CRISTIENE OKABE

**Mecanismos de formação de granulomas e papel
do sistema NF-kappa B em um modelo de doença
renal crônica por sobrecarga de adenina**

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

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Okabe, Cristiene

Mecanismos de formação de granulomas e papel do sistema NF-kappa B em
um modelo de doença renal crônica por sobrecarga de adenina / Cristiene Okabe.
-- São Paulo, 2012.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Clarice Kazue Fujihara.

Descritores: 1.Insuficiência renal crônica 2.Adenina 3.Imunidade inata 4.NF-
kappa B 5.Granuloma

USP/FM/DBD-245/12

Dedico esta dissertação ao meu Senhor Jesus, minha base, minha força, meu refúgio, minha alegria. *Eu sou a videira, vós os ramos; quem permanece em mim, e eu, nele, esse dá muito fruto; porque sem mim nada podeis fazer.* João 15:5

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Clarice Kazue Fujihara, por fazer parte de uma etapa marcante em minha vida, lutando e vencendo as dificuldades comigo durante todos esses anos. Você é um referencial de guerreira! Jamais me esquecerei da sua disposição, até mesmo nas suas férias, em me ajudar. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz, que cativa a todos pela simplicidade, humor e sobretudo pelo conhecimento. Obrigada pela disponibilidade, paciência e por me ensinar que as coisas belas estão nos mínimos detalhes!

À Dra Denise Malheiros, a quem admiro tanto, responsável pela execução de grande parte dessa dissertação. Obrigada pelas indispensáveis discussões, ensinamentos e disposição para realizar tudo que era proposto!

Ao Prof Dr. Niels Olsen Saraiva Camara, pelas cruciais colaborações e sugestões durante todo o desenvolvimento desta dissertação.

Ao doutorando Danilo Candido de Almeida, pela disponibilidade e cuidado com cada experimento de biologia molecular.

À aluna de iniciação Raquel Borges, que me auxiliou de todas as formas possíveis, com experimentos, palavras e risos. O trajeto que você percorreu comigo foi curto, mas sua presença foi indispensável!

À Grasiela Barlette, pela total dedicação, pela disposição em vencer todos os desafios surgidos e pelo impecável cuidado com os cortes e colorações histológicas.

À Camilla Fanelli, pelas discussões, sugestões e criatividade na execução dos experimentos de imuno-histoquímica! Obrigada pelo incentivo e por todos os esforços em me auxiliar desde minha iniciação científica!

À Flavia Gomes Machado e Simone Arias, flores da minha vida. Cada experimento, cada detalhe, cada sugestão, cada discussão possui o perfume de vocês. Obrigada! Vocês foram muito além de companheiras, amigas, às vezes mães e, até mesmo, filhas. Aprendi e aprendo muito a cada dia com vocês!

À Claudia Sena, por todos os ensinamentos e pelas infinitas dosagens bioquímicas realizadas.

À Dra Walcy e Ivone de Oliveira pelo auxílio com as fotos e quantificação do colágeno tecidual.

Ao Prof Dr. Krieger e Mariliza Velho Rodrigues, pela gentileza de ceder o primer de MCP-1.

À Margarete, pela contribuição nos passos iniciais desta dissertação, pelo companheirismo e pelas inúmeras gargalhadas.

À Dra Daisa David, pelas sugestões ao longo do estudo.

Aos alunos de iniciação científica Neto, Victor e Beatriz, pelo ambiente agradável que vocês propiciaram e pela companhia durante esse percurso.

À Janice Pião, pelo cuidado valioso com o biotério, pela força e pela amizade.

À Vivian Viana e ao Ricardo, pelo apoio técnico no biotério.

Ao Wagner, por ter sido sempre muito solícito em absolutamente tudo de que precisei.

À Verônica, Neuziane e Ana Cristina, pela agradável companhia e pela força durante o estágio PAE.

A todos do LIM-16, pelos momentos juntos, pelo carinho e pelo companheirismo.

À Denise, Eliana e Pedro pelo auxílio nos assuntos administrativos.

Ao amor da minha vida, meu companheiro, meu amigo, minha outra metade. Phi, você é o início da vida abundante que Deus prometeu! Obrigada pela paciência, por permanecer lutando comigo, me ensinar a ter brio e o caminho da verdade!

