Fernanda Florencia Fregnan Zambom

**A inibição das vias TLR4/NF- κ B e do NLRP3/IL-1 β previne a
DRC em um modelo de inibição crônica de NO associado à
sobrecarga de sal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre 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

Zambom, Fernanda Florencia Fregnan

A inibição das vias TLR4/NF- κ B e do NLRP3/IL-1 β previne a DRC em um modelo de inibição crônica de NO associado à sobrecarga de sal / Fernanda Florencia Fregnan Zambom. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa Nefrologia.

Orientador: Clarice Kazue Fujihara.

Descritores: 1. Óxido nítrico 2. Sobrecarga salina 3. Hipertensão 4. Insuficiência renal crônica 5. NF- κ B 6. Inflamassoma NLRP3

USP/FM/DBD-304/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Maria de Lourdes e Felicio Tadeo, pelo apoio
incondicional e todos os esforços que
fizeram por mim, especialmente em relação
à minha formação.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Clarice Kazue Fujihara, que esteve comigo desde o início desse trabalho, me ensinou e me fez crescer como pessoa e profissional. Sem ela nada disto teria acontecido. Sempre com entusiasmo e otimismo em relação ao meu trabalho e a mim, como sua aluna. Obrigada pela confiança. Meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof Dr Roberto Zatz, que me recebeu muito bem, sempre com ótimas piadas e otimismo em relação à vida e à busca pelo saber científico. Você é um exemplo, de simplicidade e grandiosidade.

Ao Prof Dr Niels Olsen Saraiva Câmara pela parceria e contribuição na construção desse trabalho, com sugestões brilhantes, que me despertou mais vontade de aprender e buscar crescer profissionalmente. Um exemplo de pessoa, professor e pesquisador.

À Dra Denise Malheiros pela enorme colaboração. Agradeço imensamente pela paciência em analisar as inúmeras lâminas e pelas preciosas discussões sobre os resultados.

Aos meus amigos do LIM, e companheiros de vida, Amanda, Carolina, José Manuel, Karin, Lisienny, Neto, Rafael, Sara, Simone, Victor e Viviane, que me ensinaram e ajudaram nos experimentos, compartilharam comigo momentos de tristeza e alegria. Obrigada por tudo!

À Ivone Oliveira e Wagner Domingues, que sempre me ajudaram no que precisei e me divertiam todos os dias, mesmo quando estes não eram fáceis.

À Claudia Sena pelo apoio técnico, ajuda e cuidado na realização de muitas dosagens bioquímicas desse estudo.

À Janice Pião pela cuidadosa manutenção do biotério e pela divertida companhia de tantas horas.

À Denise, Solange, Pedro e Eliana pela assistência em todas as questões burocráticas.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Tadeo, pela torcida e apoio incondicional, mesmo durante a minha ausência nos diversos finais de semana que passei trabalhando no laboratório. Nada seria possível sem o amor infinito de vocês.

À FAPESP pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse projeto de pesquisa (Nº do processo 2015/25368-6), vinculado ao projeto temático (Nº do processo 2012/10926-5)

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!

Augusto Cury

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Doença Renal Crônica.....	7
1.2. Imunidade inata e DRC	7
1.3 DRC e inibição crônica de NO	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MÉTODOS.....	14
3.1 Obtenção do modelo experimental.....	14
3.2 Protocolo experimental.....	14
3.3 Procedimentos Gerais	15
3.4 Análises bioquímicas	15
3.5 Análises histológicas.....	15
3.6 Estudo imuno-histoquímico do tecido renal	16
3.7 Análise do conteúdo protéico do tecido renal.....	21
3.8 Western Blot.....	22
3.9 Análise Estatística	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
α -actina	α -actina de músculo liso
ALB	Albuminúria
AngII	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
APAAP	Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina
AU	Ácido Úrico
BSA	Soro fetal bovino
Col-1	Colágeno-1 intersticial
DAMPs	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
DRC	Doença Renal Crônica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GS	Esclerose Glomerular
HA	Hipertensão Arterial
HS	Dieta Hipersódica
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
ISQ	Isquemia Glomerular
HO-1	Heme oxigenasse 1
K ⁺	Potássio sérico
L-NAME	L-Nitro-Arginina-Metil-éster
M ϕ	Macrófagos
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PC	Pressão caudal
PDTC	Ditiocarbamato de Pirrolidina
PE	Peso corpóreo
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>

SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SOD2	Manganês Superóxido Dismutase 2
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBS	Solução Salina de Tris-tamponada
TLRs	Tolllikereceptors
TLR4	Tolllike receptor 4
XO	Xantina Oxidase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros gerais após 4 semanas de acompanhamento	25
Tabela 2.	Resultados da análise bioquímica	28
Tabela 3.	Resultados da análise histomorfológica	29
Tabela 4.	Análise imuno-histoquímica do tecido renal	31
Tabela 5.	Expressão proteica dos componentes da Imunidade Inata	35
Tabela 6	Expressão protéica dos componentes anti-oxidantes	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Vias de sinalização do sistema NF- κ B e do inflamassoma NLRP3 em célula hipotética.	11
Figura 02.	Gráfico – Peso corpóreo	25
Figura 03.	Gráfico – Pressão Sistólica Caudal	26
Figura 04.	Gráfico – Albuminúria	27
Figura 05.	Gráfica – Clearance de Creatinina	28
Figura 06.	Microfotografias representativas das lesões glomerulares	29
Figura 07.	Gráfico – Isquemia e Esclerose Glomerular	30
Figura 08.	Microfotografias representativas do Infiltrado Intersticial de M ϕ	32
Figura 09.	Gráfico – Infiltrado Intersticial de M ϕ	32
Figura 10.	Microfotografias representativas da Expressão renal de AngII, α -actina e Col-1	33
Figura 11.	Gráfico – Expressão renal de AngII, α -actina e Col-1	34
Figura 12.	Expressão renal dos componentes do Sinal 1 (TLR4/NF- κ B/IL-6)	36
Figura 13.	Gráfica – Atividade da XO e AU renal	37
Figura 14.	Microfotografias representativas da expressão renal do Inflamassoma NLRP3	38
Figura 15.	Gráfica – Expressão renal do inflamassoma NLRP3	38
Figura 16.	Gráfica – Expressão renal de Caspase-1 e IL-1 β	39
Figura 17.	Gráfica – Expressão renal de HO-1 e SOD2	40

RESUMO

Zambom FFF. *A inibição das vias TLR4/NF- κ B e do NLRP3/IL-1 β previne a DRC em um modelo de inibição crônica de NO associado à sobrecarga de sal* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A inibição crônica do óxido nítrico com N ω -nitroargininemethylester (L-NAME), associado à sobrecarga de sal, leva a hipertensão grave, albuminúria, glomeruloesclerose, isquemia glomerular e fibrose intersticial, caracterizando um modelo de doença renal crônica (DRC). Achados anteriores deste laboratório e de outros sugerem que a ativação de pelo menos duas vias da imunidade inata, TLR4/NF- κ B e NLRP3/IL-1 β , ocorre em vários modelos experimentais de DRC e que a progressão da lesão renal pode ser atenuada com a inibição destas vias. No presente estudo, investigamos se a ativação da imunidade inata, através da via TLR4/NF- κ B ou NLRP3/IL-1 β , está envolvida na patogênese da lesão renal em outro modelo de DRC, o de inibição crônica do NO com sobrecarga de sal. Ratos Munich-Wistar machos adultos receberam sobrecarga de sal (2% Na⁺ na dieta e 0,5% Na⁺ na água do bebedouro) e L-NAME (32 mg/Kg/dia) dissolvido na salina do bebedouro (Grupo HS+N) ou tratados com alopurinol (Alo, 36 mg/Kg/dia, v.o), usado como inibidor de NLRP3 (grupo HS+N+Alo) ou tratados com ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC, 60 mg/Kg/dia, v.o), um inibidor de NF- κ B (Grupo HS+N+PDTC). Após 4 semanas, os ratos HS+N desenvolveram hipertensão arterial, albuminúria e lesão renal, juntamente com inflamação renal, estresse oxidativo e ativação de ambas as vias NLRP3/IL-1 β e TLR4/NF- κ B. Alo reduziu o ácido úrico renal e inibiu a via NLRP3/IL-1 β . Esses efeitos foram associados à atenuação da hipertensão arterial, albuminúria e inflamação/fibrose intersticial, mas não à lesão glomerular. O PDTC diminuiu o ácido úrico renal e inibiu as vias NLRP3 e NF- κ B, promovendo um efeito antiinflamatório e nefroprotetor mais eficiente que o Alo. As vias NLRP3/IL-1 β e TLR4/NF- κ B atuam paralelamente para promover lesão/inflamação renal e devem ser simultaneamente inibidas para obter nefroproteção maior nesse modelo de DRC.

Descritores: óxido nítrico; sobrecarga salina; hipertensão; insuficiência renal crônica; NF- κ B; inflamassoma NLRP3.

ABSTRACT

Zambom FFF. *Inhibition of both the TLR4/NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways prevents CKD in a model of chronic NO inhibition associated with salt overload* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Nitric oxide inhibition with N ω -nitroargininemethylester (L-NAME) along with salt overload leads to severe hypertension, albuminuria, glomerulosclerosis, glomerular ischemia and collapse, together with interstitial fibrosis, characterizing a model of chronic kidney disease (CKD). Previous findings of this laboratory and elsewhere suggest that activation of at least two pathways of innate immunity, TLR4/NF- κ B and NLRP3 inflammasome/IL-1 β , occurs in several experimental models of CKD, and that progression of renal injury can be slowed with inhibition of these pathways. In the present study, we investigated whether activation of innate immunity, through either the TLR4/NF- κ B or NLRP3/IL-1 β pathway, is involved in the pathogenesis of renal injury in yet another CKD model, chronic NO inhibition with salt overload. Adult male Munich-Wistar rats receiving L-NAME in drinking water and salt overload (Group HS+N) were treated with Allopurinol (ALLO), used as an NLRP3 inhibitor (Group HS+N+ALLO), or Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) a NF- κ B inhibitor (Group HS+N+PDTC). After 4 wks, HS+N rats developed hypertension, albuminuria and renal injury, along with renal inflammation, oxidative stress and activation of both the NLRP3/IL-1 β and TLR4/NF- κ B pathways. ALLO lowered renal uric acid and inhibited the NLRP3 pathway. These effects were associated with amelioration of hypertension, albuminuria and interstitial inflammation/fibrosis, but not glomerular injury. PDTC lowered renal uric acid and inhibited both the NLRP3 and NF- κ B pathways, promoting a more efficient anti-inflammatory and nephroprotective effect than ALLO. NLRP3/IL-1 β and TLR4/NF- κ B act in parallel to promote renal injury/inflammation and must be simultaneously inhibited for best nephroprotection.

