoma” foi usado a primeira vez em 2002 por Martinon e colaboradores para designar um complexo de proteínas de alto peso molecular capaz de clivar pró-IL1 β , de aproximadamente 35 KDa, em sua forma ativa, o IL1 β com aproximadamente 17 KDa (25). A composição do inflamassoma é aparentemente variável, assim como a sua distribuição espacial e temporal no citoplasma frente ao reconhecimento de um determinado PAMP/DAMP. O inflamassoma é composto geralmente por uma proteína NLR, que reconhece algum patógeno intracitoplasmático ou ainda algum DAMP, em associação com outra proteína, a caspase-1, que cliva a pró-IL1 β em IL1 β . Há três tipos bem caracterizados de inflamassomas: aqueles cujo NLRP é o NLRP1, o NLRP3 ou ainda o IPAF. Desses três, apenas o inflamassoma NLRP3 utiliza uma molécula adaptadora, o ASC, para recrutar a caspase-1 (26).

Sabemos que são necessários dois sinais para a ativação do complexo do inflamassoma: o primeiro sinal, mediado por TLR, deve ser capaz de induzir o aumento da expressão de pró-IL1 β ; o segundo sinal deve ser responsável pela clivagem de pró-IL1 β na sua forma ativa (26). Há várias hipóteses para o segundo sinal de tal ativação. A primeira delas é que a saída de potássio do interior das células é um estímulo para a clivagem de pró-IL1 β em IL1 β maduro (25, 27). Além disso, sabemos que o ATP extracelular pode funcionar como segundo sinal (28). Cristais de ácido úrico (29, 30) e outros compostos particulados (31, 32) poderiam causar um rompimento da membrana citoplasmática das células da imunidade inata e então funcionar como segundo sinal. Outra hipótese para a clivagem de pró-IL1 β em IL1 β maduro é o aumento do cálcio intracitoplasmático (33). Além disso, ácido graxos saturados podem ativar inflamassoma (34). Não sabemos se há algum componente em comum entre todos os segundos sinais descritos, como por exemplo, a liberação de ROS, como descrito por Cruz e colaboradores (35). Diversos aspectos da ativação da via do inflamassoma necessitam de um estudo mais profundo e várias perguntas precisam ser respondidas (36) antes de melhor manipularmos tal ativação no contexto de diferentes doenças. Não sabemos, por exemplo, se há alguma molécula que conecte o DAMP/PAMP ao NLRP3.

O estímulo para a ativação de NLRP1 é desconhecido; entretanto, a ruptura mecânica da parede celular é capaz de iniciar a formação do inflamassoma. Parece que os motivos de LRR do NLRP1 são capazes de reconhecer “sinais de perigo”. O inflamassoma NLRP3 é ativado por ATP (28), estresse hipotônico, compostos particulados, (30-32) cálcio intracitoplasmático (33) e ácidos graxos (34), os quais parecem mimetizar “sinais de perigo” endógenos. Recentemente, também foi demonstrado que o NLRP3 consegue reconhecer RNA bacteriano, bem como os componentes R837 e R838 do antiviral imidazoquinolina (37). O inflamassoma IPAF consiste em IPAF e caspase-1, e foi relacionado com a detecção de flagelina intracelular de *S. typhimurium* e *L. pneumophila*. A caspase-1 é o efetor central do inflamassoma, e a ativação desse complexo de proteínas multiméricas resulta na clivagem e ativação dessa protease. Por sua vez, a caspase-1 ativa, cliva e libera as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18.

Algumas vezes a ativação da via do inflamassoma leva à morte celular conhecida como “piroptose”. A palavra é derivada do grego, onde "pyro" (fogo) denota a liberação de mediadores pró-inflamatórios, e "ptose", que significa queda, um termo comumente usado para descrever morte celular foi introduzida para este tipo de morte celular com liberação de IL1 β (38). Piroptose é dependente da ativação de caspase-1 e muitas vezes é associada a um estado inflamatório elevado, em contraste com a morte por apoptose e, frequentemente, ocorre

após a infecção com patógenos intracelulares. Tem sido bem estudada no contexto de macrófagos infectados com bactérias flageladas (39). Outro aspecto importante na biologia do inflamassoma é que existem vias não canônicas de sua ativação, como a indução de piroptose de forma independente de caspase-1 (40). Tal ativação é possível porque a caspase-11 induz a secreção de IL-1 α e piroptose em resposta a bactérias Gram-negativas intracelulares, de forma independente de ASC e caspase-1. Paralelamente, em respostas a esses mesmos microorganismos, a caspase-11 é essencial no eixo de clivagem e ativação de caspase-1 dependente de Nlrp3 e ASC, o qual culmina em respostas clássicas como ativação de IL-1 β e IL-18 (40, 41).

1.5 Papel de TLR e NLR na Lesão Renal

No rim, tanto células imunes quanto não imunes expressam os TLR, estando tais receptores envolvidos em uma variedade de doenças como pielonefrite, nefrite por leptospirose, glomerulonefrite por imunocomplexos, lesão de isquemia e reperfusão, rejeição ao enxerto, dentre outras (42-44). Vários trabalhos demonstraram a importância dos TLR na patogênese de várias afecções que acometem os rins. As células tubulares renais em cultura expressam constitutivamente TLR-1-4 e 6 (45, 46). A estimulação com LPS induz a produção de MCP-1 e RANTES, um indicativo de que estas moléculas possam estar envolvidas na migração de leucócitos para dentro do interstício e destruição tubular na presença de infecção renal. Andrade et al. analisaram os níveis de expressão mRNA dos TLR em tecido de pulmão coletado durante isquemia e reperfusão de transplantados e observaram que quando o pulmão do doador era preservado hipotermicamente, os níveis de mRNA dos TLR correlacionavam com os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ) (47). Estas observações sugerem que a resposta inflamatória no órgão doador pode afetar a expressão gênica e a atividade dos TLR, ou ainda, a expressão dos TLR e sua ativação pode contribuir para a regulação das expressões de citocinas.

Uma série de estudos sugere que o inflammasome NLRP3 em células dendríticas intrarenais e macrófagos desencadeia inflamação renal. Componentes do inflammasome NLRP3 também são expressos pelas células renais, mas a sua contribuição para a sinalização da via canônica do inflamassoma permanece incerta (48). Pulskens e colaboradores utilizaram animais deficientes em NLRP3 em um modelo de UUO, no qual eles afirmam que NLRP3 previne o edema intersticial e reduz a permeabilidade vascular (49). Porém, os mecanismos

desencadeados pelo NLRP3 e a via canônica da ativação do inflamassoma precisam ser melhor entendidos em um contexto de fibrose renal.

1.6 Balanço Th1/Th2 no Desenvolvimento da Fibrose

Reações inflamatórias crônicas são tipicamente caracterizadas por um grande infiltrado de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos, eosinófilos e células do plasma. Embora a inflamação tipicamente preceda o desenvolvimento da fibrose, resultados de vários modelos sugerem que a fibrose não é sempre caracterizada como uma inflamação persistente, implicando que os mecanismos que regulam a fibrose são, até certo ponto, distintos daqueles que regulam a inflamação (50-52). No atual trabalho, propusemos entender a contribuição de células tipicamente envolvidas com a inflamação e células historicamente envolvidas com o desenvolvimento de uma resposta fibrótica no desenvolvimento de uma doença de caráter crônico.

Vários modelos experimentais de fibrose documentam a potente atividade anti-fibrótica das citocinas IFN- γ e IL-12, associadas ao padrão de resposta imune Th1. Nahas e colaboradores (53) concluíram que a administração de doses diárias de IFN- γ acarreta uma forte inibição da liberação dos componentes da ECM pelos miofibroblastos e que possíveis resultados de tal inibição seriam a redução da fibrose renal e manutenção da função dos rins. Resultados de outros grupos de pesquisa sugerem ser possível o desenvolvimento de vacinas anti-fibróticas, uma vez que o efeito pró-fibrótico da resposta tipo Th2 poderia ser minimizada em prol de uma resposta do tipo Th1 (54, 55). Estudos que investigam o padrão de expressão de genes em tecidos fibrosados encontraram diferença marcante entre a polarização dos genes relacionados às citocinas de padrão Th1 e Th2 induzidos em tais tecidos (56, 57). Dois grupos de genes foram identificados como sendo os principais em camundongos com predominância de resposta do tipo 1; aqueles associados com reações agudas e os associados com apoptose, o que explica o excessivo dano tecidual comumente observado quando a resposta do tipo Th1 permanece incontrolada. Por outro lado, vários genes envolvidos no mecanismo de cura de feridas e fibrose foram regulados positivamente em animais que exibem um perfil de resposta predominantemente do tipo Th2 (56, 57). Resta-nos melhor entender qual a relação entre os diferentes grupos de genes e como genes inicialmente inflamatórios poderiam desencadear a expressão de genes predominantemente envolvidos no mecanismo de cura de feridas e fibrose com a cronicidade do dano.

Estudos do grupo do Prof. Wynn e de colaboradores mostraram que a diminuição da fibrose está associada com a diminuição da produção de IL13 e de IL4, além do aumento do perfil de resposta imunológica do tipo Th1 (7). Estudos *in vitro* mostraram que IL13 é um potente ativador da produção de colágeno pelos fibroblastos (58). Os efeitos da IL13 podem atuar diretamente, e não através de outros mediadores pró-fibróticos ou de alterações do balanço Th1/Th2.

A IL4 é o fator de diferenciação central para o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 (59). A IL4 tem como uma das funções a ativação de produção da IL13, mesmo que já tenha sido descrita a produção desta última independente de IL4, o que acaba por explicar algumas divergências encontradas em camundongos deficientes em IL4 ou deficientes na cadeia alfa do receptor da IL4. A IL13 é produzida em níveis muito maiores do que a IL4, o que explica o motivo de IL13 atuar como uma chave efetora do perfil Th2 *in vivo*, na ausência de sinalização via IL4 (60-62).

Como dito anteriormente, artigos recentes têm mostrado redução da fibrose em camundongos deficientes em TLR4 (63) e TLR2 (64), com uma diminuição no número de miofibroblastos intersticiais na fase posterior de nefropatia. Resta-nos saber se tal controle da fibrose é dependente do balanço Th1/Th2. TLR2 e TLR4 sinalizam através da molécula intracelular adaptadora MyD88, embora poucos estudos demonstrem um papel de MyD88 na fibrose (65). Nossa hipótese é que a sinalização via MyD88 altere o balanço Th1/Th2 e consequentemente, modifique o padrão de deposição dos componentes da ECM e formação de fibrose nos rins obstruídos.

1.7 Subtipos de Macrófagos

Macrófagos são consideradas células efetoras imunes importantes. Élie Metchnikoff, que ganhou o Prêmio Nobel há mais de 100 anos por sua descrição da fagocitose, propôs que a chave para a imunidade era "estimular os fagócitos" (66). Desde esta descoberta, os imunologistas se ocupam com o conceito de macrófagos como células efetoras imunes e com a compreensão de como estas células participam na defesa do hospedeiro. No entanto, ao focar nas funções imunes dos macrófagos, imunologistas as vezes ignoram suas funções homeostáticas vitais, que são independentes do seu envolvimento nas respostas imunes (67). Os macrófagos têm a sua gênese na medula óssea, a partir de uma célula progenitora comum aos neutrófilos: a CFU-GM (do inglês, *colony former unity – Granulocyte/Monocyte*) (68). A

primeira célula dessa linhagem é o monoblasto, ainda pouco diferenciado, que origina o pró-monócito. Esta célula apresenta capacidade pinocítica e expressa receptores característicos de macrófagos, como o receptor para a porção Fc da imunoglobulina IgG e também o receptor de C3b. Elas dão origem aos pró-monócitos e estes dividem-se e originam os monócitos, que permanecem na medula óssea por 24 horas e depois caem na circulação sanguínea (69). No homem, os monócitos possuem meia vida de 70 horas e de 18 horas nos camundongos. Essas células migram constantemente para os diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais e adquirem propriedades funcionais tecido-específicas, permanecendo como células residentes (70). Hoje sabemos que macrófagos teciduais podem se dividir dependendo do estímulo a que são submetidos de forma dependente de M-CSF (do inglês, *monocyte-colony stimulating factor*) (71) ou IL4 (72). Dessa maneira, há populações teciduais que são originadas de forma independente dos monócitos circulantes.

Os macrófagos exercem suas diversas ações por meio de receptores presentes na membrana, tais como os receptores para mediadores endógenos, receptores opióides, adrenérgicos, para prostaglandinas E_2 (PGE_2), leucotrieno B_4 (LTB_4) e fator de ativação plaquetária (PAF), receptores para reconhecimento de bactérias gram-negativas e positivas, ácidos graxos livres (TLR e CD14) e receptores de células apoptóticas (receptores “scavengers” e CD36) (70, 73). Durante o processo inflamatório, ocorre aumento no número de monócitos circulantes que é acompanhado pela migração destas células para o foco da lesão. No desempenho de suas funções, estas células liberam uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes e microbicidas, além de liberar mediadores inflamatórios, tais como os eicosanóides e citocinas (70, 74).

Os macrófagos podem ser polarizados de acordo com diferentes estímulos que posteriormente os subdividem em duas populações principais, mas com outras intermediárias. Macrófagos clássicos M1 possuem função tumoricida e os macrófagos alternativos M2 promovem angiogênese, remodelamento tecidual, dentre outras funções (67). Com base no processo de cicatrização de feridas, Anders *et al.* propuseram quatro tipos diferentes de macrófagos. Estes grupos são os macrófagos M1, induzidos em um contexto de uma infecção renal e necrose celular, os macrófagos M2c/supressores que são induzidos por captação de células apoptóticas, os macrófagos M2a/cicatrizadores, induzidos pela secreção de abundantes fatores de crescimento, e macrófagos fibrolíticos, envolvidos no processo de redução da cicatriz (75). Macrófagos M1 se diferenciam quando são expostos a $IFN-\gamma$ produzido pelas células T ou células *Natural Killers* (76, 77), em conjunto com o $TNF-\alpha$ produzidos pelas APC, que foram ativadas através dos TLRs (77). Além disso, a sinalização de TLR que

resulta na secreção de TNF- α pode ativar diretamente as células M1. Essas células são distinguidas pela expressão de níveis elevados de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (78). Após sua ativação, macrófagos do tipo M1 produzem IL1, IL6, IL12 e IL23, citocinas pró-inflamatórias potentes que podem induzir a inflamação do tecido e podem também resultar na ativação de células Th17. Finalmente, estes macrófagos são responsáveis pela morte de uma variedade de agentes patogênicos, incluindo as bactérias, vírus e parasitas, tais como *Leishmania sp.* Macrófagos M2, mais especificamente, os M2a, são ativados por IL4 que são produzidos por basófilos e mastócitos em resposta à lesão no tecido, bem como a quitina, um polímero de polissacarídeo encontrado em alguns parasitas e fungos. IL4 também pode ser produzida pelos linfócitos Th2 em conjunto com a IL13. A IL4 estimula a atividade da arginase, que converte arginina em ornitina, o que acaba por aumentar a produção de colágeno (76). Macrófagos do tipo M2 também podem ser caracterizados pela expressão do receptor da manose CD36, CD206 e IL-10 (79). A exposição *in vitro* de macrófagos diferenciados com IL4 e IL13 resulta na produção de matriz extracelular e incapacidade de matar patógenos intracelulares (79).

1.8 Contribuições de Macrófagos na DRC

O desenvolvimento das DRC tem sido associado com a presença de uma lesão renal aguda prévia. Tendo em vista que as lesões renais agudas apresentam um contexto inflamatório, a presença de leucócitos infiltrantes e seus produtos podem estar relacionados com a progressão da lesão, podendo ser resolvida ou tornando-se crônica (80, 81). Os macrófagos são personagens importantes no desenvolvimento tanto de doenças renais agudas quanto crônicas. No contexto das DRCs, vários estudos têm sido feitos para se determinar a participação dos macrófagos no desenvolvimento da fibrose e também na regeneração. Mais do que avaliar a participação dos macrófagos em modelos de doença crônica, hoje se busca principalmente as características dos macrófagos presentes no contexto da doença.

Nesse âmbito, o atual projeto procurou investigar a associação entre a modulação de subtipos de macrófagos e a participação de componentes da imunidade inata no contexto da DRC. Nossa hipótese é que componentes endógenos liberados durante a obstrução mecânica do ureter e a consequente morte de células renais possam se ligar a TLR e NLR, presentes principalmente em macrófagos renais, e tal resposta favoreça um perfil imune associado com o desenvolvimento de fibrose. Buscamos, portanto, qual DAMP é o responsável por iniciar a

resposta imune inata, além de averiguar o papel de células infiltrantes renais em comparação com células residentes para o desenvolvimento da fibrose. Ainda, investigamos a contribuição direta de macrófagos M1 e M2 para a deposição de componentes da ECM.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar os mecanismos envolvidos na interação entre a resposta imune, especificamente a participação de receptores da imunidade inata, subpopulações de macrófagos e a ativação da via do inflamassoma, e o desenvolvimento da fibrose renal.

2.2 Específicos

Em um modelo *in vivo* de lesão renal crônica, nós intencionamos:

- ✓ avaliar a participação de TLR2, TLR4 e da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento da fibrose;
- ✓ avaliar a resposta imune de perfil Th1/Th2 no desenvolvimento da fibrose;
- ✓ verificar a contribuição de células T CD4⁺ e macrófagos no desenvolvimento da fibrose;
- ✓ caracterizar os diferentes subtipos de macrófagos durante o processo de fibrogênese renal;
- ✓ verificar a plasticidade dos macrófagos com a progressão da lesão renal crônica;
- ✓ analisar a participação do ácido úrico solúvel na ativação da via do inflamassoma e no consequente desenvolvimento da fibrose renal; e
- ✓ esclarecer os mecanismos pelos quais o ácido úrico solúvel pode ativar o inflamassoma de NLRP3.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, e animais deficientes (aqui chamados de KO) nas moléculas TLR2, TLR4, MyD88, IL4, IL12/23 (p40, aqui denominados simplesmente IL12), Rag-1, Stat6 e NLRP3, todos de fundo *black* (H2IA^b), pesando em torno de 20 gramas, fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos da Universidade de São Paulo e pelo CEDEME, da Unifesp. Os camundongos NLRP3 KO foram doados pela professora Vera Calich. Os animais foram mantidos no biotério de camundongos no Laboratório de Imunobiologia de Transplantes, no ICB-IV da USP, acondicionados em gaiolas coletivas, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C e com suprimentos de água e alimento disponíveis todo o tempo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição sob o número de protocolo 45/2009.

3.2 Modelo de Obstrução Unilateral do Ureter (UUO)

Os animais foram submetidos à anestesia com xilazina e quetamina (Agribands do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) por via intraperitoneal (IP), na dose de 0,004 mg/g de peso, em dose única. No dia 0, a UUO foi realizada por ligação completa do ureter com linha cirúrgica de seda 4-0 em dois pontos, e foi feita uma incisão entre os pontos de ligação. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e aquecidos por luz indireta até que estivessem completamente recuperados da anestesia. Após a recuperação, os camundongos foram mantidos sob condições de habitação normal até o sacrifício. Para cada grupo de experimento foram utilizados 10 animais, sendo 5 camundongos submetidos a UUO e 5 controles sem cirurgia. Ainda, os experimentos foram realizados, no mínimo, duas vezes.

3.3 Tratamentos utilizados no modelo *in vivo* de UUO

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- grupo UUO: animais submetidos à cirurgia de obstrução ureteral;
- controle: animais em que não ocorreu a cirurgia de UUO;

- grupo com macrófagos depletados: animais submetidos à UUO e administrados intraperitonealmente com clodronato encapsulado por lipossomas nos dias -1, 0 e 3;
- grupo com Alopurinol: animais submetidos à UUO tratados com Alopurinol (Schein Pharmaceutical, Florham Park, NJ, USA) administrado na água numa concentração de 13mg/dL do dia 0 ao dia 7;
- grupo com ácido úrico: animais submetidos à UUO e administrados intraperitonealmente, logo após a cirurgia, com ácido úrico (St. Louis, USA, Sigma) diluído em PBS num pH 7.4 e em uma concentração de 120 mg/Kg de animal.

