Viviane Dias Faustino

**Efeito de uma disfunção da barreira glomerular
sobre a imunidade inata de células tubulares
proximais**

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

Programa de Nefrologia
Orientadora: Dra. Clarice Kazue
Fujihara

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faustino, Viviane Dias

Efeito de uma disfunção da barreira glomerular
sobre a imunidade inata de células tubulares
proximais / Viviane Dias Faustino. -- São Paulo,
2018.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Clarice Kazue Fujihara.

Descritores: 1.Imunidade inata 2.Imunidade
adquirida 3.Insuficiência renal crônica 4.Macrófagos
5.Proteinúria 6.Micofenolato de mofetil

USP/FM/DBD-027/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedico esta tese a minha mãe, Maria, aos meus filhos, Gabriel, Sarah e Rafael, minha irmã Christiane e meu marido Henrique. Vocês são a minha força, cada um ao seu jeito, sempre apoiaram e deram base para minha formação. AMO VOCÊS !!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Clarice Kazue Fujihara, a quem devo muito de minha formação. Durante todo o tempo que permaneci no laboratório, desde o dia em que entrei pela primeira vez, me acolheu como uma filha, só tenho a agradecer por toda a amizade, carinho e ensinamentos. Obrigada por ser minha orientadora e acima de tudo uma ótima amiga. Muito Obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz, cujo entusiasmo e dedicação pela Ciência impressiona todos à sua volta. Você é exemplo de tudo de bom que uma pessoa pode cultivar honestidade, bondade, amizade e varias outras inúmeras qualidades. Obrigada por sempre estar presente e por sua valiosa amizade.

Aos amigos que o doutorado me trouxe durante esses anos Neto, Fernanda, Amanda, Karin, Victor, Simone, Sara, Flávia, obrigada pelo companheirismo, força e colaboração durante toda essa fase.

À Carolina Martinez Romão que sempre esteve ao meu lado e me ajudou de todas as formas possíveis, sem palavras para agradecer tudo o que você fez e faz por mim. Você é uma pessoa impar! Obrigada por tudo, sempre!

À Claudia Sena que sempre me ajudou e ensinou.

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

À Luciene dos Reis pela paciência e incansáveis explicações e por sua disponibilidade.

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

A todos do LIM-16, pela companhia, colaboração e momentos juntos. Obrigada por poder fazer parte deste ambiente científico, agradável e familiar.

Aos meus filhos Sarah, Gabriel e Rafael. Agradeço todos os dias pela alegria de ter vocês ao meu lado. A mamãe vive por vocês, e para vocês !!!

À minha mãe Maria, não tenho palavras para descrever o quanto admiro a sua força. Busco todos os dias fazer valer tudo o que você fez por mim. Obrigada pelo apoio e amor durante toda a minha vida e por cuidar tão bem de mim.

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

A minha irmã Christiane pelo exemplo de ser humano. Sou privilegiada por tê-la como irmã!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*Foi o tempo que dedicaste a
tua rosa que a fez tão
importante ...*

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
<u>1.1 Proteinúria e doença renal crônica</u>	01
<u>1.2 Imunidade inata e DRC</u>	02
<u>1.3 Nefropatia induzida por adriamicina</u>	06
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
<u>3.1 Procedimentos gerais</u>	9
<u>3.2 Obtenção do modelo experimental</u>	9
<u>3.2.1 Protocolo 1</u>	9
<u>3.2.2 Protocolo 2</u>	10
<u>3.3 Análises bioquímicas</u>	11
<u>3.4 Análises histológicas</u>	11
<u>3.5 Técnicas de imuno-histoquímica</u>	12
<u>3.5.1 Infiltração de macrófagos ED-1</u>	12
<u>3.5.2 Infiltração de macrófagos M2 e NLRP3</u>	13
<u>3.5.3 Infiltração de linfócitos (LINF) CD3</u>	13
<u>3.5.4 Detecção de α-SMA</u>	15
<u>3.5.5 Identificação de colágeno-1 (COLL-1)</u>	15
<u>3.6 Cultura de células</u>	15
<u>3.7 Imunofluorescência</u>	16
<u>3.8 Análise do conteúdo proteico do tecido renal (Western Blot)</u>	16
<u>3.8.1 Isolamento do núcleo do tecido renal</u>	17
<u>3.9 Análise do conteúdo proteico do tecido renal (ELISA)</u>	18
<u>3.10 Análise estatística</u>	18
4. RESULTADOS	19

<u>4.1 Protocolo 1</u>	19
<u>4.2 Protocolo 2</u>	34
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES PARCIAIS	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURA

Abreviaturas	Significado
ADR	Nefropatia por Adriamicina
ALB	Albuminúria de 24 horas
APAAP	Fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina PCNA
DRC	Doença renal crônica
DAMP	Padrões moleculares associados a dano
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EG	Esclerose glomerular
Ht	Hematócrito arterial
HO-1	Heme oxigenase-1
INT	Área intersticial fracional
IL1- β	Interleucina 1 β
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
LF	Linfócitos
MØ	Infiltração de macrófagos
MMF	Micofenolato de mofetil
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MFI	Intensidade média de fluorescência
Nx	Ablação renal de 5/6
NLRP3	Inflamassoma NLRP3
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors</i>

NLRC	<i>NOD-Like Receptors, CARD domain containing</i>
PAS	Ácido Periódico-Shiff
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PC	Pressão sistólica caudal
PE	Peso Corpóreo
PTC	Células tubulares proximais
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNAi	RNA de interferência
Scr	Creatinina sérica
SFB	Soro fetal bovino
SOD2	Superoxido dismutase 2
TBS	Solução salina tris-tamponada
Tg	Triglicérides plasmático
TGF- α	Fator de transformação do crescimento alfa
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>

Resumo

Faustino VD. *Efeito de uma disfunção da barreira glomerular sobre a imunidade inata de células tubulares proximais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2018.

A sobrecarga de proteínas nas células tubulares proximais pode levar a lesão intersticial por mecanismos não claros que podem envolver a ativação da imunidade inata. Nós investigamos a hipótese de que a exposição prolongada de células tubulares a altas concentrações de proteínas estimula a imunidade inata, desencadeando inflamação intersticial progressiva e lesão renal. Além disso, investigamos se a inibição específica da imunidade inata ou adaptativa proporcionaria renoproteção em um modelo estabelecido de proteinúria maciça, nefropatia por adriamicina (ADR). Os ratos adultos Munich-Wistar receberam uma dose única de ADR (5 mg / kg iv), sendo acompanhados por 2, 4 e 20 semanas. A albuminúria maciça foi associada à ativação precoce das vias da imunidade inata NF- κ B e NLRP3, cuja intensidade correlacionou-se fortemente com a densidade da infiltração de linfócitos. Além disso, os ratos ADR exibiram sinais claros de estresse oxidativo renal. Vinte semanas após a administração de ADR, observaram-se fibrose intersticial intensa, glomerulosclerose e perda da função renal. A administração de micofenolato de mofetil (MMF), 10 mg / Kg / dia, impediu a ativação da imunidade inata e adaptativa, bem como do estresse oxidativo renal e fibrose renal. Além disso, o tratamento MMF foi associado com a mudança de MØ do tipo M1 para o fenótipo M2. Nas células cultivadas de NRK52-E, o excesso de albumina aumentou o teor de proteína de TLR4, NLRP3, Caspase-1, IL6, IL1- β , MCP-1, α -SMA e COLL-1. O silenciamento do TLR4 e / ou NLRP3 mRNA atenuou esse comportamento proinflamatório / profibrótico. A ativação simultânea de imunidade inata e adaptativa podem ser fundamentais para o desenvolvimento de lesão renal em doenças altamente proteinúricas. A inibição da imunidade inata e / ou adaptativa podem constituir uma estratégia para prevenir a DRC nesse contexto.

Descritores: insuficiência renal crônica; macrófagos; proteinúria; micofenolato de mofetil

Abstract

Faustino VD. - *Effect of dysfunction acute barrier glomerular on the innate immunity of proximal tubular cells*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Protein overload of proximal tubular cells can promote interstitial injury by unclear mechanisms that may involve activation of innate immunity. We investigated the hypothesis that prolonged exposure of tubular cells to high protein concentrations stimulates innate immunity, triggering progressive interstitial inflammation and renal injury. In addition, we investigated whether specific inhibition of innate or adaptive immunity would provide renoprotection in an established model of massive proteinuria, adriamycin (ADR) nephropathy. Adult male Munich-Wistar rats received a single dose of ADR (5 mg/kg iv), being followed for 2, 4 or 20 weeks. Massive albuminuria was associated with early activation of both the NF- κ B and NLRP3 innate immunity pathways, whose intensity correlated strongly with the density of lymphocyte infiltration. In addition, ADR rats exhibited clear signs of renal oxidative stress. Twenty weeks after ADR administration, marked interstitial fibrosis, glomerulosclerosis and renal functional loss were observed. Administration of mycophenolate mofetil (MMF), 10 mg/Kg/day, prevented activation of both innate and adaptive immunity, as well as renal oxidative stress and renal fibrosis. Moreover, MMF treatment was associated with shifting of M ϕ from the M1 to the M2 phenotype. In cultivated NRK52-E cells, excess albumin increased the protein content of TLR4, NLRP3, Caspase-1, IL6, IL-1 β , MCP-1, α -actin and collagen-1. Silencing of TLR4 and/or NLRP3 mRNA abrogated this proinflammatory/profibrotic behavior. Simultaneous activation of innate and adaptive immunity may be key to the development of renal injury in heavily proteinuric disease. Inhibition of innate and/or adaptive immunity may constitute a strategy to prevent CKD in this setting.

Descriptors: innate immunity; adaptive immunity; chronic renal diseases;; proteinuria; mycophenolate mofetil

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a doença renal crônica (DRC) afeta de 10-16% da população adulta em todo o mundo (1). A sua prevalência está aumentando substancialmente sendo reconhecida como um importante problema de saúde pública global. As nefropatias crônicas tendem a progredir inexoravelmente para formas mais avançadas, levando invariavelmente à fibrose do interstício renal, mesmo que o processo se tenha iniciado exclusivamente nos glomérulos (2,3,4). É plenamente estabelecida entre nefrologistas e patologistas renais a noção de que a perda de função renal na DRC correlaciona-se antes ao grau de fibrose renal do que à própria gravidade da glomerulopatia (5).

1.1 Proteinúria e Doença Renal Crônica

A intensidade de proteinúria correlaciona-se à magnitude da lesão renal e está associada à perda progressiva da função renal em seres humanos, bem como na doença renal experimental. A proteinúria está presente no estágio inicial da doença renal antes mesmo da constatação do comprometimento da função renal e, quando associada à hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus, agrava o prognóstico da doença renal (6,7,8).