Descriptors: nitric oxide; salt overload; hypertension; renal insufficiency, chronic; NF- κ B; NLRP3 inflammasome.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica

Sabe-se que a doença renal crônica (DRC) afeta cerca de 10 a 16% da população mundial e houve um aumento progressivo no número de pacientes em seu estágio terminal, os quais necessitam de terapia renal substitutiva, sendo ela a diálise crônica ou o transplante renal ^{1, 2}. No Censo Brasileiro de Diálise de 2017, realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), o número de pacientes inscritos em programas de terapias renais substitutivas naquele ano era maior que 125.000. Entre as patologias que podem conduzir à DRC, conhecidas como doenças de base, destaca-se a hipertensão arterial, o diabetes mellitus e glomerulonefrites. Segundo os dados da SBN, a Hipertensão Arterial (HA) é a principal causa de desenvolvimento de DRC no Brasil, tornando essencial a compreensão da patogênese dessas doenças para prevenir a evolução para a perda completa da função renal.

Apesar dos avanços tecnológicos, tanto no diagnóstico da DRC quanto no desenvolvimento de novos fármacos, os mecanismos envolvidos na progressão da lesão renal crônica não estão ainda totalmente esclarecidos, estando igualmente distante a perspectiva de poder detê-los. Os dados científicos obtidos nas últimas décadas indicam que a perda progressiva de função renal está relacionada a fatores hemodinâmicos (hipertensão sistêmica/glomerular e hipertrofia glomerular) e inflamatórios, tais como a infiltração do parênquima renal por macrófagos e linfócitos, produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento ³⁻⁷. Agindo integradamente, esses fatores levam ao desenvolvimento de esclerose glomerular e fibrose do interstício renal, que inevitavelmente progridem para perda de função renal. Por essa razão, é fundamental compreender os mecanismos que progridem para fibrose intersticial e buscar novas estratégias terapêuticas capazes de neutralizá-los.

1.2. Imunidade inata e DRC

O processo inflamatório tem papel fundamental na patogênese de diversas doenças renais. Na maioria dos organismos multicelulares, a resposta imune inata é

filogeneticamente conservada e ocorre através do reconhecimento de antígenos pelas células imunes como macrófagos, linfócitos, células dendríticas e neutrófilos. Os receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) são capazes de detectar toxinas e fragmentos de DNA (PAMP, *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 PAMPs e DAMPs promovem a ativação de diferentes vias de sinalização, induzindo o processo inflamatório renal ⁸⁻¹⁰.

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

A descoberta dos Toll-Like Receptors (TLRs) em meados de 1990 ¹¹ proporcionou uma avalanche de conhecimentos a respeito da imunidade inata em diversas patologias. Os TLRs constituem uma numerosa família de PRRs superficiais localizados em células inflamatórias e de revestimento, como células epiteliais e endoteliais ^{10, 12, 13}. Os TLRs são ligados a proteínas de membrana ou intracelulares, como o MyD88, e quando ocupados com PAMPs ou DAMPs promovem a ativação da via de sinalização NF- κ B. Inicialmente descrito em Linfócitos B, o complexo NF- κ B é formado por heterodímeros estáveis, sendo o mais estudado o formado pelas subunidades p50/p65 ligadas a subunidade inibidora I κ B α ^{14, 15}. Seja por estímulos fisiológicos ou patológicos, a ativação desse complexo necessita da fosforilação/degradação da subunidade I κ B α e a migração do heterodímero p50/p65 para o núcleo, onde a subunidade p65 do NF- κ B atua como fator de transcrição para produção de interleucinas, como o IL-6, pro-IL-1 β e pro-IL-18 ^{8, 14-17}. Uma das substâncias que sabidamente estimula a via do NF- κ B é a AngII, que é produzida pelas células inflamatórias e através da sua ligação ao receptor AT1 assume um papel de "citocina-like", atuando na perpetuação do processo inflamatório ¹⁸⁻²³.

O complexo NF- κ B é uma das principais vias de sinalização intracelular envolvida nas doenças inflamatórias crônicas ^{15, 17, 24, 25} e a sua ativação pode ser um indicador da progressão de doenças renais. O aumento da ativação de NF- κ B foi observado em pacientes com glomerulopatia de lesões mínimas ²⁶, nefropatia

membranosa ^{27, 28}, nefropatia da IgA ²⁹, síndrome nefrótica ³⁰ e nefropatia diabética ^{31, 32}. No modelo de redução da massa renal de 5/6 (Nx5/6), um dos mais utilizados nos estudos experimentais de DRC, o aumento na expressão de NF-κB foi observada na área intersticial, glomerular e vascular ³³. O composto ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) previne a degradação da proteína inibitória IκBα ²⁴ e é utilizado como bloqueador da ativação do NF-κB. Em nosso laboratório, Fujihara e colaboradores ³³ relataram que no modelo Nx5/6, os animais que foram tratados com PDTC apresentaram redução na expressão da subunidade p65 do NF-κB associada à normalização da pressão arterial sistêmica, redução da albuminúria, inflamação renal, lesões glomerulares e intersticiais. Mais recentemente, nós demonstramos que em um modelo de nefrite túbulo-intersticial por sobrecarga de adenina, a inibição do NF-κB também foi capaz de atenuar a inflamação e fibrose renal, além de reduzir a formação de granulomas no interstício renal ³⁴. Esses resultados sugerem a participação da via TLRs/NF-κB na inflamação e na progressão das lesões renais e o possível efeito protetor da inibição do NF-κB em diversos modelos experimentais de DRC.

Via de sinalização da via inflamassoma NLRP3 (Sinal 2)

Além dos TLRs, os receptores citosólicos, que foram descritos em anos recentes, também são capazes de reconhecer os DAMPs e estimular a síntese de moléculas inflamatórias, contribuindo para o processo inflamatório crônico ^{35, 36}. Esses receptores detectam 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, esses receptores ou alguns de seus constituintes são submetidos a um processo de oligomerização, formando complexos moleculares conhecidos como inflamassomas. Dentre os receptores intracelulares mais estudados atualmente, destacam-se os NLRs (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*), os quais oligomerizam-se para formar uma plataforma molecular (inflamassoma) controladora da produção de citocinas pro-inflamatórias. Esses receptores são capazes de reconhecer sinais endógenos de perigo como espécies reativas de oxigênio, ácido úrico em forma de cristais ou solúvel e baixas concentrações de potássio intracelular

³⁷⁻⁴³. Os NLRP3 são os NLRs mais estudados devido associação às doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como diabetes tipo II, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais ^{44, 45}. 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), que promovem a clivagem das interleucinas inativas pró-IL-1 β e pró-IL18 em suas formas ativas ^{8, 16, 39}. A ativação da via do inflamassoma NLRP3 é amplamente estudada em diversos modelos de DRC. Na nefropatia diabética, Wang e cols ⁴⁶ constataram aumento na expressão das proteínas que compõem inflamassomas NLRP, como NLRP3, ASC e Caspase-1 em tecido renal de ratos diabéticos. No modelo de obstrução ureteral unilateral (UUO), a ausência de NLRP3 (NLRP3^{-/-}) atenuou a inflamação do parênquima renal, injúria tubular e fibrose ⁴⁷. Recentemente, nós demonstramos que em ratos com Nx5/6 tratados com Alopurinol, a expressão do inflamassoma NLRP3 estava reduzida e foi associada à menor inflamação e fibrose renal ⁴⁸.

Dados recentes da literatura indicam que a hiperuricemia ativa o inflamassoma NLRP3 e que está associada à lesão renal ^{44, 47-49}. A hiperuricemia é observada em 20 a 35% dos pacientes com DRC, particularmente naqueles que também apresentam hipertensão e alterações metabólicas, como dislipidemia e resistência à insulina ⁵⁰. O ácido úrico (AU) é o produto final do metabolismo das purinas, sendo a xantina oxidase a principal catalisadora da síntese de AU ⁵¹. O Alopurinol (Alo) é uma pró-droga do oxipurinol, que é um inibidor da atividade da xantina oxidase. Há inúmeras evidências de que o Alo reduz a HA e glomerular, atenua a proteinúria e a inflamação renal, previne a hipertrofia glomerular e o espessamento das arteríolas e, além disso, atenua a perda de função e as lesões renais associadas à DRC ^{46, 48}. No entanto, há dúvidas sobre quais são os mecanismos envolvidos nessa proteção renal.

Os elementos envolvidos no sinal 1 e 2 não agem de maneira isolada ou independente, existindo vários pontos de contato entre as sequências de eventos deflagradas por cada um deles (Figura 1). Em seu conjunto, os TLRs e NLRs (Sinal 1 e 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 ^{10, 13, 39}.

Figura 1: Vias de sinalização do sistema NF-κB e do inflamassoma NLRP3 em célula hipotética.
 Sinal 1: Através da ativação de TLRs por DAMPs ou PAMPs, ou até mesmo do receptor AT1 pela AII, ocorre a ativação da proteína IKK, que por sua vez, promove fosforilação e degradação da enzima inibitória IκBα, liberando o dímero p50/p65. O dímero transloca-se para o núcleo onde irá atuar como fator de transcrição para diversos genes de moléculas inflamatórias, como IL-6, TNF-α e as porções inativas da IL-1β e IL-18. Sinal 2: além de DAMPs e PAMPs, cristais, DNA simples, ATP, toxinas, alta glicose e o efluxo de potássio podem levar a oligomerização do inflamassoma NLRP3, formado pelo inflamassoma NLRP3, a proteína adaptadora ASC e a pro-Caspase 1. Essa oligomerização promove a clivagem da pró-Caspase em Caspase 1, que é responsável pela maturação das formas inativas pro-IL-1β e pro-IL-18 em suas formas ativas funcionais, levando a ativação de Macrófagos e linfócitos.