3.4 Geração de camundongos quiméricos

Camundongos *knockout* (KO) IL4 e IL12 machos de 6 a 8 semanas de idade foram irradiadas (11 Gy irradiação total do corpo durante 1597 segundos) . Uma hora mais tarde, os animais foram reconstituídos com 5×10^6 células da medula óssea a partir de doadores machos IL12 KO ou IL4 KO, respectivamente. Durante as duas primeiras semanas do transplante de medula óssea, os camundongos receberam 0,2% Ciprofloxacin (Cipronil, Farmabase, Jaguariúna, Brasil), em sua água potável. UUO foi realizada seis semanas após o período de recuperação do enxerto para permitir a reconstituição completa de células da medula óssea, e os rins foram analisadas ao fim de 7 dias.

3.5 Preparação de lipossomas e depleção de macrófagos

O clodronato (Bonefos®, Schering, São Paulo, Brasil) foi aprisionado em lipossomas por injeção de éter como descrito anteriormente (82). Resumidamente, 0,5 ml de uma solução com éter contendo 50 mg de fosfatidilcolina e 8 mg de colesterol foram injetadas (0,2 ml/min) em 5 mL de uma solução aquosa a 50 mmol/L de clodronato mantida a 42 °C. A solução etérea foi injetada com uma seringa adaptada, modelo KDS120 *Push-Pull Pump*, equipada com uma agulha de calibre fino (N° 3D). Durante a injeção, uma corrente de nitrogênio gasoso foi injetada na solução de clodronato, corrente esta que continuou até depois da formação dos lipossomas para a remoção do solvente residual. A suspensão de lipossomas foi centrifugada a 22800 g durante 30 minutos (centrífuga Hitachi CR20B2 Himac, Hitachi Ltda) a 25 °C. O sedimento contendo o lipossoma foi lavado duas vezes por centrifugação sob as mesmas condições de uma solução de NaCl a 0,9% (p/v). O sedimento final foi ressuspensão

em 2 ml de solução salina. A concentração de fosfatidilcolina, um dos constituintes da membrana dos lipossomos, foi determinada como descrito anteriormente por Rouser e colegas (83). As concentrações finais de fosfatidilcolina e de clodronato em lipossomas foram de 10 mmol/L e 0,5 mmol/L, respectivamente. O rendimento de clodronato aprisionado foi cerca de 1% da quantidade inicial adicionada. Os camundongos foram injetados i.p. com 100 μ l da preparação de lipossomas (6 μ g de clodronato) 24 h antes da cirurgia UUO. Além disso, 200 μ L da preparação de lipossomas (12 μ g de clodronato) foram administrados ip durante a cirurgia e três dias mais tarde. Após a depleção das células fagocíticas, foi realizada a cirurgia de UUO e sacrificamos os animais após sete dias.

3.6 Células utilizadas *in vitro*

Foram utilizados fibroblastos murinos imortalizados (3T3-L1) obtidos da A.T.C.C., entre as passagens 10 e 20. As 3T3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM-High (Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em garrafas de poliestireno de 25 cm², em incubadora à 37 °C, umidificadas numa mistura gasosa de ar (95%) e dióxido de carbono (5%).

Utilizamos fibroblastos imortalizados L929, também obtidos da A.T.C.C. As L929 foram cultivadas em meio de cultura DMEM-High (Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Utilizamos macrófagos obtidos pela extração de células da medula óssea de acordo com Boltz-Nitulescu et al. (84). Para tal, anestesiámos os camundongos como descrito anteriormente, fizemos a eutanásia por deslocamento cervical e retiramos suas tíbias e os fêmures para fazermos a lavagem da medula com PBS. As células foram filtradas em peneiras estéreis de poliestireno (70–100 μ m) e foram divididas em 10 placas de petri (100 x 20 mm Style, BD, Franklin Lakes, EUA) suplementadas com 10 mL de meio contendo 60% de DMEM-High (Invitrogen, EUA), 25% de sobrenadante de cultura de células L929 e 15% de soro fetal bovino. No quarto dia de cultura adicionamos mais 10 mL do meio para diferenciação, descrito anteriormente. Coletamos as células no sétimo dia utilizando acutase (MP Biomedicals, CA, EUA) após lavá-las com PBS.

Consideramos macrófagos M0 aqueles nos quais colocamos apenas DMEM-High (Invitrogen, EUA) e 5% de soro bovino fetal após termos diferenciados as células com sobrenadante de cultura de L929. Para polarização para um fenótipo M1, os macrófagos diferenciados a partir da medula óssea de diferentes camundongos (M0) foram cultivados na

presença de 10 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 50 ng/mL IFN γ (R&D Systems, MN, EUA) diluídos em DMEM-High (Invitrogen, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal por 24h. Para polarização para um fenótipo M2, adicionamos aos macrófagos 10 ng/mL de IL4 (Peprotech, CA, EUA) e 10 ng/mL IL13 (R&D Systems, MN, EUA) por 24h, nas mesmas condições de cultura acima descrita. Outro protocolo alternativo para a polarização de macrófagos em um perfil M2 consistiu em lavar as células retiradas da medula óssea com PBS, filtrá-las em peneiras de poliestireno (70–100 μ m) e cultivá-las na presença de 10 ng/mL de M-CSF diluído em DMEM-High (Invitrogen, EUA) suplementados com 5% de soro bovino fetal por sete dias.

3.7 Tratamentos utilizados no modelo *in vitro*

Macrófagos foram estimulados com 180 μ M de ácido úrico (Sigma-Aldrich, MO, EUA) na presença ou ausência de 10 ng/mL de LPS. Uricase (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi usada na concentração de 0,25 U/mL. Nigericina (Invivogen, CA, EUA) foi usada na concentração de 5 ng/mL. Cloreto de potássio foi utilizado na concentração de 150 mM para o experimento de bloqueio da saída de potássio do interior das células para o meio extracelular. O controle com cloreto de sódio foi utilizado na mesma concentração.

Para que fizéssemos ensaios de hipóxia e reoxigenação, macrófagos primários e fibroblastos 3T3 foram cultivados até a confluência ideal (aproximadamente 80%) e foram expostos à hipóxia (1% O₂/5% CO₂, N₂ para balancear) por 24, 48 ou 72 horas (Ruskin Invivo 300, Ruskin, EUA).

3.8 Ensaio de migração em sistema transwell

Macrófagos foram colocados na parte superior do sistema transwell em membranas (BD, Califórnia, EUA) cujos poros possuem 8 μ m de diâmetro. Na parte de baixo foi adicionado 100 nM de leucotrieno B₄ diluído em DMEM-High (Invitrogen, EUA) suplementados com 5% de soro bovino fetal por 8 horas. Após este período, as membranas foram retiradas, e as células que estavam na parte inferior foram fixadas com formol a 10% tamponado e coradas com hematoxilina de Harris. Para a análise da quantidade de células que migraram, as membranas foram observadas em um microscópio de luz (Zeiss, USA) tendo sido avaliados todos os campos.

3.9 Preparação da matriz tridimensional (3D) de colágeno tipo I e fibronectina

Para preparar a matriz tridimensional, foram adicionados em um tubo 212 ml (0,850 mg/mL) de colágeno I, 100 ml DMEM 10x, 100 ml de tampão RB 10x. Em outro tubo adicionou-se 500 µl de PBS, 10 µl de SFB, 10 µl de fibronectina derivada de plasma humano e 10 µl de DQ Collagen Type I, Fluorescein Conjugate (Life Technologies, EUA). Os tubos foram centrifugados a 4 °C por 3 minutos a 10.000 RMP. Para ajustar o pH (7.4) 60 ml de HCl foram adicionados à mistura, que foi bem homogeneizada no vórtex. A partir dessa preparação, 130 µl do gel foram colocados em placas de cultura contendo uma lamínula de vidro de 12 mm no centro. Os discos foram incubados a 37° C, por 2 horas, para a polimerização do gel inferior. Após este período, em um volume de 75 µl de gel, 2×10^3 células foram adicionados sobre a matriz já polimerizada e incubadas a 37° C por um período de 2 horas. Após este período, adicionou-se 2 ml do respectivo meio de cultura.

Para realização dos ensaios de migração, as placas permaneceram na estufa por 16 horas, período suficiente para que as células espriassem e adquirissem a morfologia alongada e cilíndrica, típica de célula em 3-D. Após a confirmação de que as células se encontravam em 3-D, o meio foi substituído por DMEM 10% contendo tampão HEPES (60 mM) e, por fim, uma camada de óleo mineral foi adicionada sobre o meio de cultura para evitar que ocorressem trocas gasosas durante o experimento.

3.10 Análise ultra-estrutural dos macrófagos

Para o estudo ultraestrutural dos macrófagos, a fixação foi feita em solução gelada de fixador Karnowski (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7.2 a 4 °C) por um período de 24 horas. Posteriormente ao período de fixação, o material foi lavado com PBS por três vezes consecutivas de cinco minutos cada, de modo a retirar o excesso de fixador. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,2M com sacarose por 2 horas a 4 °C. Em seguida, os fragmentos foram colocados por 24 horas em solução de acetato de uranila a 0,5% em água destilada com sacarose a 1%, a 4°C. Após essa etapa, o material foi novamente lavado em água marinha conforme citado anteriormente. Em seguida, foi realizado processo de desidratação em soluções alcoólicas crescentes de 70% a 100%, sendo dois banhos de 20 minutos cada um em álcool 70%, dois banhos de 20 minutos em álcool 95%, quatro banhos de 15 minutos em álcool 100%. Entre cada banho, as células foram centrifugadas a rotação de 1000 G por 10 minutos para a

formação do pellet de células a fim de facilitar a retirada do álcool e também para evitar que material fosse perdido durante o processo. Após desidratação alcoólica, foram realizadas duas passagens pelo óxido de propileno puro durante 20 minutos cada. A infiltração foi realizada com óxido de propileno mais resina básica (Araldite) em partes iguais, durando 12 horas, com agitação em temperatura ambiente. Na sequência os pellets foram colocados em resina pura a 37°C, depositados em moldes e levados à estufa a 70 °C, durante 3 dias. Os blocos obtidos foram então trimados com auxílio de uma lâmina metálica e sob microscópio estereoscópio do ultramicrotomo LKB Porter Blum MT-1. Esse procedimento foi realizado para que se retirasse o excesso de resina em torno do material incluído. Para a microtomia de corte semifino, da ordem de 0,5 mm de espessura, utilizou-se o ultramicrotomo LKB Porter Blum MT-1; esses cortes foram corados com solução de azul de toluidina por 2 minutos a fim de evidenciar um plano de corte favorável a observações posteriores em microscópio eletrônico de transmissão. Para cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm utilizou-se o ultramicrotomo LKB Porter Blum MT 2, cujos cortes foram coletados em telas de cobre de 300 mesh, corados com acetato de uranila a 2% em água destilada durante 1 hora e lavados em água destilada durante 30 minutos. Para as análises das telas e obtenção de micrografias eletrônicas, empregamos o microscópio eletrônico do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP (JEOL-JEM-100 CX-II).

3.11 Taxa de consumo de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi medida em macrófagos selvagens, MyD88 KO e NLRP3 KO usando o XF (fluxo extracelular) XF24 analyser (Seahorse Bioscience). Um meio composto por 114 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KH₂PO₄, 1,16 mM de MgSO₄, 20 mM de HEPES, 2,5 mM de CaCl₂, 0,2 % de albumina de soro bovino, pH 7,2, e suplementado com 2,8 mM de glucose foi usada na análise XF. As células foram semeadas numa microplaca de cultura de células XF24 com 24 poços numa concentração de 10.000 células/poço (área de crescimento de 0,32 cm²) em 500 mL de meio de crescimento e incubadas durante a noite a 37 °C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO₂. Antes do ensaio, o meio foi removido e substituído por 750 µl de meio de ensaio. As células foram pré-incubadas sob estas condições durante 2 horas a 37 °C em ar. Os experimentos foram concebidos para determinar a respiração em baixo teor de glucose (2,8 mM) e durante 60 min a seguir a transição para alta (16,7 mM) de glucose. As proporções de respiração dependente da síntese de ATP e o vazamento de prótons foram determinados pela adição de

oligomicina (4 μg / ml). Após mais 30 min, 4 μM do desacoplador carbonil cianeto de p-Trifluorometoxifenilidrazona foi adicionado para determinar a capacidade respiratória máxima. Após mais 10 min, 1 μM de rotenona foi adicionado para bloquear a transferência de elétrons a partir do complexo I da ubiquinona.

3.12 Transfecção celular e leitura da atividade da luciferase

Para o ensaio de transfecção celular, plaqueamos 1×10^4 macrófagos derivados da medula óssea de diferentes camundongos em placas opacas de 96 poços (Costar, EUA). No segundo dia, fizemos a transfecção como descrito: adicionamos em um eppendorf 180 ng de DNA iGluc/Luciferase e 20 ng de DNA pShuttle/Renilla em 25 μL de DMEM (Invitrogen, EUA) sem SBF. Num outro eppendorf, colocamos 1,25 μL Lipofectamine + 23,75 μL DMEM (Invitrogen, EUA) sem SBF. Esperamos 5 minutos e adicionamos lipofectamine 2000 (Invitrogen, EUA) + DMEM, numa proporção 1:1 e misturamos bem. Depois de 15 minutos, adicionamos o mix de plasmídeos + lipofectamina nos poços previamente incubados com meio sem soro por 30 minutos. Esperamos 2 a 4 horas e adicionamos DMEM (Invitrogen, EUA) 20% SBF com antibiótico. Incubamos por 2 dias e depois colocamos em nossas células os estímulos a serem estudados por 8 ou 24 h.

Para a leitura da atividade da luciferase e renilla no luminômetro, sugamos o meio das células e adicionamos 40 μL de DMEM sem phenol red e sem soro ou PBS. Depois adicionamos 40 μL de Dual-Glo Luciferase Substrate (Promega, EUA) previamente descongelado à temperatura ambiente. Incubamos nossa placa por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a leitura da luciferase, fizemos o mix para leitura da Renilla: Stop and Glo Substrate + Dual-glo Stop & glo buffer na proporção de 1:100, adicionamos 40 μL do mix em cada poço, esperamos mais 10 minutos e realizamos a última leitura no luminômetro. Em todos os experimentos de transfecção utilizamos constructo com uma mutação pontual que gerou uma perda de função em nosso constructo, como controle do ensaio de luciferase.

3.13 Análises bioquímicas

Amostras de urina ou sobrenadante de células foram processadas para dosagens de uréia e creatinina séricas através de kits comerciais (Labtest, Sete Lagoas, Brasil). Em alguns experimentos, as dosagens de creatinina e uréia foram realizadas no aparelho IDEXX Catalyst DX analyzer (IDEXX Laboratories, MA, EUA). A relação proteína/creatinina urinária foi

medida em amostras coletadas de pelve obstruída e da bexiga aos 7 dias após a cirurgia. A relação proteína/creatinina foi normalizada dividindo a relação da pelve dos animais obstruídos pela relação antes da cirurgia em cada grupo de animais.

3.14 RT-PCR em tempo real

- **Extração de RNA**

Para extração de RNA dos rins coletados após o sacrifício dos animais utilizamos o Trizol (Invitrogen, EUA) e seguimos as instruções do fabricante. Após precipitação e lavagem do RNA total, foram feitas leituras da concentração de RNA obtida, usando o aparelho NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop, EUA). As amostras foram consideradas de boa qualidade quando apresentavam as relações 260/230 e 260/280 iguais ou maiores que 2.

- **Síntese de cDNA**

Para síntese do cDNA incubamos 2 µg deste RNA total no tampão DNase I Reaction Buffer (Promega, EUA) e tratamos com 1 µL de RNase-Free DNase (Promega, EUA) por 15min a 25 °C. Em seguida adicionamos 0,5 µM de OligodT (GE Healthcare, EUA) e 1 µL EGTA 20 mM (Promega, EUA) e incubamos a 65 °C por 10 min deixando no gelo por mais 5 min. Acrescentamos então 1 µL BSA (Bovine Serum Albumin), o tampão M-MLV 1x, 10 µL de deoxynucleotídeo trifosfato (dNTP e) 10 mM e 2 µL enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, EUA), e novamente aquecemos por 37 °C por 60 min e 65 °C por 10 min.

- **PCR em tempo real**

Utilizamos sondas Taqman para análise da expressão de *il-6* (Mm00446190_m1), *tnf-α* (Mm00443258_m1), *il-1β* (Rn00580432_m1), *tlr2* (Mm00442346_m1), *tlr4* (Mm00445273_m1), *MyD88* (Mm00440338_m1), *xdh* (Mm00442110_m1), *il-18* (Mm00434226_m1), *IL-33* (Mm00505403_m1), *gata-3* (Mm01337569_m1), *tbx21* (Mm00450960_m1), colágeno tipo 1 (Mm00801666_g1), *il4* (Mm00445259_m1), arginase-1 (Mm01190441_g1), *tslp* (Mm00498739_m1), iNOS (*nos2*) (Mm00440485_m1), *tgf-β* (Mm03024053_m1), *nlrp3* (Mm00840904_m1) e *hprt* (Mm00446968_m1) como gene normatizador. Para outros genes, foram utilizados os seguintes primers Syber, sendo a β-actina utilizada como gene normatizador:

TNF-α: F-CCTCCCTCTCATCAGTTCTATGG

IL-10: R-TGTCCCTTGAAGAGACCTGG
 F- CCAAGCCTTATCGGAAATGA
 R- TTTTCACAGGGGAGAAAT
 β -Actina: F-ACTGGCATTGTCATGGACTC
 R- GCACAGCTTCTCCTTGATGT

Para a reação, utilizamos 4 μ L de cDNA diluído 1:10, 0,5 μ L de sonda, 5 μ L de master mix Taqman e/ou Syber e completamos o volume de 10 μ L com água DEPC. A amplificação foi realizada em aparelho ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystem, EUA). As condições de amplificação foram as seguintes: 50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min e 45 ciclos de 95 °C 15 seg, 60 °C 1min. Para análise, uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT) foi usada para determinar a expressão gênica, em relação ao controle HPRT (gene constitutivo). Dessa maneira, níveis arbitrários de RNAm foram expressos como uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador. Para cada amostra, os valores (CT) dos genes alvo foram normalizados e o valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo foi calculado utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Previamente descrita por K. Livak – PE – Applied Biosystems; Sequence Detector User Bulletin 2), sendo que nos animais controle o valor da expressão relativa foi considerada como sendo 1.

3.15 Análise de expressão gênica por microarray

- **Extração do RNA total**

O RNA foi extraído com o kit RNeasy® Mini (Qiagen) junto com a etapa de tratamento com DNase, seguindo as instruções do fabricante. Para avaliar a integridade do RNA extraído, todas as amostras foram analisadas com o auxílio do Bioanalyzer 2100 – Agilent Technologies, observando-se a presença dos RNA ribossomais 18 e 28S. O Agilent 2100 Bioanalyzer é uma plataforma baseada em tecnologia para o dimensionamento, quantificação e controle de qualidade de DNA, RNA, proteínas e células. A análise realizada pela plataforma Bioanalyzer informa de forma automatizada parâmetros do RNA como concentração e integridade, este último por meio da variável RIN (RNA Integrity Number). O RIN varia de zero a dez, indicando respectivamente de zero a cem por cento de integridade do RNA. Foram utilizadas somente amostras com $RIN \geq 8$.