Em indivíduos sadios existe uma alta restrição à filtração de proteínas pelos glomérulos. Mesmo assim, uma pequena quantidade de proteínas consegue atingir o espaço urinário, entrando em ação um segundo mecanismo: as proteínas filtradas são quase totalmente reabsorvidas no túbulo proximal por um processo de endocitose. As moléculas de proteína ligam-se a receptores existentes na superfície luminal das células tubulares (megalina e cubilina), ocorrendo internalização dessas proteínas, juntamente com seus receptores, seguindo-se a formação de vesículas endocitóticas, que se fundem com lisossomas para posterior hidrólise. Os aminoácidos resultantes dessa reação retornam à circulação (9), conseqüentemente é mínima a quantidade de proteína excretada na urina. Em situações patológicas, a alteração na barreira

glomerular permite um aumento expressivo de proteínas no filtrado glomerular, o que torna inevitável a perda de proteínas na urina.

Uma série de evidências sugere que a exposição a altas concentrações de proteínas pode ter um efeito tóxico sobre as células do túbulo proximal e até mesmo sobre os podócitos, podendo contribuir significativamente para o desenvolvimento da DRC (7,10,11). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que altas concentrações de proteínas induzem células do túbulo proximal a produzir mediadores inflamatórios e profibróticos, apontando para um papel dos mecanismos de reabsorção tubular de proteínas na patogênese da DRC (12,13). Essa hipótese ajuda ainda a explicar a consistente correlação entre lesão glomerular e inflamação intersticial. De acordo com esse ponto de vista, é como se a lesão glomerular se “traduzisse” em uma inflamação intersticial (14,15, 16, 17). A albuminúria estimula nas células tubulares proximais a síntese de quimiocinas (MCP-1 e RANTES) que recrutam monócitos, células T e contribuem para a liberação de citocinas e moléculas de atração de neutrófilos e a promoção de fibrose (a endotelina, angiotensina II, e TGF- α) através de fosfolipase C, MAPK ou ativação do NF- κ B (18, 19). Esses dados levantaram uma preocupação com o papel patogênico da proteinúria na progressão da doença renal crônica.

Os mecanismos que governam esse suposto efeito pró-inflamatório da exposição das células tubulares a excesso de proteínas não estão claros. Em vista dos conhecimentos acumulados nos últimos 20 anos, é concebível que a intensa atividade reabsortiva das células epiteliais quando expostas a concentrações anormalmente altas de proteínas leve à ativação de algumas vias da imunidade inata devido à ruptura de lisossomos, essenciais à hidrólise das proteínas captadas.

1.2 Imunidade inata e DRC

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

O sistema imune inato conta com uma extensa rede de moléculas e mecanismos de sinalização, muitos dos quais envolvem o padrão de reconhecimento dos toll-like receptors, os TLRs (20, 21). As vias de sinalização do sistema imune inato têm sido largamente estudadas em leucócitos, mas

estudos recentes apontam para a importância da sinalização via TLRs em outros tipos celulares expostos a lesão (22). Os TLRs constituem uma numerosa família de receptores celulares superficiais localizados em células inflamatórias e de revestimento, como células epiteliais e endoteliais (23, 24). Esses receptores são capazes de detectar toxinas e fragmentos de DNA (PAMP ou Pathogen Associated Molecular Pattern) ou moléculas resultantes da destruição/estresse de células do próprio organismo (DAMP ou Damage Associated Molecular Pattern), como HMGB1, cristais de ácido úrico e ATP. Os TLRs são ligados a proteínas de membrana ou intracelulares, como o MyD88, quando ocupados, promovem a ativação do sistema NF κ B e, consequentemente, a produção de uma série de mediadores que amplificam extraordinariamente a intensidade da resposta inflamatória, atraindo ao local células sanguíneas que, por sua vez, sintetizam novos mediadores, em um típico processo de realimentação positiva. Assim, os TLRs, e a sequência inflamatória que comandam, são parte importante do arsenal de que dispõem organismos pluricelulares para proteger seus tecidos contra invasões por microorganismos e para limitar os danos causados pela destruição de suas próprias células (23, 24).

Via de sinalização que envolve inflamassoma (Sinal 2)

Os TLRs não são a única via através da qual as células manifestam sua capacidade inata de reagir a situações de estresse. Em anos recentes, descobriu-se a existência de receptores citosólicos que funcionam no reconhecimento dos chamados padrões de risco ou de dano celular, os DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). Tais receptores são capazes de detectar a presença de moléculas ou fragmentos moleculares resultantes da alteração da homeostase celular, destruição de lisossomas, perda de potássio pelo citosol, e vários outros sinais de dano celular. Uma vez ativados, os receptores citosólicos ou alguns de seus constituintes, sofrem um processo de oligomerização, formando complexos moleculares conhecidos como inflamassomas. Esses agregados moleculares ativam enzimas como a caspase-1 que catalisam a síntese de potentes mediadores, como as interleucinas 1 β , 18 e (33), que desencadeiam uma sequência de eventos inflamatórios destinados em princípio a conter uma possível invasão

microbiana e a remover o mais rapidamente possível os detritos resultantes da destruição de células. Dentre os receptores intracelulares mais estudados atualmente, destacam-se os NLR (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*), os quais oligomerizam-se para formar inflamassomas que controlam a produção de citocinas pro-inflamatórias conhecidas por siglas com que se procura descrever sua complexa composição, tais como NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine-rich Repeat and Pyrin domain containing*), e NLRC (*NOD-Like Receptors, CARD domain containing*) (24, 20). Esses receptores são capazes de reconhecer peptídeos glicanos de paredes bacterianas (25), sinais endógenos de perigo como espécies reativas de oxigênio (ROS), acúmulo de cristais de ácido úrico (26) e baixas concentrações de potássio intracelular (27), dentre outros. Os receptores NOD1, NOD2 e o inflamassoma de NLRP3 são os NLRs mais estudados devido associação às doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como diabetes tipo II, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais (28). Os receptores NLRPs regulam processos pós-transcricionais que levam à formação do inflamassoma, composto pela caspase-1 ativa e proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like containing a CARD domain). Esse inflamassoma é expresso em baixas quantidades em células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Consequentemente, um aumento na expressão de NLRP3 mediado pela ativação de NF- κ B é crítica para a ativação desse inflamassoma (29).

As vias que envolvem os TLRs (sinal 1) e NLRs (sinal 2) não agem de maneira isolada e independente, existindo vários pontos de contato entre as sequências de eventos deflagradas por cada um deles (Figura 1). No entanto, conforme discutido no parágrafo anterior, há diferenças marcantes entre suas formas de atuação, de tal modo que alguns pesquisadores consideram que TLRs e NLRs ativam dois tipos distintos de sinais celulares de dano ou de perigo: o Sinal 1, representado pela ativação de TLRs, e o Sinal 2, materializado na ativação de NLRs e outros receptores intracelulares. Em seu conjunto, os TLRs e NLRs (ou o Sinal 1 e o Sinal 2) encarnam uma propriedade importantíssima e extremamente conservada na evolução dos organismos pluricelulares: a capacidade de reagir imediatamente a ameaças externas mediante o recrutamento e ativação de enormes contingentes de

células circulantes, destinadas a conter a agressão muito antes que a imunidade adaptativa possa ser acionada.

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

Estudos recentes têm focado na imunidade inata e o papel da inflamação no processo do desenvolvimento da DRC (30). A forte associação entre atividade desregulada do inflamassoma e certas doenças inflamatórias humanas sugere a importância dessa via em respostas imunes inatas. Sabe-se que em vários modelos experimentais e pacientes com DRC há a ativação da imunidade inata. A ativação do sistema NFκB, um dos componentes da via de sinalização da imunidade inata (sinal 1), foi observada no interstício, glomérulo e vaso de animais com redução de massa renal de 5/6, um dos mais utilizados nos estudos de DRC (31, 32, 33, 34). Expressão aumentada de NFκB foi observada em pacientes com nefropatia por lesão mínima, nefropatia membranosa idiopática e nefropatia por IgA (35). A ativação da via do

inflamassoma (sinal 2) foi também observada em modelos de DRC. Na nefropatia diabética, Wang e cols (36) constataram aumento na expressão das proteínas que compõem inflamassomas NLRP, como NLRP3, ASC e Caspase-1 em tecido renal de ratos diabéticos. Du e colaboradores (37) demonstraram que a ativação de NOD2, um inflamassoma do subtipo NLRC, participa do processo inflamatório que leva ao dano renal na ND. Conforme descrita anteriormente, a reabsorção de proteínas requer a ação de lisossomas, os quais, sabidamente, podem ajudar a ativar a imunidade inata, ao menos em células fagocíticas (38). Há evidências de que a IL-18 e caspase-1, que são os principais marcadores da atividade do inflamassoma Nlrp3, são expressos no epitélio tubular renal de pacientes com DRC, sugerindo que a imunidade inata pode desempenhar um papel importante no mecanismo de perpetuação das doenças renais (38, 39). Esses achados, relativamente recentes, podem auxiliar na compreensão do mecanismo envolvido na inflamação intersticial após exposição de células tubulares a altas concentrações de proteínas.

1.3 Nefropatia induzida por adriamicina

A adriamicina (doxorubicina) é conhecida como uma eficiente indutora de proteinúria e lesão renal em roedores, mimetizando o observado na síndrome nefrótica humana. A primeira descrição de Adriamicina induzindo lesão renal em ratos ocorreu em 1976 (40). Desde então, o modelo de nefropatia por adriamicina tem sido amplamente utilizado para compreender os processos que envolvem a progressão da lesão renal em condição proteinúrica. Nesse modelo animal, as alterações histológicas assemelham-se aos da esclerose glomerular segmentar e focal humana, com a fusão de pedicelas, colapso de alças capilares, com inflamação e fibrose túbulo intersticiais (41, 42 e 43).

Outra característica do modelo é a infiltração acentuada de linfócitos T e B e macrófagos tanto na área cortical quanto medular, demonstrando a participação da imunidade adquirida e inata, sendo essas consideradas como moduladoras da lesão renal na nefropatia por adriamicina, (44). Demonstramos recentemente que existe uma ativação paralela da imunidade inata e adquirida no modelo de redução de massa renal Nx (33). A imunidade adaptativa é um conjunto mais lento e mais complexo de mecanismos que compõem o

reconhecimento, o processamento e, finalmente, a eliminação de antígenos por linfócitos B (produtores de anticorpos) e linfócitos T (citotóxico). A imunidade inata refere-se ao mecanismo de defesa rápida e não específico envolvendo fagócitos como macrófagos e neutrófilos (45). Os macrófagos são classificados em vários sub-tipos de acordo com a sua característica funcional no processo inflamatório, os dois principais são do tipo M1 que são considerados pró-inflamatórios e os do tipo M2 anti-inflamatórios (46).