1.3 DRC e inibição crônica de óxido nítrico (NO)

Em 1992, pesquisadores do nosso e de outro Laboratório descreveram um modelo de HA através da administração crônica de um inibidor do NO como Nw-L-nitroargininametilester, L-NAME ^{52, 53}. Posteriormente, descrevemos que a associação com dieta hipersódica (HS) agravava a hipertensão, provocava o aparecimento de uma proteinúria maciça, o desenvolvimento de inflamação renal, esclerose glomerular e fibrose intersticial, caracterizando um modelo de DRC ⁵⁴.

A infiltração de células imunes no parênquima renal é um achado universal em modelos experimentais de hipertensão e comumente encontrado em casos de hipertensão essencial em humanos ^{55, 56}. Em modelos de hipertensão sensível a sal há uma estreita relação entre a infiltração de células imunes no parênquima renal e a natriurese pressórica ⁵⁷. No modelo L-NAME associada à sobrecarga salina (HS+L-NAME), as lesões renais foram acompanhadas de intensa infiltração de macrófagos e proliferação de células renais ^{6, 7, 57}. Esses dados estão de acordo com o relato de que a ausência do NO provoca o aumento da migração e adesão de leucócitos, expressão de colágeno tipo I, citocinas e fatores de crescimento ⁵⁸. Além disso, nós demonstramos que o tratamento com Micofenolato de Mofetil (MMF), um imunossupressor que inibe a proliferação linfocitária, limita a infiltração intersticial de macrófagos e atenua a injúria renal em animais HS+L-NAME ⁶. Como em outros modelos de DRC, a Ang II participa do estabelecimento das lesões renais no modelo HS+L-NAME. Nesse modelo, o fenômeno inflamatório é revertido após o bloqueio de receptores AT1 da AngII, indicando que, além dos efeitos hemodinâmicos já estabelecidos, a AngII promove efeitos inflamatórios através da ativação do sistema NF- κ B, via ativação do receptor AT1 ou indiretamente através do receptor TLR4 ^{23, 59-61}. Esses achados fortalecem as evidências de que o infiltrado inflamatório tem um papel crucial no desenvolvimento da fibrose e lesões renais neste modelo de DRC.

Apesar do amplo conhecimento sobre o envolvimento dos fenômenos inflamatórios na inibição crônica do NO, ainda são escassos os estudos que abordem a ativação da imunidade inata no modelo HS+L-NAME. Sollinger e colaboradores ⁶² mostraram que os camundongos TLR4^{-/-} não desenvolveram hipertensão e lesões vasculares, refletindo o importante papel da imunidade inata no modelo L-NAME. Quiroz e cols ⁶³ constataram que após administração de L-NAME, a ativação do sistema NF- κ B correlacionou-se positivamente à infiltração de linfócitos e macrófagos. Esses dados sugerem que no modelo de inibição crônica de NO, pelo menos parte das vias de sinalização da imunidade inata está envolvida no desenvolvimento da HA e das lesões renais. No entanto, não há dados na literatura sobre o papel do sistema NF- κ B e do inflamassoma NLRP3 no modelo de inibição do NO associado à sobrecarga salina, e se a inibição dessas vias é capaz de retardar a progressão da DRC.

2. OBJETIVOS

I. Geral

- a) Investigar o papel da imunidade inata na patogênese da hipertensão e das lesões renais no modelo de doença renal crônica induzida pela inibição crônica do NO associada a uma sobrecarga salina.

II. Específicos

- b) Verificar a ativação do eixo TLR4-NF- κ B (sinal1) e dos eventos que se seguem (*downstream*);
- c) Verificar a ativação da via de sinalização que envolve o inflamassoma NLRP3 (sinal 2);
- d) Verificar um possível efeito renoprotetor da inibição dessas vias.

3. MÉTODOS

3.1 Obtenção do modelo experimental

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Munich-Wistar, obtidos de uma colônia estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos em temperatura ambiente de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos experimentais que foram utilizados seguiram as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão De Ética No Uso De Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq, protocolo nº. 191/15).

O modelo experimental de DRC adotado neste estudo consiste na administração de um inibidor da síntese de NO, o N ω -L- nitroargininametilester (L-NAME, Sigma-Aldrich, USA), na dose de 8 mg/rato/dia (aproximadamente 32 mg/kg/dia) associada à dieta hipersódica, 2% de Na⁺ na dieta e 0,5% de Na⁺ na água do bebedouro. A dieta rica em sal foi preparada com ração farelada (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil), acrescida de caseína (Labsynth, Brasil) na concentração de 15%, com a composição final de 22% de proteína. Utilizamos ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC, Sigma-Aldrich, USA) na dose de 15 mg/rato/dia (aproximadamente 60 mg/kg/dia) e Alopurinol (Alo, Medley, Brasil) na dose de 36 mg/rato/dia (aproximadamente 150 mg/kg/dia), ambos os medicamentos foram diluídos na água de bebedouro acrescida de 0,5% de Na⁺.

3.2 Protocolo experimental

- **HS**, ratos recebendo dieta rica em sódio, 2% em Na⁺ na dieta e 0,5% de Na⁺ na água do bebedouro durante o período de 30 dias.
- **HS+N**, ratos recebendo HS acrescida de L-NAME na água do bebedouro durante o período de 30 dias.
- **HS+N+Alo**, ratos recebendo HS+N acrescido de Alopurinol diluído em solução salina durante o período de 30 dias.
- **HS+N+PDTC**, ratos recebendo HS+N acrescido de ditiocarbamato de pirrolidina diluído em solução salina durante o período de 30 dias.

3.3 Procedimentos Gerais

Após 30 dias de tratamento, 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 no período de 24 e determinação da concentração de ALB e creatinina urinária. Após essas avaliações, os ratos foram anestesiados com 50 mg/kg Ketamina (Cristália, EUA) e 10 mg/kg Rompun (Bayer, Alemanha) intramuscular, e submetidos ao procedimento de coleta de sangue e tecido renal. O sangue foi coletado da aorta abdominal para a determinação de eletrólitos (Na^+ e K^+) e concentrações de creatinina. Após a perfusão dos dois rins com salina gelada, a uma pressão igual à sistêmica, o rim direito foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido no freezer -80°C para análise da expressão de proteínas (Western-Blot e ELISA). A seguir, o rim esquerdo foi perfundido com a solução Du Boscq-Brasil, para a fixação “in situ” e preparado para análise histológica e imuno-histoquímica.

3.4 Análises bioquímicas

Albuminúria de 24 horas- A presença de albumina na urina foi avaliada por imunodifusão radial, empregando um anticorpo específico (anti-albumina de rato, MPBiomedicals LLC, EUA) ⁶⁴.

Creatinina - A concentração sérica e urinária de creatinina foi avaliada através da análise colorimétrica, utilizando kit comercial disponível (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Esses dados foram utilizados para o clearance de creatinina.

Sódio e potássio- A determinação da concentração do sódio e do potássio plasmático foi realizada através do analisador de eletrólitos 9140 (AVL Medical Instruments, Suíça).

3.5 Análises histológicas

Após a fixação “in situ” com uma solução de Du Boscq-Brasil, os tecidos renais perfundidos foram pesados, fatiados em 2-3 segmentos coronais e 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 montados sobre lâminas secas. Os cortes de tecido renal foram submetidos a um processo de desparafinização, sendo inicialmente mantidas por 24 horas em estufa a 60°C. Em seguida, foram submetidas a 3 banhos seguidos de xilol. Após a desparafinização seguiu-se a reidratação dos tecidos, com banhos sucessivos em misturas etanol/água com proporções decrescentes de etanol e, finalmente, água destilada. Após esse processo, iniciaram-se as colorações propriamente ditas.

Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A reação de PAS foi utilizada na avaliação das lesões glomerulares. Os cortes foram submetidos à oxidação por solução de ácido periódico 0,5% por 15 minutos e lavadas em água destilada. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução de reativo de Schiff (solução aquosa de fucsina básica a 0,5% acrescido de 15 ml de ácido clorídrico 1N e 9 g de metabissulfito de sódio a cada 100mL da solução) durante 20 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina de Carazzi (solução aquosa 20% de glicerina, 0,1% de hematoxilina, 5% de sulfato de alumen e potássio e 0,02% de iodato de potássio) durante 5 minutos. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com permount. A quantificação de lesões glomerulares (% esclerose e % isquemia glomerular) foi avaliada examinando-se sucessivamente cerca de 200 glomérulos em aumento final de 400x⁵⁴.

3.6 Estudo imuno-histoquímico do tecido renal

A técnica de imuno-histoquímica foi empregada na detecção de mediadores inflamatórios e fibrose. Os tecidos parafinizados foram cortados em espessura de 4 µm e colocados em lâminas previamente silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Para o processo de silanização, as lâminas foram colocadas em um banho de álcool 96º durante 1 minuto, seguido de banhos sucessivos de acetona PA durante 1 minuto e silano 6% durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em 2 banhos de acetona e 2 banhos de água destilada, sendo posteriormente secadas em estufa a 60°C durante 24 horas.

Os tecidos renais montados em lâminas silanizadas foram mantidos em estufa a 60°C durante 30 minutos. Após esse procedimento, os tecidos foram submetidos à desparafinização em 3 banhos de xilol e re-hidratados 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.

Infiltração de Macrófagos ED-1+ (M ϕ)

A identificação de células positivas para M ϕ 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 contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glicergel) 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 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (céls/mm²).