- **Microarranjos de oligonucleotídeos (Agilent Technologies)**

Os experimentos de hibridização para análise de expressão gênica foram realizados na plataforma Agilent. Esta plataforma utiliza *bioarrays* confeccionados com oligonucleotídeos de 60 bases, individualmente pré-validados. Para as análises de perfil de expressão gênica, foram utilizadas lâminas de microarranjos contendo 44.000 transcritos de transcriptoma de camundongo (Agilent Technologies Arrays, EUA). Os procedimentos de hibridização seguiram estritamente os protocolos fornecidos pelo fabricante. As imagens foram capturadas pelo leitor *Agilent Bundle* de acordo com os parâmetros recomendados para *Agilent bioarrays* e extraídos pelo software *Feature Extraction* versão 9.5.3.

A qualidade das lâminas foi analisada por meio do relatório de controle de qualidade das lâminas gerado pelo software *Feature Extraction* (Agilent Technologies). Esse relatório apresentou diversos parâmetros importantes para a avaliação da qualidade tais como reprodutibilidade, distribuição gaussiana dos sinais de fluorescência encontrados, comportamento similar do sinal processado e do background nas diferentes linhas e colunas do microarranjo, distribuição uniforme do background e obtenção de uma curva de comportamento linear ($R^2=0.99$) utilizando como pontos os sinais de fluorescência obtidos de diferentes RNAs *spike-in*. Ademais, a qualidade também foi avaliada pela análise da correlação entre a quantidade de spots e a intensidade destes utilizando o programa R (R Development Core Team, 2008).

Foram refeitas as lâminas que não apresentaram enquadramento, as que possuíam mais de 50 spots saturados, além daquelas nas quais não se formou uma correlação entre a concentração de Spikeins e seus sinais processados. O valor dos spots considerados para as análises de bioinformática subsequentes foi o sinal processado (*gProcessedSignal*), gerado pelo software *Feature Expression* (v9.5.3). Foram desconsiderados os spots controles e os que não foram encontrados, ou aqueles saturados em alguma das lâminas utilizadas.

Para determinar diferenças estatisticamente significativas no nível de expressão de cada transcrito avaliado, foi utilizado o teste estatístico SAM (Significance Analysis of Microarray). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa TmeV.

3.16 Western Blot

Breve, aproximadamente 25 μ g de proteína total, obtido do tecido renal, do lizado celular ou do sobrenadante de células, foram diluídos em tampão de amostra (Biorad, EUA), contendo 20 mg/ml de 2- β -mercaptoetanol (Sigma, EUA). A seguir as proteínas foram

desnaturadas por aquecimento de 5 minutos a 95 °C e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sendo esta bloqueada 1 hora com leite 5% dissolvido em TBS-T, e a seguir incubada com o anticorpo primário diluído em TBS-T *overnight*. A seguir, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário. Na sequência, a membrana foi lavada novamente e exposta ao revelador ECL. Em seguida, a massa molecular das proteínas foi determinada por comparação com a migração das proteínas padrão Rainbow ou Dual-Color (BioRad Laboratories, EUA). Foram utilizados os seguintes anticorpos: da Abcam (EUA) – IL1 β (ab9722); da Santa Cruz – MyD88 (sc-11356), caspase 1 (sc-56036); da Sigma (EUA) – β actina (A2228)

3.17 Dosagem de citocinas

Os níveis proteicos de IL1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), IL13 (eBioscience, San Diego, EUA) e TGF β (Promega, Madison, EUA) foram determinados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o anticorpo de captura foi diluído na concentração de uso, distribuído nos poços de uma placa de 96 poços, e deixado incubado *overnight*. No dia seguinte, os poços foram lavados, seguido de adição das amostras ou curva padrão e incubação de 2 horas. Após nova lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual ficou em incubação por mais 2 horas. Em seguida, adicionou-se a solução de estreptavidina-HRP, com posterior adição de solução de substrato (uma mistura de H₂O₂ e tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida após a adição de uma solução de H₂SO₄, 2N). Em seguida, foi feita a leitura a 450 nm. Para o imunoensaio de TGF β ainda tivemos que fazer uma leitura prévia à adição do ácido pois desta maneira conseguimos distinguir sua forma inativa da forma ativa, clivada. Todos os resultados são apresentados como pg citocina/mg de proteína total, medida usando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Ainda, as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-12/23 (p40) foram quantificadas no sobrenadante de células em cultura pela metodologia de CBA, seguindo as instruções do fabricante (Mouse Inflammation kit, BD Biosciences, EUA). Os resultados foram determinados em pg/mg de proteína. Para análise dos dados, foi utilizado o software FCAP Array (BD Biosciences).

3.18 Análises histológicas

Durante o sacrifício dos animais, um dos rins foi retirado, e depois de seccionada e retirada a cápsula renal, o rim foi cortado sagitalmente em dois fragmentos aproximadamente simétricos. O material foi fixado em formol a 10% tamponado, até a montagem em blocos de parafina. Após processamento habitual, foi estudado pelo menos um corte de cada fragmento, na coloração de hematoxilina-eosina (HE).

3.19 Imunohistoquímica

Esta técnica foi realizada em cortes de parafina, utilizando uma técnica de recuperação de antígeno baseado em micro-ondas. Os anticorpos utilizados neste estudo incluem colágeno tipo I (diluído 1:300; Abcam, Cambridge, EUA), FSP- 1 (diluído 1:600, A5114, DAKO, Ely, UK) e α sma (DAKO, Denmark). Antes da marcação, as lâminas foram desparafinadas, re-hidratadas, e submetidas a Tris- EDTA, pH 9, a uma solução de recuperação de antígenos a 95 °C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio, e as seções foram bloqueadas com *Protein Block Solution* (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, ou um reagente de controle negativo, seguido de incubação com o polímero marcado (Dual Link System- HRP, Glostrup, Dinamarca, DAKO) usando duas incubações sequenciais de 30 minutos à temperatura ambiente. A coloração foi terminada através da realização de um 1 a 3 minutos de incubação com substrato 3,30-diaminobenzidina-cromogénio, o que resulta em um precipitado de cor castanha no local de antígeno. A contracoloração foi realizada com hematoxilina. Para a análise, as lâminas foram observadas em um microscópio de luz (Zeiss, USA) tendo sido avaliados 25 campos por lâmina, escolhidos aleatoriamente, que praticamente cobrirá toda a medular externa dos cortes. A quantificação foi feita baseada no número de marcações positivas por campo.

3.20 Quantificação da fibrose túbulo-intersticial

O grau de expansão do interstício renal foi avaliado quantitativamente em secções de picrosirius coradas por uma técnica de contagem em campos microscópicos consecutivas com uma ampliação final de 100X sob uma grade 176 ponto com a ajuda do programa de KS300 (Zeiss) . Para a coloração de picrosirius, 0,1 g de vermelho Sirius e 100 ml de solução

saturada de ácido pícrico foram usadas para corar três secções de parafina de 3 µm de espessura. Os cortes histológicos foram desparafinados com xilol e, posteriormente, hidratados com álcool absoluto (4X) e água corrente. As secções foram então imersas em solução saturada de ácido pícrico, durante 15 minutos e, em seguida, em picrosirius por mais 20 minutos. Contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Secções de picrosirius coradas foram analisadas por um microscópio Olympus BX50 com uma câmara Olympus anexada. O córtex, ampliado 40 vezes, e observado sob luz polarizada foi analisado. Fotografias de pelo menos cinco campos diferentes em cada lâmina foram tomada, e estruturas, tais como os glomérulos, córtex subcapsular, grandes vasos e a medula, foram excluídos. As fotos foram digitalizadas e, em seguida, o volume intersticial de colágeno no córtex em relação à área total do córtex foi quantificada por morfometria. Para a análise morfométrica, foi utilizado o *Image Processing* e análises foram feitas no software Java Image J. O resultado da análise é representado pela porcentagem, e refere-se à proporção do volume intersticial do colágeno no córtex para o volume total de interstício cortical, e em seguida, a média aritmética dos campos analisados foi calculada para cada lâmina.

3.21 Determinação da presença de hipóxia

A presença de hipóxia foi avaliada através da detecção de pimonidazol, pelo protocolo de Hypoxyprobe (Burlington, EUA), o qual se liga a grupamentos tióis de tecidos ou células que ficaram numa condição de pO_2 menor do que 10mmHg. Os tecidos foram processados pela técnica de IHQ, seguindo o mesmo protocolo do item anterior. Já a detecção de hipóxia nas células foi feita por imunofluorescência. Após o protocolo experimental, as células, já cultivadas em lâminas, foram lavadas 2X com PBS, e foi adicionada uma solução de paraformaldeído 2%. Em seguida, foi feita nova lavagem e adicionou-se uma solução de triton 0,5%. Após mais uma lavagem, foi adicionada solução de bloqueio (soro de cavalo 7%) por 30 minutos, seguido de adição do anticorpo primário (diluído 1:100 em PBS), com incubação *overnight*. No dia seguinte, os cortes foram incubados por 1 hora com o anticorpo secundário, marcado com o fluoróforo TexasRed (Abcam, EUA). Na sequência, adicionou-se o corante de núcleo (Hoechst – Life Technologies, EUA). Em seguida, as lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Zeiss, EUA).

3.22 Quantificação de hidroxiprolina

Alíquotas de hidroxiprolina padrão (St. Louis, EUA, Sigma) ou amostras de rim foram hidrolisados em pH alcali. As amostras hidrolizadas foram então misturadas com um reagente de cloraminas-T tamponada, e a oxidação foi deixada prosseguir durante 25 minutos à temperatura ambiente. O cromóforo foi, em seguida, desenvolvido com a adição de reagente de Ehrlich, e a absorbância do complexo púrpura avermelhada foi medida a 550 nm utilizando um espectrofotômetro. Os valores de absorbância foram representados graficamente em função da concentração de hidroxiprolina padrão, e a presença de hidroxiprolina foi determinada utilizando a curva padrão.

3.23 Atividade da arginase

As amostras de rim foram homogeneizadas em tampão de lise e centrifugadas durante 30 minutos a 14000 g a 4 °C. Resumidamente, as amostras de lizados foram incubadas com 10 mM de MnCl₂ e 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). A reação de hidrólise da L-arginina pela arginase foi realizada incubando a mistura que contém a arginase ativada e foi interrompida pela adição de uma solução de ácido. Para determinação calorimétrica de ureia, α -isonitrosopropiophenona foi adicionada, e a mistura foi aquecida a 100 °C durante 45 minutos. Depois de colocar a amostra no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente, a concentração de ureia foi determinada por espectrofotometria pela absorbância a 550 nm.

3.24 Citometria de Fluxo

Os animais foram sacrificados e os rins foram coletados e colocados em filtros (70–100 μ m), onde os tecidos renais foram mecanicamente homogeneizados. As células foram então diluídas em 15 mL de RPMI e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Em seguida, essas foram ressuspensas em solução de DNase (12.5 μ g/mL)/collagenase IV (0.5 mg/mL) em 7 mL de RPMI. As células foram então incubadas por 30 minutos a 37°C e em seguida foi adicionado SBF 10%, sendo as células centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de PBS. As células foram adicionadas a uma solução de Percoll e o material foi centrifugado a 2600 rpm por 25 minutos para separação de fases. As células foram então separadas na fase de interesse, novamente sofreram centrifugação, sendo ressuspensas em tampão FACS. Nós analisamos

a população de linfócitos infiltrantes renais pela técnica de citometria de fluxo de múltiplas cores. Os anticorpos utilizados para marcação de superfície foram F4/80 PerCP, MIG PE, CD206 FITC, CD11b Pacific Blue, CCR7 PercP, IL4 PE, IL12/23 (p40) APC, IFN γ PE-Cy7, CD4 FITC, GM-CSF APC e IAB PE (Biolegend, San Diego, EUA). As amostras foram adquiridas em um aparelho FACSCanto, usando o software FACSDIVA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) e em seguida analisadas através do programa FLOWJO (Tree Star, San Carlo, CA). As voltagens de fluorescência foram determinadas usando células não marcadas. A compensação foi feita utilizando células marcadas com somente um marcador. Foram adquiridos no mínimo 200.000 eventos em um *gate* de células mononucleares vivas.

3.25 Análise estatística dos dados

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste t de Student e para comparação entre mais de dois grupos experimentais utilizamos o ANOVA e como pós-teste *Tukey's Multiple Comparison Test* considerando um $p < 0,05$ como significativo. O software utilizado para as análises foi o *Graphpad Prism* (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 TLR2, TLR4 e MyD88 estão envolvidos no desenvolvimento da fibrose tecidual

A inflamação e a morte celular estão presentes durante o remodelamento de componentes da matriz extracelular em diferentes modelos de DRC. Tais processos estão intrinsecamente associados a liberação de moléculas endógenas capazes de se ligarem a receptores da imunidade inata presentes nas células infiltrantes, além de receptores presentes em células parenquimatosas ao longo do néfron (46). Por isso, inicialmente, nós investigamos a expressão de TLR2, TLR4 e MyD88 nos rins de camundongos selvagens submetidos à UUO, como demonstrado nas figuras 1a-c. Uma vez que observamos expressão aumentada de TLR4 e MyD88, nós nos questionamos se tais receptores da imunidade inata estariam envolvidos na fibrose renal presente na doença terminal. Então, nós submetemos animais geneticamente deficientes em TLR2, TLR4 e MyD88, e seu controle, à UUO, e, como observado na figura 1d, todos os animais KO exibiram menor proteinúria quando comparados aos animais selvagens. Além disso, esses animais demonstraram menor produção *de* FSP-1 (*fibroblast specific protein1*), menor expressão e deposição de colágeno do tipo 1 e também menor produção de hidroxiprolina, o principal aminoácido formador de colágeno (figuras 1d-j). Esses resultados sugerem que a sinalização pelos receptores TLRs via MyD88 participam no desenvolvimento da fibrose renal.

4.2 Sinalização via MyD88 favorece um perfil de resposta imune do tipo Th2 no contexto renal

Vários estudos vêm associando a ativação de TLRs com um perfil de resposta imune do tipo Th2(85-87). Em um modelo de alergia pulmonar crônica, por exemplo, a polarização para um perfil Th2 se dá via ativação de TLR4 presente em células dendríticas tanto no compartimento hematopoiético, quanto estromal (88). Em um modelo de infecção por helminto, a ausência de MyD88 é associada com menor resposta do tipo Th2 (86). Então, usando o modelo de UUO, nós investigamos se a sinalização via MyD88 estaria envolvida na fibrose renal ao favorecer um perfil do tipo Th2. Como demonstrado nas figuras 2a e 2b, a UUO leva a um aumento da expressão tanto de IL4 quanto de IFN γ em camundongos selvagens. Então, nós examinamos a relação GATA3/Tbet. Como demonstrado pela figura 2c,

Fig . 1: MyD88, TLR2 e TLR4 e a fibrose renal. TLR4 (A), o TLR2 (B) e MyD88 (C) mRNA foram quantificados 7 dias pós a cirurgia de UUO. A razão proteinúria/creatininúria da pelve (D) em todos os camundongos KO e nos selvagens 7 dias após a UUO. Marcação de FSP1 (E e F) e a expressão de mRNA (L) e marcação (H e I) de colágeno tipo 1 aos 7 dias pós-cirurgia em animais WT, TLR2, TLR4 e MyD88 KO. Relação renal de hidroxiprolina tecidual (J) nos animais estudados. A imunohistoquímica é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. A linha tracejada representa os animais WT não submetidos à UUO. qPCR foi normalizado pelo gene HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada como 1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

tal relação foi menor nos animais TLR2 e MyD88 KO. Além disso, a expressão de RNAm de *arginase-1*, *gata3*, *tslp* e *fizz-1*, todas moléculas relacionadas com um perfil de resposta imune do tipo Th2, foram diminuídas em camundongos MyD88 KO (figuras 2d-g). Por outro lado, não houve diferença nos níveis de expressão de *tbx21*, *TNF α* , *iNOS* e *il6* nos animais TLR2, TLR4 e MyD88 KO quando comparados aos camundongos selvagens (figuras 2h-k). Também, nós investigamos a expressão de RNAm de *MCP-1*, um potente quimioatraente para macrófagos, como demonstrado na figura 2l. Camundongos TLR2 e MyD88 KO apresentaram menor expressão de *MCP-1*, quando comparados aos animais selvagens.

Ainda, para confirmar se houve a polarização para um perfil Th2, nós avaliamos a porcentagem de células com perfil de citocinas Th1 e Th2, além de macrófagos dos subtipos M1 e M2 infiltrantes nos rins dos animais submetidos à UUO. A estratégia de análise das amostras de FACS é mostrada na figura em anexo1. Como esperado, os camundongos geneticamente deficientes em MyD88 apresentaram menor porcentagem de células T IL4⁺CD4⁺ infiltrantes (fig. 3a). Por outro lado, a porcentagem de células T IFN γ ⁺CD4⁺ não mudou entre os diferentes animais analisados (fig. 3b). Também examinamos a razão IL4/IFN γ entre os linfócitos infiltrantes e pudemos observar que camundongos MyD88 KO possuem tal relação reduzida quando comparados aos animais selvagens (fig. 3c).

Uma vez que as células do sistema imune adaptativo modulam as células do sistema inato, e vice-versa, resolvemos avaliar a frequência das células mielóides, incluindo as subpopulações M1 e M2 de macrófagos. Nós notamos que animais MyD88 KO possuem menor porcentagem de células CD11b^{high} e CD11b^{low} infiltrantes (fig. 3d e 3e). Entretanto, a porcentagem de macrófagos CD11b^{high} que expressam CCR7, um marcador de macrófagos do subtipo M1, estava aumentado nos animais MyD88 KO (fig. 3f). Células CD11b^{high}, que expressam CD206 e IL10, ambos marcadores de macrófagos alternativamente ativados (M2), mostraram-se diminuídas nos camundongos deficientes em MyD88, quando comparados aos selvagens (fig. 3g e 3h). A porcentagem de macrófagos CD11b^{high} que expressam IL12(p40) e MIG foi a mesma entre todos os grupos analisados (fig. 3i e 3j). Juntos, tais resultados sugerem que animais TLR2, TLR4 e MyD88 KO são protegidos contra fibrose renal uma vez que não são capazes de ativar macrófagos do subtipo M2 e, conseqüentemente, montar uma resposta imune Th2. Este perfil é mais acentuado nos animais deficientes em MyD88.

Fig. 2: Padrão de resposta imune do tipo Th2 nos animais WT, TLR2, TLR4 e MyD88 KO submetidos à UUO. UUO levou ao aumento dos níveis de mRNA de IL4 (A) e (B) IFN- γ em camundongos WT. Razão GATA3/TBX21 renal (C) em camundongos TLR2, TLR4, e MyD88 KO. A razão em camundongos WT submetidos à UUO foi considerado como 1. Expressão de mRNA de arginase 1 (D), GATA3 3(E), TSLP (F), Fizz 1 (L), TBX21 (H), TNF α (I), iNOS (J), IL6 (K), e MCP1 (L) de rins dos animais 7 dias após a UUO. qPCR foi normalizada pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada como 1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fig. 3: Caracterização fenotípica das células renais em animais WT, TLR2, TLR4 e MyD88 KO após UUO. Porcentagem de células T CD4⁺ que expressam IL4 (A) e IFN γ (B) nos animais 7 dias após a UUO. Razão IL4/IFN γ em camundongos TLR2, TLR4, e MyD88 KO (C). A razão nos camundongos WT submetidos à UUO foi considerada como 1. A porcentagem de células infiltrantes CD11b^{high} (D) e CD11b^{low} (E) e a porcentagem de células CD11b^{high} que expressam CCR7 (F), CD206 (L), IL10 (H), IL12 (p40) (I) e MIG (J) em animais WT, TLR2, TLR4 e MyD88 KO 7 dias após a UUO. A linha a tracejado representa os animais WT não submetidos a UUO. * p < 0,05

4.3 Perfil de resposta imune do tipo Th2 no desenvolvimento da fibrose

Uma vez que nossos resultados sugerem que o padrão de resposta imune do tipo Th2 é associado com a fibrose renal, nós investigamos se a incapacidade de montar uma resposta Th2 levaria a uma melhora no quadro de fibrose renal frente à UUO. Como esperado, nós observamos que camundongos IL4 KO não desenvolvem um perfil de resposta do tipo Th2,

exemplificado pela menor produção de IL13 (fig. 4a), menor expressão de RNAm de *TGF-β* (fig. 4b) e menor produção do componente ativo do TGF-β (fig. 4c), quando comparados aos animais selvagens e aos camundongos deficientes em IL12 após a UUO. Além disso, camundongos IL4 KO mostraram menor atividade de arginase (fig. 4d), maior porcentagem de células MIG⁺CD11b^{high} (fig. 4e) e menor porcentagem de CD206⁺CD11b^{high} (fig. 4f) infiltrantes renais quando comparados aos animais IL12 KO.