A participação de linfócitos/macrófagos no desenvolvimento de DRC não é restrita ao modelo de adriamicina. Em nosso laboratório, demonstramos que a inibição de linfócitos/macrófagos com micofenolato mofetil (MMF) atenua as lesões renais no modelo de ablação de 5/6 (NX) (2) e na nefropatia diabética (47). Estudos relataram que a renoproteção observada em ratos NX tratados com MMF estava associada à redução na proliferação de células renais, infiltração de miofibroblastos e depósito de colágeno (48, 49). No entanto, o mecanismo exato de como o MMF reduz a fibrose renal na DRC não está totalmente esclarecido. Recentemente, alguns estudos têm mostrado vias de sinalização que são inibidas pelo MMF. Em um estudo *in vitro*, Olejaz e cols (50) mostraram que o ácido micofenólico (composto ativo do MMF) inibe a espécie reativa de oxigênio (ROS) e a ativação do sistema NF- κ B nas células endoteliais estimuladas com TNF α . Resultados semelhantes foram obtidos por Andreucci M e cols (51) que utilizaram células do túbulo proximal estimuladas com H₂O₂ e observaram inibição da atividade de NF- κ B pelo ácido micofenólico. *In vivo*, Li e cols (52) relataram que o tratamento com MMF inibiu a ativação do TLR4 e NF- κ B no modelo de isquemia/reperfusão do miocárdio, reduzindo a resposta inflamatória e apoptose das células cardíacas. Esses resultados sugerem que o MMF inibe a atividade de alguns componentes da imunidade inata.

No presente estudo, utilizamos o modelo de nefropatia por adriamicina e cultura para expor as células do epitélio tubular a concentrações elevadas de proteínas e provar a hipótese de que em algum momento, precocemente ou tardiamente, há a ativação da imunidade inata no tecido renal. Além disso, um segundo grupo adicional de animais com ADR foi utilizado para verificar se o tratamento com MMF inibe a atividade da imunidade inata e atenua as lesões renais características do modelo de adriamicina.

2. OBJETIVOS

- ✓ Verificar a hipótese de que a exposição prolongada de células tubulares a altas concentrações de proteínas, devido à disfunção da barreira glomerular, estimula a imunidade inata, ativando assim a cascata inflamatória e o desenvolvimento de uma nefropatia crônica.

- ✓ Verificar a hipótese de que o tratamento com MMF promove renoproteção no modelo de nefropatia por adriamicina e está relacionada com a atividade da imunidade inata.

3. Métodos

3.1 – Procedimentos gerais

Para a realização do estudo *in vivo*, utilizamos ratos Munich-Wistar machos, obtidos de uma colônia estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos em temperatura ambiente de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h, com livre acesso a uma ração convencional para roedores (Nuvital, Curitiba, PR) e água. Todos os procedimentos experimentais que foram utilizados seguiram as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo de Pesquisa No. 108/15).

3.2- Obtenção do modelo experimental:

Os animais foram anestesiados (intramuscular) com ketamine (2 mg/kg im) e xylazine (0,4 mg/kg im), e divididos em dois grupos: ADR que receberam uma injeção intravenosa caudal de 5 mg/Kg de doxorubicin hydrochloride (Sigma) dissolvida em solução salina e controle (C) que receberam apenas a solução salina (veículo). O peso corpóreo foi avaliado semanalmente.

O estudo foi dividido em 2 protocolos distintos. O protocolo nº 1 foi desenvolvido para verificar se a imunidade inata é ativada e em qual fase da nefropatia induzida por adriamicina. O protocolo nº2 foi desenvolvido para verificar se a inibição da proliferação do linfócito, através do micofenolato mofetil (MMF), resulta na redução da atividade da imunidade inata e renoproteção na progressão da nefropatia induzida por ADR.

3.2.1- Protocolo 1:

Ratos ADR e ratos C foram acompanhados por períodos de 2, 4 e 20 semanas. Os grupos precoces (2 e 4 semanas) foram utilizados para examinar o comportamento dos parâmetros de inflamação, e da ativação da imunidade inata em um momento em que, a despeito da proteinúria intensa, não houve

ainda tempo para que a nefropatia crônica associada a esse modelo se estabelecesse. O tardio (20 semanas) para podermos avaliar a evolução do processo de lesão renal crônica e a relação que, segundo supomos, se estabelece entre a imunidade inata e os parâmetros “convencionais” de inflamação, como infiltração por macrófagos, linfócitos e miofibroblastos nessa fase mais avançada da nefropatia. Em todos os períodos foram realizadas as análises bioquímicas, histológicas, imunohistoquímicas, Western Blot e ELISA. O grupo Controle foi composto de 3 ratos de cada período (2, 4 e 20 semanas), uma vez que os parâmetros bioquímicos e morfológicos não foram alterados com o tempo.

3.2.2- Protocolo 2:

Ratos ADR+MMF, que receberam MMF (Roche Laboratories, Nutley, NJ, EUA) que foi dissolvido em dimetilsulfóxido (5%) e posteriormente em azeite. O MMF foi administrado diariamente por gavagem na dose de 10 mg/Kg/dia. Um grupo de ratos ADR foram também acompanhados por períodos de 2, 4 e 20 semanas.

Procedimentos Gerais

Após 2, 4 e 20 semanas da indução, determinamos o peso corpóreo, a pressão caudal (PC) e a excreção urinária de albumina de 24 horas (ALB). A PC foi avaliada, após breve aquecimento dos animais, utilizando um método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina e determinação da ALB, através da técnica de imunodifusão radial, empregando anticorpo específico (anti-albumina de rato, MPBiomedicals LLC, EUA).

Após 20 semanas, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas para a determinação dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos. Após essas avaliações, os ratos foram anestesiados com Ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e Rompun (Bayer, 10 mg/kg) intramuscular. Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal para determinação de eletrólitos, interleucinas, concentrações de creatinina e uréia (Kit Labtest Diagnóstica S.A.). Após a perfusão dos dois rins com salina gelada, a uma pressão igual à sistêmica, o

rim direito será removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido no freezer -80°C para análise de proteínas (Western-Blot e Elisa). A seguir, o rim esquerdo foi perfundido com a solução Du Boscq-Brasil, para a fixação "in situ" e preparado para análise histológica e imunohistoquímica. Os detalhes desses procedimentos e do processamento do tecido renal estão descritos a seguir.

3.3 – Análises bioquímicas

As dosagens de creatinina, uréia sérica, triglicérides e colesterol foram realizadas através de sistema colorimétrico disponíveis comercialmente (Kit Labtest Diagnóstica S.A.). As dosagens de sódio e potássio plasmático foram realizadas através do analisador de eletrólitos 9140 (AVL Medical Instruments).

3.4- Análises histológicas

Após a fixação "in situ" com uma solução de Du Boscq-Brasil, os rins foram pesados e fatiados em 2 segmentos coronais e pós-fixados em tampão fosfato com formaldeído a 10%. Os tecidos renais foram mantidos por 14 horas em processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Alemanha) para desidratação, diafanização e impregnação em parafina. Após inclusão em blocos de parafina, os tecidos foram cortados na espessura de 4 µm e corados pela reação de Ácido Periódico-Shiff (PAS) para a análise de lesões glomerulares. Além disso, determinamos a fração da área do córtex renal ocupada por interstício em tecidos corados com a reação de Tricrômio de Masson.

A quantificação da porcentagem de esclerose glomerular (%EG) foi realizada através da contagem do número de glomérulos com esclerose, independente da extensão da lesão. Para essa avaliação foram analisados 200 glomérulos por corte, sob aumento de 400x. A fração do córtex renal ocupada por interstício e corada positivamente foi quantificada por um método de contagem de pontos. Foram avaliados 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos, obtendo-se um valor final, expresso em porcentagem de expansão intersticial (53).

3.5- Imuno-histoquímica

Os tecidos renais parafinizados foram cortados em espessura de 4 µm e colocados em lâminas previamente silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano Sigma). Após 30 minutos em estufa a 60°C, os tecidos foram submetidos à desparafinização em 3 banhos de xilol e reidratados em etanol (concentrações decrescentes) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor por 30 minutos a temperatura de 98 °C, em solução de ácido cítrico 10 mM de pH 6,0. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes.

3.5.1- Infiltração de Macrófagos (MØ) ED-1

A identificação de células positivas para macrófagos foi realizada pelo método de APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina). Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA), em concentração 1:20 por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-ED-1 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho - RAM (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:50 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados com o Complexo APAAP na diluição 1:70 por 30 minutos. Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Permanent-Red. As células positivas para o epítipo ED-1 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Permanent-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de macrófagos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção,

correspondendo a uma área de $0,08 \text{ mm}^2$. Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm^2).

3.5.2- Infiltração de Macrófagos (M2) e NLRP3

Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro livre de proteínas (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário anti-receptor de manose (Abcam, Cambridge, UK) para macrófagos M2 e anti-NLRP3 (Sigma, Saint Louis, USA) na diluição de 1:400 e 1:10000, respectivamente, à temperatura de $3-8^\circ\text{C}$ durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato DAB. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados.

Para a estimativa da densidade renal intersticial cortical de M2 e NLRP3, o número de células positivas por células mm^2 foi avaliado de forma cega a uma ampliação de 400x. Para cada seção, foram examinados 50 campos microscópicos (correspondentes a uma área total de $1,6 \text{ mm}^2$).

3.5.3- Infiltração de Linfócitos (LF)

Para avaliação da expressão de CD3 foi empregada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako #X0590) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector #S-2000) na concentração de 1:50 diluído em solução de BSA 1% por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-CD3 (Dako #M7254) diluído em BSA 1% na proporção de 1:100. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o anticorpo secundários anti-camundongo biotinilado (Vector BA-2001) diluído

em BSA 1% na proporção de 1:200 durante 45 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Streptavidina-AP (Vector Vectastain ABC-AP #AK5000). Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Permanent-Red. As células positivas para o epítipo CD3 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Permanent-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de linfócitos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

3.5.4- Detecção de α -SMA

A α -SMA está presente constitutivamente em artérias e arteríolas e, na vigência de inflamação crônica do interstício renal, passa a ser detectada também nesse compartimento, indicando a presença de miofibroblastos. Para a detecção da α -SMA, utilizou-se o método Streptavidina AP (Streptavidina Fosfatase Alcalina). Após desparafinização e exposição dos epítomos por aquecimento, os cortes foram incubados com soluções para bloqueio da biotina endógena tecidual (Dako, Califórnia, EUA). Em seguida, as lâminas foram incubadas com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA), diluído a 2% em solução de leite desnatado a 2% em TBS, durante 30 minutos. Após a retirada do excesso de soro, os cortes foram incubados com o anticorpo anti- α -SMA de músculo liso (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) 1:1000 produzido em camundongos, na proporção de 0,12% em BSA, à temperatura de 4°C, durante 18h. No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-camundongo produzido em cavalo (Vector Laboratories, Califórnia, EUA), respectivamente, por 45 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com o complexo Streptavidina-Fosfatase Alcalina (Dako, Califórnia, EUA) durante 30 minutos, as marcações positivas para o α -SMA foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da

fosfatase alcalina do Complexo e do Permanent-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. Para a avaliação da porcentagem da área intersticial ocupada por miofibroblastos utilizamos um método de contagem de pontos. Foram avaliados 20 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos.