Infiltração de Macrófagos com fenótipo M2 (M2)

A identificação de macrófagos com fenótipo M2 foi realizada utilizando o método da Fosfatase Alcalina. Após desparafinização convencional e recuperação antigênica, foi feito o bloqueio de marcações inespecíficas com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de Leite desnatado 5% em TBS por 50 minutos. Retirou-se o excesso de soro e os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-Receptor de Manose (#Ab64693) na diluição 1:10.000 em BSA 1%, durante 18 horas em câmara úmida. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Link Rabbit/Mouse (Dako, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com TBS e incubados com 80µl da solução Enzima AP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com substrato cromogênico Permanet Red (Dako, Carpinteria, CA, EUA), preparado na proporção de 1:100 em substrato. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel). A quantificação de macrófagos com fenótipo M2 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 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/s/mm²). Em seguida foi feita a razão entre o número de macrófagos com fenótipo M2 e o número de macrófagos ED-1+.

Infiltração de células intersticiais NLRP3+

A identificação de células positivas para o inflamassoma NLRP3 foi realizada utilizando o método da peroxidase endógena. Após desparafinização convencional e recuperação antigênica, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio acrescida de metanol por 30 minutos. Após serem lavadas com tampão TBS, os cortes foram incubados com solução Dako Protein Block (Dako, Carpinteria, CA, EUA), para bloqueio de marcação inespecífica por 30 minutos. Retirou-se o excesso de soro e os cortes foram incubados com o anticorpo primário

anti-NLRP3 (#HPA01278) na diluição 1:400 em BSA 1%, durante 18 horas em câmara úmida. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel). A quantificação de células positivas para o inflamassoma NLRP3 foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (céls/mm²).

Identificação de Colágeno 1 (Col-1)

A identificação de Col-1 foi realizada utilizando o método da Peroxidase Endógena. Após a desparafinização e recuperação antigênica procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio acrescida de metanol por 30 minutos. Após serem lavadas com tampão TBS, os cortes foram incubados com soro não imune de cavalo na diluição de 1:50 em solução de BSA 1% 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-colágeno tipo 1 (Abcam®, Cambridge, UK) diluído na proporção de 1:200 em solução de BSA a 1% em TBS, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) durante 2 minutos. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glicergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A fração do córtex renal ocupada por Col-1 foi quantificada por um método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos⁶⁵.

Identificação de células positivas para AngII e α -actina

Para avaliar a expressão de AngII e α -actina 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, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de Leite desnatado 5% e 2% em TBS, respectivamente por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com os respectivos anticorpos primários; anti-AII (Península Laboratories #T4007) e anti- α -actina (Sigma-Aldrich), diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:400 e 1:800. No dia seguinte, os cortes foram incubados com seus respectivos anticorpos secundários, anti-coelho biotinilado (Vector BA-1000) e anti-camundongo biotinilado (Vector BA-2001), diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:1000 e 1:200, durante 45 minutos. Depois disso, os cortes para AII foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Vector Lab, Burlingame, EUA) e os cortes para α -actina com Dako Estreptavidina Fosfatase Alcalina (Dako Carpinteria, CA, EUA) e por fim, revelados com substrato cromogênico Fast Red, preparado conforme descrito anteriormente, com tempo variável. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris 100% (Labsynthy, Brasil) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel) e foram em seguida devidamente etiquetados.

A quantificação tanto da infiltração das células intersticiais positivas para AII foi realizada através da contagem de células marcadas no córtex renal, ao microscópio com aumento de 400x. Foram analisados 50 campos para cada lâmina, correspondente à área de 3,2 mm². Os resultados foram apresentados como células positivas por milímetro quadrado (céls/mm²).

A α -actina 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. A quantificação da porcentagem de área intersticial renal ocupada pela α -actina foi realizada pelo método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, observados sob um aumento de 400x, com auxílio de uma ocular graticulada de 144

pontos⁶⁵. Para essa avaliação, as artérias e arteríolas marcadas positivamente foram desconsideradas, uma vez que a positividade nessas estruturas é considerada constitutiva.

3.7 Análise do conteúdo protéico do tecido renal

Extração e quantificação de proteínas teciduais– Amostras de rim pesando entre 100 e 200 mg foram colocados em tubos de polipropileno reforçado, contendo microesferas de cerâmica (OMNI 19-628), juntamente com tampão RIPA e inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche®), para serem homogeneizados no aparelho OMNI BEAD RUPTOR 24. O teor proteico foi determinado utilizando um kit comercial (Pierce BCA ProteinAssay Kit, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Atividade da Xantina Oxidase renal – A atividade da enzima Xantina Oxidase no tecido renal foi obtida por análise colorimétrica, utilizando kit comercial (MAK078; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados estão expressos em miliunidades/g de proteína, onde uma miliunidade (mU) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação da xantina, gerando 1mM de ácido úrico e peróxido de hidrogênio por minuto, a 25 °C.

Conteúdo de Ácido Úrico renal – Para a dosagem de AU do tecido renal foram usadas amostras obtidas através da extração com microesferas de cerâmica juntamente com tampão RIPA e inibidores de proteases e fosfatases. A dosagem colorimétrica foi feita com kit comercial Labtest, seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de AU renal foi calculada através do resultado obtido no espectrofotômetro em relação à quantidade de proteína de cada amostra, obtida pela quantificação de proteína (Pierce BCA ProteinAssay Kit, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA).

Conteúdo renal de Interleucina 1 β – Para a detecção da quantidade de IL-1 β no tecido renal foi utilizado o método Elisa Sanduíche, utilizando kit comercial (R&D Systems, Minnessota, EUA). O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas

seguiram as recomendações do fabricante. Para cada amostra, foram utilizados 100 µl de proteína do extrato tecidual.

3.8 Western Blot

Conteúdo proteico de TLR4, Caspase-1 e IL-6 - Para cada amostra, 100 µg de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIORAD), foram utilizados para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em concentração previamente padronizado pelo laboratório, que se completou em 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, os géis foram transferidos (transferência úmida e semi-úmida, respectivamente) para membranas de nitrocelulose, durante 2 horas a 400mA para transferência úmida e 45 minutos a 20V para transferência semi-úmida. Após a transferência, as membranas foram coradas com Solução de Ponceau (Sigma Aldrich, USA) para conferir a transferência. Posteriormente lavada três vezes com solução de TBSt (TBS [NaCl Glicina Tris-Base ,10x], Água destilada, Tween 20, pH 7.4), e bloqueada por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de BSA 5% em TBSt para TLR4 e Leite 5% em TBSt para Caspase-1 e IL-6. Após o bloqueio, foi realizada a incubação das membranas com os respectivos anticorpos primários, diluído em BSA a 1% em TBSt, na seguinte proporção: anti-TLR4 (Santa Cruz) 1:250, anti-Caspase-1 (Santa Cruz) 1:1000 e anti-IL-6 1:1000 (Sigma Aldrich, USA). A incubação teve duração aproximada de 18 horas (over night) e foi realizada a temperatura de 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com solução de TBSt por 5 minutos e incubada com os respectivos anticorpos secundários (Anti-coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich; Anti-Camundongo HRP: 1:15000, Sigma-Aldrich), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 5 minutos com TBSt.

Translocação Nuclear da fração p65 do NF-κB (Western Blot) - Para a separação da porção nuclear da citoplasmática, foram utilizados 100 mg de tecido renal. Após a adição de 1000 µL da solução Tampão A (HEPES [10X], KCl [10X], MgCl₂ [10X], Sacarose [5X], glicerol PA, NP-40 PA e inibidores de protease e fosfatase (Roche, Suíça), a amostra foi homogeneizada em gelo com o Dounce Homogenizer (Sigma Aldrich, USA). O conteúdo foi transferido para um tubo pré-refrigerado, e centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 1000G. Posteriormente, o sobrenadante foi

transferido para um tubo pré-refrigerado (fração citoplasmática). O pellet foi suspenso em 1000 µL do tampão A e centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 1000G. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi novamente suspenso em 200 µL no tampão B (Sacarose, SDS, Tris-HCl [10X], Bromo-phenol-blue e beta mercaptoetanol PA). A solução foi centrifugada por 10 minutos, a 4 °C e 1500G. O sobrenadante foi transferido para um tubo pré-refrigerado (fração nuclear) e o material foi submetido a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), que se completou em 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, o gel foi transferido (transferência semi-úmida) a uma membrana de nitrocelulose, durante 45 minutos a 20V. Após a transferência, a membrana foi corada com Solução de Ponceau para conferir a transferência. Posteriormente lavada três vezes com solução de TBSt (TBS [10x] água destilada Tween 20, pH 7.4), e bloqueada por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de Leite3% + BSA3% em TBSt. Após o bloqueio, foi realizada a incubação da membrana com o anticorpo primário anti-p65 fosforilado (Cell Signaling, Massachussets, EUA) diluído em BSA a 1% em TBS na proporção 1:100. A incubação teve duração aproximada de 18 horas e foi realizada a temperatura de 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com solução de TBSt por 5 minutos e incubada com o anticorpo secundário (Anti-coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 5 minutos com TBSt.

Conteúdo proteico de HO-1 e SOD2: Para cada amostra, 100µg (para HO-1) e 25 µg (para MnSOD) de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (LaemmliSample Buffer – BIORAD), foram utilizados para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em concentração previamente padronizado pelo laboratório, que se completou em 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, os géis foram transferidos (transferência semi-úmida) para membranas de nitrocelulose, durante 45 minutos a 20V. Após a transferência, as membransa foram coradas com Solução de Ponceau para conferir a transferência. Posteriormente lavada três vezes com solução de TBSt (TBS [NaCl Glicina Tris-Base ,10x], água destilada, Tween 20, pH 7.4), e bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de Leite 5% em TBSt. Após o bloqueio, foi realizada a incubação das membranas com os respectivos anticorpos primários, diluídos em TBSt, na seguinte proporção: anti-HO-1 (Abcam) 1:500 e anti-SOD2 (Cayman) 1:10.000. A incubação

teve duração aproximada de 18 horas e foi realizada a temperatura de 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBSt por 5 minutos e incubada com os respectivos anticorpos secundários (Anti-Camundongo HRP: 1:15000, Sigma-Aldrich e Anti-coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich, respectivamente), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 5 minutos com TBSt.