À minha mammy querida, Gisele, por todos os momentos que você deixou de pensar em você para pensar em mim, pelo ambiente de carinho e aconchego que você me proporcionou durante esses anos. Obrigada por ser mãe, amiga e irmã! Busco somente retribuir tudo aquilo que você investiu em mim.

Ao meu pappy querido, Pedro, e sua esposa, por todo apoio, confiança e exemplo de caráter e bondade. Amo vocês incondicionalmente!

À minha vó Nice, por ter cuidado de mim como uma filha, por ter me ensinado o caminho da fé e perseverança. Sua valentia me inspira a cada dia!

Às minhas tias Sueli e Eneida, prima Raquel, sogros e amigos, pelas sinceras palavras, torcidas e zelo. A companhia de vocês foi e é absolutamente indispensável!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
Objetivos	10
2. MÉTODOS	11
3. RESULTADOS	28
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Genes e seus correspondentes iniciadores usados para análise de expressão gênica comparativa	25
Tabela 02. Resultados após 3 semanas de tratamento	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Esquema do protocolo experimental	12
Figura 02.	Alterações estruturais induzidas pela presença de cristais ...	29
Figura 03	Marcação para E-caderina em células tubulares	31
Figura 04	Cristais no córtex e sua análise quantitativa	35
Figura 05	Western blot para IKK- α	35
Figura 06	Expressão gênica de IL-6, IFN- γ , FSP-1 e MCP-1	36

RESUMO

Okabe, C – Mecanismos de formação de granulomas e papel do sistema NF-kappa B em um modelo de doença renal crônica por sobrecarga de adenina [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

O excesso de adenina na dieta (ADE) promove precipitação intratubular de cristais, levando à instalação de uma nefrite intersticial progressiva e perda da função renal. Observações recentes indicam que a sobrecarga de ADE em camundongos em que os genes para TLR-2, -4, MyD88, ASC ou caspase-1 foram inativados provoca menos dano renal do que quando administrado a camundongos selvagens, sugerindo a existência de um papel patogênico para a ativação de TLRs e a montagem de inflamassomas nesse modelo. O presente estudo foi concebido para investigar se outro importante componente da imunidade inata, o sistema NF- κ B, também exerce papel patogênico na nefropatia associada ao excesso de ADE. Ratos Munich-Wistar machos e adultos foram divididos em 3 grupos: C (N=17), ração padrão; ADE (N=17), ADE na ração, 0,7% durante 1 semana e 0,5% durante 2 semanas; ADE+PDTC (N=14), ADE administrada como descrito anteriormente, associada ao inibidor do NF- κ B, pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), 120 mg/kg/dia na água do bebedouro. Após 3 semanas, observou-se deposição de numerosos cristais no tecido renal, em sua maioria no interior de granulomas de corpo estranho, acompanhada de intensa atividade proliferativa tubulointersticial. Uma parte dos cristais apareceu envolvida por uma camada de células aparentemente

derivadas do epitélio tubular, que pareciam segregar os precipitados e, em alguns casos, expulsá-los ao interstício. Essas alterações associaram-se a uma grande expansão da área intersticial, com deposição de colágeno, além de hipotrofia glomerular. Foi possível ainda demonstrar um aumento da expressão da interleucina-6, do interferon- γ , da proteína específica de fibroblastos (FSP-1) e da proteína quimiotática para macrófagos (MCP-1). A abundância do IKK- α , uma quinase ativadora do sistema NF- κ B, mostrou-se também acentuadamente elevada nesses ratos. O tratamento com PDTC normalizou a expressão do IKK- α , diminuindo o número de granulomas e a proliferação celular, além de atenuar fortemente a fibrose e o declínio da função renal. Esses achados, que contribuem para elucidar os mecanismos de formação de granulomas no modelo de sobrecarga de adenina, são consistentes com o conceito de que o sistema NF- κ B é ativado pela precipitação intratubular de cristais e contribui, juntamente com outros mecanismos ligados à imunidade inata, para iniciar a intensa resposta inflamatória associada a esse modelo.

Descritores: 1. Insuficiência renal crônica 2. Adenina 3. Imunidade inata 4. NF- κ B 5. Granuloma.