3.5.5- Identificação de Colágeno I (COLL-1)

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

3.6. Cultura de células

As células epiteliais tubulares renais imortalizadas NRK-52E (American Type Culture Collection) (PTC) foram cultivadas e mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) / F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo 10% de

soro fetal bovino e 1% de penicilina -estreptomicina e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Na confluência, a cultura celular foi tripsinizada e o meio fresco foi substituído a cada 2 dias, e as células foram subcultivadas a cada 7 dias após a semeadura. As PTCs foram então incubados com BSA 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Alemanha), os reagentes de transfecção e siRNA para Nlrp3 e TLR4, obtidos de Invitrogen (reagente RNAiMax e Stealth RNAi™). O siRNA (Stealth RNAi™) com sequência de codificação não-direcionada foi usado como um controle negativo. As células PTCs cultivadas foram transfectadas de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e as células foram mantidas por 24h. A eficiência dos reagentes de transfecção e a eficiência de silenciamento de genes foram avaliadas através da análise de coloração de imunofluorescência para TLR4 e NLRP3. A viabilidade/proliferação celular foi avaliada utilizando o ensaio de proliferação de células de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Alemanha). Foi utilizada a técnica de imunofluorescência para quantificar TLR4, IL-6, NLRP3, IL-1 β e α -SMA, westesrn blot para colágeno-1 e Caspase-1, ELISA para MCP1.

3.7 Imunofluorescência

As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Após o bloqueio do soro durante 30 min, as células foram incubadas com o anticorpo primário com o anti-NLRP3 (Sigma, Saint Louis, EUA); anti-TLR4 (Santa Cruz, Dallas, EUA); anti-IL-1 β (Santa Cruz, Dallas, EUA); anti-IL-6 (Abcam, Cambridge, Reino Unido); anti- α -SMA (Sigma, Saint Louis, EUA) e, em seguida, com o anticorpo secundário conjugado alexa fluoróforo 633 (Rodamina) ou alexa fluoróforo 488 (FITC) (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Finalmente, as células foram contra-coradas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), montadas em lâminas de vidro e visualizadas usando um microscópio de fluorescência. Os perfis de PTCs contendo material fluorescente são expressos como uma porcentagem do número total de núcleos. As reações foram fotografadas em diferentes campos no aumento de 40x. Foram coletadas imagens múltiplas por grupo e a intensidade média de fluorescência (MFI) das manchas para diferentes imagens foi quantificada usando o software ImageJ e calculada em relação ao número de núcleos por campo.

3.7- Análise do conteúdo protéico do tecido renal (Western Blot)

As proteínas das células e tecidos renais foram extraídas usando o tampão de lise (RIPA) e a concentração de proteína foi determinada utilizando um ensaio de Bradford. 100 µg de proteínas totais foram misturados com 2x do tampão Laemmli e foram desnaturados a 96 °C durante 5 min. Para a análise específica da fração nuclear, as amostras pré-condicionadas não foram desnaturadas. A separação de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de dodecyl sulphate-poliacrilamida de sódio. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) e foram incubadas com 5% de leite ou 5% de BSA em TBS durante 1 hora à temperatura ambiente para o bloqueio de ligações não específicas. A membrana foi então incubada durante a noite a 4° C com anticorpos primários para: β -actina, 1: 5000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA); colágeno-1, 1: 500 (Abcam, Cambridge, Reino Unido); TLR4, 1: 250 (Santa Cruz, Dallas, EUA), caspase 1, 1: 1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA); heme oxigenase 1 (HO-1), 1: 500 (Abcam, Cambridge, Reino Unido); superóxido dismutase 2 (SOD2), 1: 10000 (Cayman, Michigan, EUA). Após enxaguar com tampão (TBST), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários marcados com HRP. As bandas marcadas foram detectadas usando um kit de quimioluminescência (Thermo Scientific, Rockford, EUA), e foram analisadas adicionalmente por densitometria com um sistema de documentação de gel o software Uvisoft-UvibandMax (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

3.7.1- Isolamento de núcleos do tecido renal

Para o isolamento de núcleos, os tecidos renais foram homogeneizados em gelo com pilão de vidro especial (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) em tampão de lise e centrifugados a 1000 G durante 10 min a 4 ° C para obter um pellet nuclear bruto. O sobrenadante (fração citosólica) foi descartado. Além disso, o sedimento foi reconstituído em tampão Laemmli e centrifugado a 1500 G durante 10 min a 4 ° C para obter uma suspensão nuclear pura. A separação de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de dodecyl sulphate-poliacrilamida de sódio. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) e foram incubadas com 5% de leite ou 5% de BSA em TBS durante 1 hora à

temperatura ambiente para o bloqueio de ligações não específicas. A membrana foi então incubada durante a noite a 4° C com anticorpo primário para p65 (NF- κ B), 1: 100 (Cell Signaling Danvers, EUA); histona, 1: 1500 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Após enxaguar com tampão (TBST), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário marcado com HRP. As bandas marcadas foram detectadas usando um kit de quimioluminescência (Thermo Scientific, Rockford, EUA), e foram analisadas adicionalmente por densitometria com um sistema de documentação de gel o software Uvisoft-UvibandMax (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

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

O método de ELISA foi utilizado para a quantificação do conteúdo protéico de urina, tecido congelado e sobrenadante da cultura celular. A concentração de NGAL foi determinada na urina e foi utilizando um kit NGAL ELISA para ratos (BioPorto, Copenhagen, Dinamarca). O conteúdo protéico de IL-1 β e IL-10 foi avaliado nas amostras de tecido da córtex renal e MCP-1 no sobrenadante celular. A quantificação de IL-1 β , IL-10 e MCP-1 foi realizada através do kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Todas as análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.9- Análise Estatística

Os resultados dos grupos do protocolo 1 e da cultura de células foram analisados através de comparação entre grupos, aplicando-se análise de variância (ANOVA) de um fator, com pós-testes de acordo com o método de Newman-Keulz. No protocolo 2, a comparação entre os dois grupos foi realizada através do teste “t student” sendo considerados significativos os valores de “p” inferiores a 0,05. Os cálculos foram efetuados através do software GraphPad Prism® versão 4.0 e os resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1- Protocolo 1

A indução da nefropatia por Adriamicina (Grupo ADR) foi realizada em 34 animais que receberam uma única dose de 5,0 mg/kg de Cloridrato de Doxorubicina na veia caudal. Os ratos ADR foram subdivididos por período de 2 semanas (ADR_{2w}, N=12), 4 semanas (ADR_{4w}, N=12) e 20 semanas (ADR_{20w}, N=10). Com o intuito de facilitar a análise, 3 animais controles de cada período foram utilizados para compor um único Grupo C.

Na Tabela 1 Figura 2-4 estão representados os resultados dos parâmetros que foram avaliados ao final do estudo.

Tabela 1. Resultados ao longo de 20 semanas após indução com adriamicina

	C (n=9)	ADR_{2w} (n=12)	ADR_{4w} (n=12)	ADR_{20w} (n=10)
PE	314±20	239±7 ^a	235±7 ^a	268±22 ^a
ALB	4±2	265±27 ^a	347±59 ^a	536±33 ^{abc}
[sALB]	3,5±0,2	1,5±0,2 ^a	1,3±0,3 ^a	1,3±0,1 ^a
TCP	144±3	151±3	157±2 ^a	167±4 ^{abc}
%HT	50±1	46±1 ^a	44±1 ^a	44±1 ^a
TG	46±8	202±28 ^a	715±33 ^{ab}	335±46 ^{ac}
Colesterol	79±6	262±34 ^a	513±25 ^{ab}	373±35 ^{ac}
Na⁺	142±1	141±1	141±1	141±1
K⁺	4,1±0,2	5,0±0,1 ^a	4,9±0,3 ^a	5,4±0,4 ^a
NGAL	28±4	121±24 ^a	90±13 ^a	195±70 ^a
Uréia	52±2	58±3	51±2	141±22 ^{abc}
Scr	0,60±0,02	0,69±0,05	0,71±0,03	1,38±0,20 ^{abc}

Valores do peso corpóreo dos animais (PE, g), albuminúria (ALB, mg/24h), concentração de albumina no soro [sALB, mg/dL], pressão caudal (TCP, mmHg), hematócrito arterial (HT,%), triglicérides (TG, mg/dL), colesterol plasmático (mg/dL), concentração de sódio (Na⁺, mEq/L) e potássio (K⁺, mEq/L) plasmático, concentração urinária de Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocain (NGAL, µg/24h), concentração sérica de ureia (mg/dL) e creatinina (Scr, mg/dL), dos grupos C e ADR avaliados com 2, 4 e 20 semanas. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. ADR₂; ^cp<0,05 vs.ADR₄).

Figura 2. (A) valores de albuminúria (B) creatinina SCr e (C) pressão caudal TCP, dos grupos ADR e C, com 2, 4 e 20 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs.4w).

A nefropatia induzida pela adriamicina provocou albuminúria maciça, hipoalbuminemia, perda de peso corpóreo, anemia e hiperlipidemia e hipercolesterolemia (Tabela 1 e Figura 2), esses resultados indicam que a dose de adriamicina utilizada foi adequada para obter o modelo de síndrome nefrótica (30). Os triglicérides e colesterol (Tabela 1) aumentaram a partir da segunda semana após a injeção da adriamicina, associado ao aumento da albuminúria que também ocorre a partir da segunda semana. A perda excessiva de proteínas encontrada nesses animais ocasiona a redução da pressão oncótica plasmática que levam a um aumento da síntese de proteínas pelo fígado, ocasionando assim o aumento do triglicérides e colesterol. Esses resultados estão de acordo com os dados de outros estudos que utilizaram esse mesmo modelo experimental.

O grupo ADR apresentou hipertensão sistêmica (Figura 2C) e elevação das concentrações séricas de creatinina (Figura 2B) e uréia (tabela 1), indicando perda da função renal evidente após 20 semanas de ADR.