Identificação e quantificação das bandas - A revelação das membranas foi feita por quimioluminescência, utilizando kit comercial (Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA), e as imagens foram registradas com aparelho fotodocumentador (UVITEC Cambridge®). A identificação, análise e quantificação das bandas foram realizadas através do software Uvisoft-UvibandMax (UVITEC Cambridge®, UK). A proteína constitutiva β -actina (anti- β -actina, Sigma-Aldrich, 1:5000 em BSA 1%) foi utilizada para a normalização dos resultados das proteínas alvo TLR4, Caspase-1, IL-6, HO-1 e SOD2. Para a normalização dos resultados da proteína alvo p65 fosforilada, foi utilizada a proteína constitutiva nuclear histona H2B (anti-histona H2B, Abcam®, 1:1000 em BSA 1%). As membranas foram previamente incubadas com BSA 5% para bloquear marcações inespecíficas e em seguida, retirou-se o excesso e adicionou-se os respectivos anticorpos primários, as quais permaneceram durante 18 horas à 4°C. Em seguida, foram lavadas com TBSt e incubadas com os respectivos anticorpos secundários e posteriormente reveladas.

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator seguido do método *post-test* de Newman-Keuls ⁶⁶, sendo considerados significativos os valores de “p” inferiores a 0,05. Os cálculos foram efetuados através do software GraphPadPrism® versão 4.0 e os resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão.

4. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos após 4 semanas de acompanhamento dos animais dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Os valores de peso corpóreo, pressão caudal (PC) e albuminúria (ALB) dos grupos estão representados na Tabela 1 e Figuras 2-4.

Tabela 1. Parâmetros gerais após 4 semanas de acompanhamento

	HS (n=12)	HS+N (n=11)	HS+N+Alo (n=12)	HS+N+PDTC (n=13)
Peso Corpóreo (g)	316±7	281±6 ^a	273±9 ^a	299±6 ^c
PC (mmHg)	149±2	209±4 ^a	190±4 ^{ab}	174±4 ^{abc}
ALB (mg/24h)	9±3	147±12 ^a	80±17 ^{ab}	37±8 ^{ab}

Valores de peso corpóreo, PC e ALB dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Figura 2. Peso corpóreo (gramas) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Os animais dos grupos HS+N e HS+N+Alo apresentaram menor ganho de peso em relação aos animais HS ($p<0,05$). Apenas o tratamento com PDTC foi capaz de evitar a perda de peso provocada pelo HS+L-NAME, cujos valores foram semelhantes aos observados no grupo HS ($p>0,05$).

Figura 3. Pressão caudal (mmHg) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^a $p<0,05$ vs HS; ^b $p<0,05$ vs HS+N; ^c $p<0,05$ vs HS+N+Alo).

Corroborando dados dos trabalhos anteriores do nosso laboratório, o bloqueio da síntese de NO associado à sobrecarga salina promoveu hipertensão sistêmica ($p<0,05$ vs HS). O tratamento com Alo atenuou a hipertensão ($p<0,05$ vs HS+N), apesar de permanecer elevada em relação aos animais HS ($p<0,05$). A redução na pressão caudal foi ainda mais acentuada nos animais que receberam PDTC ($p<0,05$ vs HS e HS+N+Alo), sugerindo o envolvimento maior do sistema NF- κ B nos mecanismos de HA neste modelo.

Figura 4. ALB (mg/24h) dos Grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Como foi descrito previamente, os animais do grupo HS+N apresentaram albuminúria maciça ($p<0,05$ vs HS) que é decorrente da alteração na barreira glomerular. Os tratamentos com Alo e PDTC atenuaram a excreção urinária de albumina ($p<0,05$ vs. HS+N), mas ainda elevada em relação aos animais HS ($P<0,05$). Esses resultados sugerem que as duas vias da imunidade inata participam da permeabilidade da barreira glomerular nesse modelo.

Após 4 semanas de tratamento os animais foram anestesiados para a coleta de materiais para a análise bioquímica e morfológica. Os dados a seguir (Tabela 2 e Figura 5) correspondem a análise do clearance de creatinina (Cl Creat), concentração plasmática de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺).

Tabela 2. Resultados da análise bioquímica dos grupos estudados

	HS (n=12)	HS+N (n=11)	HS+N+Alo (n=12)	HS+N+PDTC (n=13)
Cl_{Creat} (mL/min)	1,4±0,2	0,6±0,1 ^a	0,8±0,1 ^a	1,0±0,1 ^a
Na⁺(mEq/L)	141±1	141±1	142±1	140±1
K⁺(mEq/L)	4,3±0,3	4,2±0,2	4,0±0,2	4,0±0,2

Valores de Clearance de Creatinina (Cl Creat) e concentração plasmática de Sódio e Potássio (Na⁺ e K⁺) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Após 4 semanas de acompanhamento, as concentrações plasmáticas de Na⁺ e K⁺ não apresentaram alterações significativas entre os grupos avaliados (p>0,05), indicando ausência de alterações tubulares graves que poderiam dificultar a excreção de potássio e aumentar a sua concentração plasmática.

Figura 5. Clearance de Creatinina (Cl Creat) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Ao final do período, o CI Creat estava reduzido nos animais do Grupo HS+N ($p<0,05$ vs HS), corroborando dados anteriores do nosso laboratório que mostraram perda da função renal no modelo HS+L-NAME. Nos animais que receberam tratamento com Alo, o CI Creat permaneceu próximo dos valores do Grupo HS+N ($p>0,05$). O tratamento com PDTC foi capaz de atenuar a queda no CI Creat, mantendo a função renal mais próxima dos animais HS ($p>0,05$).

Análise Histológica do Tecido Renal

Na Tabela 3 e Figuras 6 e 7 estão representados os resultados das análises histológicas realizadas ao final do estudo.

Tabela 3. Resultados da análise histológica dos grupos estudados

	HS (n=12)	HS+N (n=11)	HS+N+Alo (n=12)	HS+N+PDTC (n=13)
% ISQ	0,6±0,5	10±2 ^a	7±2 ^a	2,7±1 ^b
% GS	0,2±0,1	4,6±1 ^a	3,6±1 ^a	0,8±0,3 ^{bc}

Valores da porcentagem de glomérulos isquêmicos (%ISQ) e glomérulo com esclerose (%GS) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^a $p<0,05$ vs HS; ^b $p<0,05$ vs HS+N; ^c $p<0,05$ vs HS+N+Alo).

Isquemia Glomerular e Esclerose Glomerular

Na Figura 6 apresentamos as microfotografias das lesões glomerulares (ISQ e GS) e as suas quantificações na Figura 7.

Figura 6. Microfotografia representativa de glomérulo normal (A) do grupo HS, glomérulo isquêmico (B) e glomérulo com esclerose (C) do grupo HS+N. Coloração PAS, aumento (400X).

Figura 7. Porcentagem de glomérulos isquêmicos (ISQ) e escleróticos (GS) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Como descrito previamente em nosso laboratório, a lesão glomerular mais frequente nesse modelo é o tipo isquêmico ($p<0,05$ vs HS), possivelmente decorrente da predominância de agentes vasoconstritores. Embora a % de lesões do tipo esclerose fosse menor que o isquêmico, ainda foi significativamente maior que o grupo HS ($P<0,05$). O tratamento com Alo reduziu apenas numericamente as lesões glomerulares ($p>0,05$ vs HS+N). Ao contrário, o tratamento com PDTC preveniu o desenvolvimento dos dois tipos de lesões glomerulares ($p>0,05$ vs. HS, $p<0,05$ vs HS+N e HS+N+Alo), sugerindo um papel fundamental da via do NF- κ B na progressão das lesões glomerulares nesse modelo experimental.

Análise imuno-histoquímica do Tecido Renal

Na Tabela 4 e Figuras 8-11 estão apresentados os resultados dos estudos imuno-histoquímicos dos grupos avaliados após 4 semanas de tratamento.

Tabela 4. Análise imuno-histoquímica do tecido renal

	HS (n=12)	HS+N (n=11)	HS+N+Alo (n=12)	HS+N+PDTC (n=13)
Mφ ED-1_{INT} (céls/mm²)	23±2	131±7 ^a	89±8 ^{ab}	48±5 ^{abc}
Mφ CD206_{INT} (céls/mm²)	12±2	49±6 ^a	36±4 ^{ab}	28±2 ^{ab}
Mφ CD206/ED-1 (%)	50±1	38±1	44±1	60±1 ^b
AngII_{INT} (céls/mm²)	2±1	13±1 ^a	5±1 ^{ab}	3±1 ^{bc}
α-actina Cortical (%)	0,8±0,1	10±1 ^a	5±0,8 ^{ab}	2,0±0,5 ^{bc}
Col-1 Cortical (%)	1,0±0,1	2,8±0,1 ^a	2,2±0,1 ^{ab}	1,6±0,1 ^{abc}

Medidas de infiltração túbulo-intersticial de macrófagos (ED-1 e CD206), porcentagem de macrófagos CD206, células AngII+, infiltração de miofibroblastos (α-actina) e deposição cortical de Col-1 dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Infiltrado Intersticial de Macrófagos

Figura 8. Microfotografia representativas da infiltração de macrófagos dos grupos de estudo. Aumento de 400X.

Figura 9. Infiltrado de macrófagos (Mφ ED-1 e CD206) e porcentagem de macrófagos CD206 dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo; HS+N+PDTC após 4 semanas de tratamento. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Como descrevemos previamente, os animais HS+N apresentaram maior infiltrado macrofágico no interstício renal, indicando acentuado processo inflamatório. O tratamento com Alo foi capaz de reduzir a inflamação em relação aos animais HS+N (p<0,05). Entretanto, o tratamento com PDTC foi ainda mais eficiente em reduzir a infiltração intersticial de macrófagos (p<0,05 vs HS+N e HS+N+Alo).