Fig. 4: Deficiência de IL4 prejudica a resposta imune Th2/M2 após UUO. Níveis de IL13 (A), mRNA (B) e níveis proteicos (C) de TGFβ e atividade da arginase 1 (D) em camundongos WT, IL4 e IL12 KO sujeitos à UUO. A porcentagem de células CD11b^{high} que expressam CD206 (E) e MIG (F) nos rins de animais submetidos à UUO. qPCR foi normalizado pelo gene HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada como 1. A linha tracejada representa os animais WT não submetidos à UUO. *p < 0,05, **p < 0,01.

Apesar da obstrução física causada pela ligadura unilateral do ureter, camundongos IL4 KO apresentaram menor proteinúria na pelve, quando comparados aos IL12 KO (fig. 5a). Camundongos IL4 KO também mostraram reduzida produção de hidroxiprolina e menor expressão de RNAm de *colágeno tipo 1* (figuras 5b-c). Tais resultados foram corroborados pela análise histológica de picrosirius, na qual observamos maior deposição de colágeno nos rins dos animais IL12 KO do que nos rins dos animais selvagens e também dos IL4 KO

(figuras 5d-e). Juntos, estes resultados confirmam a participação de citocinas do tipo Th2 no desenvolvimento da fibrose renal devido a diferentes mecanismos.

Fig. 5: Resposta imune Th2 gera perda da função renal e aumento da fibrose. Razão proteinúria/creatininúria (A) da pelve e razão hidroxiprolina/proteína total (B) em animais WT, IL4 e IL12 KO 7 dias após a UUO. mRNA (C) e deposição (D e E) de colágeno 1 7 dias pós cirurgia nos animais. A coloração com picrosirius é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada 1. A linha a tracejada representa os animais WT não submetidos a UUO. * $p < 0,05$.

4.4 Células de origem hematopoiética são as responsáveis pelo desenvolvimento da fibrose renal

O microambiente pode modular a resposta imune e então interferir na ativação de macrófagos e linfócitos T $CD4^+$. Para determinar se a fibrose é devido à IL4 proveniente de células parenquimatosas ou de leucócitos infiltrantes, nós utilizamos modelos de quimerismo. Para tal experimento, nós irradiamos camundongos IL12 KO e os repopulamos com a medula

óssea de camundongos IL4 KO, e vice-versa. Como mostrado na figura 6a, animais IL12 KO, que possuíam uma proteinúria elevada antes do quimerismo, mostraram redução da proteína liberada na urina após serem irradiados e repopulados com células da medula óssea de IL4 KO. O contrário também pôde ser observado, uma vez que animais IL4 KO, anteriormente protegidos, demonstraram um aumento da proteinúria após serem repopulados com a medula óssea de IL12 KO. Tais resultados corroboraram os resultados de picrosírius, no qual observamos a mesma relação inversa entre proteção e piora na deposição de colágeno entre os animais após a realização do quimerismo (fig. 6b e 6c).

Fig . 6: Importância das células de origem hematopoiética para o desenvolvimento da fibrose renal. Razão proteinúria/creatininúria da pelve (A) em animais WT, IL4 e IL12 KO não quiméricos e animais IL4 KO quiméricos após receberem a medula óssea de camundongos IL12 KO e animais IL12 KO com após receberem a medula óssea de IL4 KO. Fotomicrografias e quantificação da deposição de colágeno por picrosírius (B e C) em animais quiméricos. A linha a tracejada representa os animais WT não submetidos à UUO. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Para avaliar a importância dos macrófagos e dos linfócitos T e esclarecer se uma dessas células era mais ativa no desenvolvimento da fibrose renal desencadeada pela obstrução unilateral do ureter, nós utilizamos duas estratégias diferentes: depletar os

macrófagos via clodronato encapsulado por lipossomos (figura em anexo 2), ou eliminar os linfócitos com o uso de animais Rag-1 KO. Macrófagos possuem papel central no controle da apoptose de células tubulares e no desenvolvimento da fibrose renal (89). A administração do clodronato encapsulado gerou uma diminuição da proteinúria (fig. 7a) além da diminuição da deposição de colágeno observado pela análise de picrosirius (fig. 7b). Em contraste, a falta de células T não alterou a proteinúria nem a deposição de colágeno. Estes resultados sugerem que macrófagos provenientes da medula óssea influenciam diretamente o desenvolvimento da fibrose no modelo de UUO e ainda são os responsáveis por criar um microambiente de perfil imune produtor de citocinas de padrão M2/Th2.

Fig. 7: Macrófagos influenciam diretamente o desenvolvimento da fibrose renal. Razão proteinúria/creatininúria da pelve (A) em animais WT cujos macrófagos foram depletados, em animais Rag 1 KO e animais WT submetidos à UUO. Fotomicrografias e quantificação da deposição de colágeno por picrosirius (B e C) nos mesmos animais. A linha tracejada representa os animais WT não submetidos à UUO. * $p < 0,05$. MΦ macrófagos.

4.5 Macrófagos M0 apresentam maior capacidade de migração quando comparados com macrófagos M1 e M2

Uma vez que determinamos que a participação de macrófagos é essencial no desenvolvimento da fibrose posterior à obstrução do ureter, nós decidimos investigar qual a subpopulação destas células seria a principal indutora do perfil fibrótico. Portanto, nossa estratégia foi depletar os macrófagos dos animais submetidos à UUO e repopulá-los apenas com um subtipo de macrófago. Para tal, inicialmente nós caracterizamos os macrófagos após diferenciá-los em subpopulações M0, M1 e M2. A figura 8 mostra fotografias de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura das três subpopulações de macrófagos. Nós observamos que os macrófagos M1 possuem uma morfologia mais espiculada quando comparados aos M0, enquanto os macrófagos M2 possuem morfologia mais fibroblastóide.

Fig. 8: Caracterização morfológica das diferentes subpopulações de macrófagos. Macrófagos foram derivados da medula óssea de camundongos WT após o cultivo com o sobrenadante de células L929 por 7 dias (M0). Algumas células foram polarizadas por 24h com $\text{IFN}\gamma$ + LPS (M1) ou com IL4 + IL13 (M2). Foram feitas micrografias de luz e eletrônica de varredura das diferentes subpopulações de macrófagos.

Além da caracterização morfológica, nós avaliamos alguns marcadores das diferentes subpopulações de macrófagos, como demonstrado nas figuras 9a-g. Os macrófagos M1

produzem mais CCR7, GMCSF, MHC de classe II, p40 (IL12/23) e IFN γ , quando comparados aos macrófagos M0, enquanto que os macrófagos M2 produzem maiores níveis do receptor de manose, o CD206. Tais dados são confirmados com dados presentes na literatura relativos à caracterização das diferentes subpopulações de macrófagos (67, 90).

Fig. 9: Caracterização fenotípica das diferentes subpopulações de macrófagos. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de F4/80 e CD11b (A), e células CD11b⁺ foram avaliadas quanto à porcentagem de CCR7 (B), GMCSF (C), MHC de classe II (IAB) (D), p40 (IL12/23) (E), IFN γ (F) e CD206 (G). *p < 0,05.

Já que o desenvolvimento de fibrose está diretamente relacionado com o remodelamento da ECM, nós resolvemos caracterizar os diferentes subtipos de macrófagos quanto à produção e expressão de moléculas relacionadas com a atividade de matriz extracelular. A figura 10a traz uma visão geral de alguns dos genes diferencialmente expressos entre os três subtipos de macrófagos. A lista completa de todos os genes avaliados neste PCR *array* encontra-se nas figuras em anexo. A figura 10b mostra os genes superexpressos e os genes reprimidos em macrófagos M2 quando comparados aos macrófagos M1. Nós podemos notar, por exemplo, que M2 expressam menos *Thbs1*, *MMP3*, *MMP10* e *MMP13*, mas expressam mais *Timp2*, *MMP9*, *MMP11* e *MMP15*, quando comparados aos macrófagos M1. As figuras 10c-d trazem o mesmo tipo de análise, porém vemos os genes superexpressos e os genes reprimidos nos macrófagos M0 quando comparados aos

macrófagos M1 e M2, respectivamente. Além da expressão de diferentes moléculas relacionadas com a adesão celular e com proteínas de matriz, nós avaliamos a produção de TGF β ativo pelos três subtipos de macrófagos e notamos que todos eles produzem quantidades similares (fig. 10e).

Fig. 10: Padrão de expressão de genes relacionados à matriz pelas diferentes subpopulações de macrófagos. PCR array demonstrando as expressões dos genes relacionados à matriz extracelular das diferentes subpopulações de macrófagos (A). Genes diferencialmente expressos comparando-se macrófagos M1 e M2 (B). As barras em branco representam os genes super expressos nos macrófagos M2, quando comparados aos M1. Genes diferencialmente expressos comparando-se macrófagos M1 e M0 (C) e M2 e M0 (D). Em ambos os casos, as barras em branco representam os genes super expressos nos macrófagos M0. Produção de TGF β ativo no lizado celular 24h após a polarização em diferentes subtipos de macrófagos (E).

Mais do que a capacidade de remodelamento da ECM, outro aspecto que deve ser levado em conta no desenvolvimento da fibrose renal é a habilidade das células em degradarem a matriz a sua volta e, logo, a habilidade de migração pelo tecido. Por isso, nós fizemos um ensaio de migração em um sistema *transwell* no qual colocamos diferentes

subtipos de macrófagos na parte superior de uma membrana com poros de 8 μm e, na parte inferior, leucotrieno B4, um indutor de migração. Como visto na figura 11a, o número de células na parte inferior da membrana após 8h foi maior para macrófagos M0, quando comparados aos outros dois subtipos. Tais resultados foram corroborados por outro ensaio de migração, no qual o colágeno do tipo I se torna fluorescente ao ser degradado para que as células possam migrar em um sistema *in vitro* 3D. As figuras 11b e 11c mostram a quantificação e as imagens de microscopia confocal e nós observamos que a degradação do colágeno I foi maior quando macrófagos do subtipo M0 foram colocados em tal sistema 3D. Portanto, apesar de uma quantidade semelhante de produção de TGF β ativo, e de variada expressão de diferentes moléculas da matriz extracelular entre os subtipos de macrófagos, aparentemente células M0 possuem maior capacidade de destruição de matriz e consequente maior capacidade migratória.

Fig. 11: Remodelamento da matriz pelas diferentes subpopulações de macrófagos. Macrófagos M0, M1 e M2 foram colocados na parte de cima de uma membrana cujos poros possuem 8 μm de diâmetro e na parte de baixo de tal sistema *transwell* foi adicionado leucotrieno B4 por 8h. O número de macrófagos que migraram neste sistema foi quantificado (A). Diferentes subpopulações de macrófagos foram colocadas em uma matriz tridimensional de fibronectina e colágeno do tipo I. A degradação do colágeno I pode ser quantificada por fotomicrografias em microscopia confocal, uma vez que colágeno degradado emite luz verde (B e C). Os macrófagos foram marcados em vermelho com o corante PKH26. * $p < 0,05$.

4.6 Macrófagos do subtipo M1 repopulam os rins submetidos à UUO e passam a apresentar marcadores relacionados ao perfil M2

Como citado anteriormente, após a caracterização dos diferentes subtipos de macrófagos, nós resolvemos transferi-los aos animais submetidos à obstrução ureteral e avaliar o grau de fibrose que cada subtipo de macrófagos é capaz de induzir. A figura 12a mostra o protocolo de injeção dos macrófagos. Inicialmente, nós transferimos apenas os subtipos M1 ou M2 e fomos capazes de repopular os rins dos animais Rag1 KO depletados de macrófagos e submetidos à UUO, quando comparamos estes com animais Rag1 KO depletados, porém não injetados com macrófagos (fig. 12b). Quer seja o subtipo M1, quer seja M2, a quantidade macrófagos ao final dos 7 dias foi igual nos dois grupos, como exemplificado na figura 12b e figura em anexo 2c, na qual nós vemos uma imunofluorescência com os macrófagos injetados marcados em vermelho. Para este experimento, nós injetamos macrófagos com o alótipo CD45.1 em camundongos congênicos depletados de macrófagos com o alótipo CD45.2. A figura 12c sugere que apenas uma parte dos macrófagos presentes nos rins dos animais derivou das células injetadas, e que a quantidade de células injetadas infiltrantes é maior para os macrófagos M1, quando comparados aos M2. A outra parcela dos macrófagos renais provavelmente derivou da medula óssea dos próprios camundongos ou da proliferação tecidual, como inferido por diferentes autores (71, 72). Além disso, nós podemos ainda observar que os macrófagos anteriormente caracterizados (dados presentes na figura 9) e transferidos são células plásticas. A figura 12d mostra que macrófagos M1, que anteriormente não expressavam CD206, sete dias após a injeção passam a expressar níveis similares aos dos macrófagos M2 de tal receptor de manose. Além disso, as figuras 12e-f mostram que macrófagos M1, que anteriormente expressavam maiores níveis de IFN γ e IL12 agora expressam níveis comparáveis aos dos macrófagos M2. Tal plasticidade já foi demonstrada por Lee S. e colaboradores (91), porém esta é a primeira vez que os dados são mostrados em animais repopulados que não possuem linfócitos T, ou seja, esta é a primeira vez nós observamos que macrófagos M1 podem mudar o fenótipo para um perfil M2, mesmo sem a presença de linfócitos que poderiam estar modulando tal plasticidade.

Fig. 12: Macrófagos M1 se tornam M2 e geram maior fibrose após sua transferência para camundongos Rag1 KO. Protocolo esquemático da injeção de macrófagos 3 dias após a realização da UUO (A). Porcentagem de células CD11b⁺ nos rins dos animais Rag1 KO depletados e injetados ou não com macrófagos M1 ou M2 (B). Porcentagem de células CD45.1⁺ nos rins dos animais Rag1 KO, CD45.2⁺ injetados com macrófagos CD45.1⁺ (C) Porcentagem de células CD11b⁺ que expressam CD206 (D), IFNγ (E) e IL12/23 (p40) (F) nos rins destes animais. Razão proteinúria/creatininúria da pelve (A) em animais Rag1 KO submetidos à UUO e injetados ou não com macrófagos M0, M1 ou M2 (G). Quantificação e fotomicrografias da deposição de colágeno por picrosirius (H e I) nos mesmos animais. A coloração com picrosirius é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. *p < 0,05.

4.7 A transferência de macrófagos com perfil M1 leva a uma piora no quadro fibrótico

Nosso próximo objetivo foi avaliar como estava o quadro inflamatório e fibrótico após a transferência de macrófagos para os animais Rag1 KO. Para tanto, nós injetamos macrófagos M0, M1 ou M2 em camundongos depletados de macrófagos e avaliamos, inicialmente, a proteinúria desses animais. Mesmo que macrófagos M0 possuem maior capacidade migratória *in vitro* e que macrófagos M2 são mais frequentes ao final do sétimo dia de UUO (dados mostrados anteriormente), animais injetados com macrófagos M1 apresentaram maior quantidade de proteína na urina (fig. 12g). Tal resultado ainda corroborou dados de picrossirius, no qual vemos que a injeção de M1 três dias após a obstrução do ureter levava a uma maior deposição de colágeno no dia 7 (figuras 12h-i). Os animais injetados com macrófagos M1 também exibiram maior deposição de α -SMA quando comparados aos animais que receberam macrófagos M0 e M2 (figuras 13a-b). Além disso, animais injetados com macrófagos do subtipo M1 mostram maior expressão de RNAm para $TGF\beta$, *colágeno do tipo 1* e *tslp*, comparados aos animais Rag1 KO sem depleção. O aumento da expressão dessas moléculas não pôde ser observado após a injeção de macrófagos M0 e M2 (figuras 13c-e). Além desses componentes relacionados com a fibrose, nós também observamos moléculas relacionadas com a inflamação. Como esperado, a injeção de macrófagos M1 aumentou a produção de IL12p40, IL1 β , IL6 e TNF α no sétimo dia após a UUO (figuras 13f-i).

Para esclarecer se o desenvolvimento da fibrose renal está relacionado com a simples presença de macrófagos M1 no início do dano, ou se está diretamente relacionado com o aparecimento de macrófagos do subtipo M2 com o passar do tempo, nosso próximo passo foi injetar macrófagos do subtipo M1 incapazes de se tornarem M2. Para tal, utilizamos duas estratégias diferentes: (1) injetamos células M1 em camundongos IL4 KO e (2) injetamos macrófagos M1 derivados da medula óssea de animais Stat6 KO em animais Rag-1 KO, uma vez que Stat6 participa da via de sinalização das citocinas IL4 e IL13 (92-94).

Inicialmente verificamos que macrófagos Stat6 KO exibem um perfil mais M1 quando comparados aos macrófagos WT, seja em seu estado basal (M0), ou com estímulo para diferenciação para M1 (IFN γ + LPS) ou M2 (IL4 + IL13 ou M-CSF). Utilizamos M-CSF, pois esta sinalização, que é independente de Stat6, e poderia levar à polarização dos macrófagos Stat6 KO para um perfil M2 ao injetarmos tais células *in vivo*. Porém, como

Fig. 13: Transferência de macrófagos M1 leva a um perfil mais inflamatório e mais fibrótico. Fotomicrografias e quantificação da deposição de asma (A e B) nos animais Rag1 KO nos quais foram transferidos M0, M1 ou M2. Expressão de mRNA de TGFβ (C), colágeno 1 (D) e TSLP (E) nos mesmos animais. Níveis de p40 (F), IL1β (G), IL6 (H) e TNFα (I) nos animais Rag1 KO depletados e que receberam os diferentes macrófagos. A imunohistoquímica é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada 1. *p < 0,05.

observado nas figuras 14a-c, mesmo que macrófagos Stat6 KO apresentem redução nos níveis de MIG, CCR7 e IL12p40 após o estímulo com M-CSF, a expressão dessas moléculas em tais células ainda é maior do que a expressão dessas moléculas em células WT. A adição de IL4 + IL13 em macrófagos Stat6 KO não reduziu de forma significativa os níveis de MIG, CCR7 e IL12/23 (p40) quando comparados aos macrófagos M0 provindos dos mesmos animais (fig. 14a-c). A expressão de CD206 é reduzida nas células derivadas da medula de animais Stat6 KO quando comparadas às células de animais selvagens, também independentemente do estímulo que essas células são expostas (fig. 14d).

Fig. 14: Caracterização fenotípica dos macrófagos não polarizáveis ao perfil M2. Caracterização por citometria de fluxo de células CD11b⁺ derivadas de animais WT e Stat6 KO quanto à porcentagem de expressão de MIG (A), CCR7 (B), IL12/23 (p40) (C) e CD206 (D) após estímulos para polarização em diferentes subpopulações. Macrófagos foram derivados da medula óssea de camundongos WT ou Stat6 KO após o cultivo com o sobrenadante de células L929 por 7 dias (M0). Algumas células foram polarizadas por 24h com IFN γ + LPS (M1), com IL4 + IL13 (M2), ou ainda com M-CSF (M2). *p < 0,05.