Figura 3. (A) Valores de NGAL e (B) potássio (K⁺) dos grupos C e ADR, com 2, 4 e 20 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs. C)

Mostramos que o NGAL (Figura 3A) estava aumentado precocemente e se manteve aumentado ao longo de todo o período de estudo (p<0,05), seguindo o padrão da albuminúria. Esses resultados corroboram os dados de potássio sérico (Figura 3B), reforçando a hipótese de que o excesso de proteína no túbulo estaria promovendo lesões nas células tubulares.

Os resultados dos estudos morfométricos no tecido renal estão apresentados na Tabela 2 e Figuras -.

Tabela 2. Resultados das análises morfológicas após indução com adriamicina

	C (n=9)	ADR _{2w} (n=12)	ADR _{4w} (n=12)	ADR _{20w} (n=10)
PR/PE	0,5±0,02	0,61±0,02 ^a	0,64±0,03 ^a	0,65±0,02 ^a
%EG	0,01±0	1,5±0,7	3±1,0 ^a	46±10 ^{abc}
%INT	0,4±0,2	1,1±0,3	2±0,4 ^{ab}	8,4±2,3 ^{abc}

Valores da relação peso renal/ peso corpóreo (PR/PE), da porcentagem de esclerose glomerular (%EG) e da porcentagem da área de interstício cortical (%INT) dos grupos C e ADR ao longo das 2, 4 e 20 semanas de estudo. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs. C; ^b p<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs.4w).

Figura 4. (A) Valores do peso renal corrigido pelo peso corpóreo (LKW/BW), (B) porcentagem de esclerose glomerular (%GS) e (C) área de interstício cortical (INT %) dos grupos C e ADR ao longo das 2, 4 e 20 semanas de estudo. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs. C; ^bp<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs.4w).

Figura 5 – Microfotografias representativas %GS **A- C**, **B-** ADR_{20w}; e %INT **C- C**, **D-** ADR_{20w}. Coloração de PAS e Masson. Aumento 40X.

Os animais ADR apresentaram hipertrofia renal (Figura 4 A) que foi observada precocemente (2 semanas), apesar da perda da seletividade da barreira glomerular desde o início da nefropatia, a presença de esclerose glomerular (Figura 4B) foi significativa apenas após 4 semanas. Mostramos que os animais do grupo ADR_{4w} apresentaram um aumento na expansão do

interstício renal (Figura 4C) em relação aos animais C, mantendo-se aumentado ao longo das 20 semanas de estudo. Essa expansão intersticial é resultado da infiltração e proliferação de células no interstício, com acúmulo de matriz extracelular e colágeno (Tabela 2, Figuras 4-5).

Os resultados da análise da inflamação e fibrose estão apresentados na Tabela 3 e Figura 6.

Tabela 3 – Resultados da análise da inflamação e fibrose renal

	C (n=9)	ADR_{2w} (n=12)	ADR_{4w} (n=12)	ADR_{20w} (n=10)
LINF	27±4	140±24 ^a	189±29 ^a	262±24 ^{abc}
Mø	7±1	243±46 ^a	229±36 ^a	320±45 ^{abc}
α-SMA	2±1	8±2 ^a	12±1 ^{ab}	19±1 ^{abc}
Coll-1	3±1	9±2 ^a	16±1 ^{ab}	25±2 ^{abc}

Medidas de infiltração túbulo-intersticial de macrófagos (Mø, céls/mm²) e linfócitos (LINF, céls/mm²), % de interstício renal preenchido por colágeno-1 (Coll-1, %) e α-actina (α-SMA, %) dos grupos C e ADR ao longo das 2, 4 e 20 semanas de estudo. Resultados apresentados com Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs. 4w)

Figura 6. (A) Infiltração de Linfócitos, (B) macrófagos, (C) α-SMA e (D) coll-1 no interstício renal nos grupos C e ADR ao longo de 2, 4 e 20 semanas de estudo. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0.05 vs C; ^bp<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs. 4w).

Figura 7 – Microfotografias representativas de macrófagos **A**- C, **B**- ADR_{20w}, linfócitos **C**- C, **D**- ADR_{20w}, α-SMA **E**- C, **F**- ADR_{20w} e colágeno-1 **G**- C, **H**- ADR_{20w}. Aumento 40X.

A administração de ADR foi associada à infiltração intersticial precoce por linfócitos e macrófagos e fibrose intersticial (Tabela 3, Figura 6-7). Os animais do grupo ADR_{2W} apresentaram um aumento na expressão de colágeno 1 e α -SMA ($p < 0,05$ vs C) e esse aumento foi progressivo até o final do período de estudo. Esses achados indicam a presença de miofibroblastos já na fase precoce, que foi aumentando progressivamente ao longo da evolução da nefropatia. Comparando os gráficos da α -SMA e colágeno, observamos um padrão muito semelhante que foi mantido ao longo das 20 semanas de estudo.

A albuminúria correlacionou-se com a densidade de infiltração de macrófagos ED-1, α -SMA, e com a intensidade da deposição de colágeno (Figura 8). Juntos, os dados de correlação sugerem que o excesso de proteína foi tóxico para as células tubulares.

Figura 8. Correlações (no grupo ADR) entre albuminúria e infiltração intersticial de macrófagos (A); albuminúria e α -SMA (B); albuminúria e deposição de colágeno (C). Correlações significativas foram estabelecidas de acordo com o ($p < 0,05$).

Para verificar a ativação de componentes da imunidade inata no modelo adriamicina, foi realizada a análise do conteúdo proteico de TLR4 (WB), P65 fosforilado/NF- κ B que foi analisado no núcleo (WB), NLRP3 (imunohistoquímica), caspase-1 (WB), IL1- β (ELISA) no tecido renal. Os resultados estão apresentados na Tabela 4 e Figura 9-10.

Tabela 4 – Análise da expressão proteica de componentes da imunidade inata.

	C (n=9)	ADR _{2w} (n=12)	ADR _{4w} (n=12)	ADR _{20w} (n=10)
TLR4	1,0±0,2	4,0±0,9 ^a	4,0±1 ^a	11±2 ^{abc}
NF-κB	1,0±0,1	1,0±0,3	2,0±0,3	5,0±0,6
NLRP3	0,5±0,1	1,0±0,2	1,5±0,2	3,5±0,5
Casp-1	1,0±0,1	1,5±0,2	2,0±0,4	3,0±0,7 ^{abc}
IL-1β	0,5±0,1	1,7±0,3	1,9±0,3 ^a	4,0±0,7 ^{abc}

Valores da expressão proteica renal de componentes da imunidade inata: TLR4 (fold increase, x C), NF-κB (fold increase, x C), NLRP3 (cells/mm²), Caspase-1, (fold increase, x C) e IL-1β (pg/mg), dos grupos C, ADR_{2w}, ADR_{4w} e ADR_{20w}. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs. 4w).

Figura 9. (A) Medidas da expressão proteica TLR4, (B) NF-κB nuclear, (C) NLRP3, (D) Caspase-1 e (E) IL-1β, dos grupos C e ADR ao longo das 2, 4 e 20 semanas. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs. 2w; ^cp<0,05 vs. 4w).

Figura 10 – Microfotografias representativas de TLR4 **A-** C, **B-** ADR_{20W}, Caspase-1 **C-** C, **D-** ADR_{20W}, NLRP3 **E-** C, **F-** ADR_{20W} e IL-1 β -1 **G-** C, **H-** ADR_{20W}. Aumento 40X.

No grupo ADR, ocorreu precocemente a ativação de pelo menos duas principais vias da imunidade inata TLR4/NF- κ B e a via do inflamassoma NLRP3/Caspase-1, associada ao aumento do conteúdo protéico de IL-1 β . Na fase tardia (20 semanas) todos os parâmetros avaliados estavam exacerbados (Tabela 4, Figura 9-10).

Além disso, a excreção urinária de albumina correlacionou-se positivamente com a abundância renal de IL-1 β , NLRP3 (Figura 11). Assim, mostramos que a albuminúria ativou a imunidade inata em ADR.

Figura 11. Correlações (no grupo ADR) entre albuminúria e NLRP3 (A); albuminúria e IL-1 β (B). Correlações significativas foram estabelecidas de acordo com o ($p < 0,05$).

Para verificar a contribuição do estresse oxidativo na ativação da imunidade inata, pela presença de albuminúria, avaliamos o conteúdo proteico de HO-1 e SOD2. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Medidas da expressão proteica HO1 (A) e SOD2 (B). Resultados apresentados como Média $\pm$ EP. (^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs. 2s; ^c $p < 0,05$ vs. 4s).

A albuminúria resultou em aumento do estresse oxidativo. Nos animais ADR, ocorreu à indução de HO-1 e diminuição do SOD2 sugerindo uma deficiência na remoção das espécies reativa de oxigênio (ROS) que

contribuíram ainda mais para agravar o estresse oxidativo (Figura 12). O estresse oxidativo pode exercer ação pró-inflamatória por vários mecanismos distintos.

Para verificar se a exposição de células tubulares ao excesso de albumina ativa a imunidade inata e se o bloqueio dessas vias diminuiriam os efeitos causados pela albumina, avaliamos alguns componentes da imunidade inata nas células tubulares proximais de rato (PTC) cultivadas com BSA e com RNAi para silenciamento gênico do TLR4 e NLRP3. Para controle de citotoxicidade analisamos a viabilidade das células tratadas com o BSA e RNAi para descartar citotoxicidade (MTT). Os resultados estão apresentados nas Figuras 13-18.

Figura 13. (A) Valores de viabilidade celular (MTT). Expressão proteica de componentes da imunidade inata e fibrose nas PTCs: (B) TLR4, (B) IL-6, (C) NLRP3, (D) Caspase-1, (E), (F) IL-1 β), (G) MCP1, (H) α -SMA e (I) COL-1 dos grupos C, BSA, Scramble, siTLR4 e siNLRP3. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs. BSA; ^cp<0,05 vs. Scramble).

Figura 14 – Microfotografias representativas de TLR4 nos grupos C e ADR_{20W}. Aumento 40X.

Figura 15 – Microfotografias representativas de TLR4 nos grupos C e ADR_{20W}. Aumento 40X.

Figura 16 – Microfotografias representativas de NLRP3 nos grupos C e ADR_{20W}. Aumento 40X.

Figura 17 – Microfotografias representativas de IL1- β nos grupos C e ADR_{20w}. Aumento 40X.

Figura 18 – Microfotografias representativas de α -SMA nos grupos C e ADR_{20W}. Aumento 40X.