Após 4 semanas, o número de células positivas para CD206, que corresponde aos macrófagos polarizados para o fenótipo M2 (anti-inflamatório), estava aumentado nos animais do grupo HS+N (Figura 9B), mas representa apenas 38% da população total de macrófagos (Figura 9C). Esse resultado indica que há uma predominância dos macrófagos pró-inflamatório no interstício dos animais HS+N. Embora o tratamento com Alo tenha reduzido o número de células positivas para CD206 ($p < 0,05$ vs. HS+N), o total de macrófagos (ED-1) também foi reduzido (Figura 9A), correspondendo a 44% da população total de macrófagos (Figura 9C), indicando um aumento discreto de macrófagos com fenótipo anti-inflamatório em relação ao grupo HS+N ($p > 0,05$). Apesar do número de células positivas para CD206 ter sido semelhante nos animais que receberam Alo e PDTC (Figura 9B), o infiltrado macrofágico total foi muito menor nos animais tratados com PDTC (Figura 8A), correspondendo a presença de 60% de macrófagos anti-inflamatório M2 ($p < 0,05$ vs HS+N). Esses resultados sugerem que o PDTC, mais que o Alo, é capaz de promover a polarização de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório.

Expressão renal intersticial de AngII, Miofibroblastos e Col-1

Figura 10. Microfotografia representativa da infiltração de células AngII+ e da expressão de α -actina e Col-1 dos grupos de estudo. Aumento de 400X.

Figura 11. Infiltrado de células AngII+ e deposição cortical de α -actina e Col-1 dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP. (^a $p < 0,05$ vs HS; ^b $p < 0,05$ vs HS+N; ^c $p < 0,05$ vs HS+N+Alo).

Apesar da dieta rica em sal, o bloqueio de NO associado à dieta hipersódica provocou aumento no número de células AngII+ no interstício renal ($p < 0,05$ vs HS). O tratamento com Alo reduziu esse parâmetro ($p < 0,05$ vs HS+N), no entanto, permaneceu elevado quando comparado aos animais HS ($p < 0,05$). Ao contrário, o PDTC reduziu ainda mais a infiltração de células AngII+ ($p < 0,05$ vs HS+N e HS+N+Alo), apresentando valores semelhantes aos observados nos animais HS ($p > 0,05$).

Nos animais HS, como esperado, a marcação positiva para α -actina ocorreu apenas em vasos. Após 30 dias, os animais HS+N apresentaram acentuada expressão intersticial de α -actina, indicando presença marcante de miofibroblastos. O tratamento com Alo atenuou a quantidade de miofibroblastos no interstício renal ($p < 0,05$ vs HS+N), mas ainda elevada em relação aos animais HS. O bloqueio do sistema NF- κ B foi capaz de reduzir esse parâmetro, tanto em relação aos animais HS+N como também aos animais HS+N+Alo, sugerindo maior participação do sistema NF- κ B na estimulação na infiltração de miofibroblastos intersticiais no modelo HS+L-NAME.

Após 30 dias, o depósito de Col-1 era abundante nos animais HS+N ($p < 0,05$ vs HS), contribuindo para a fibrogênese renal. O tratamento com Alo atenuou esse parâmetro, mas não reduziu a valores observados nos animais HS. O tratamento com PDTC foi ainda mais eficiente na redução na deposição intersticial de Col-1 ($p < 0,05$ vs

Hs+N e HS+N+Alo). Esses resultados sugerem a importância do sistema NF-κB no desenvolvimento da fibrose renal neste modelo de DRC.

Expressão Proteica dos componentes da imunidade inata

Buscando compreender os mecanismos da resposta imune no modelo de bloqueio crônico do NO associado à sobrecarga salina, avaliamos os componentes das principais vias de sinalização da imunidade inata, como o conteúdo protéico do inflamassoma NLRP3 e NF-κB. Além disso, avaliamos o conteúdo protéico de XO e AU renal. A Tabela 5 e as Figuras 12-16 mostram os resultados das análises protéicas através das técnicas de colorimetria, Western Blot, imuno-histoquímica e ELISA.

Tabela 5. Expressão proteica dos componentes da Imunidade Inata.

	HS	HS+N	HS+N+Alo	HS+N+PDTC
TLR4 (fold increase)	1,0±0,1	2,6±0,4 ^a	1,8±0,4	1,3±0,2 ^b
NF-κB Nuclear (fold increase)	1,0±0,1	3,0±0,2 ^a	2,7±0,3 ^a	1,4±0,3 ^{bc}
IL-6 (fold increase)	1,0±0,1	2,6±0,4 ^a	2,3±0,4 ^a	1,3±0,4 ^{abc}
XO (mU/g)	20,3±1,5	72,9±10,1 ^a	28,4±3,1 ^b	33,9±4,1 ^b
AUr (mg/g)	1,0±0,1	1,7±0,2 ^a	0,8±0,1 ^b	1,0±0,2 ^b
NLRP3 INT (cels/mm²)	3±1	8±1 ^a	5±1 ^{ab}	5±1 ^{ab}
Casp-1 (fold increase)	1,0±0,1	2,7±0,4 ^a	1,5±0,2 ^b	1,1±0,2 ^b
IL-1β (pg/mg)	1,5±0,3	4,3±0,8 ^a	2,0±0,3 ^b	2,5±0,5 ^b

Análise dos componentes da imunidade inata por técnicas colorimétricas, Western Blot, ELISA e Imuno-histoquímica dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC após 4 semanas de tratamento. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Componentes do sinal 1 da Imunidade Inata

Figura 12. Expressão proteica dos componentes do sinal 1 (TLR4/NF-κB/IL-6) obtidos do tecido renal dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Após 4 semanas, a expressão proteica de TLR4 no tecido renal dos animais HS+N estava aumentada em relação aos animais HS ($p < 0.05$) e foi atenuada com Alo, mas não foi estatisticamente significativa quando comparado com HS+N ($p > 0.05$). Ao contrário, o tratamento com PDTC foi capaz de prevenir o aumento na expressão de TLR4 ($p < 0.05$ vs. HS+N e $p > 0.05$ vs HS).

A expressão da subunidade p65 fosforilada na fração nuclear estava exacerbada nos animais HS+N ($p < 0.05$ vs HS), indicando ativação acentuada do NF-κB pós associação HS+L-NAME. Esse perfil não foi alterado com a administração do Alo ($p > 0.05$ vs HS+N), confirmando que o Alo não inibe a via do sinal 1. Como esperado, o tratamento com PDTC preveniu a ativação do sistema NF-κB ($p < 0.05$ vs HS+N e HS+N+Alo).

Considerando que o conteúdo protéico de IL-6 é um dos produtos finais da ativação do sistema NF-κB, o aumento da expressão renal de IL-6 era esperado nos animais HS+N. Uma vez que o tratamento com Alo não inibiu a ativação do NF-κB, o conteúdo protéico de IL-6 também manteve aumentado nesses animais

($p > 0,05$ vs HS+N). Corroborando o resultado de NF- κ B, o PDTC normalizou a expressão renal de IL-6 ($p > 0,05$ vs HS).

Atividade da xantina oxidase e ácido úrico renal

Figura 13. Atividade da Xantina Oxidase do renal (mU/g) e concentração de Ácido Úrico (mg/g) no tecido renal dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP. (^a $p < 0,05$ vs HS; ^b $p < 0,05$ vs HS+N; ^c $p < 0,05$ vs HS+N+Alo).

A atividade da XO e a formação de AU estavam aumentadas nos tecidos renais de ratos HS+N ($p < 0,05$ vs. HS). Como esperado, o tratamento com Alo reduziu a atividade da XO, e consequentemente a produção de AU renal ($p < 0,05$ vs HS+N), atingindo valores semelhantes aos observados nos animais HS ($p > 0,05$). Surpreendentemente, o PDTC também foi capaz de prevenir o aumento da atividade da XO e a síntese de AU ($p > 0,05$ vs HS e $p < 0,05$ HS+N). Esses resultados confirmam a relação existente entre NF- κ B e a XO ⁶⁷.

Componentes do sinal 2 da Imunidade Inata

Figura 14. Microfotografia representativa da infiltração de células NLRP3+ (setas pretas) dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC após 4 semanas de tratamento. Aumento de 400X.

Figura 15. Expressão intersticial do Inflamassoma NLRP3 dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^a $p < 0,05$ vs HS; ^b $p < 0,05$ vs HS+N; ^c $p < 0,05$ vs HS+N+Alo).

Durante a vigência do HS+N, a expressão do NLRP3 foi observada na área intersticial ($p < 0.05$ vs HS). Ambos os tratamentos, com Alo ou PDTC, foram capazes de reduzir, de maneira semelhante, o número dessas células no compartimento intersticial ($p < 0.05$ vs HS+N), porém ainda elevado quando comparado ao observado nos animais HS ($p < 0.05$ vs HS).

Figura 16. Expressão proteica de Caspase-1 e IL-1β dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Após 4 semanas, os animais HS+N apresentaram maior expressão de Caspase-1 em relação aos animais HS ($p<0.05$), indicando a formação do complexo do inflamassoma. Ambos os tratamentos apresentaram redução semelhante no conteúdo de Caspase-1 no tecido renal.

Uma vez que houve ativação do NF-κB e formação do complexo inflamassoma, era de se esperar o aumento no conteúdo protéico de IL-1β nos animais HS+N ($p<0.05$ vs HS). A inibição tanto do sinal 1 quanto do sinal 2 foi capaz, individualmente, de prevenir o aumento na síntese de IL-1β no tecido renal ($p>0.05$ vs HS).

Expressão proteica de marcadores anti-oxidantes

Com o intuito verificar se os tratamentos com Alo e PDTC apresentam atividade anti-oxidante, quantificamos o conteúdo protéico de Heme oxigenasse-1 (HO-1) e Manganês Superóxido Dismutase (SOD2 ou MnSOD) no tecido renal. A Tabela 6 e a Figura 17 mostram os resultados das análises proteicas de HO-1 e SOD2 dos grupos tratados após 30 dias de HS+N.