Após a caracterização fenotípica dos macrófagos derivados da medula óssea de animais Stat6 KO, nós os transferimos para animais Rag-1 KO, utilizando o mesmo protocolo de depleção de macrófagos seguida da cirurgia de UUO. Como visto na figura 15a-c, a injeção de macrófagos derivados de animais Stat6 KO leva a um maior quadro de proteinúria e maior deposição de colágeno nos rins dos animais receptores. Já a injeção de macrófagos WT polarizados para um perfil M1 em animais deficientes em IL4, mas que possuem células T, não acarretou aumento tão acentuado na proteinúria, o que revela que IL4 é importante para a participação de macrófagos no contexto de doenças renais, assim como demonstrado pela literatura (72). Entretanto, nós percebemos a mesma deposição de colágeno por picrosirius quando comparamos macrófagos injetados em camundongos IL4 KO aos animais

Rag-1 KO que receberam os mesmos macrófagos M1 (fig 15a-c). Tais resultados trazem novas perspectivas para o entendimento do quadro fibrótico em DRC ao mostrarem que o grau de fibrose está mais relacionado com a infiltração de macrófagos M1 do que com a própria presença de macrófagos M2.

Fig. 15: Macrófagos M1 são os causadores da fibrose renal. Razão proteinúria/creatininúria da pelve em animais Rag1 KO submetidos à UUO e injetados com macrófagos M1 de camundongos WT ou Stat6 KO. A proteinúria/creatininúria dos animais IL4 KO submetidos à UUO e que receberam macrófagos M1 provenientes de animais WT também é demonstrada (E). Quantificação e fotomicrografias da deposição de colágeno por picrosirius (F e G) nos mesmos animais. A coloração com picrosirius é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. * $p < 0,05$.

4.8 O ácido úrico é liberado após um quadro de hipóxia e é capaz de ativar a via do inflamassoma

Após verificarmos que os macrófagos M1 que alcançam os rins no momento do dano renal, através da sinalização via MyD88, são os responsáveis pelo desenvolvimento de fibrose, nosso próximo passo foi procurar a causa da ativação dessas células no contexto da lesão renal. Nós procuramos por ligantes endógenos capazes de ativar receptores TLRs como

o biglican, a fibronectina, HMGB1 e HSP70 (95, 96). Sete dias após a obstrução ureteral, apenas a fibronectina estava expressa em maior quantidade, quando comparados aos níveis dos animais controles (fig. 16a). Além disso, quantificamos o ácido úrico, outro marcador de dano celular, liberado toda vez que o conteúdo celular é liberado da célula. Como esperado, a quantidade de ácido úrico dosada nos rins dos animais submetidos à UUO é maior do que a quantidade nos rins dos animais controles (fig. 16b). Por isso decidimos avaliar a expressão da enzima responsável pela produção de ácido úrico a partir da xantina, durante o metabolismo de purinas, a xantina desidrogenase (XDH). Também há um aumento na expressão de *xdh* nos animais submetidos à cirurgia quando comparados aos animais controles (fig. 16c). Uma vez que o ácido úrico é liberado após a morte celular, especialmente quando condições de hipóxia deprivam a energia da célula (97), nós formulamos a hipótese de que o ácido úrico estaria aumentado devido ao quadro de hipóxia presente na UUO. Por isso, nós avaliamos o grau de hipóxia tecidual e, como observado nas figuras 16d-e, a obstrução do ureter levou a um maior quadro de hipóxia, o que confirmou nossa hipótese.

O aumento da concentração de ácido úrico posterior à hipóxia se explica pela degradação de certas moléculas contendo ligações de fosfato de alta energia. A quebra dessas ligações poderia compensar este estado de decréscimo de energia, o que leva ao aumento dos níveis de adenosina, que é subsequentemente degradado a inosina, hipoxantina, a xantina e, por último, a ácido úrico (98). Para corroborar nossos dados quanto à origem do ácido úrico, submetemos fibroblastos à hipóxia por diferentes tempos e quantificamos o ácido úrico liberado na cultura. Como observado na figura 16f, a hipóxia celular leva ao aumento da produção de ácido úrico. Por fim, avaliamos a expressão de moléculas relacionadas ao inflamassoma nos animais submetidos à UUO, uma vez que ácido úrico é descrito extensivamente como ativador do inflamassoma NLRP3 (26). A figura 16g mostra que *pro-IL1 β* , *pro-IL18*, *IL33*, *NLRP3* e *MyD88* são mais expressos em animais submetidos à UUO do que em controles. Temos, portanto, o primeiro indício de que o ácido úrico liberado após a UUO ativa a via do inflamassoma, o que acaba por gerar uma resposta inflamatória e posterior formação de fibrose.

Fig. 16: Moléculas relacionadas com o inflamassoma e o ácido úrico oriundo de um ambiente de hipóxia são aumentados após a UUO. Expressão de mRNA de HMGB1, HSP70, biglican e fibronectina (A) 7 dias após a cirurgia de UUO. Níveis de ácido úrico, normalizado pela proteína total, nos rins dos animais WT submetidos à UUO (B). Expressão de mRNA de xantina desidrogenase (C) nos rins 7 dias após a cirurgia. Fotomicrografias e quantificação da área de hipóxia nos rins dos animais WT 7 dias após a UUO (D e E). Níveis de ácido úrico no sobrenadante de células 3T3-L1 submetidas à hipóxia (F). Expressão de mRNA de *il1 β* , *il18*, *il33*, *nlrp3*, *nos2* e *MyD88* (G) 7 dias após a cirurgia de UUO. A imunohistoquímica para hipoxiprobe é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada 1. * $p < 0,05$.

4.9 A ativação do inflamassoma NLRP3 via ácido úrico é responsável pelo dano renal

Para confirmarmos o papel da ativação do inflamassoma no desenvolvimento da fibrose nós resolvemos então realizar obstrução ureteral nos animais deficientes em NLRP3 e compará-los tanto aos animais selvagens quanto aos animais MyD88 KO submetidos à UUO. Nós observamos na figura 17a que ambos os animais deficientes apresentam menor proteinúria quando comparados aos selvagens. Além disso, a deficiência tanto em NLRP3 quanto em MyD88 acarreta menor deposição de colágeno observada por picrossirius (fig. 17b e 17c). Também, nós quantificamos o ácido úrico produzido após a obstrução ureteral e, neste caso, os camundongos MyD88 KO apresentaram menores níveis de ácido úrico (fig. 17d). Como dito anteriormente, o ácido úrico é capaz de estimular moléculas do inflamassoma e por isso, nós avaliamos a expressão dessas moléculas. A expressão de *pro-IL1 β* , *pro-IL18*, *IL33*, *NLRP3* e *MyD88* é reduzida em ambos os animais KO (fig. 17e), o que é justificável pois o ácido úrico liberado não é capaz de estimular a via do inflamassoma no caso dos camundongos NLRP3 KO e a quantidade de ácido úrico produzida nos animais MyD88 KO é baixa. Confirmamos que a produção de MyD88 é reduzida nos animais NLRP3 KO por *western blotting* (figuras 17f-g).

Nosso próximo passo foi administrar ácido úrico exógeno no momento da cirurgia de obstrução do ureter. Diferente dos animais deficientes em NLRP3 e em MyD88, apenas os animais selvagens tiveram um aumento da proteinúria (fig. 18a). Os animais selvagens e MyD88 KO injetados com ácido úrico e submetidos à UUO tiveram aumento da expressão de colágeno do tipo 1 (fig. 18b), mas apenas no caso dos animais selvagens observamos o acompanhamento do aumento da expressão com o aumento da deposição de colágeno analisada por picrossirius (fig. 18c). Por outro lado, animais NLRP3 KO não aumentaram a expressão e a deposição de colágeno. Ademais, nós avaliamos a expressão de moléculas relacionadas com o inflamassoma sete dias após a injeção do ácido úrico concomitante com a cirurgia de UUO. Como visto na figura 18d, pró-IL1 β , NLRP3 e MyD88 são aumentados nos animais selvagens submetidos à UUO, quando comparados aos animais submetidos à UUO e injetados com ácido úrico. Além disso, nós observamos que os animais selvagens e MyD88 KO injetados com ácido úrico possuem redução na expressão de iNOS quando comparados aos animais não injetados, o primeiro indício de que o ácido úrico desvia a degradação da arginina feita pela iNOS para sua degradação pela arginase, uma característica de macrófagos com perfil mais M2 (fig. 18d).

Fig. 17: Animais deficientes ou em MyD88 ou NLRP3 são protegidos contra fibrose renal. Razão proteinúria/creatininúria da pelve (A) em animais WT, NLRP3 KO e MyD88 KO submetidos à UUO. Fotomicrografias e quantificação da deposição de colágeno por picrosirius (B e C) nos mesmos animais. Níveis de ácido úrico, normatizado pela proteína total, nos rins dos animais WT, NLRP3 KO e MyD88 KO submetidos à UUO (D). Expressão de mRNA de *il1 β* , *il18*, *il33*, *nlrp3*, *nos2* e *MyD88* (E) 7 dias após a cirurgia de UUO. Imagem e representação gráfica (E e G) do *western blotting* com anticorpo específico para o MyD88 dos animais

WT controle e WT, NLRP3 KO e MyD88 KO submetidos à UUO. A coloração com picrosirius é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada 1. * $p < 0,05$.

Fig. 18: A injeção de ácido úrico solúvel seguida pela UUO leva a um quadro de inflamação e fibrose. Razão proteinúria/creatininúria da pelve (A) em animais WT, NLRP3 KO e MyD88 KO submetidos à UUO e injetados ou não com ácido úrico solúvel. Expressão de mRNA (B) e quantificação da deposição de colágeno por picrosirius (C) aos 7 dias pós-cirurgia nos mesmos animais. Expressão de mRNA de *il1 β* , *il18*, *il33*, *nlrp3*, *nos2* e *MyD88* (D) 7 dias após a cirurgia de UUO. A coloração com picrosirius é representada pela proporção da área de coloração pela área total do campo. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada 1. * $p < 0,05$.

Na tentativa de avaliar o perfil de células do sistema imune sete dias após a injeção de ácido úrico, nós estudamos o fenótipo dessas populações celulares por citometria de fluxo. A figura 19a mostra que o ácido úrico foi capaz de aumentar a população de macrófagos CD11^{high} após a UUO nos animais selvagens, NLRP3 KO e MyD88 KO. Porém, apenas nos animais selvagens o ácido úrico foi capaz de aumentar a população de macrófagos do subtipo M2, caracterizados pela expressão de CD206 (fig. 19b). Por outro lado, a população de

macrófagos M1 não alterou entre os grupos analisados (fig. 19c e 19d). A mudança de perfil de resposta imune observada para os macrófagos pôde ser também observada para as células TCD4⁺ já que houve um aumento de células T IL4⁺CD4⁺ após a injeção de ácido úrico apenas nos animais selvagens e não houve variação da porcentagem de células T IFN γ ⁺CD4⁺ (fig. 19e-f). Esses dados indicam que a injeção de ácido úrico seguida pela obstrução do ureter gera uma resposta com perfil inflamatório do tipo Th2 e o desenvolvimento de fibrose, além de um maior número de macrófagos do subtipo M2 ao final dos 7 dias, de forma dependente de NLRP3 e MyD88.

Fig. 19: A injeção de ácido úrico solúvel seguida pela UUO acarreta no acúmulo de macrófagos de perfil M2. Porcentagem de células CD11b⁺ (A) nos rins dos animais WT, NLRP3 KO e MyD88 KO submetidos à UUO e injetados ou não com ácido úrico solúvel. Células CD11b⁺ foram avaliadas quanto à porcentagem de CD206 (B), MIG (C), p40 (IL12/23) (D). Células T CD4⁺ foram avaliadas quanto à porcentagem de IL4 (E) e IFN γ (F). *p < 0,05.

4.10 O bloqueio do ácido úrico leva a um melhor prognóstico frente à UUO

Na tentativa de reduzir os danos causados pela obstrução do ureter, os animais foram tratados com alopurinol durante os sete dias seguintes a UUO. Alopurinol é uma droga que inibe a XDH, e para demonstrarmos a eficiência da droga, dosamos o ácido úrico produzido nos rins dos animais. A figura 20a mostra que o ácido úrico liberado nos rins obstruídos dos animais que tomaram a droga foi menor do que nos animais submetidos à UUO sem o consumo da droga. Mais do que a redução nos níveis de ácido úrico, o consumo de alopurinol acarretou em menor proteinúria (fig. 20b), menor expressão de colágeno do tipo 1 (fig. 20c) e menor produção de hidroxiprolina (fig. 20d), o principal aminoácido constituinte do colágeno. Além disso, os animais tratados com alopurinol tiveram menor expressão de *pro-IL1 β* , *IL33*, *NLRP3*, *iNOS* e *MyD88* (fig. 20e). A menor expressão de *pró-IL1 β* foi acompanhada pela menor produção desta citocina sete dias após a obstrução (fig. 20f). Por fim, o uso de alopurinol acarretou uma menor produção de IL13, citocina relacionada com um perfil de resposta imune do tipo Th2, e maior produção de MIG (CXCL9), citocina de perfil Th1 (figuras 20g e 20h, respectivamente). Esses resultados trouxeram uma boa perspectiva quanto ao uso de bloqueadores da produção de ácido úrico frente à obstrução do ureter na redução do quadro fibrótico.

4.11 O ácido úrico é o responsável pela polarização de macrófagos para um perfil M2

Para avaliar o papel do ácido úrico na ativação e diferenciação dos macrófagos, derivamos células da medula óssea de animais selvagens e as diferenciamos em macrófagos. Após sete dias de diferenciação, nós trocamos o meio e adicionamos 180 μ M de ácido úrico diluído no meio de cultura na ausência ou presença de LPS. Como observado nas figuras 21a-b, o ácido úrico diminui a porcentagem de células marcadas com p40 (IL12/23) e com MIG. Além disso, o ácido úrico solúvel aumenta a porcentagem de células marcadas com CD206 (fig. 21c), dado que corrobora os resultados *in vivo* vistos na figura 19. Esta variação que favorece um perfil M2 é ainda intensificada com o uso de LPS. Além da mudança no perfil de macrófagos, nós podemos observar que o ácido úrico, quando colocado junto com o LPS, aumentou a expressão de *pró-IL1 β* de tal forma que o maior aumento se deu após 6 horas de estímulo. Com 24 e 72 horas, nós ainda vemos maior expressão de *pró-IL1 β* quando comparados às células não estimuladas, porém, tal expressão não é tão acentuada quanto com 6 horas (figura 21d). É interessante notar que após 24h e 72h de estímulo apenas com ácido

úrico, a expressão de *pró-IL1 β* é reduzida quando comparada às células não estimuladas, dados estes que corroboram mais uma vez, que a produção de IL1 β diminui sua própria expressão (99, 100). Nós resolvemos então utilizar o tempo de 24h por apresentar uma expressão intermediária para avaliarmos a produção das proteínas IL1 β e caspase-1. Como demonstrado nas figuras 21e-h, a IL1 β e a caspase-1 são aumentadas após o estímulo com ácido úrico sozinho ou junto com LPS tanto no lisado celular quanto no sobrenadante da cultura.

Fig. 20: Inibição do ácido úrico resulta em melhor função renal, menor fibrose e diminuída resposta Th2. Tratamento com allopurinol reduz os níveis de ácido úrico (A) nos rins dos animais WT submetidos à UUU.

Razão proteinúria/creatininúria da pelve (B) em animais WT submetidos à UUO tratados ou não com alopurinol. Expressão de mRNA de colágeno 1 nos rins desses animais. Quantificação da hidroxiprolina (C) e expressão de mRNA de *il1 β* , *il18*, *il33*, *nlrp3*, *nos2* e *MyD88* (D) nos rins 7 dias após a cirurgia de UUO. Níveis de IL1 β (E), IL13 (F) e MIG (G) renais nos animais submetidos à UUO tratados com alopurinol e seus controles WT com e sem cirurgia. O ácido úrico, a hidroxiprolina, IL1 β , IL13 e o MIG foram normalizados pela quantidade de proteínas totais nas amostras analisadas. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média dos camundongos controles foi considerada 1. *p < 0,05.

Fig. 21: O ácido úrico solúvel é responsável pela polarização dos macrófagos em M2 e pela ativação do inflamassoma *in vitro*. Porcentagem de macrófagos CD11b⁺ que expressam IL12/23 (p40) (A), MIG (B) e CD206 (C) após serem estimulados com ácido úrico solúvel na presença ou ausência de LPS. Expressão de mRNA de IL1 β nos macrófagos WT estimulados com ácido úrico por 6, 24 ou 72 horas (D). Imagem (E) e representação gráfica do *western blotting* do lisado de células (F e G) ou do sobrenadante de cultura (H), com anticorpos específicos para IL1 β (F e H) e caspase-1 (G) de macrófagos estimulados com ácido úrico solúvel na presença ou ausência de LPS. qPCR foi normalizado pelo HPRT, e a média das amostras de células controle, sem o estímulo foi considerada 1. *p < 0,05.

Posteriormente, nós avaliamos a expressão de várias moléculas relacionadas com o inflamassoma após o estímulo de macrófagos selvagens, macrófagos deficientes em NLRP3 e deficientes em MyD88, com ácido úrico. A figura 22a mostra alguns dos genes diferencialmente expressos entre os diferentes macrófagos. Ao agruparmos os macrófagos em *clusters* por semelhança na expressão dos diversos genes, verificamos que os macrófagos MyD88KO estimulados com ácido úrico são os mais próximos dos macrófagos selvagens não estimulados enquanto que os macrófagos selvagens estimulados são os mais distantes. A figura 22b mostra uma comparação entre macrófagos selvagens estimulados ou não com ácido úrico. Mais uma vez observamos que a expressão de *IL1 β* diminui após 24h de estímulo. Interessante notar que o único gene superexpresso após 24h é o *Naip1*. Na figura 22c, nós comparamos macrófagos selvagens e macrófagos NLRP3 KO estimulados com ácido úrico enquanto que em 22d comparamos macrófagos selvagens e macrófagos MyD88 KO também estimulados. Em ambas as comparações, nós observamos mais uma vez que *Naip1* apresenta maior expressão nos macrófagos selvagens.

Após a análise dos genes diferencialmente expressos entre os macrófagos NLRP3 KO, MyD88 KO e os selvagens, nós resolvemos comparar essas células quanto à produção de *IL1 β* após o estímulo com ácido úrico na presença ou ausência de LPS. Como controle do experimento, nós colocamos também o ácido úrico na presença de uricase. Nós vemos na figura 22e que somente os macrófagos selvagens aumentam a produção de *IL1 β* , liberado no meio de cultura, após o estímulo de 24h com ácido úrico. Nós podemos observar ainda que tal aumento é acentuado quando o ácido úrico é acompanhado do LPS. Os experimentos com os controles nos quais usamos apenas LPS são mostrados na figura 3a do anexo. Uma vez que a medida de *IL1 β* pelas técnicas conhecidas não distingue sua forma inativa da forma ativa, nós utilizamos um sistema de transfecção celular no qual a clivagem de pró-*IL1 β* em *IL1 β* gera um ganho da atividade de luciferase, presente no constructo transfectado (101). Nós repetimos, então, o experimento anterior, no qual estimulamos os diferentes macrófagos com ácido úrico e, mais uma vez, observamos que somente os macrófagos selvagens são capazes de clivar a pró-*IL1 β* em *IL1 β* madura (fig. 22f). O ganho de luminescência observado é perdido quando o ácido úrico é colocado juntamente com a uricase. Os experimentos com os controles nos quais usamos apenas LPS ou ainda colocamos LPS com nigericina, um ativador de NLRP3, são mostrados na figura em anexo 3b.