O ensaio de MTT mostra que a quantidade de BSA e RNAi não foi citotóxica para as células. Em consistência com as observações *in vivo*, a exposição de PTCs ao excesso de albumina aumentou a produção de NLRP3 (Figura 13D), Caspase-1 (Figura 13E) e IL-1 β (Figura 13F), indicando que a via de inflammasoma NLRP3 foi ativada. Além disso, o aumento do conteúdo renal de TLR4 (Figura 13B) e IL-6 (Figura 13C) sugere que o sistema NF- κ B também foi ativado. A produção de MCP-1, α -SMA e COLL-1 estavam aumentada. O silenciamento dos genes TLR4 e NLRP3 atenuou o conteúdo

protéico de MCP-1, IL-1 β , IL-6, α -SMA e COLL-1. Esses resultados sugerem que os componentes da imunidade inata, o TLR4 e NLRP3, estão envolvidos no mecanismo de fibrose das células tubulares expostas a alta concentração de proteína.

4.2- Protocolo 2

A indução da nefropatia por Adriamicina (Grupo ADR) foi realizada em 60 animais que receberam no dia 1 uma única dose de 5,0 mg/kg de Cloridrato de Doxorubicina na veia caudal, a partir do segundo dia os animais do grupo ADR+MMF receberam diariamente MMF (10mg/Kg/dia) até o final de cada período de estudo (2, 4 e 20 semanas).

Os valores de linfócitos, albuminúria, pressão caudal, peso corpóreo, % de esclerose glomerular α -SMA e COLL-1 dos grupos estudados ao longo do período de acompanhamento, estão representados na tabela 5 e Figura 19 -20 .

Tabela 5. Resultados ao longo de 2, 4 e 20 semanas

	ADR_{2W}	ADR_{2W}+MMF	ADR_{4W}	ADR_{4W}+MMF	ADR_{20W}	ADR_{20W}+MMF
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
LINF	143 $\pm$ 22	85 $\pm$ 15	212 $\pm$ 28	127 $\pm$ 17*	261 $\pm$ 22	190 $\pm$ 24*
ALB	289 $\pm$ 21	244 $\pm$ 18	393 $\pm$ 70	305 $\pm$ 28	537 $\pm$ 43	256 $\pm$ 32*
PC	152 $\pm$ 3	150 $\pm$ 3	157 $\pm$ 2	155 $\pm$ 2	170 $\pm$ 2	164 $\pm$ 1
PE	234 $\pm$ 8	220 $\pm$ 8	239 $\pm$ 11	222 $\pm$ 8	270 $\pm$ 15	235 $\pm$ 17
%GS	1,5 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,3*	46,8 $\pm$ 6,7	38,1 $\pm$ 6,8
COLL-1	9 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2*	26 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1*
α-SMA	8 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2*	20 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1*

Medidas de infiltração túbulo-intersticial de linfócitos (LINF, céls/mm²), albuminúria (ALB, mg/24h), valores de pressão caudal (PC, mmHg), peso corpóreo (PE, g), da % de esclerose glomerular (%GS) e % de interstício renal preenchido por α -aSMA e COLL-1 (Col-1, %) dos grupos ADR e ADR+MMF. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP (* p<0.05 vs. Respectivo ADR)

Figura 19. Infiltração de linfócitos (A), albuminúria (B), % de esclerose glomerular (C), % de interstício renal preenchido por α-SMA (D) e COLL-1 (E) no tecido renal nos grupos ADR e ADR+MMF ao longo de 2, 4 e 20 semanas de estudo. Resultados apresentados como Média±EP ($p < 0.05$ vs Respetivo ADR).

Figura 20 – Microfotografias representativas da α-SMA A- C, B- ADR_{20W}, C- ADR+MMF_{20W}, e COLL-1 D- C, E- ADR_{20W}, F- ADR+MMF_{20W}. Aumento 40X.

A infiltração de linfócitos renais foi observada após 2 semanas de ADR, sugerindo que a imunidade adaptativa também está envolvida na lesão renal desse modelo. O tratamento com MMF foi capaz de diminuir a infiltração de linfócitos no grupo ADR+MMF (Figura 19 A) durante a fase aguda do estudo, corroborando os achados da literatura. A albuminúria (Figura 19B) permaneceu exacerbada nos animais ADR, que foi ainda mais acentuada após 20 semanas, confirmando os resultados do protocolo 1. O tratamento com MMF não alterou a excreção de albumina, embora tenha sido observada uma atenuação com 20 semanas. MMF atenuou o depósito de α -SMA (Figura 19D) COL-1 (Figura 19E). No entanto, o MMF reduziu a esclerose glomerular (Figura 19C) apenas nos estágios iniciais da nefropatia, perdendo essa proteção ao longo do tempo. Esses resultados indicam que o MMF reduziu a infiltração linfocitária e a fibrose intersticial no modelo ADR.

Para verificar um possível efeito benéfico do MMF sobre a ativação de componentes da imunidade inata e estresse oxidativo no modelo adriamicina, foi realizada a análise do conteúdo proteico de TLR4, NF- κ B, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , HO-1 e SOD2 nos grupos estudados. Os resultados da expressão proteica estão apresentados na Tabela 6 e Figura 21.

Tabela 6 – Análise da expressão proteica de componentes da imunidade inata dos animais.

	ADR_{2W} (N=10)	ADR_{2W}+MMF (N=10)	ADR_{4W} (N=10)	ADR_{4W}+MMF (N=10)	ADR_{20W} (N=10)	ADR_{20W}+MMF (N=10)
TLR4	4,4 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 0,4*	4,5 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,7*	10,0 $\pm$ 1,7	5,7 $\pm$ 1,1*
NF-κB	1,2 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,2*
NLRP3	1,0 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,2*
Casp-1	1,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*	1,6 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2
IL-1β	2,0 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2*	4,1 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,3*
HO1	2,1 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,3*	3,6 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,2*
SOD2	0,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2*	0,8 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2*	0,3 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2*

Valores da expressão proteica renal de componentes da imunidade inata: TLR4 (fold increase, xC), NF- κ B (fold increase, xC), NLRP3 (cells/mm²), Caspase-1 (fold increase, xC), IL-1 β (pg/mg) e HO1 (fold increase, xC) e SOD2 (fold increase, xC), dos grupos ADR e ADR+MMF ao longo de 2, 4 e 20 semanas. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP (*p<0.05 vs Respetivo ADR).

Figura 21. Medidas da expressão proteica TLR4 (A), NF-κB (B), NLRP3 (C), Caspase-1 (D), IL-1β (E) e HO-1 (F) e SOD2 (G) dos grupos ADR e ADR+MMF ao longo das 2, 4 e 20 semanas. Resultados apresentados como Média±EP (* p<0.05 vs Respetivo ADR).

O tratamento com MMF diminuiu a abundância renal de TLR4 (Figura 21A) e NF-κB (Figura 21B), sugerindo o MMF inibiu a via TLR4/NF-κB da imunidade inata. Além disso, o MMF diminuiu o conteúdo protéico de NLRP3

(Figura 21C), Caspase-1 (Figura 21D) e IL-1 β (Figura 21E), indicando que a via do inflamassoma NLRP3 também foi inibida pelo MMF. A redução do conteúdo renal de HO-1 e o aumento do SOD2 indicam que o MMF reduziu o estresse oxidativo nos ratos ADR. O tratamento com MMF reduziu a ativação da imunidade inata e suprimiu o estresse oxidativo.

Na Figura 22 estão os valores para macrófagos (ED-1), macrófagos M2 (Receptor de Manose) e IL-10.

Figura 22. Infiltração de macrófagos (Figura 19A), macrófagos M2 (Figura 19B), Receptor de Manose/ED-1 (Figura 19C) e IL-10 (Figura 19D) no tecido renal nos grupos ADR e ADR+MMF ao longo de 2, 4 e 20 semanas de estudo. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP (* p <0.05 vs Respetivo ADR).

Ao longo do estudo, a densidade da infiltração de macrófagos ED-1 não foi significativamente diferente em ADR+MMF comparado ao ADR (Figura 22A).

No entanto, a densidade de macrófagos do tipo M2 (receptor de manose) era maior nos animais que receberam MMF (Figura 22B), sugerindo uma predominância de macrófagos com atividade anti-inflamatória, constatada na Figura 22C, onde apresentamos a porcentagem de macrófagos com atividade anti-inflamatória/pró-inflamatória. Avaliamos os níveis de proteína anti-inflamatória de IL-10 (Figura 22D), que diminuiu em ADR e foi regulado positivamente em animais que receberam tratamento com MMF. Dados de literatura mostraram que o IL-10 é capaz de polarizar macrófagos para o fenótipo M2. O tratamento com MMF mostra o deslocamento de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório M2.

5. DISCUSSÃO

De acordo com o esperado (42), os ratos tratados com ADR desenvolveram albuminúria maciça, hipoalbuminemia, perda de peso, anemia e hiperlipidemia. Essas alterações foram acompanhadas por hipertrofia renal, hipertensão sistêmica, esclerose glomerular e fibrose/inflamação intersticial, bem como por perda da função renal 20 semanas após a administração de ADR, um tempo de observação excepcionalmente longo para este modelo.

Uma semana após a injeção de ADR, a concentração de NGAL na urina estava aumentada, numa fase em que a creatinina sérica ainda não estava elevada, indicando a ocorrência precoce de lesões tubulares. Em consistência com esses resultados, o NGAL foi descrito recentemente como um biomarcador que pode se tornar útil na detecção precoce da DRC (54). Outro indicativo de dano tubular nessa fase precoce da ADR é o aumento na concentração plasmática de potássio, que sugere uma limitação da capacidade de excretar esse íon pelos túbulos renais.

A proteinúria, uma das principais características do modelo ADR, indica a existência de lesão da barreira glomerular e prediz a progressão da doença renal humana. Vários estudos mostraram uma correlação positiva entre o grau de proteinúria e a progressão da doença renal, sugerindo que a presença de proteínas no lúmen tubular pode ser nociva às células tubulares (55,56,57,58,59). Essas descobertas não provam causalidade. No entanto, vários estudos *in vitro* (60,61,62) mostraram fortes evidências da toxicidade do excesso de proteína nas células tubulares.

O dano tubular não foi a única consequência da proteinúria induzida por ADR. A administração de ADR também foi associada à infiltração intersticial precoce por linfócitos e macrófagos, consistente com o conceito de que a exposição de células tubulares ao excesso de proteína leva a alterações fenotípicas que conduzem a inflamação e fibrose. Estudos anteriores mostraram que a exposição à albumina estimula células tubulares a sintetizar MCP1 e RANTES, recrutando leucócitos, com liberação adicional de citocinas e promovendo fibrose através da ativação da fosfolipase C, da MAP quinase e/ou do sistema NF κ B (63,64). Outros estudos mostraram que a exposição de PTC a

altas concentrações de albumina estimula o RAS e aumenta a expressão do TGF β em células tubulares proximais cultivadas (65). Em consonância com observações anteriores, no presente estudo a albuminúria correlacionou-se com a densidade da infiltração por macrófagos/miofibroblastos e com a intensidade da deposição de colágeno.