Tabela 6. Expressão proteica dos componentes anti-oxidantes.

	HS	HS+N	HS+N+Alo	HS+N+PDTC
HO-1 (fold increase)	1,0±0,1	4,5±0,7 ^a	2,9±0,1 ^{ab}	1,8±0,3 ^{ab}
SOD2 (fold increase)	1,0±0,1	0,6±0,1 ^a	0,6±0,1 ^a	0,9±0,1 ^{bc}

Análise dos componentes anti-oxidantes por Western Blot dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Figura 17. Valores de expressão de HO-1 e SOD2 dos grupos HS, HS+N, HS+N+Alo e HS+N+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs HS; ^bp<0,05 vs HS+N; ^cp<0,05 vs HS+N+Alo).

Após 4 semanas de acompanhamento, os animais HS+N apresentaram aumento na expressão de HO-1 ($p < 0,05$ vs HS), indicando a ativação de um mecanismo renoprotetor contra o estresse oxidativo e apoptose por morte celular. O tratamento com Alo atenuou a expressão da HO-1, apesar de ainda elevada em relação aos animais HS. O tratamento com PDTC preveniu o aumento da expressão proteica de HO-1 ($p < 0,05$ vs HS+N), indicando que o PDTC apresenta propriedade antioxidante mais efetivo que o Alo.

Os animais do Grupo HS+N apresentaram redução na expressão de SOD2 ($p < 0,05$ vs HS), que é uma enzima removedora de espécies reativas de oxigênio (ERO). Ao contrário do Alo que manteve a SOD2 reduzida ($p > 0,05$ vs HS+N), o tratamento com PDTC foi capaz de prevenir a sua redução, mantendo os valores do SOD2 próximo de HS ($p > 0,05$), indicando a atividade antioxidante do PDTC.

5. DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente ^{6,54,68,69}, a inibição do NO associada à sobrecarga de sal promoveu hipertensão sistêmica acentuada e albuminúria maciça, além de alterações funcionais e morfológicas renais graves. Além disso, os tecidos renais desses ratos apresentaram intensa infiltração de macrófagos, células positivas para AngII, aumento na expressão de α -actina, indicando a presença de miofibroblastos, juntamente com extensa fibrose intersticial, corroborando relatos prévios deste e de outros laboratórios ^{6,7,57}. No entanto, os mecanismos envolvidos na progressão da fibrose renal nesse modelo não estão estabelecidos.

Há algumas evidências na literatura que sugerem o envolvimento da resposta imune nos mecanismos que levam à inflamação renal nesse modelo, como nos estudos em que foi demonstrada a participação do TLR4 na patogênese da hipertensão e lesão vascular em ratos que receberam L-NAME ^{62,70}. Em concordância com esses dados, Mao e colaboradores ⁷¹ relataram que o NO é capaz de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos. Além disso, há a possibilidade do efeito do L-NAME ser exacerbado pela sobrecarga salina, uma vez que foi demonstrada uma ativação da via do inflamassoma NLRP3 em ratos Dahl ⁷². Consistente com os resultados desses estudos, nós mostramos no presente estudo, um aumento na abundância renal da caspase-1 e do inflamassoma NLRP3 nos animais que receberam HS+L-NAME, indicando ativação local desta via.

O inflamassoma NLRP3 não foi a única via da imunidade inata ativada em ratos HS+L-NAME. Nós observamos também o aumento na expressão renal de TLR4, bem como na translocação nuclear da unidade p65 da via NF- κ B. Consistente

com esses achados, a expressão de IL-6, uma potente citocina pró-inflamatória conhecida como um dos principais produtos da ativação do sistema NF- κ B^{73,74}, estava aumentada no grupo HS+N. Em estudos anteriores, nós mostramos que a ativação de NF- κ B é uma característica importante em dois modelos distintos de DRC, 5/6 de ablação renal³³ e sobrecarga de adenina³⁴. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram esses achados e ajudam a consolidar a visão de que a ativação de NF- κ B é um mecanismo patogênico comum na DRC.

Vários mecanismos podem contribuir para ativar a imunidade inata neste modelo. O excesso de proteína na luz tubular devido à ruptura da barreira glomerular pode exercer um efeito tóxico nas células renais, ativando tanto as vias NF- κ B quanto as NLRP3⁷⁵⁻⁷⁸. Por outro lado, a ativação da via NF- κ B foi associada a um aumento acentuado na densidade de células positivas para AngII intersticiais renais. Esse achado é consistente com relatos anteriores de que AngII estimula a ativação da via TLR4/NF- κ B, promovendo inflamação/fibrose na DRC^{59, 73, 79}.

O papel patogênico do ácido úrico (AU) tem sido amplamente debatido. Vários estudos forneceram evidências de uma conexão entre a AU, a hipertensão e o desenvolvimento da DRC^{80, 81}. Os mecanismos pelos quais o AU pode promover lesão renal são incertos. Um efeito patogênico óbvio do AU é a formação local de microcristais⁸², o que pode contribuir para ativar as vias TLR4/NF- κ B e NLRP3/IL-1 β ^{42, 44, 82}. Além do papel patogênico do AU, a ativação da XO pode promover lesão renal através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)^{83,84}, um subproduto da síntese de AU que pode desencadear vários mecanismos de lesão, incluindo a ativação da imunidade inata⁸⁵⁻⁸⁷. No presente estudo, o tratamento com HS+L-NAME resultou no aumento da atividade renal de XO, em consonância com relatos prévios observados no modelo L-NAME^{88,89}. Consequentemente, o conteúdo

de HO-1 renal foi aumentado em ratos HS+N, uma resposta bem conhecida à adaptação ao estresse oxidativo e citotoxicidade ⁹⁰⁻⁹², enquanto o conteúdo renal de SOD2 foi diminuído, um sinal de disfunção mitocondrial e deficiência no sistema de remoção de ERO ⁹³⁻⁹⁵. Juntos, esses achados sugerem fortemente a predominância dos fatores oxidativos sobre os anti-oxidativos nos ratos HS+N, uma possível explicação para a ativação da imunidade inata observada nesse grupo.

O tratamento com Alopurinol mostrou efeito renoprotetor em ratos HS+N+Alo, atenuando a HA e a ALB, reduzindo a infiltração de macrófagos, células intersticiais positivas para AngII e deposição de Col-1. No entanto, a renoproteção com Alo foi predominante no compartimento intersticial, mantendo inalteradas as lesões glomerulares nos ratos HS+N+Alo. Esses achados são consistentes com aqueles observados em animais Nx5/6 tratados com Alo ⁴⁸. Vários mecanismos podem explicar os efeitos positivos do Alo no modelo HS+L-NAME. Como esperado, o tratamento com Alo inibiu a XO e reduziu os níveis de AU no tecido renal de ratos HS+N+Alo. Além disso, o Alo inibiu a expressão de NLRP3, Caspase-1 e IL-1 β , como observado anteriormente no modelo Nx5/6 ⁴⁸ e em diabetes experimental ⁴⁶. A atividade antioxidante do Alo, indicada pelo seu efeito na HO-1, pode ter desempenhado um papel renoprotetor, através do efeito direto da redução do ERO e também pela redução do estímulo da imunidade inata pelo ERO. No entanto, os níveis renais de SOD2 não foram restaurados pelo Alo, sugerindo que a deficiência na remoção de ERO observada com HS+L-NAME não foi corrigida pelo tratamento com Alo. Deve-se notar que o Alopurinol exerceu um efeito seletivo da imunidade inata, uma vez que a via NF- κ B não foi afetada.

A inibição da translocação nuclear da subunidade p65 pelo PDTC foi associada à melhora da função renal e atenuação da HA, ALB e deposição de Col-1.

Além disso, diferentemente do tratamento com Alo, os dois tipos de lesões glomerulares (isquêmica e esclerose) estavam significativamente reduzidas com PDTC. Estes efeitos foram associados à redução acentuada da inflamação e fibrose renal. Várias ações do PDTC, além da redução drástica da ativação do NF- κ B e da produção de IL-6, podem ter contribuído para seu melhor efeito renoprotetor em comparação com o Alo. O PDTC inibiu a atividade de XO, consistente com relatos de que a atividade de XO é regulada por NF- κ B ^{96, 97}, exercendo assim um efeito similar ao do Alo. Além disso, o estresse oxidativo foi reduzido, como uma possível consequência da inibição da XO. Este efeito antioxidante foi ainda mais pronunciado do que o do Alo, uma vez que o PDTC promoveu uma redução tanto nos níveis renais de HO-1 como um aumento nos de SOD2.

O tratamento com PDTC não reduziu drasticamente apenas a intensidade da infiltração renal de macrófagos, mas promoveu também uma alteração no seu fenótipo, de pro-inflamatório M1 para o anti-inflamatório M2 ^{98, 99}, agindo eficientemente contra o estado profundamente inflamatório do modelo HS+L-NAME. Finalmente, o PDTC diminuiu a expressão renal de TLR4, mais efetivamente do que o Alo, aumentando assim a inibição da cascata de NF- κ B e diminuindo a abundância renal de NLRP3 e Casp-1. É interessante notar que, em um estudo recente, a deficiência de TLR4 reduziu o estresse oxidativo renal, a inflamação mediada por macrófagos e a deposição de proteína da matriz extracelular em um modelo de hipertensão ¹⁰⁰. Uma vez que o conteúdo renal de IL-1 β também foi reduzido pelo PDTC, pode se afirmar que, além dos efeitos inibitórios no sistema NF- κ B, o PDTC também aboliu eficientemente a ativação da via do inflamassoma NLRP3.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam que, no modelo HS+L-NAME, a lesão renal grave está associada à ativação de duas vias distintas da

imunidade inata, TLR4/NF- κ B e NLRP3/IL-1 β . A inibição de NLRP3/IL-1 β e estresse oxidativo pelo Alo, como demonstrado anteriormente em outros modelos de DRC, atenuou a inflamação e a lesão intersticial. O tratamento com PDTC exerceu uma renoproteção mais completa, agindo em ambos os sistemas, sugerindo que pode ser necessária a inibição das duas ou mais vias da imunidade inata para impedir a progressão da DRC.