SUMMARY

Okabe, C – Mechanisms of granuloma formation and role of the NF-kappa B system in a model of chronic renal disease by adenine overload [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Excessive dietary adenine (ADE) promotes intratubular precipitation of crystals, leading to the installation of progressive interstitial nephritis and renal function loss. Recent observations indicate that ADE overload in mice in which genes for TLR-2, -4, MyD88, ASC or caspase-1 were inactivated causes less renal damage than when administered to wild-type mice, suggesting the existence of a pathogenic role for the activation of TLRs and the assembly of inflamassomes in this model. The present study was designed to investigate whether another important component of innate immunity, the NF- κ B system, also plays a role in the pathogenesis of the nephropathy associated with excess ADE. Adult Male Munich-Wistar rats were distributed among three groups: C (n = 17), receiving standard diet; ADE (N = 17), given ADE in the diet at 0.7% for 1 week and 0.5% for 2 weeks; and ADE + PDTC (N = 14), receiving ADE as described above, associated with the NF- κ B inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), 120 mg/kg/ day in drinking water. After three weeks, there was widespread deposition of crystals in the renal tissue, mostly within granulomas, accompanied by florid tubulointerstitial proliferative activity. Part of these crystals was enclosed in a layer of cells apparently derived from the tubular epithelium, which appeared to segregate the precipitates, and in some

cases, to extrude them to the interstitium. These changes were associated with marked interstitial expansion, collagen deposition, and glomerular hypotrophy. Increased expression of interleukin-6, interferon- γ , fibroblast specific protein (FSP-1) and macrophage chemoattractant protein (MCP-1) were also shown. The abundance of IKK- α , a kinase that activates the NF- κ B system, was also markedly elevated in these mice. Treatment with PDTC normalized the expression of IKK- α , reducing the number of granulomas and cell proliferation, and strongly attenuated interstitial fibrosis and the decline of renal function. These findings, which contribute to illuminate some mechanisms of granuloma formation in the ADE overload model, are consistent with the concept that the NF- κ B system is activated by intratubular precipitation of crystals and contributes, along with other mechanisms related to innate immunity, to initiate the intense inflammatory response associated with this model.

Descriptors: 1.Chronic renal failure 2. Adenine 3.Innate immunity 4. NF-kappa B
5. Granuloma.

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um dos problemas mais sérios de saúde pública em nossos dias. Estima-se que em todo o mundo cerca de 2.000.000 de pacientes necessitem de terapia de substituição renal. No Brasil, cerca de 100.000 pacientes dependem da diálise crônica para sobreviver, enquanto outros 30.000 pacientes/ano são incluídos nesses programas [1]. Sabe-se que os mecanismos que desencadeiam a perda da função renal estão relacionados a fatores hemodinâmicos e inflamatórios. Tais fatores são capazes de promover hipertrofia glomerular, expansão de matriz mesangial e lesão de podócitos, culminando com o desenvolvimento de esclerose glomerular (EG). Além das lesões glomerulares, a fibrose intersticial e a atrofia tubular também participam do processo que leva à perda progressiva da função renal [2]. Uma vez que a progressão da fibrose renal resulta na perda irreversível da função renal, é fundamental compreender melhor os mecanismos que levam às nefropatias progressivas.

A fibrose túbulo-intersticial é o processo final comum para todas as doenças renais que conduzem à perda total da função renal [3]. A fibrose é caracterizada por deposição de matriz extracelular (MEC) em associação com infiltração por células inflamatórias, perda de células tubulares, acúmulo de fibroblastos e rarefação da microvasculatura peritubular [4]. No tecido renal com fibrose, os espaços intersticiais são preenchidos por material fibrilar constituído predominantemente por colágeno (tipos I e III) e fibronectina [3, 5].

Além disso, essa matriz fibrótica contém fragmentos residuais de colágeno tipo IV, normalmente encontrados nas membranas basais, sustentando o endotélio ou o epitélio tubular [6]. Os fibroblastos, células essenciais ao mecanismo da fibrose, sintetizam uma série de componentes da MEC que, produzidos em grande quantidade, conduzem ao acúmulo de colágeno e fibrose. Nesse contexto, os fibroblastos sofrem alterações fenotípicas, diferenciando-se em miofibroblastos, capazes de expressar α -actina e assim promover retração do tecido fibrosado [7, 8]. Os macrófagos, que desempenham papel central na patogênese da inflamação, produzindo citocinas, fatores de crescimento e recrutando células inflamatórias também são capazes de produzir MEC. O principal mediador desse processo é o TGF- β , que não só estimula a síntese de proteínas da MEC como inibe sua degradação através do aumento da produção de inibidores da ativação do plasminogênio (PAI) e da atividade de inibidores das metaloproteinases (TIMP) [9].