Em consistência com estudos anteriores (66), uma infiltração intensa de linfócitos foi observada na área intersticial renal 2 semanas após a administração de ADR, indicando ativação precoce da imunidade adaptativa nesses animais. Além disso, a ativação precoce de pelo menos duas das principais vias da imunidade inata foi observada no grupo ADR: a via TLR4/NF- κ B e a via do inflamassoma NLRP3/Caspase-1, associada ao aumento da produção de IL-1 β , um de seus produtos finais mais potentes. Além disso, a excreção urinária de albumina correlacionou-se positivamente com a abundância renal de IL-1 β . Juntos, esses achados sugerem que a exposição a um excesso de albumina pode ter desencadeado a ativação da imunidade inata em células tubulares.

A ativação da imunidade inata é um dos possíveis estímulos para a inflamação renal na doença renal e pode ser a ligação entre a exposição ao excesso de proteína e o desenvolvimento de um fenótipo pró-inflamatório. Estudos anteriores mostraram aumento da expressão de IL-1 β e caspase-1 no epitélio tubular de pacientes com DRC (67, 68). A ativação do sistema NF- κ B e o simultâneo desenvolvimento de inflamação intersticial dependente de MCP-1 foram relatados em dois modelos experimentais de proteinúria intensa, Nx e nefrite de Heymann (69). Assim, várias evidências, *in vivo* e *in vitro*, dão respaldo à hipótese de que a exposição de PTC a um excesso de albumina pode ativar a imunidade inata.

Em consistência com as observações anteriores e com os nossos dados *in vivo*, mostramos no presente estudo que a exposição de células tubulares murinas cultivadas a um excesso de albumina aumentou a produção de NLRP3, Caspase-1 e IL-1 β , indicando que a via do inflamassoma NLRP3 foi ativada. O aumento concomitante do conteúdo renal de TLR4 e IL-6 sugere que o sistema NF- κ B também foi ativado. O aumento acentuado e simultâneo da produção de MCP-1 indica que a ativação da imunidade inata nessas células foi associada ao desenvolvimento de um fenótipo pró-inflamatório. O aumento concomitante

da produção de α -SMA e de colágeno é consistente com a transformação do epitélio-mesenquimal, levando células tubulares a se comportar como miofibroblastos (70,71,72). Essa observação é consistente com o conceito de que a exposição a um excesso de proteína pode levar a PTC a atrair células inflamatórias para a área peritubular, bem como a promover diretamente o desenvolvimento de fibrose renal (66). A nossa observação de que o silenciamento dos genes TLR4 e NLRP3 atenua a produção de mediadores inflamatórios e colágeno em células tubulares estimuladas com BSA indica que a ativação de pelo menos algumas vias de imunidade inata pode ser a ligação entre um excesso de proteína intratubular e o desenvolvimento de um fenótipo proinflamatório pelas PTC. Os mecanismos pelos quais o excesso de albumina ativa a imunidade inata não são claros. Sabe-se que a exposição a concentrações altas de albumina, com a consequente necessidade de reabsorvê-la, promove intensa atividade endocítica e proteolítica nas células tubulares. Com isso, a imunidade inata pode ser ativada devido à eventual ruptura de lisossomos e a consequente inundação do citoplasma com produtos de hidrólise e fragmentos de membrana que podem atuar como Padrões Moleculares Associados ao Perigo (DAMPs) (73, 74). Uma contribuição adicional pode ter derivado do estresse oxidativo associado à intensa endocitose e digestão de proteínas (75). O estresse oxidativo pode exercer uma ação pró-inflamatória por vários mecanismos, incluindo a ativação do sistema NF κ B (75, 60, 61). Estudos anteriores mostraram que a albuminúria induz a produção de ROS, associada à ativação das vias NF- κ B e NLRP3 (76,77). No presente estudo, verificamos o aumento de HO-1 no grupo ADR, uma adaptação bem conhecida ao estresse oxidativo e a outros efeitos citotóxicos. Em consistência com esses resultados, o conteúdo renal de SOD2, outra molécula protetora que reduz a ação de espécies reativa de oxigênio (78), mostrou-se diminuído em animais que receberam ADR, sugerindo uma deficiência na remoção de ROS, que pode ter contribuído ao agravamento do estresse oxidativo.

Demonstramos recentemente que a imunidade inata e a adquirida são ativadas em paralelo no modelo Nx (33). Outros estudos forneceram uma possível explicação mecanística para essa ligação, mostrando que o NLRP3 é expresso em linfócitos CD4, ali atuando como um fator de transcrição (79). O

presente estudo fornece evidências claras de que a ativação da imunidade adaptativa está envolvida no desenvolvimento de lesão renal e inflamação associadas à administração de ADR. A infiltração de linfócitos renais foi observada precocemente após 2 semanas da administração de ADR e sua densidade correlacionou-se com a abundância de NLRP3 e de IL-1 β . No entanto, a evidência mais convincente da importância patogênica da ativação da imunidade adaptativa no modelo de administração de ADR é o efeito protetor do tratamento precoce com MMF, cujo efeito é especialmente evidente em fases avançadas. O MMF atenuou a progressão da fibrose intersticial e a esclerose glomerular foi numericamente reduzida nos estágios iniciais da nefropatia. Resultados semelhantes foram observados neste (47) e em outros laboratórios (49) utilizando outros modelos de DRC. Essa renoproteção está relacionada à capacidade do MMF de inibir significativamente a infiltração de linfócitos nos estágios iniciais da nefropatia por ADR, embora esse efeito tenha sido perdido na fase tardia. Apesar da intensa redução da infiltração de linfócitos renais nas primeiras semanas, a excreção de albumina não foi alterada pelo MMF, embora tenha sido observada uma redução discreta da albuminúria no longo prazo, sugerindo que o MMF exerceu pouco efeito sobre a barreira glomerular.

O tratamento com MMF diminuiu o conteúdo proteico de TLR4, NLRP3, Caspase-1 e IL-1 β , bem como a translocação nuclear do NF- κ B no tecido renal. Conseqüentemente, o conteúdo renal de colágeno e a infiltração por miofibroblastos também foram reduzidos. Esses achados mostram mais uma vez a íntima conexão entre a imunidade inata e a adaptativa. Estudos em células tubulares humanas cultivadas mostraram que o ácido micofenólico inibe a fosforilação do componente p65 do NF κ B (51). Neste estudo, o conteúdo renal de HO-1 diminuiu em ratos tratados com MMF, enquanto o de SOD2 aumentou, sugerindo que o estresse oxidativo renal foi reduzido nesses animais. Um efeito benéfico adicional do MMF foi a mudança de fenótipo de uma parte substancial dos macrófagos que infiltram o tecido renal, de um caráter inflamatório (M1) para um fenótipo antiinflamatório M2, explicando assim o fato de que a densidade da infiltração de macrófagos não diminuiu apesar da redução da fibrose renal e da preservação da função renal. EM consistência com esse achado, a IL-10, que exerce efeitos anti-inflamatórios (80), teve sua expressão aumentada em animais que receberam tratamento com MMF. A IL-10 polariza

os macrófagos para o fenótipo M2 quando a expressão de NLRP3, caspase-1 e IL-1 β é baixa (46).

Em resumo, a imunidade inata e a adaptativa são ativadas no modelo ADR, estimulando-se reciprocamente. Ambas estão envolvidas no efeito tóxico do excesso de albumina em células do túbulo proximal, que leva ao desenvolvimento de inflamação e fibrose. A inibição de qualquer uma dessas modalidades de resposta imune pode diminuir esses efeitos tóxicos e constituir a base para uma abordagem inovadora destinada a prevenir a progressão da DRC em doenças caracterizadas por proteinúria intensa.

6. CONCLUSÕES

- 1) A imunidade inata e a adquirida são ativadas simultaneamente e estão envolvidas no desenvolvimento da inflamação renal associada à administração de adriamicina a ratos.
- 2) A ativação da imunidade inata pode ser o elo entre a exposição de células do túbulo proximal a concentrações altas de albumina e o desenvolvimento de um fenótipo inflamatório por essas células.
- 3) A ativação da imunidade adaptativa é necessária ao desenvolvimento do processo inflamatório crônico no modelo de administração de adriamicina
- 4) A inibição de uma ou ambas as modalidades de imunidade pode constituir a base para uma abordagem inovadora na prevenção da DRC em doenças proteinúricas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nagy J. [The chronickidneydisease "epidemy"]. OrvHetil. 2013 Jan 13;154(2):43-51.
2. FujiharaCK, Malheiros DMAC, Zatz R et al. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. Kidney Int.54:1510-1519, 1998.
3. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol.21:1819-1834, 2010.
4. Zatz R, Fujihara CK. Mechanisms of progressive renal disease: role of angiotensin II, cyclooxygenase products and nitric oxide. J Hypertens.Suppl.20:S37-S44, 2002.
5. Jenkins J, Brodsky SV, Satoskar AA et al. The relevance of periglomerular fibrosis in the evaluation of routine needle core renal biopsies. Arch Pathol Lab Med.135:117-122, 2011.
6. Caramori ML, Parks A, Mauer M. Renal Lesions Predict Progression of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. J Am SocNephrol. May 16, 2013
7. Erkan E. Proteinuria and progression of glomerular diseases. Pediatr Nephrol. Nov 3, 2012.
8. Wu AY, Low LP. Managing vascular risk in hypertension with a focus on microalbuminuria: attitude and practices. Singapore Med J. Oct;50(10):976-81, 2009.
9. Zatz R. Bases fisiológicas da nefrologia. São Paulo: Editora Atheneu, 394p, 2011
10. Remuzzi G, Bertani T: Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? Kidney Int 38: 384–394, 1990.
11. Bertani T, Andreina P, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: Sequence of pathologic events. Lab Invest 46: 16–23, 1982.
12. Tang R, Yang C, Tao JL, You YK, An N, Li SM, Wu HL, Liu HF. Epithelial-mesenchymal transdifferentiation of renal tubular epithelial cells induced by urinary proteins requires the activation of PKC- α and β I isozymes. Cell Biol Int. Sep;35(9):953-9, 2011.
13. Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. PediatrNephrol. Aug;27(8):1233-47, 2012.