6. CONCLUSÕES

- 1) As duas vias da imunidade inata participam da patogênese da hipertensão e das lesões renais no modelo de DRC induzida pela inibição crônica de NO associada a uma sobrecarga salina;
- 2) O efeito renoprotetor do Alopurinol decorre da inibição da via NLRP3/CASP1;
- 3) O PDTC inibe as vias TLR4/NF- κ B e NLRP3/CASP-1, exercendo um efeito renoprotetor superior ao do Alopurinol.

7. REFERÊNCIAS

1. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, *et al.* Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. *J Bras Nefrol* 2016; **38**: 54-61.
2. Nagy J. [The chronic kidney disease "epidemy"]. *Orv Hetil* 2013; **154**: 43-51.
3. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, *et al.* Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1985; **76**: 612-619.
4. Wu LL, Cox A, Roe CJ, *et al.* Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1997; **51**: 1553-1567.
5. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, *et al.* Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 1986; **77**: 1925-1930.
6. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha, *et al.* Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension* 2001; **37**: 170-175.
7. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, *et al.* Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F38-47.
8. Anders HJ, Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**: 1387-1400.
9. Correa-Costa M, Braga TT, Semedo P, *et al.* Pivotal role of Toll-like receptors 2 and 4, its adaptor molecule MyD88, and inflammasome complex in experimental tubule-interstitial nephritis. *PLoS One* 2011; **6**: e29004.
10. Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, *et al.* New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol* 2011; **73**: 428-435.
11. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973-983.

12. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 335-376.
13. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**: 381-399.
14. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, *et al.* Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 1993; **365**: 182-185.
15. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1066-1071.
16. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; **183**: 787-791.
17. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, *et al.* NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1254-1262.
18. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, *et al.* Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992; **19**: 464-474.
19. Kagami S, Border WA, Miller DE, *et al.* Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; **93**: 2431-2437.
20. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, *et al.* Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 1999; **103**: 627-635.
21. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, *et al.* Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1693-1701.
22. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, *et al.* Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999; **100**: 1223-1229.
23. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, *et al.* Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 881-900.

24. Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* 1999; **100**: 1330-1337.
25. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, *et al.* NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000; **35**: 193-201.
26. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, *et al.* Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1648-1658.
27. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, *et al.* Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2000; **57**: 147-158.
28. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res* 2016; **41**: 901-910.
29. Zhang H, Sun SC. NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci* 2015; **5**: 63.
30. Mezzano SA, Barría M, Droguett MA, *et al.* Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 2001; **60**: 1366-1377.
31. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, *et al.* Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia* 1999; **42**: 222-232.
32. Mezzano S, Aros C, Droguett A, *et al.* NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 2505-2512.
33. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, *et al.* Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F92-99.
34. Okabe C, Borges RL, de Almeida DC, *et al.* NF-κB activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **305**: F155-163.

35. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; **10**: 417-426.
36. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; **425**: 516-521.
37. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 229-265.
38. Ghaemi-Oskouie F, Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr Rheumatol Rep* 2011; **13**: 160-166.
39. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2014; **29**: 41-48.
40. Abais JM, Xia M, Zhang Y, *et al.* Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal* 2015; **22**: 1111-1129.
41. Masood H, Che R, Zhang A. Inflammasomes in the Pathophysiology of Kidney Diseases. *Kidney Dis (Basel)* 2015; **1**: 187-193.
42. Isaka Y, Takabatake Y, Takahashi A, *et al.* Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2016; **31**: 890-896.
43. Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M, *et al.* Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci Rep* 2017; **7**: 39884.
44. Kim SM, Lee SH, Kim YG, *et al.* Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; **308**: F993-F1003.
45. Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol* 2012; **13**: 352-357.
46. Wang C, Pan Y, Zhang QY, *et al.* Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. *PLoS One* 2012; **7**: e38285.
47. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, *et al.* The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1732-1744.

48. Foresto-Neto O, Ávila VF, Arias SCA, *et al.* NLRP3 inflammasome inhibition ameliorates tubulointerstitial injury in the remnant kidney model. *Lab Invest* 2018; **98**: 773-782.
49. Granata S, Masola V, Zoratti E, *et al.* NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. *PLoS One* 2015; **10**: e0122272.
50. Kang DH, Nakagawa T. Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease. *Semin Nephrol* 2005; **25**: 43-49.
51. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, *et al.* Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol* 2016; **213**: 8-14.
52. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, *et al.* Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; **20**: 298-303.
53. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; **90**: 278-281.
54. Fujihara CK, Michellazzo SM, de Nucci G, *et al.* Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am J Physiol* 1994; **266**: F697-705.
55. Rodríguez-Iturbe B, Franco M, Tapia E, *et al.* Renal inflammation, autoimmunity and salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; **39**: 96-103.
56. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, *et al.* Autoimmunity in the pathogenesis of hypertension. *Nat Rev Nephrol* 2014; **10**: 56-62.
57. Franco M, Tapia E, Bautista R, *et al.* Impaired pressure natriuresis resulting in salt-sensitive hypertension is caused by tubulointerstitial immune cell infiltration in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **304**: F982-990.
58. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 4651-4655.
59. Nair AR, Ebenezer PJ, Saini Y, *et al.* Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. *Exp Cell Res* 2015; **335**: 238-247.

60. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. *J Nephrol* 2000; **13 Suppl 3**: S101-110.
61. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, *et al.* Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 2000; **86**: 1266-1272.
62. Sollinger D, Eißler R, Lorenz S, *et al.* Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 2014; **101**: 464-472.
63. Quiroz Y, Bravo J, Herrera-Acosta J, *et al.* Apoptosis and NFkappaB activation are simultaneously induced in renal tubulointerstitium in experimental hypertension. *Kidney Int Suppl* 2003: S27-32.
64. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; **2**: 235-254.
65. 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; **383**: 265-270.
66. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980; **47**: 1-9.
67. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res* 2011; **21**: 103-115.
68. Arcos MI, Fujihara CK, Sesso A, *et al.* Mechanisms of albuminuria in the chronic nitric oxide inhibition model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**: F1060-1066.
69. Fujihara CK, Sena CR, Malheiros DM, *et al.* Short-term nitric oxide inhibition induces progressive nephropathy after regression of initial renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F632-640.
70. Bomfim GF, Dos Santos RA, Oliveira MA, *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 2012; **122**: 535-543.

71. Mao K, Chen S, Chen M, *et al.* Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res* 2013; **23**: 201-212.
72. Zhu Q, Li XX, Wang W, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation inhibited high salt-induced activation of the NLRP3 inflammasome in the renal medulla in Dahl S rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; **310**: F621-F627.
73. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 1999; **84**: 695-703.
74. Kobayashi S, Nagino M, Komatsu S, *et al.* Stretch-induced IL-6 secretion from endothelial cells requires NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **308**: 306-312.
75. Faustino VD, Arias SCA, Ferreira Ávila V, *et al.* Simultaneous activation of innate and adaptive immunity participates in the development of renal injury in a model of heavy proteinuria. *Biosci Rep* 2018; **38**.
76. Fang L, Xie D, Wu X, *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells. *PLoS One* 2013; **8**: e72344.
77. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, *et al.* Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int* 1998; **53**: 1608-1615.
78. Morigi M, Macconi D, Zoja C, *et al.* Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 1179-1189.
79. Ji Y, Liu J, Wang Z, *et al.* Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2009; **23**: 265-276.
80. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, *et al.* A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2888-2897.
81. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, *et al.* Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 2001; **38**: 1101-1106.

82. Liu H, Xiong J, He T, *et al.* High Uric Acid-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells via the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Am J Nephrol* 2017; **46**: 333-342.
83. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 774-797.
84. Matesanz N, Lafuente N, Azcutia V, *et al.* Xanthine oxidase-derived extracellular superoxide anions stimulate activator protein 1 activity and hypertrophy in human vascular smooth muscle via c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Hypertens* 2007; **25**: 609-618.
85. Zhao MM, Xu MJ, Cai Y, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2011; **79**: 1071-1079.
86. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 1317-1327.
87. Tsai PY, Ka SM, Chang JM, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 744-754.
88. Sainz J, Wangensteen R, Rodríguez Gómez I, *et al.* Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens* 2005; **18**: 871-877.
89. Rincón J, Correia D, Arcaya JL, *et al.* Role of Angiotensin II type 1 receptor on renal NAD(P)H oxidase, oxidative stress and inflammation in nitric oxide inhibition induced-hypertension. *Life Sci* 2015; **124**: 81-90.
90. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1998; **152**: 711-720.
91. Wagner CT, Durante W, Christodoulides N, *et al.* Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997; **100**: 589-596.
92. Correa-Costa M, Semedo P, Monteiro AP, *et al.* Induction of heme oxygenase-1 can halt and even reverse renal tubule-interstitial fibrosis. *PLoS One* 2010; **5**: e14298.

93. Ishola DA, Post JA, van Timmeren MM, *et al.* Albumin-bound fatty acids induce mitochondrial oxidant stress and impair antioxidant responses in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006; **70**: 724-731.
94. Zhuang Y, Yasinta M, Hu C, *et al.* Mitochondrial dysfunction confers albumin-induced NLRP3 inflammasome activation and renal tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; **308**: F857-866.
95. Liu Y, Wang Y, Ding W. Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2018; **2018**: 5828120.
96. Xu P, Huecksteadt TP, Hoidal JR. Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics* 1996; **34**: 173-180.
97. Satriano J, Schlondorff D. Activation and attenuation of transcription factor NF- κ B in mouse glomerular mesangial cells in response to tumor necrosis factor- α , immunoglobulin G, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. Evidence for involvement of reactive oxygen species. *J Clin Invest* 1994; **94**: 1629-1636.
98. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; **122**: 787-795.
99. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3522-3530.
100. Pushpakumar S, Ren L, Kundu S, *et al.* Toll-like Receptor 4 Deficiency Reduces Oxidative Stress and Macrophage Mediated Inflammation in Hypertensive Kidney. *Sci Rep* 2017; **7**: 6349.