Fig. 22: O ácido úrico solúvel ativa o inflamassoma de maneira dependente de NLRP3. PCR array demonstrando as expressões dos genes relacionados à via do inflamassoma em macrófagos derivados de camundongos WT, NLRP3 e MyD88 KO estimulados com ácido úrico solúvel durante 24h (A). Genes diferencialmente expressos comparando-se macrófagos estimulados ou não com ácido úrico (B). As barras em preto representam os genes super expressos nos macrófagos estimulados com ácido úrico solúvel. Genes diferencialmente expressos comparando-se macrófagos WT e NLRP3 KO, estimulados com ácido úrico solúvel (C). Genes diferencialmente expressos comparando-se macrófagos WT e MyD88 KO, estimulados com ácido úrico solúvel (D). Em C e D, as barras em preto representam os genes super expressos nos macrófagos WT. Produção de IL1 β normalizada pela proteína total em sobrenadante de cultura de diferentes macrófagos estimulados com ácido úrico solúvel por 24h (E). Quantificação do ganho de luciferase dos diferentes macrófagos após serem transfectados com vetor específico e estimulados com ácido úrico solúvel (F). A luciferase é expressa toda vez que pró-IL1 β é clivada em IL1 β . * $p < 0,05$.

4.12 A hipóxia das células leva à ativação do inflamassoma

Uma vez que mostramos anteriormente que o ácido úrico provém de um ambiente de hipóxia, nosso próximo passo foi averiguar se a hipóxia é capaz de induzir a ativação de componentes do inflamassoma em macrófagos. Como observado na figura 23a, a hipóxia por

24h é capaz de aumentar a expressão de *pró-IL1 β* , *NAIP1* e *MyD88*. Além disso, *NLRP12*, um dos reguladores da ativação do inflamassoma (26) é menos expresso após as células serem colocadas em um ambiente de hipóxia. Nós avaliamos então a produção de IL1 β no sobrenadante dos macrófagos submetidos à hipóxia. Como visto na figura 23b, a hipóxia eleva as concentrações de IL1 β , quadro que é revertido com o uso da uricase. Tais resultados confirmam nossa hipótese de que o ácido úrico proveniente da morte por hipóxia acarreta na ativação da via do inflamassoma e leva à produção de IL1 β pelos macrófagos.

Fig. 23: Hipóxia induz ativação do inflamassoma. Genes relacionados à via do inflamassoma analisados por PCR array e diferencialmente expressos comparando-se macrófagos WT em normóxia com macrófagos em hipóxia (A). As barras em preto representam os genes super expressos nos macrófagos em hipóxia durante 24h. Produção de IL1 β normalizado pela proteína total em sobrenadante de cultura de macrófagos WT em normóxia e em hipóxia (B). * $p < 0,05$.

4.13 O ácido úrico ativa a via do inflamassoma através de diferentes sinais

É preciso dois sinais para a ativação do inflamassoma: o primeiro sinal deve ser capaz de induzir a expressão de *pró-IL1 β* e *pró-IL18*, enquanto que o segundo sinal deve ser capaz de clivar tais formas inativas em uma forma ativa (102). Muito se sabe sobre a via de ativação do inflamassoma e vários segundos sinais são propostos para que haja a clivagem de *pró-IL1 β* (103), porém o consenso a respeito do fator comum entre os diferentes sinais ainda não foi estabelecido. Dessa forma, investigamos diferentes hipóteses para a ativação do segundo sinal, responsável por tal clivagem. O primeiro deles foi a procura de compostos particulados que pudessem causar a ruptura da membrana plasmática e ativar a via do inflamassoma. Fica

claro na imagem de microscopia eletrônica de transmissão que o padrão de organização da membrana plasmática dos macrófagos WT estimulados com ácido úrico é diferente daquele visto nas mesmas células, porém sem adição do ácido úrico solúvel (fig. 24a). As membranas plasmáticas de ambos os macrófagos MyD88 e NLRP3 KO estimulados com ácido úrico são mais parecidas com a membrana dos macrófagos WT sem ácido úrico (fig. 24a). Além disso, na figura 24a, a seta aponta uma estrutura englobada por um pedaço de membrana. Tal estrutura pode ser vista em maior aumento na figura 3c do anexo.

A segunda hipótese analisada com relação ao segundo sinal como sendo responsável pela ativação do inflamassoma foi a alteração na taxa do consumo de oxigênio (OCR). Na figura 24b avaliamos o consumo de oxigênio dos macrófagos estimulados com ácido úrico. Observamos que o oxigênio não mitocondrial dos macrófagos NLRP3 KO é menor quando comparado aos macrófagos WT e MyD88 KO estimulados com ácido úrico solúvel. Como proposto por Hill e colegas (104), tal resultado indica que as ROS extra mitocondrial no caso dos macrófagos NLRP3 KO estão em menor quantidade. Além disso, observamos que macrófagos NLRP3 KO estimulados com ácido úrico possuem baixa demanda de ATP uma vez que o oxigênio ligado ao ATP no caso desses macrófagos é menor quando comparados aos macrófagos WT e MyD88 KO. Aliado a tal resultado, também observamos que macrófagos NLRP3 KO quando estimulados com ácido úrico solúvel apresentam maior taxa de acidificação do meio quando comparados aos macrófagos WT e MyD88 KO (fig. 24c). Temos um indício, portanto, de que células deficientes em NLRP3 utilizam-se do efeito Warburg para produção de energia (104). Tais resultados sugerem, portanto, que o padrão de consumo de oxigênio dos macrófagos deficientes em NLRP3 é diferente do padrão dos macrófagos WT e MyD88 após serem estimulados com ácido úrico.

A última hipótese que analisamos como sendo a responsável pelo segundo sinal da ativação do inflamassoma foi o efluxo de potássio. Para tal, nós bloqueamos o efluxo de potássio ao colocarmos uma concentração alta de potássio no meio extracelular, em comparação com a mesma concentração de sódio, e nós observamos que no caso dos macrófagos selvagens, há menor produção de IL1 β após o bloqueio (fig. 24d). Em conjuntos, tais resultados mostram que o ácido úrico solúvel é capaz de ativar a via do inflamassoma por diferentes mecanismos.

Fig. 24: O ácido úrico ativa a via do inflamassoma através de diferentes maneiras. Micrografia eletrônica de transmissão de macrófagos WT, MyD88 KO e NLRP3 KO estimulados com ácido úrico solúvel (A). A seta indica uma estrutura particulada no interior de um vacúolo. Gráficos relativos ao consumo de oxigênio, dividido entre a capacidade de reserva, vazamento de prótons, oxigênio ligado ao ATP, e consumo não mitocondrial de macrófagos WT, MyD88 KO e NLRP3 KO estimulados com ácido úrico solúvel (B). Representação gráfica do ECAR dos diferentes macrófagos após adição no meio de oligomicina, CCCP, antimicina A e rotenona (C). Quantificação de IL1 β no sobrenadante dos macrófagos WT, NLRP3 e MyD88 KO estimulados com ácido úrico solúvel após o bloqueio do efluxo de potássio pela adição de 150 mM de potássio no meio extracelular (D). *p < 0,05.

5 DISCUSSÃO

A fibrose renal é resultado final a um insulto que leva a um desbalanço entre a produção e a degradação de componentes da matriz extracelular (MEC). No modelo experimental de UUO, uma vez que a obstrução do ureter é contínua, a deposição dos componentes da matriz (MEC) se torna massiva e, aliado a isso, o aumento da pressão intra-tubular leva a apoptose de células epiteliais renais que resulta em atrofia tubular (64). O remodelamento da MEC e o estresse celular liberam moléculas que ativam respostas inflamatórias via receptores do sistema imune inato. Vários grupos demonstraram a importância de receptores do tipo *Toll* em DRC, onde estes receptores são ativados por produtos relacionados à deposição de componentes da MEC (63, 65, 105). Por outro lado, dados anteriores mostram que a deficiência em TLR2 e TLR4 faz com que animais sejam mais protegidos da fibrose (63-65, 105), porém, até agora, pouco se sabe como que a ativação desses receptores culmina no processo de fibrogênese. Além disso, já foi proposto que citocinas de padrão Th2 estão implicadas na formação de fibrose em diferentes modelos de doenças crônicas (50, 52, 106). Então, nossa hipótese foi de que a ativação de receptores do tipo *Toll* levaria à formação de fibrose através da modulação da resposta imune ao influenciar a diferenciação de macrófagos para um perfil M2 e a população de linfócitos para um perfil Th2. Assim, nós exploramos o papel da resposta imune inata, especificamente das vias que convergem para sinalização via MyD88, e a resposta imune adaptativa, ao estudar o desenvolvimento de um perfil de resposta celular do tipo Th2 e investigamos a diferenciação de macrófagos, num modelo experimental de lesão renal crônica.

Inicialmente, ao caracterizar a resposta imune neste modelo, nós evidenciamos que animais selvagens exibiram um perfil Th2 frente à obstrução ureteral enquanto que os animais TLR2, TLR4 e MyD88 KO, não. Além disso, nós também observamos um aumento de citocinas de perfil Th1 nos animais selvagens, porém, assumimos que o aumento das citocinas de perfil Th2 teve maior relevância biológica para a indução de fibrose, pelo nível de expressão dos fatores de transcrição. Níveis diminuídos de TGF- β , IL13, IL4, GATA-3, TSLP e de atividade de arginase-1 nos animais TLR2, TLR4 e MyD88 KO corroboraram tal hipótese.

A IL13, uma citocina de perfil Th2, promove a produção de colágeno por meio de diferentes, mas, sobrepostos, mecanismos (107). Ela estimula a produção de TGF- β pelos macrófagos, ativa diretamente a maquinaria de produção de colágeno nos fibroblastos e também promove a ativação de macrófagos alternativos (M2) ao aumentar a atividade de

arginase nestas células (107). Membros da superfamília de TGF- β são os mais extensivamente estudados fatores de crescimento derivados de macrófagos que foram relacionados à fibrose renal. Esta citocina é um quimioatraente potente para macrófagos/monócitos e pode induzir a transformação de miofibroblastos via transição endotélio-mesenquimal ou transição epitélio-mesenquimal (108). No nosso modelo, a expressão da IL13 e TGF- β estava aumentada em todos os camundongos com maior deposição de colágeno. Finalmente, a TSLP, que foi reduzida nos animais deficientes em TLR2, TLR4 e MyD88, é descrita como eficaz na diferenciação de células Th2. A combinação de estimulação de TCR e a sinalização via TSLP é capaz de induzir a transcrição de IL4 e maior polarização Th2 (109). Por isso, a diminuição dos níveis destes produtos relacionados ao perfil Th2 que foram observados em camundongos protegidos leva à conclusão de que a obstrução ureteral induz o desenvolvimento de fibrose de uma maneira dependente da resposta imune com perfil Th2.

Para determinar a origem das células relacionadas com o perfil imune Th2, nós investigamos a contribuição de infiltração de células hematopoiéticas e/ou células do parênquima na formação da fibrose. Inicialmente, nós realizamos experimentos com quimerismo e observamos que os camundongos IL12 KO ao receberem a medula óssea de animais IL4 KO demonstraram melhora da função renal e diminuição da deposição de colágeno, o que sugere uma dependência de IL4 oriundo de células hematopoiéticas para gerar fibrose. Os linfócitos T e macrófagos são incluídos nestas células hematopoiéticas, no entanto, o papel dos linfócitos T na formação de fibrose é controverso. Tapmeier colaboradores afirmam que as células T CD4⁺ desempenham um papel crucial na fibrose renal oriunda da obstrução ureteral (110). No entanto, este grupo não encontrou nenhuma diferença no dano tubular, no número de macrófagos F4/80⁺ e na expressão de mRNA de TGF- β ao comparar camundongos Rag-1 KO e WT, o que sugere que a redução da fibrose nos animais Rag-1 KO pode ser o resultado do menor infiltrado de macrófagos. Por outro lado, Shappell e colegas demonstraram que a ausência de células T não altera a atrofia tubular e a expansão do volume intersticial em comparação com camundongos com células T em modelo de nefropatia obstrutiva (111). Nossos dados são consistentes com o estudo de Shappell, indicando que a resposta fibrótica é uma consequência indireta da injúria renal mediada por células T, ao invés de células T serem diretamente responsáveis pela fibrose. As células T parecem atuar mais como influenciadoras da função dos macrófagos e da deposição de colágeno pelos fibroblastos.

A infiltração de macrófagos no rim é uma característica proeminente associada com a gravidade da lesão renal e a progressão da insuficiência renal (112). Vários grupos mostraram

que a depleção dos fagócitos com clodronato encapsulado por lipossomos em diferentes modelos de lesão renal reduz os danos morfológicos nos rins (89, 113, 114). No entanto, estudos recentes levantam a possibilidade de que o fenótipo dos macrófagos recrutados, ao invés de sua presença em si, determina a extensão da lesão do parênquima renal (91, 114). Wang e colaboradores demonstraram que a infusão de M1 induz uma piora nos parâmetros renais em um modelo pró-inflamatório de doença renal (112). A presença de macrófagos pró-inflamatórios em órgãos lesados aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induz a morte de células tubulares (115). Além disso, a população de macrófagos M2 aumenta quando ocorre a proliferação de tais células tubulares, principalmente em modelos crônicos de injúria renal. Lee *et al.* demonstraram que os macrófagos M1 diminuem a expressão de iNOS e aumentam marcadores de M2 após o contato com as células do túbulo proximal, quer num sistema *in vitro* quer num modelo de lesão crônica *in vivo* (91). No entanto, mais estudos devem ser realizados para esclarecer até que ponto, diferentes subpopulações de macrófagos são atraídas para o rim, ou uma única célula é plástica e, portanto, capaz de causar dano e também regular o processo cicatricial.

Com base no processo de cicatrização de feridas, Anders *et al.* propuseram quatro tipos diferentes de macrófagos. Estes grupos são os macrófagos M1, induzidos em um contexto de uma infecção renal e necrose celular, os macrófagos M2c/supressores que são induzidos por captação de células apoptóticas, os macrófagos M2a/cicatrizadores, induzidos pela secreção de abundantes fatores de crescimento, e macrófagos fibrolíticos, envolvidos no processo de redução da cicatriz (75). No presente estudo foi investigada a presença de macrófagos M1 (pro-inflamatórios) e M2 (cicatrizadores), e encontramos uma diminuição da quantidade de macrófagos M2 em camundongos deficientes em TLR2, TLR4, MyD88 e IL4. Esses camundongos em última análise apresentavam menor fibrose.

Propomos, portanto, que o modelo de obstrução do fluxo urinário gera o recrutamento e ativação de macrófagos M2 e uma consequente resposta imune do tipo Th2 (116, 117), de maneira dependente de MyD88. Este processo culmina com a deposição de matriz extracelular e formação de fibrose. Tomados em conjunto, estes resultados fornecem evidência de que futuras estratégias terapêuticas contra fibrose renal devem ser acompanhadas da modulação do equilíbrio M1/M2 e Th1/Th2, e este controle parece ser essencial na DRC. Uma vez que observamos que os macrófagos M2 são os mais abundantes no nosso modelo de UUO, resolvemos testar a hipótese de que tais macrófagos são os responsáveis diretos pela formação da fibrose. O mesmo modelo de depleção e posterior injeção de macrófagos já foram realizados por Lee e colaboradores (91), porém, este estudo foi realizado num modelo

de isquemia e reperfusão. Além dessa diferença, nós utilizamos animais Rag-1 KO para minimizar qualquer alteração fenotípica dos macrófagos subsequente à ativação por linfócitos, diferente dos camundongos utilizados no estudo citado. Como esperado, a injeção de macrófagos M1 levou ao aumento de moléculas inflamatórias, e para nossa surpresa, também levou ao aumento de moléculas pró-fibróticas, como no caso da produção de α -SMA e expressão de *tgfb*, *colágeno 1* e *tslp*, além de maior deposição de colágeno. A literatura que credita o papel fibrótico aos macrófagos M2 é vasta (116, 118-120), porém o que propusemos, a partir desses dados, e diferente do que esperávamos, é que os macrófagos M2 possuem muito mais um papel resolutivo do que fibrótico num contexto de DRC. Essa hipótese é também apresentada por Pesce *et al.* em dois diferentes trabalhos (121, 122), nos quais os autores mostram que macrófagos Arginase-1⁺ e macrófagos Fizz1⁺ funcionam mais como supressores do que como indutores de uma inflamação do tipo Th2 e de fibrose. Macrófagos M2 produzem arginase-1, enquanto macrófagos M1 expressam óxido nítrico sintase (NOS2). Ambas as enzimas clivam L-arginina, porém NOS2 gera hidroxarginina e L-citrulina, enquanto a arginase-1 promove a produção de uréia e L-ornitina. A L-ornitina é o substrato para formação de poliaminas, que são cruciais para o crescimento celular, e para formação de L-prolina, o principal aminoácido que compõe o colágeno. Por essa razão, credita-se aos macrófagos M2 como sendo os responsáveis pelo processo fibrótico (120), porém, nossos dados mostram que macrófagos M2, apesar de díspares expressões de moléculas relacionadas à MEC quando comparados aos macrófagos M0 e M1, não são os macrófagos que mais produzem TGF β , nem são aqueles que mais migram *in vitro*. Além disso, a injeção de macrófagos M2 em camundongos após a obstrução ureteral não é capaz de aumentar a síntese de colágeno destes tais como no caso da injeção de macrófagos M1. Nós sugerimos, portanto, que o grau de fibrose está mais relacionado aos macrófagos inflamatórios M1 em um momento que precede ao período de fibrogênese do que à presença de macrófagos M2 *per se*.

Assim como observado por Lee e colegas (91), nós também vimos que macrófagos M1 se tornam M2 com a cronicidade da doença. Este fato explica porque nós temos mais macrófagos M2 no momento da formação de fibrose e porque tais células são erroneamente mais associadas como causadoras do processo fibrótico. Por isso, nós injetamos macrófagos M1 incapazes de mudarem o fenótipo para um perfil M2. Utilizamos macrófagos provenientes da medula óssea de animais Stat6 KO, já que tal fator de transcrição é mobilizado após a sinalização de IL4/IL13 (92, 93, 123). Usamos como controles, macrófagos Stat6 KO polarizados para um perfil M2 com M-CSF (124, 125), uma vez que a sinalização via M-CSF é independente de Stat6. Tais células não exibem um perfil M2 e, ao contrário, possuem um

perfil M1 mais acentuado. Macrófagos M1 provenientes de camundongos Stat6 KO transferidos para animais Rag-1 KO, geram uma piora do quadro fibrótico, o que corrobora dados anteriores de que a presença de M1 é mais preditiva para o desenvolvimento posterior da fibrose. Por outro lado, a transferência de macrófagos M1 provenientes de animais selvagens em camundongos deficientes em IL4 faz com que a deposição de colágeno nesses animais seja a mesma quando comparada à deposição vista após a injeção dos mesmos macrófagos em animais Rag-1 KO, o que pode ser explicado por outros fatores presentes nos animais IL4 KO, como por exemplo, a IL13, que poderiam modificar o fenótipo das células injetadas. Entretanto, observamos menor perda de função renal nos animais IL4 KO que receberam macrófagos M1, fato este que poderia ser explicado pela menor proliferação tecidual dos macrófagos na ausência de IL4, como proposto por Jenkins e colaboradores (72).