Um modelo experimental de DRC é a da sobrecarga de adenina, causadora de uma inflamação intersticial crônica com atrofia tubular e fibrose intensa. Nos mamíferos, a adenina proveniente da degradação de nucleotídeos, é utilizada, por meio de uma via de reaproveitamento, para ressintetizar esses compostos. Um passo crucial desse processo é a conversão de adenina a monofosfato de adenosina (AMP), através da ação da adenina fosforribosil transferase (APRT). A deficiência dessa enzima, verificada em uma rara doença autossômica recessiva que afeta o cromossomo 16q24 [10], é causadora de um grave processo inflamatório que, se não tratado a

tempo, leva rapidamente a um quadro de insuficiência renal. Isso ocorre porque, na ausência da APRT, a adenina acumula-se rapidamente e, não encontrando via metabólica alternativa acaba sendo convertida, por meio da ação da xantina oxidase, em 2,8 dihidroxiadenina (2,8-DHA) [11, 12], um composto extremamente insolúvel. A doença humana é reproduzida em camundongos *knockout* para a APRT, que apresentam nefrolitíase com dilatação tubular, inflamação intersticial grave, necrose tubular e fibrose intensa, com mortalidade de 90% antes de completarem 6 meses de vida [13, 14].

A administração de um excesso de adenina na dieta pode levar a um acúmulo dessa purina no organismo, com consequências semelhantes às da inativação da APRT. Phillips e cols [11] foram os primeiros a observar que uma sobrecarga de adenina a ratos e camundongos causava lesões renais graves acompanhadas por elevação da ureia plasmática e diminuição do peso corpóreo. Em 1977, outros pesquisadores reproduziram esses achados [15], mas foi somente em 1986 que um modelo de DRC induzido pela administração de adenina na dieta foi padronizado por Yokozowa e cols [16], que mostraram que o tecido renal apresentava fibrose intersticial acentuada, contendo depósitos cristalinos e numerosos granulomas de corpo estranho, em associação com insuficiência renal. Estudos posteriores confirmaram esses achados, mas só recentemente o modelo descrito em 1986 passou a ser utilizado em maior escala para o estudo da patogênese da DRC e de inúmeras

de suas complicações, como a doença óssea metabólica [17], calcificação vascular [17], anemia [18] e a hipertensão (moderada) [18].

Os mecanismos que levam à nefrite intersticial crônica e à insuficiência renal associadas ao excesso de adenina não estão esclarecidos. Muitos pesquisadores são de opinião que essas anomalias decorrem da obstrução intratubular maciça por cristais de 2,8-DHA [16]. No entanto essa hipótese não explica um achado curioso: o de que pelo menos uma parte dos cristais observados nesse modelo se encontra no interstício renal, em vez de se situar no lume tubular [16-18], provocando a formação de granulomas de corpo estranho. Admitindo-se que a precipitação inicial da 2,8-DHA só pode ocorrer no interior dos túbulos, é necessário postular um mecanismo de translocação dos cristais do lume tubular ao interstício. Tal mecanismo é atualmente desconhecido. No entanto, é possível que essa migração seja análoga à que já foi proposta para a patogênese da nefrocalcinose, para a qual contribuiria um complexo mecanismo de transferência de precipitados de oxalato de cálcio do lume ao interstício [19]. Esse processo se iniciaria com a aderência de precipitados contendo cálcio à membrana luminal das células tubulares, continuaria com a elaboração de um neopitélio envolvendo esses precipitados e terminaria com a extrusão dos mesmos para o interstício. No entanto, os mecanismos celulares que governam esse processo são desconhecidos, e nem mesmo sua existência foi inequivocamente comprovada.