14. Thomas ME, Brunskill NJ, Harris KP et al. Proteinuria induces tubular cell turnover: a potential mechanism for tubular atrophy. *Kidney Int.* 55: 890–898, 1999.
15. Erkan E, De Leon M, Devarajan P. Albumin overload induces apoptosis in LLC-PK(1) cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280: F1107–F1114, 2001.
16. Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int.* Jun;79(12):1331-40.17, 2011.
17. Abbate M, Zoja C, Rottoli D et al. Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney Int.*61:2066-2077, 2002.
18. Drumm K, Bauer B, Freudinger R, Gekle M. Albumin induces NF-kappaB expression in human proximal tubule-derived cells (IHKE-1). *Cell Physiol Biochem.* 12(4):187-96, 2002.
19. Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J. Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension.* 37:1171–8, 2001.
20. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* Feb;16(1):3-9, 2004.
21. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996. 86: 973-983. *J Immunol.* Jun 1;188(11):5210-20, 2012.
22. Gribar SC, Richardson WM, Sodhi CP, Hackam DJ. No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med.* Sep-Oct;14(9-10):645-59, 2008.
23. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.*23:381-399, 2012.
24. Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, Câmara NO. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol.* May;73(5):428-35, 2011.
25. Martinon, F. Agostini, L. Meylan, E. Tschopp, J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol.*, v. 14, p. 1929-1934, 2004

26. Shi, Y. Evans, J. E.; Rock, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, v. 425, p. 516-521, 2000
27. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell.*, v. 10, p. 417-426, 2002
28. Wen, H.; Ting, J. P. O'Neill, L. A. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases—did Warburg miss inflammation? *Nat. Immunol.*, v. 13, p. 352-357, 2012
29. Bauernfeind, F. G.; Horvath, G.; Stutz, A.; ALNEMRI, E. S.; MACDONALD, K.; SPEERT, D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; MONKS, B. G.; FITZGERALD, K. A.; HORNUNG, V.; LATZ, E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.*, v. 183, p. 787-791, 2009
30. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 29:41–8, 2014.
31. Gong R1, Rifai A, Tolbert EM, Biswas P, Centracchio JN, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Nov;15(11):2868-81.
32. Fujihara CK1, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DM, Vieira JM Jr, Zatz R. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Jan;292(1):F92-9. Epub 2006 Aug 8.
33. Fanelli C, Arias SCA, Machado FG, *et al.* Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. *Sci Rep* 2017;7(1):3192.
34. Foresto-Neto. NLRP3 Inflammasome Inhibition Ameliorates Tubulointerstitial Injury in the Remnant Kidney Model. Laboratory investigation. 2018. No prelo.
35. Mezzano SA1, Barria M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, Egido J. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease *Kidney Int.* 2001 Oct;60(4):1366-77.

36. Wang C, Pan Y, Zhang QY, Wang FM, Kong LD. Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. *PloS one*. 2012;7(6):e38285.
37. Du P, Fan B, Han H, Zhen J, Shang J, Wang X, et al. NOD2 promotes renal injury by exacerbating inflammation and podocyte insulin resistance in diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2013;84(2):265-76
38. Gauer S, Sichler O, Obermuller N, Holzmann Y, Kiss E, Sobkowiak E, et al. IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. *Kidney Int*. 72:1081–7, 2007.
39. Lonnemann G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Interleukin-18, interleukin-18binding protein and impaired production of interferon-gamma in chronic renal failure. *Clin Nephrol*. 60:327–34, 2003.
40. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*. 1991 Sep 15;115(6):457-69.
41. Bucciarelli E, Binazzi R, Santori P, Vespasiani G. [Nephrotic syndrome in rats due to adriamycin chlorhydrate]. *Lav. Ist. Anat. Istol. Patol. Univ. Studi Perugia* 1976; 36 (2): 53–69.
42. Wang Y, Wang YP, TayYC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immune histochemical events. *Kidney Int*. 2000; 58 (4): 1797–804.
43. De Boer E, Navis G, Tiebosch AT, De Jong PE, De Zeeuw D. Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in adriamycin nephrotic rats. *J Am SocNephrol*. 1999 Nov;10(11):2359-66.
44. Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am SocNephrol*. 2009 Jan;20(1):114-22.
45. Gonçalves, G. M. et al. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand. J Immunol*. 73, 428–435 (2011).
46. Pelegri P1, Surprenant A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates. *EMBO J*. 2009 Jul 22;28(14):2114-27. doi: 10.1038/emboj.2009.163. Epub 2009 Jun 18.
47. Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int*. 2003 Jan;63(1):209-16. Erratum in: *Kidney Int*. 2003 Apr;63(4):1602.

48. Badid C1, Vincent M, McGregor B, Melin M, Hadj-Aissa A, Veyseyre C, Hartmann DJ, Desmouliere A, Laville M. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int.* 2000 Jul;58(1):51-61.
49. Briggs WA, Choi MJ, Schell PJ. Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 1998;31:213-7.
50. Olejarz W1, Bryk D, Zapolska-Downar D, Małeck M, Stachurska A, Sitkiewicz D. Mycophenolic acid attenuates the tumour necrosis factor- α -mediated proinflammatory response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF- κ B and ROS pathways. *Eur J Clin Invest.* 2014 Jan;44(1):54-64.
51. Andreucci M1, Faga T, Lucisano G, Uccello F, Pisani A, Memoli B, Sabbatini M, Fuiano G, Michael A. Mycophenolic acid inhibits the phosphorylation of NF-kappaB and JNKs and causes a decrease in IL-8 release in H2O2-treated human renal proximal tubular cells. *Chem Biol Interact.* 2010 May 14;185(3):253-62.
52. Li T, Yu J, Chen R, Wu J, Fei J, Bo Q, Xue L, Li D. Mycophenolate mofetil attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via regulation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Pharmazie.* 2014 Nov;69(11):850-5.
53. Jepsen FL, Mortensen PB. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1979 Aug 23;383(3):265-70. PubMed PMID: 158870.
54. Patel ML1, Sachan R2, Misra R3, Kamal R4, Shyam R5, Sachan P6. Prognostic significance of urinary NGAL in chronic kidney disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2015 Oct 15;8:139-44. doi: 10.2147/IJNRD.S87423. eCollection 2015.
55. Abbate M1, Zoja C, Remuzzi G.J How does proteinuria cause progressive renal damage? *Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):2974-84. Epub 2006 Oct 11.
56. Baines RJ, Brunskill NJ. Tubular toxicity of proteinuria. *Nat Rev Nephrol*2011;7:177–80.
57. Eddy AA. Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am J Pathol*1989;135:719–33.
58. Eddy AA, Giachelli CM. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int*1995;47:1546–57.

59. Thomas ME, Brunskill NJ, Harris KP, Bailey E, Pringle JH, Furness PN, et al. Protein-uria induces tubular cell turnover: a potential mechanism for tubular atrophy. *Kidney Int* 1999;55:890–8.
60. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, Remuzzi G. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int.* 1998 Jun;53(6):1608-15.
61. Morigi M, Macconi D, Zoja C, Donadelli R, Buelli S, Zanchi C, Ghilardi M, Remuzzi G. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol.* 2002 May;13(5):1179-89.
62. Wang Y, Rangan GK, Tay YC, Wang Y, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kappaB in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1204–13.
63. Takase O, Minto AW, Puri TS, Cunningham PN, Jacob A, Hayashi M, et al. Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. *Kidney Int* 2008;73:567–77.
64. Wang Y, Rangan GK, Tay YC, Wang Y, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kappaB in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1204–13.
65. Largo R, Gomez-Garre D, Soto K, Marron B, Blanco J, Gazapo RM, et al. Angiotensin-converting enzyme is upregulated in the proximal tubules of rats with intense proteinuria. *Hypertension* 1999 (Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Stahl RA. Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells. *Kidney Int* 2004.
66. Pereira Wde F, Brito-Melo GE, Carneiro CM, Melo Dde S, Costa KB, Guimarães FL, Rocha-Vieira E, Vieira ÉL, Simões e Silva AC. Increased Migratory and Activation Cell Markers of Peripheral Blood Lymphocytes in an Experimental Model of Nephrotic Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:209764. doi:10.1155/2015/209764. Epub 2015 May 7.
67. Fang L, Xie D, Wu X, Cao H, Su W, Yang J. Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells. *PLOS ONE* 2013;8:e72344.
68. Zhuang Y, Ding G, Zhao M, Bai M, Yang L, Ni J, Wang R, Jia Z, Huang S, Zhang A. NLRP3 inflammasome mediates albumin-induced renal tubular injury through impaired mitochondrial function. *J Biol Chem.* 2014 Sep 5;289(36):25101-11. doi: 10.1074/jbc.M114.578260. Epub 2014 Jul 24.

69. Donadelli R, Abbate M, Zanchi C, Corna D, Tomasoni S, Benigni A, et al. Protein traffic activates NF- κ B gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am J Kidney Dis* 2000.
70. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1367-74.
71. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan;15(1):1-12. Review.
72. Jiang YS, Jiang T, Huang B, Chen PS, Ouyang J. Epithelial-mesenchymal transition of renal tubules: divergent processes of repairing in acute or chronic injury? *Med Hypotheses*. 2013 Jul;81(1):73-5. doi: 10.1016/j.mehy.2013.03.020. Epub 2013 Apr 16.
73. Liu D1, Xu M1, Ding LH1, Lv LL1, Liu H1, Ma KL1, Zhang AH2, Crowley SD3, Liu BC4. Activation of the Nlrp3 inflammasome by mitochondrial reactive oxygen species: a novel mechanism of albumin-induced tubulointerstitial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Dec;57:7-19.
74. Liu D, Wen Y, Tang TT, Lv LL, Tang RN, Liu H, Ma KL, Crowley SD, Liu BC. Megalin/Cubulin-Lysosome-mediated Albumin Reabsorption Is Involved in the Tubular Cell Activation of NLRP3 Inflammasome and Tubulointerstitial Inflammation. *J Biol Chem*. 2015 Jul 17;290(29):18018-28. doi: 10.1074/jbc.M115.662064. Epub 2015 May 29.
75. Cao W, Zhou QG, Nie J, Wang GB, Liu Y, Zhou ZM, Hou FF. Albumin overload activates intrarenal renin-angiotensin system through protein kinase C and NADPH oxidase-dependent pathway. *J Hypertens*. 2011 Jul;29(7):1411-21.
76. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology* 2010;11(2):136-140.
77. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10(8):2247-2258.
78. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989;264(14):7761-7764.
79. Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, Dutow P, Woodruff TM, Yu ZX, O'Neill LA, Coll RC, Sher A, Leonard WJ, Köhl J, Monk P, Cooper MA, Arno M, Afzali B, Lachmann HJ, Cope AP, Mayer-Barber KD, Kemper C. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science*. 2016 Jun 17;352(6292).

80. Lu J1, Cao Q, Zheng D, Sun Y, Wang C, Yu X, Wang Y, Lee VW, Zheng G, Tan TK, Wang X, Alexander SI, Harris DC, Wang Y. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013 Oct;84(4):745-55. doi: 10.1038/ki.2013.135. Epub 2013 May 1.