Vista a importância dos macrófagos para o desenvolvimento da fibrose renal, nosso próximo passo foi averiguar quais fatores poderiam induzir tal ativação celular. A lesão tecidual observada na UUO compromete a integridade da membrana plasmática das células renais e leva à liberação inadequada do conteúdo intracitoplasmático, que são considerados padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que em última análise, podem ser detectados por receptores da imunidade inata (126). O modelo da ativação do sistema imune por DAMPs foi proposto por Matzinger (127) e, segundo tal modelo, a resposta imune só é montada em um contexto de perigo, sem o qual desenvolveríamos tolerância. Vários estudos demonstram que DAMPs podem sinalizar por meio de MyD88 (95, 128). Inicialmente, examinamos ligantes endógenos previamente correlacionados com doenças renais: HMGB1, biglicana, fibronectina e HSP-70. Tais ligantes, com exceção da fibronectina foram semelhantes entre os grupos, apesar de vários estudos demonstrarem a importância de tais DAMPs na fibrose (96), o que poderia ser explicado pelo tempo analisado após a obstrução. Babelova e colegas mostraram, por exemplo, que biglicana desempenha um papel importante na produção de IL1 β e na lesão tubular após UUO; no entanto, biglicana aparece aumentada apenas no terceiro dia após a cirurgia (95).

Outro DAMP avaliado aos sete dias de cirurgia foi o ácido úrico (129), e seus níveis também se mostraram reduzidos em camundongos protegidos. Ácido úrico é uma molécula pró-oxidante bem conhecida que reduz a disponibilidade de NO através de um mecanismo dependente da arginase (130). Além disso, o acúmulo de ácido úrico aumenta a produção de ROS, ativa NF- κ B e as vias MAPK, e estimula a produção de MCP-1, uma quimiocina para macrófagos (130). Dados da literatura corroboram a ideia de que ligantes endógenos podem ser libertados a partir de tecidos isquêmicos, e o ácido úrico é um ótimo candidato para tal

(129, 131). Nós mostramos que os animais MyD88 KO apresentam uma redução na liberação de ácido úrico e em adição a isso, a resposta reduzida frente ao ácido úrico no caso de camundongos deficientes em NLRP3 (132) explica a secreção diminuída de citocinas relacionadas ao inflamassoma observados nos animais NLRP3 e MyD88 KO. Por consequência, observamos menor dano e formação de fibrose em tais animais KO.

O estudo do ácido úrico tem implicações evolutivas, uma vez que primatas, como os seres humanos, diferente de outros mamíferos, incluindo os camundongos, perderam a capacidade de síntese de uricase (133). A consequência direta é que nós possuímos maiores níveis séricos de ácido úrico do que camundongos (180-400 μM versus 18-40 μM) (129, 134) e talvez concentrações fisiológicas para seres humanos sejam indutoras de uma resposta imune nas células murinas. É consenso, porém, que o ácido úrico, liberado a partir da morte de células em ambas as espécies atue como um ativador da inflamação (29, 135). Tal molécula é considerada um adjuvante para a ativação de células dendríticas (29) e células T (136) nos camundongos. Em nossos experimentos, utilizamos 180 μM de ácido úrico e verificamos que em tais concentrações, fomos capazes de estimular a produção de IL1 β pelos macrófagos e modulá-los para um perfil M2, resultados que são dependentes tanto de NLRP3 quanto de MyD88. Além disso, os níveis de ácido úrico também aumentam em períodos prolongados de fome, quando nossas reservas de gordura estão escassas e a degradação de nossas proteínas ocorre (133). Tais implicações para a ativação da via dos inflamassomas serão discutidas posteriormente.

A liberação de IL1 β é uma medida indireta para estudar a ativação da via do inflamassoma. No entanto, as técnicas utilizadas para tal medida são incapazes de distinguir a forma madura do IL1 β de sua forma não clivada, que também pode ser liberada após o estresse celular. Por isso, utilizamos um sistema de transfecção celular no qual a clivagem de pró-IL1 β em IL1 β gera um ganho da atividade de luciferase, presente no constructo transfectado (101), o que tornou um padrão ouro para o estudo do inflamassoma. Para que o IL1 β seja clivado em sua forma ativa, inicialmente é necessário que um primeiro sinal, dependente de TLR, aumente a expressão de pró-IL1 β . Um segundo sinal é responsável pela formação do complexo de inflamassoma, composto por NLRP3, a molécula adaptadora ASC, e também caspase-1, que cliva o pró-IL1 β em IL1 β (102, 135). Outro aspecto a ser considerado acerca da biologia do IL1 β , além de sua formação, é que sua produção desencadeia um *feedback* negativo na sua própria expressão, uma vez que a proteína IL1 β sinaliza via receptor de IL1, que por sua vez é acoplado ao MyD88 (99, 100). Isso explica, por exemplo, observarmos menor expressão de pró-IL1 β sete dias após a inoculação de ácido

úrico, seguida pela cirurgia de UUO, *in vivo*, e também a menor expressão de pró-IL1 β em macrófagos 24h após o estímulo com ácido úrico, *in vitro*.

Além da dependência de NLRP3 para a ativação do inflamassoma, verificamos também que o estímulo de ácido úrico solúvel durante 24h induz a expressão de NAIP1 em macrófagos, outra molécula relacionada com o inflamassoma. NAIP1 é descrita como capaz de reconhecer T3SS, proteína com um formato de seringa, presentes em patógenos (137, 138). Pode ser que NAIP1 seja um sensor *upstream* ou um adaptador de NLRP3, que facilite sua ativação. Porém, mais estudos são necessários para entendermos qual a relação física entre a molécula de ácido úrico e NAIP1. Nossa primeira hipótese investigada a respeito da ativação do inflamassoma pelo ácido úrico solúvel foi, portanto, a presença de compostos particulados, que podem interagir com o complexo do inflamassoma. As outras hipóteses investigadas incluíram a alteração do perfil metabólico das células, e o efluxo de potássio (103). A disponibilidade de ROS proveniente de mitocôndrias no interior dos macrófagos é capaz de ativar NLRP3 (139), o que faz com que o ácido úrico seja, portanto, capaz de alterar o consumo de glicose e a o perfil metabólico das células, de forma a desviar a via metabólica basal na ausência de inflamação para produção de ROS num contexto inflamatório, de forma dependente de NLRP3. As três hipóteses foram confirmadas em nosso estudo, o que nos faz pensar que muito ainda deve ser feito para elucidar se há uma característica comum entre os diferentes DAMPs que ativam NLRP3 (36).

Numa visão geral, a obstrução do ureter causa danos renais mediados por diferentes receptores da imunidade inata, como o TLR2, TLR4 e a molécula sinalizadora MyD88. Tais danos são quimiotáticos para diferentes células do sistema imune, como os linfócitos T e macrófagos. Os primeiros macrófagos a migrarem para o rim, os macrófagos do subtipo M1 geram danos renais como a amplificação da resposta imune e, com a cronicidade da doença, tornam-se macrófagos M2, que tentam controlar a inflamação inicial. Portanto, apesar de os macrófagos M1 serem os causadores da lesão renal, ao final de sete dias de obstrução observamos mais macrófagos do subtipo M2. Outra molécula que atua como DAMP no contexto da UUO é o ácido úrico solúvel, liberado principalmente pela hipóxia tecidual vista neste modelo. O ácido úrico é capaz de ativar a via do inflamassoma de forma dependente de NLRP3 e também capaz de aumentar a população macrófagos M2 ao longo do tempo. O dano renal observado com a presença de ácido úrico e sua sinalização via receptores da imunidade inata citados trazem como consequência a deposição de proteínas no interstício renal e formação de um quadro de fibrose.

6 CONCLUSÕES

Tendo como base nossos resultados, podemos concluir que a formação da fibrose depende da modulação da população de macrófagos e da ativação de diferentes componentes da imunidade inata.

6.1 Quanto à participação das moléculas TLR2, TLR4 e MyD88 no desenvolvimento da fibrose

- ✓ A deficiência em TLR2, TLR4 ou MyD88 gera um quadro de menor fibrose renal; e
- ✓ a deficiência em tais receptores gera um menor perfil de resposta imune do tipo Th2 durante o desenvolvimento da fibrose.

6.2 Quanto à participação de diferentes subpopulações de macrófagos no desenvolvimento da fibrose

- ✓ Macrófagos são as células responsáveis diretamente pelo desenvolvimento da fibrose;
- ✓ Macrófagos M1, encontrados no início da injúria renal, se tornam macrófagos M2 com a cronicidade da doença; e
- ✓ A presença de macrófagos M1 no início da doença é preditiva de um quadro de fibrose observada no período tardio.

6.3 Quanto à participação do ácido úrico solúvel na ativação do inflamassoma NLPR3 e posterior desenvolvimento da fibrose

- ✓ O ácido úrico solúvel é um ligante endógeno liberado no contexto da lesão crônica devido a um quadro de hipóxia;
- ✓ A via do inflamassoma de NLPR3 é ativada pelo ácido úrico solúvel na UUO;
- ✓ O ácido úrico solúvel é capaz de modular macrófagos e induzir um quadro de fibrose; e
- ✓ NLPR3 é ativado por diferentes mecanismos durante o estímulo com ácido úrico.

REFERÊNCIAS*

1. Zatz R, Romao JE, Jr., Noronha IL. Nephrology in Latin America, with special emphasis on Brazil. *Kidney international Supplement*. 2003;83):S131-4.
2. Mangione F, Dal Canton A. The epidemic of chronic kidney disease: looking at ageing and cardiovascular disease through kidney-shaped lenses. *Journal of internal medicine*. 2010;268(5):449-55.
3. Nagle RB, Bulger RE, Cutler RE, Jervis HR, Benditt EP. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1973;28(4):456-67.
4. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney international*. 2005;68(3):925-37.
5. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 1995;47(5):1285-94.
6. Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, et al. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int*. 2001;60(3):924-34.
7. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
8. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349-63.
9. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004;1(2):98-105.
10. Liu JY, Li SR, Ji SX. [Effects of connective tissue growth factor antisense oligonucleotides on the cultured human keloid fibroblasts in vitro]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2004;20(6):454-6.
11. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8):2199-210.
12. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
13. Strutz F. Novel aspects of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(9):1526-32.
14. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110(3):341-50.
15. Stahl D, Venetz JP, Lacroix-Desmazes S, Rondeau E, Bonnin E, Kazatchkine MD, et al. Idiopathic membranous glomerulonephritis is associated with altered patterns of self-reactive IgM and IgG antibody repertoires. *Scand J Immunol*. 2001;54(5):534-42.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

16. Yang L, Liu X, Fu H, Qiang O, Huang M. [TGF beta 1 and ET-1 expression in the peripheral blood of patients with cirrhosis]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2001;32(2):202-3, 12.
17. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(6):F1060-7.
18. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-76.
19. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):3-9.
20. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15416-21.
21. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(4):621-5.
22. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008;28(3):285-7.
23. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*. 2009;21(4):317-37.
24. Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO reports*. 2001;2(8):736-42.
25. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 2002;10(2):417-26.
26. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*. 2009;27:229-65.
27. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation*. 2007;14(9):1583-9.
28. Laliberte RE, Eggler J, Gabel CA. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(52):36944-51.
29. 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.
30. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(8):2262-71.
31. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876):674-7.

32. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*. 2008;9(8):847-56.
33. Traves PG, Pimentel-Santillana M, Carrasquero LM, Perez-Sen R, Delicado EG, Luque A, et al. Selective impairment of P2Y signaling by prostaglandin E2 in macrophages: implications for Ca²⁺-dependent responses. *J Immunol*. 2013;190(8):4226-35.
34. Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol*. 2013;191(8):4337-47.
35. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(5):2871-9.
36. Lupfer C, Kanneganti TD. Unsolved Mysteries in NLR Biology. *Frontiers in immunology*. 2013;4:285.
37. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;430(6996):213-8.
38. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*. 2005;73(4):1907-16.
39. Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(35):E3321-30.
40. Case CL, Kohler LJ, Lima JB, Strowig T, de Zoete MR, Flavell RA, et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(5):1851-6.
41. Cunha LD, Zamboni DS. Subversion of inflammasome activation and pyroptosis by pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;3:76.
42. Schroppel B, He JC. Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. *Kidney Int*. 2006;69(5):785-7.
43. Yang LS, Yin ZX, Liao JX, Huang XD, Guo CJ, Weng SP, et al. A Toll receptor in shrimp. *Mol Immunol*. 2007;44(8):1999-2008.
44. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*. 2006;439(7073):208-11.
45. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168(3):1286-93.
46. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, et al. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*. 2002;169(4):2026-33.

47. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant*. 2005;5(5):969-75.
48. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2014;29(1):41-8.
49. Pulskens WP, Butter LM, Teske GJ, Claessen N, Dessing MC, Flavell RA, et al. Nlrp3 prevents early renal interstitial edema and vascular permeability in unilateral ureteral obstruction. *PloS one*. 2014;9(1):e85775.
50. Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest*. 1999;104(6):777-85.
51. Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF, Jr., Cheever AW, et al. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest*. 2006;116(7):2044-55.
52. Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW, et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and immunity*. 2006;74(3):1471-9.
53. Oldroyd SD, Thomas GL, Gabbiani G, El Nahas AM. Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int*. 1999;56(6):2116-27.
54. Zardi EM, Vespasiani Gentilucci U, Picardi A, Ambrosino G, Fazio VM, Dobrina A, et al. Iloprost: an adjunctive approach to chronic viral hepatitis treatment. *Medical hypotheses*. 2005;64(1):46-52.
55. Lodillinsky C, Langle Y, Guionet A, Gongora A, Baldi A, Sandes EO, et al. *Bacillus Calmette Guerin* induces fibroblast activation both directly and through macrophages in a mouse bladder cancer model. *PloS one*. 2010;5(10):e13571.
56. Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiaramonte M, Hesse M, Davis EM, et al. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *Faseb J*. 2001;15(13):2545-7.
57. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol*. 2003;171(7):3655-67.
58. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1776-84.
59. Rattner A, Nathans J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(11):860-72.
60. Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, et al. A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest*. 2002;109(2):251-9.

61. Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow derivation of pericycral myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut*. 2002;50(6):752-7.
62. Moore BB, Paine R, 3rd, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol*. 2001;167(8):4368-77.
63. Leemans JC, Butter LM, Pulskens WP, Teske GJ, Claessen N, van der Poll T, et al. The role of Toll-like receptor 2 in inflammation and fibrosis during progressive renal injury. *PloS one*. 2009;4(5):e5704.
64. Pulskens WP, Rampanelli E, Teske GJ, Butter LM, Claessen N, Luirink IK, et al. TLR4 promotes fibrosis but attenuates tubular damage in progressive renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(8):1299-308.
65. Skuginna V, Lech M, Allam R, Ryu M, Clauss S, Susanti HE, et al. Toll-like receptor signaling and SIGIRR in renal fibrosis upon unilateral ureteral obstruction. *PloS one*. 2011;6(4):e19204.
66. Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nature immunology*. 2008;9(7):695-8. Epub 2008/06/20.
67. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
68. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors*. 2004;22(4):225-31.
69. Johnston RB, Jr. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *The New England journal of medicine*. 1988;318(12):747-52.
70. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
71. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
72. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011;332(6035):1284-8.
73. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.
74. Stefater JA, 3rd, Ren S, Lang RA, Duffield JS. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(12):743-52.
75. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney international*. 2011;80(9):915-25.
76. Ji Y, Sun S, Xu A, Bhargava P, Yang L, Lam KS, et al. Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(17):13561-71.

77. Kakutani R, Adachi Y, Takata H, Kuriki T, Ohno N. Essential role of Toll-like receptor 2 in macrophage activation by glycogen. *Glycobiology*. 2012;22(1):146-59.
78. Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cellular immunology*. 2012;280(2):164-70.
79. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, Kristariyanto Y, et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol*. 2013;190(2):565-77.
80. Nelson PJ. The contentious ontogeny of fibrosis in the kidney. *Kidney international*. 2013;84(1):14-5.
81. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. The renal mononuclear phagocytic system. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(2):194-203.
82. Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;443(3):629-34.
83. Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A. Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 1970;5(5):494-6.
84. Boltz-Nitulescu G, Wiltshcke C, Holzinger C, Fellingner A, Scheiner O, Gessl A, et al. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *Journal of leukocyte biology*. 1987;41(1):83-91.
85. Takai T, Chen X, Xie Y, Vu AT, Le TA, Kinoshita H, et al. TSLP expression induced via Toll-like receptor pathways in human keratinocytes. *Methods in enzymology*. 2014;535:371-87.
86. Scalfone LK, Nel HJ, Gagliardo LF, Cameron JL, Al-Shokri S, Leifer CA, et al. Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*. 2013;81(4):1354-63.
87. Usategui A, Criado G, Izquierdo E, Del Rey MJ, Carreira PE, Ortiz P, et al. A profibrotic role for thymic stromal lymphopoietin in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(12):2018-23.
88. Tan AM, Chen HC, Pochard P, Eisenbarth SC, Herrick CA, Bottomly HK. TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen. *J Immunol*. 2010;184(7):3535-44.
89. Sung SA, Jo SK, Cho WY, Won NH, Kim HK. Reduction of renal fibrosis as a result of liposome encapsulated clodronate induced macrophage depletion after unilateral ureteral obstruction in rats. *Nephron Experimental nephrology*. 2007;105(1):e1-9.
90. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
91. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(2):317-26.

92. Takeda K, Kishimoto T, Akira S. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J Mol Med (Berl)*. 1997;75(5):317-26.
93. Rolling C, Treton D, Pellegrini S, Galanaud P, Richard Y. IL4 and IL13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells. *FEBS letters*. 1996;393(1):53-6.
94. Kim HD, Yu SJ, Kim HS, Kim YJ, Choe JM, Park YG, et al. Interleukin-4 induces senescence in human renal carcinoma cell lines through STAT6 and p38 MAPK. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(40):28743-54.
95. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(36):24035-48.
96. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
97. Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *The Journal of clinical investigation*. 1987;79(6):1564-70.
98. Plank MS, Calderon TC, Asmerom Y, Boskovic DS, Angeles DM. Biochemical measurement of neonatal hypoxia. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(54).
99. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998;9(1):143-50.
100. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. 1997;7(6):837-47.
101. Bartok E, Bauernfeind F, Khaminets MG, Jakobs C, Monks B, Fitzgerald KA, et al. iGLuc: a luciferase-based inflammasome and protease activity reporter. *Nature methods*. 2013;10(2):147-54.
102. Netea MG, van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. The role of NLRs and TLRs in the activation of the inflammasome. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(12):1867-72.
103. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6):397-411.
104. Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Jr., Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological chemistry*. 2012;393(12):1485-512.
105. Pradere JP, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease*. 2010;30(3):232-44.
106. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox TM, et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol*. 1994;153(2):753-9.
107. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annual review of immunology*. 2003;21:425-56.

108. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney international Supplement*. 2010;119:S22-6.
109. Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nature immunology*. 2010;11(4):289-93.
110. Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS, et al. Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney international*. 2010;78(4):351-62.
111. Shappell SB, Gurpinar T, Lechago J, Suki WN, Truong LD. Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1998;9(6):1008-17.
112. Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VW, Ouyang L, Chang DH, et al. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney international*. 2007;72(3):290-9.
113. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, et al. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *Journal of pharmacological sciences*. 2009;111(3):285-92.
114. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21(5):1231-9.
115. Pazar B, Ea HK, Narayan S, Kolly L, Bagnoud N, Chobaz V, et al. Basic calcium phosphate crystals induce monocyte/macrophage IL-1 β secretion through the NLRP3 inflammasome in vitro. *J Immunol*. 2011;186(4):2495-502.
116. Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol*. 2007;179(6):3926-36.
117. Anthony RM, Urban JF, Jr., Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature medicine*. 2006;12(8):955-60.
118. Stahl M, Schupp J, Jager B, Schmid M, Zissel G, Muller-Quernheim J, et al. Lung collagens perpetuate pulmonary fibrosis via CD204 and M2 macrophage activation. *PloS one*. 2013;8(11):e81382.
119. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):583-94.
120. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001;167(11):6533-44.
121. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS pathogens*. 2009;5(4):e1000371.