Para que a precipitação de cristais de 2,8-DHA possa levar à grave lesão estrutural observada nesse modelo, é necessário que sejam postos em

movimento mecanismos de inflamação que terminam por levar à fibrose crônica. O funcionamento de tais mecanismos no modelo de excesso de adenina tem sido amplamente demonstrado em inúmeros estudos. Tamura e cols [20] observaram aumento na infiltração de macrófagos e na expressão de MCP-1, RANTES, IL-1, TGF- β e α -actina no interstício renal de animais tratados com adenina, além de uma correlação significativa entre as expressões de α -actina e TGF- β , sugerindo a transdiferenciação de células do epitélio tubular em miofibroblastos. Outros investigadores demonstraram a participação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ e genes relacionados à inflamação como a C10, uma proteína responsável pela migração de linfócitos T, monócitos e eosinófilos em camundongos *knockout* para APRT [21, 22].

Embora o exuberante processo inflamatório que caracteriza o modelo de nefropatia por excesso de adenina seja bem conhecido e esteja bem caracterizado, os mecanismos que o iniciam a partir da precipitação de 2,8-DHA e seu deslocamento ao interstício renal ainda não estão estabelecidos, assim como é incerto o vínculo entre inflamação e outros tipos de insulto, como a hipertensão glomerular e a exposição de células tubulares a quantidades excessivas de proteína. O recente acúmulo de informações sobre a imunidade inata trouxe novos elementos para que esse vínculo pudesse ser mais bem compreendido. Dá-se o nome de imunidade inata a um sistema complexo de defesa contra a invasão de tecidos por patógenos, extremamente conservado

na evolução, que compreende desde simples barreiras físicas até a produção de mediadores químicos que recrutam células especializadas e ativam a imunidade adquirida. Até as últimas décadas do século XX, acreditava-se que o funcionamento da imunidade inata era deflagrado essencialmente por moléculas derivadas de microorganismos, hoje conhecidas pela designação genérica de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). No entanto, desde a descoberta dos *toll-like receptors* (TLR) em meados dos anos 1990 [23], tornou-se claro que é comum a ativação da imunidade inata, mesmo na ausência de patógenos, por moléculas originadas por sofrimento ou destruição celular, tais como proteases liberadas de lisossomas, fragmentos de ácidos nucléicos e até mesmo moléculas de ATP, além de perturbações graves da homeostase celular, como o efluxo de potássio [24, 25]. Além disso, a imunidade inata pode ser ativada por cristais microscópicos, como os de ácido úrico (e presumivelmente de 2,8-DHA), que são introduzidos nas células através de vesículas endocitóticas e podem ser parcial ou totalmente dissolvidos em lisossomas. Em seu conjunto, essas moléculas, detritos moleculares anômalos e outras alterações da homeostase intracelular são conhecidos pela sigla DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), ou seja, constituem padrões de risco ou de dano celular. Esses padrões podem ser reconhecidos por receptores citosólicos, como os *NOD-like receptors* (NLR) que através de um intrincado mecanismo de oligomerização e associação, formam grandes complexos moleculares conhecidos por inflamassomas, como o NLRP3 [26] que ativam enzimas como a caspase-1 que, por sua vez,

catalisam a síntese de potentes mediadores, como as interleucinas 1α , 18 e 33 [27], desencadeando rapidamente uma sequência de eventos inflamatórios que independe da ativação da imunidade adquirida. Os DAMPs e os PAMPs também ativam os TLRs, que acionam uma série de vias intracelulares, como a AP-1 e as MAP quinases, as quais, em última análise, promovem, com os inflamassomas e em sinergismo com eles, a síntese de um grande número de mediadores inflamatórios que seriam destinados em princípio a barrar invasores microbianos.

Uma das mais importantes vias intracelulares associadas à imunidade inata é o sistema NF- κ B, inicialmente identificado em linfócitos B. Esse sistema é constituído por vários heterodímeros estáveis, o mais importante e mais bem estudado dos quais é aquele formado pelas subunidades conhecidas como p50 e p65. Esse heterodímero é na verdade um fator de transcrição que, uma vez no interior do núcleo, ativa uma série de genes que codificam proteínas direta ou indiretamente envolvidas no processo inflamatório, como citocinas e quimiocinas [28, 29], a ciclooxigenase-2 (COX-2) [30, 31], moléculas de adesão [30, 32] a iNOS [33], entre muitas outras. No entanto, essa translocação ao núcleo é normalmente impedida pela presença de uma terceira proteína, o I- κ B α , que constitui assim um fator inibidor desse processo [34]. Para que o sistema NF- κ B seja ativado, é necessário que a subunidade I- κ B α seja fosforilada por uma quinase especial, a IKK, o que a torna suscetível à ubiquitinação e posterior degradação pelo proteasoma, liberando assim o

complexo p65/p50. O NF- κ B pode ser assim ativado em diversos tipos de células expostas à ação de estímulos fisiológicos e patológicos, tais como citocinas, agentes mitogênicos, vírus, estresse mecânico ou oxidativo e a angiotensina II [29, 35]. Há inúmeras evidências de que o sistema NF- κ B está ativado em doenças inflamatórias crônicas [36], podendo até mesmo prever a progressão da DRC. A ativação do sistema NF- κ B foi observada em pacientes com glomerulopatia de lesões mínimas [37], glomerulonefrite membranosa [37], nefropatia da IgA [37] e nefropatia diabética [38]. No modelo Nx, a ativação do sistema NF- κ B foi observada em glomérulos, assim como em vasos e na área intersticial [39, 40].

A ativação de NF- κ B pode ser bloqueada impedindo-se a degradação do I κ B α , tratando as células com proteases inibidoras ou com um anti-oxidante [34]. Um composto muito eficiente nesse sentido é o pirrolidina ditiocarbamato, conhecido pela sigla PDTC. Sabe-se de longa data que o PDTC, que possui um efeito antioxidante [41-43], inibe a ativação do sistema NF- κ B e, como provável resultado dessa ação, limita fortemente a produção de moléculas de adesão [44], a expressão de MCP-1 [42], a indução da iNOS e a proliferação celular [32]. Em 2007, nosso grupo desenvolveu um estudo em que ratos submetidos à nefrectomia de 5/6 Nx foram tratados com PDTC durante os 60 dias que se seguiram ao procedimento [39]. O tratamento com o PDTC reduziu nitidamente a presença da subunidade p65 em células do interstício renal, confirmando a inibição do sistema NF- κ B pelo composto. Em associação com

esse efeito, observamos redução da pressão arterial sistêmica e uma atenuação significativa da albuminúria, da inflamação renal, da esclerose glomerular e da expansão intersticial. Esse estudo não apenas veio reforçar o conceito de que fenômenos inflamatórios estão intimamente ligados à patogênese das nefropatias progressivas, mas trouxe a perspectiva de que a inibição do sistema NF- κ B pode vir a representar uma ferramenta importante na terapêutica desses processos.

Algumas evidências recentes sugerem que, em roedores que recebem sobrecarga de adenina na dieta, a imunidade inata é ativada e participa ativamente do processo inflamatório que leva à lesão estrutural e à insuficiência renal características desse modelo. Oyama e cols [45] demonstraram que a *High-mobility group box-1 protein* (HMGB-1), uma proteína liberada por células necróticas e/ou células inflamatórias e que atua como um ligante para um dos *toll-like receptors*, o TLR-4, ativando assim a imunidade inata, é essencial à formação dos granulomas induzidos pela precipitação de cristais de 2,8-DHA. Nosso grupo de pesquisa, em associação com o Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, demonstrou recentemente que a inativação, em camundongos, dos genes de alguns elementos-chave da imunidade inata, como os TLRs 2 ou 4, as proteínas adaptadoras MyD88 e ASC, e a própria caspase-1, atenuava drasticamente as lesões renais causadas pelo excesso de adenina [21], indicando que uma parcela substancial das vias relacionadas à imunidade

inata, incluindo TLRs e inflamassomas, está envolvida na ativação do processo inflamatório e da injúria renal que resultam do acúmulo de adenina. No entanto, não se conhece ainda a possível participação nesse processo do sistema NF- κ B, seja como via independente de ativação de mediadores inflamatórios, seja como via acessória à ativação de TLRs e inflamassomas.

Em vista das considerações acima, os objetivos deste estudo foram: 1) examinar a sequência de eventos que levam da precipitação intratubular de cristais de 2,8-DHA à formação de granulomas e à extensa fibrose intersticial observada no modelo de sobrecarga de adenina em ratos. 2) verificar a hipótese de que a inibição do sistema NF- κ B com o PDTC tem um efeito antiinflamatório e renoprotetor nesse modelo.