122. Pesce JT, Ramalingam TR, Wilson MS, Mentink-Kane MM, Thompson RW, Cheever AW, et al. Retnla (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *PLoS pathogens*. 2009;5(4):e1000393.
123. Oh CK, Geba GP, Molfino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2010;19(115):46-54.
124. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*. 2012;188(11):5752-65.
125. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology*. 2011;12(3):231-8.
126. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(10):1732-44.
127. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
128. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 2011;54(3):999-1008.
129. Kono H, Chen CJ, Ontiveros F, Rock KL. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(6):1939-49.
130. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(6):1791-9.
131. Patschan D, Patschan S, Gobe GG, Chintala S, Goligorsky MS. Uric acid heralds ischemic tissue injury to mobilize endothelial progenitor cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(5):1516-24.
132. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(9):2936-46.
133. Johnson RJ, Lanaspa MA, Gaucher EA. Uric acid: a danger signal from the RNA world that may have a role in the epidemic of obesity, metabolic syndrome, and cardiorenal disease: evolutionary considerations. *Seminars in nephrology*. 2011;31(5):394-9.
134. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(2):675-80.
135. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-41.
136. Shi Y, Galusha SA, Rock KL. Cutting edge: elimination of an endogenous adjuvant reduces the activation of CD8 T lymphocytes to transplanted cells and in an autoimmune diabetes model. *J Immunol*. 2006;176(7):3905-8.

137. Rayamajhi M, Zak DE, Chavarria-Smith J, Vance RE, Miao EA. Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *J Immunol.* 2013;191(8):3986-9.
138. Yang J, Zhao Y, Shi J, Shao F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(35):14408-13.
139. Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol.* 2013;191(10):5230-8.

APÊNDICE - Figuras suplementares

Fig. A.1: Estratégia de seleção de células infiltrantes renais aos 7 dias após a cirurgia de UUO. Exclusão de duplets e multiplots seguida da análise de células com tamanho e granulosidade correspondente a células vivas. A positividade da marcação foi baseada no uso de anticorpos isotópicos. A marcação para células CD11b⁺ e a porcentagem de células CD11b^{high} MIG⁺ é utilizado como exemplo na figura.

Fig. A.2: Análise de macrófagos renais. Estratégia de seleção de macrófagos infiltrantes renais (A) e quantificação (B) de células CD11b⁺ após a administração de clodronato encapsulado por lipossomos, 5 e 7 dias após a realização da cirurgia de UUO. Fotomicrografias de rins de animais injetados com macrófagos M1 ou M2 (C). Os macrófagos injetados estão corados em vermelho com o corante PKH26 e os núcleos corados com DAPI. *p < 0,05. MΦ macrófagos.

Fig. A.3: Ativação da via do inflamassoma pelo ácido úrico solúvel. Produção de IL1 β normatizado pela proteína total em sobrenadante de cultura de diferentes macrófagos estimulados com ácido úrico solúvel por 24h (A). Quantificação do ganho de luciferase de diferentes macrófagos após serem transfectados com vetor específico e estimulados com ácido úrico solúvel (B). Em A e B vemos todos os controles utilizados nos experimentos. Micrografia eletrônica de transmissão de macrófago WT estimulado com ácido úrico solúvel (C). Esta figura representa um maior aumento da estrutura particulada no interior de um vacúolo vista na figura 19.

ANEXO - Tabelas de genes analisados por PCR Array

Tabela A.1: Genes Relacionados com Matriz Extracelular

Symbol	Description	Gene Name
Adamts1	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAM-TS1, ADAMTS, ADAMTS-1, C3-C5, METH-1, METH1
Adamts2	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	ADAM-TS2, ADAMTS-2, ADAMTS-3, PCINP, hPCPNI, mKIAA4060, pNPI
Adamts5	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	9530092O11Rik, ADAM-TS5, ADAMTS1, ADAMTS11, AI481094, ASMP-2
Adamts8	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	METH-2, METH2
Ctnna1	Catenin (cadherin associated protein), alpha 1	2010010M04Rik, AA517462, AI988031, Catna1
Ctnna2	Catenin (cadherin associated protein), alpha 2	AI481747, Catna, Catna2, cdf, chp
Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	Bfc, Catnb, Mesc
Cd44	CD44 antigen	AU023126, AW121933, AW146109, HERMES, Ly-24, Pgp-1
Cdh1	Cadherin 1	AA960649, E-cad, Ecad, L-CAM, UVO, Um
Cdh2	Cadherin 2	CDHN, N-cadherin, Ncad
Cdh3	Cadherin 3	AI385538, Cadp, Cdhp, P-cadherin, Pcad
Cdh4	Cadherin 4	AW120700, R-Cadh, R-cadherin, Rcad
Cntn1	Contactin 1	AW495098, CNTN, F3cam
Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	Col1a-1, Cola-1, Cola1, Mov-13, Mov13
Col2a1	Collagen, type II, alpha 1	Col2, Col2a, Col2a-1, Del1, Dmm, Lpk, M100856, Rgsc856
Col3a1	Collagen, type III, alpha 1	AW550625, Col3a-1, MMS10-W, Ms10w, mKIAA4231
Col4a1	Collagen, type IV, alpha 1	Bru, Col4a-1, Del(8)44H, Raw, Svc
Col4a2	Collagen, type IV, alpha 2	Col4a-2
Col4a3	Collagen, type IV, alpha 3	[a]3(IV), alpha3(IV)
Col5a1	Collagen, type V, alpha 1	AI413331
Col6a1	Collagen, type VI, alpha 1	AI747156, Col6a-1
Vcan	Versican	5430420N07Rik, 9430051N09, Cspg2, DPEAAE, NG2, PG-M, PG-M(V0), PG-M(V1), hdf
Ctgf	Connective tissue growth factor	Ccn2, Fisp12, Hcs24, fisp-12
Ecm1	Extracellular matrix protein 1	AI663821, p85
Emilin1	Elastin microfibril interfacier 1	5830419M17Rik, AW229038, BB105748, EMILIN-1, gp115
Entpd1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2610206B08Rik, AA408691, Cd39, NTPDase-1

Fbln1	Fibulin 1	-
Fn1	Fibronectin 1	E330027I09, Fn, Fn-1
Hapln1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	BB099155, CLP, Crtl1, Crtl1I, LP, LP-1
Hc	Hemolytic complement	C5, C5a, He
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	CD54, Icam-1, Ly-47, MALA-2
Itga2	Integrin alpha 2	CD49B, DX5
Itga3	Integrin alpha 3	AA407068, CD49C, GAPB3
Itga4	Integrin alpha 4	CD49D, Itga4B
Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Cd49e, Fnra, VLA5
Itgae	Integrin alpha E, epithelial-associated	A530055J10, CD103, aM290, alpha-E1, alpha-M290
Itgal	Integrin alpha L	(p180), Cd11a, LFA-1, LFA-1A, Ly-15, Ly-21
Itgam	Integrin alpha M	CD11b, CD18, CR3, CR3A, Cd11b, F730045J24Rik, Ly-40, MAC1, Mac-1, Mac-1a
Itgav	Integrin alpha V	1110004F14Rik, 2610028E01Rik, CD51, D430040G12Rik
Itgax	Integrin alpha X	AI449405, Cd11c, Cr4, N418
Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	4633401G24Rik, AA409975, AA960159, CD29, ENSMUSG00000051907, Fnrb, Gm9863, gpIIa
Itgb2	Integrin beta 2	2E6, AI528527, Cd18, LAD, LCAMB, Lfa1, MF17
Itgb3	Integrin beta 3	CD61, GP3A, INGRB3
Itgb4	Integrin beta 4	AA407042, C230078O20, CD104
Lama1	Laminin, alpha 1	AA408497, Lama
Lama2	Laminin, alpha 2	5830440B04, dy, mKIAA4087, mer, merosin
Lama3	Laminin, alpha 3	Lama3B, [a]3B
Lamb2	Laminin, beta 2	AW211941, Lamb-2, Lams
Lamb3	Laminin, beta 3	-
Lamc1	Laminin, gamma 1	Lamb2
Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	AV377895, MMP-10, SL-2
Mmp11	Matrix metalloproteinase 11	ST3, Stmy3
Mmp12	Matrix metalloproteinase 12	AV378681, Mmel
Mmp13	Matrix metalloproteinase 13	Clg, MMP-13, Mmp1
Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	AI325305, MT-MMP-1, MT1-MMP, sabe
Mmp15	Matrix metalloproteinase 15	AI503551, MT2-MMP
Mmp1a	Matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)	Mcol-A, Mcola
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	Clg4a, GelA, MMP-2
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3	SLN-1, SLN1, STR-1, Stmy1, Str1
Mmp7	Matrix metalloproteinase 7	MAT
Mmp8	Matrix metalloproteinase 8	BB138268
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	AW743869, B, MMP9, Clg4b, MMP-9, pro-MMP-9
Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1	CD56, E-NCAM, NCAM-1, Ncam

Ncam2	Neural cell adhesion molecule 2	Ncam-2, Ocam, RNCAM
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	C85791, Cd31, PECAM-1, Pecam
Postn	Periostin, osteoblast specific factor	A630052E07Rik, A1747096, OSF-2, Osf2, PLF, PN, peri
Sele	Selectin, endothelial cell	CD62E, E-selectin, Elam
Sell	Selectin, lymphocyte	AI528707, CD62L, L-selectin, LECAM-1, Lnhf, Ly-22, Ly-m22, Lyam-1, Lyam1
Selp	Selectin, platelet	CD62P, GMP-140, Grmp, LECAM3, PADGEM
Sgce	Sarcoglycan, epsilon	e-SG
Sparc	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	AA517111, BM-40
Spock1	Sparc/osteonectin, cwcw and kazal-like domains proteoglycan 1	Spock, Ticn1, testican
Spp1	Secreted phosphoprotein 1	2AR, Apl-1, BNSP, BSPI, Bsp, ETA-1, Eta, OP, Opn, Opnl, Ric, Spp-1
Syt1	Synaptotagmin I	AW124717, G630098F17Rik, Sytl
Tgfb1	Transforming growth factor, beta induced	68kDa, A1181842, A1747162, Beta-ig, big-h3
Thbs1	Thrombospondin 1	TSP-1, TSP1, Thbs-1, tbsp1
Thbs2	Thrombospondin 2	TSP2, Thbs-2
Thbs3	Thrombospondin 3	TSP3, Thbs-3
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Clgi, TIMP-1, Timp
Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	D11Bwg1104e, Timp-2
Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp-3
Tnc	Tenascin C	AI528729, C130033P17Rik, Hxb, TN, TN-C, Ten, cytactin, tenascin-C
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	CD106, Vcam-1
Vtn	Vitronectin	AI256434, Vn
Gusb	Glucuronidase, beta	AI747421, Gur, Gus, Gus-r, Gus-s, Gus-t, Gus-u, Gut, asd, g
Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	C81579, HPGRT, Hprt1
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa, AL022974, C81438, Hsp84, Hsp84-1, Hsp90, Hspcb
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd
Actb	Actin, beta	Actx, E430023M04Rik, beta-actin
MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	MIGX1B
RTC	Reverse Transcription Control	RTC
PPC	Positive PCR Control	PPC

Tabela A.2: Genes Relacionados com o Inflamassoma

Symbol	Description	Gene Name
Aim2	Absent in melanoma 2	Gm1313, Ifi210
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	AW986256, Bcl-2, C430015F12Rik, D630044D05Rik, D830018M01Rik
Bcl2l1	Bcl2-like 1	Bcl(X)L, Bcl-XL, Bcl-Xs, Bcl2l, BclX, bcl-x
Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	AW146227, Api1, Api2, Birc3, HIAP1, HIAP2, IAP1, IAP2, MIAP1, MIAP2, MIHB, MIHC, RNF48, ciAP1, ciAP2, mciAP1
Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	AW107670, Api1, Api2, Birc2, HIAP2, IAP1, IAP2, MIAP1, MIAP2, MIHB, MIHC, RNF49, ciAP-1, ciAP-2, ciAP1, ciAP2
Card6	Caspase recruitment domain family, member 6	D730008L15
Casp1	Caspase 1	ICE, Il1bc
Casp12	Caspase 12	-
Casp8	Caspase 8	CASP-8, FLICE, MACH, Mch5
Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12	MCP-5, Scya12
Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	MuRantes, RANTES, SISd, Scya5, TCP228
Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	MCP-3, Scya7, fic, marc, mcp3
Cd40lg	CD40 ligand	CD154, CD40-L, Cd40l, HIGM1, IGM, IMD3, Ly-62, Ly62, T-BAM, TRAP, Tnfsf5, gp39
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2310024N18Rik, A430105C05Rik, CLARP, Cash, Casper, ENSMUSG00000072980, FLAME, FLAME-1, Flip, Gm9845, I-FLICE, MRIT, c-Flip
Chuk	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	AI256658, Chuk1, Fbx24, Fbxo24, IKBKA, IKK1, Ikka, NFKBIKA
Ciita	Class II transactivator	C2ta, EG669998, Gm9475
Ctsb	Cathepsin B	CB
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Fsp, Gro1, KC, Mgsa, N51, Scyb1, gro
Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	Dcip1, Gm1960
Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Mort1, FADD

Hsp90aa1	Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	86kDa, 89kDa, AL024080, AL024147, Hsp86-1, Hsp89, Hsp90, Hspca, hsp4
Hsp90b1	Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1	ERp99, GRP94, TA-3, Targ2, Tra-1, Tra1, endoplasmin, gp96
Ifnb1	Interferon beta 1, fibroblast	IFN-beta, IFNB, Ifb
Ifng	Interferon gamma	IFN-g, Ifg
Ikbkb	Inhibitor of kappaB kinase beta	AI132552, IKK-2, IKK-beta, IKK2, IKK[b], IKKbeta
Ikbkg	Inhibitor of kappaB kinase gamma	1110037D23Rik, AI848108, AI851264, AW124339, IKK[g], NEMO
Il12a	Interleukin 12A	IL-12p35, Il-12a, LI12a, p35
Il12b	Interleukin 12B	Il-12b, Il-12p40, Il12p40, p40
Il18	Interleukin 18	Igif, Il-18
Il1b	Interleukin 1 beta	IL-1beta, Il-1b
Il33	Interleukin 33	9230117N10Rik, Il-33, Il1f11, NF-HEV
Il6	Interleukin 6	Il-6
Irak1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	AA408924, IRAK, IRAK-1, IRAK1-S, Il1rak, Plpk, mPLK
Irf1	Interferon regulatory factor 1	AU020929, Irf-1
Irf3	Interferon regulatory factor 3	C920001K05Rik, IRF-3
Irf4	Interferon regulatory factor 4	AI385587, IRF-4, LSIRF, Spip
Map3k7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	B430101B05, C87327, Tak1
Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	9030612K14Rik, AA407128, AU018647, C78273, ERK, Erk2, MAPK2, PRKM2, Prkm1, p41mapk, p42mapk
Mapk11	Mitogen-activated protein kinase 11	P38b, Prkm11, Sapk2, Sapk2b, p38-2, p38beta, p38beta2
Mapk12	Mitogen-activated protein kinase 12	AW123708, Erk6, P38gamma, Prkm12, Sapk3
Mapk13	Mitogen-activated protein kinase 13	SAPK4, Serk4
Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3	Erk-1, Erk1, Ert2, Esrk1, Mnk1, Mtap2k, Prkm3, p44, p44erk1, p44mapk

Mapk8	Mitogen-activated protein kinase 8	AI849689, JNK, JNK1, Prkm8, SAPK1
Mapk9	Mitogen-activated protein kinase 9	AI851083, JNK2, Prkm9, p54aSAPK
Mefv	Mediterranean fever	FMF, TRIM20, pyrin
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88	-
Naip1	NLR family, apoptosis inhibitory protein 1	AV364616, Birc1a, D13Lsd1, Naip, Naip-rs1
Naip5	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5	Birc1e, Lgn1, Naip-rs3
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105	NF-KB1, NF-kappaB, NF-kappaB1, p105, p50, p50, p105
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	AI462015, Nfkb1
Nfkbib	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	IKB-beta, IKappaBbeta, Ikb, IkbB
Nlrc4	NLR family, CARD domain containing 4	9530011P19Rik, CLAN, CLAN1, CLANA, CLANB, CLANC, CLAND, Card12, IPAF
Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5	AI451557, AK220210, NOD27
Nlrp12	NLR family, pyrin domain containing 12	Nalp12, PYPAF7
Nlrp1a	NLR family, pyrin domain containing 1A	CARD7, DEFCAP, Gm14, Gm15, NAC, Nalp1, Nalp1a, Nlrp1, PP1044
Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	AGTAVPRL, Ail, AVP, Cias1, FCAS, FCU, MWS, Mmig1, NALP3, Pypaf1
Nlrp4b	NLR family, pyrin domain containing 4B	AU022726, E330024M09, Nalp-gamma, Nalp4b
Nlrp4e	NLR family, pyrin domain containing 4E	4930406H16Rik, Nalp-epsilon, Nalp4e, Nlrp4
Nlrp5	NLR family, pyrin domain containing 5	Mater, Nalp5, Op1, PAN11
Nlrp6	NLR family, pyrin domain containing 6	AI504961, Avr, Nalp6, Navr, Navr, Avr, Pypaf5
Nlrp9b	NLR family, pyrin domain containing 9B	Nalp-delta, Nalp9b, Nlrp9
NlrX1	NLR family member X1	BC034204, NOD9
Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	C230079P11, Card4, F830007N14Rik, Nlrc1
Nod2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	ACUG, BLAU, CD, Card15, F830032C23Rik, IBD1, Nlr2

P2rx7	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	AI467586, P2X(7), P2X7R
Panx1	Pannexin 1	AI847747
Pea15a	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15A	Mat1, PEA-15, Pea15, Pkcs15
Pstpip1	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	CD2BP1, def-2
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX2, Cox-2, PGHS-2, PHS-2, Pgbs2, TIS10
Pycard	PYD and CARD domain containing	9130417A21Rik, Asc, CARD5, TMS-1, TNS1, masc
Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	p65
Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	2210420D18Rik, CARD3, CARDIAK, CCK, D4Bwg0615e, RICK, RIP2
Stk30	Serine/threonine kinase 30	MOK, RAGE1, Rage
Sugt1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)	2410174K12Rik, SGT1
Tab1	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1	2310012M03Rik, Map3k7ip1, b2b449Clo
Tab2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	1110030N06Rik, A530078N03Rik, Map3k7ip2, mKIAA0733
Tirap	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein	AA407980, C130027E04Rik, Mal, Tlr4ap, Wyatt
Tnf	Tumor necrosis factor	DIF, TNF-a, TNF-alpha, TNFSF2, TNFalpha, Tnfa, Tnfsf1a
Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	Ly109I, ODF, OPG, OPGL, RANKL, Trance
Tnfsf14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	HVEM-L, HVEM-L, LIGHT, LTg, Ly113
Tnfsf4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	Ath-1, Ath1, CD134L, OX-40L, Ox40I, TXGP1, Txgp1I, gp34
Traf6	Tnf receptor-associated factor 6	2310003F17Rik, AI851288, C630032O20Rik
Txnip	Thioredoxin interacting protein	1200008J08Rik, AA682105, Hyplip1, THIF, Tbp-2, VDUP1
Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	1110015C02Rik, Aipa, Api3, Birc4, IAP3, ILP-1, MIHA, mXIAP
Actb	Actin, beta	Actx, E430023M04Rik, beta-actin
B2m	Beta-2 microglobulin	Ly-m11, beta2-m, beta2m

Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd
Gusb	Glucuronidase, beta	Al747421, Gur, Gus, Gus-r, Gus-s, Gus-t, Gus-u, Gut, asd, g
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa, AL022974, C81438, Hsp84, Hsp84-1, Hsp90, Hspcb
MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	MIGX1B
RTC	Reverse Transcription Control	RTC
PPC	Positive PCR Control	PPC