2. MÉTODOS

No presente estudo utilizamos ratos da cepa Munich-Wistar, pesando entre 280 e 310 gramas (3-4 meses), obtidos de uma colônia dessa linhagem de ratos estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h. Os procedimentos utilizados nesse estudo seguiram as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo nº. 195/11) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como diretrizes internacionais para manutenção e cuidado de animais de laboratório.

Indução de DRC por excesso de adenina

O modelo experimental de DRC utilizado neste estudo consiste na administração de adenina (base livre grau - referência A8626 - Sigma-Aldrich, Saint Luis, USA) misturada à ração oferecida aos animais (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil, acrescida de caseína a 15%), durante um período de 3 semanas (ADE). A porcentagem de adenina acrescentada à ração foi de 0,7% na primeira semana e de 0,5% nas duas semanas seguintes. Um grupo de animais que não recebeu adenina foi utilizado como controle (C).

Inibição crônica do sistema NF- κ B

Para impedir a ativação do sistema NF- κ B, um grupo de ratos que receberam dieta rica em adenina recebeu o composto pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), dissolvido na água do bebedouro a uma concentração de 0,5 mg/mL, correspondente a uma taxa média de ingestão de 120 mg/kg/dia.

Grupos experimentais e protocolo de estudo

Os seguintes grupos experimentais foram estudados:

- **C** (Controle): Dezesete ratos que receberam ração convencional, sem acréscimo de adenina ou PDTC.
- **ADE**: Dezesete ratos que receberam adenina acrescida à ração conforme descrito acima.
- **ADE+PDTC**: Quatorze ratos que receberam adenina e PDTC conforme descrito acima.

Figura 1. Esquema do protocolo experimental do estudo.

A Figura 1 mostra de modo esquemático o protocolo experimental que foi seguido neste estudo. Todos os animais foram acompanhados durante 3 semanas após o início dos tratamentos. Ao final desse período, avaliamos o peso corpóreo dos animais (PE), a albuminúria de 24 horas ($U_{alb}V$), o fluxo urinário (F_{Ur}) e a pressão caudal (PC), após breve aquecimento dos animais, utilizando o método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos). Em seguida, os animais foram anestesiados com ketamina (Cristália[®], 50 mg/kg) e calmiun (Agener União[®], 10 mg/kg) e amostras de sangue foram coletadas da aorta para medidas da concentração sérica de creatinina (S_{cr}) e potássio sanguíneo (K^+). O rim direito foi retirado, dividido em 4 porções iguais e congelado em nitrogênio líquido para extração protéica e de RNAm. O rim esquerdo foi perfundido a uma pressão igual à sistêmica, inicialmente com solução salina, para remover o sangue dos vasos e, a seguir, fixado *in situ* com uma solução de Duboscq-Brasil. Em seguida, o tecido renal foi dividido em 2 ou 3 segmentos coronais e pós-fixado em formaldeído a 10% diluído em tampão fosfato, sendo em seguida preparado para exame histológico e imuno-histoquímico, conforme técnicas descritas adiante.

Técnicas histológicas

Após desidratação, diafanização e impregnação em parafina utilizando um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica

Instruments GmbH, Alemanha), o tecido renal foi incluído em blocos de parafina e cortado em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha), produzindo secções de 4 µm de espessura que foram montadas sobre lâminas previamente silanizadas e coradas pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) e pelo Tricômio de Masson.

Para o processo de silanização, as lâminas foram colocadas em um banho de álcool 96° 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 1 dia.

Para o processo de coloração histoquímica, 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. Findo esse processo, iniciaram-se as colorações propriamente ditas.

Para a reação do Ácido Periódico de Schiff, 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 9g de metabissulfito de sódio a cada 100ml da solução) por 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) por 5 minutos.

Para a coloração com Tricrômio de Masson, as lâminas foram coradas por 10 minutos com hematoxilina férrica de Weigert, que consiste numa solução de hematoxilina diluída a 1% em etanol 95% e de uma solução aquosa de cloreto férrico 1,2%. Após serem lavadas em água destilada, as lâminas foram coradas com solução de escarlata de Biebrich (solução aquosa 0,9% de escarlata de Biebrich, 0,1% de fucsina ácida e 0,01% de ácido acético glacial) por 1 minuto. Após lavagem das lâminas com água destilada, seguiu-se a coloração com diferenciador de Masson (solução aquosa 2,5% de ácido fosfotúngstico e 2,5% de ácido fosfomolibdico) por 10 a 15 minutos e, em seguida, azul de anilina 2,5% acrescido de 2ml de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução. Após serem coradas, as lâminas foram desidratadas e diafanizadas com uma sequência de banhos em soluções de etanol com concentração crescente, seguidos de 3 banhos em xilol. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com permount.

Para a detecção de colágeno pela coloração de Picrosirius-Hematoxilina, utilizamos um *kit* disponível comercialmente (EasyPath, São Paulo, Brasil), após desparafinização em xilol por 5 minutos, hidratação em concentrações decrescentes de etanol e lavagem em água corrente. Após o procedimento recomendado pelo fabricante, os cortes de tecido renal foram desidratados, colocados em xilol e montados em lâminas adequadamente preparadas.

Histomorfometria renal

A quantificação da esclerose glomerular (%EG) foi realizada, em lâminas coradas pela reação de PAS, por meio da determinação da porcentagem de glomérulos apresentando lesões esclerosantes. Foram analisados 200 glomérulos por corte, sob aumento de 400X. Para a determinação do volume glomerular (V_G), avaliamos a área média do tufo glomerular (A_G) através do programa Image-Pro® Plus versão 7.0 para Windows® (Media Cybernetics, EUA). Para tanto, examinamos 50 glomérulos por animal, sob aumento de 400x, utilizando a fórmula: $V_G = 1,25 \times (A_G)^{3/2}$ [46]. A Fração do córtex renal ocupada pelo interstício (%INT) foi quantificada por um método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, em material corado pelo Tricômio de Masson, sob aumento de 100x, em um campo contendo 144 pontos [47]. A quantidade de granulomas e de cristais de 2,8-DHA no córtex renal, bem como a distribuição de cristais entre os lumes tubulares e o interstício, foram determinados em 25 campos microscópicos consecutivos em cortes corados pela reação de PAS, sob aumento de 100x. Para a determinação da porcentagem da córtex renal ocupada por colágeno (%COL), examinamos e fotografamos, sob luz polarizada, 8 campos consecutivos de cada lâmina. A %COL foi obtida com o auxílio de um processador de imagens (Image-Pro® Plus, versão 7.0 para Windows®, Media Cybernetics, EUA).

Técnicas de imuno-histoquímica

Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados em cortes histológicos de 4 μ m de espessura, montados sobre lâminas previamente silanizadas. Essas lâminas foram desparafinizadas e reidratadas através de aquecimento (em estufa a 60°C durante 30 minutos) seguido por uma bateria de banhos de xilol e etanol em concentrações decrescentes. Ao término desta sequência as lâminas foram mantidas em água destilada por no mínimo 5 minutos e, para recuperação antigênica, foram posteriormente submetidas a calor úmido, em solução de ácido cítrico 10 mM tamponado, em pH 6,0, a uma temperatura aproximada de 95°C, durante 30 minutos.

Para todos os marcadores utilizamos a solução salina tris-tamponada TBS (0,05 M de Tris e 0,15 M de cloreto de sódio pH 7,6) como tampão de lavagem. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

Os métodos utilizados para o estudo imuno-histoquímico foram APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina), Streptavidina AP (Estreptavidina-Fosfatase Alcalina), Streptavidina+HRP (Dako LSAB, Carpinteria, CA, EUA) Complexo N-Histofine™ +HRP (Nichirei, Tokio, Japão), descritos mais adiante.

Para a identificação de Macrófagos (MØ) através da detecção do antígeno citoplasmático ED-1, foi empregado o método APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina). Após desparafinização e exposição dos epítomos, as lâminas foram incubadas com soro não imune de coelho (Dako,

Dinamarca) por 30 minutos, a fim de bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário. Após esse bloqueio, o excesso de soro foi retirado das lâminas e estas foram incubadas com um anticorpo primário anti-ED-1 produzido em camundongos (Serotec, Oxford, Reino Unido), diluído na proporção de 0,5% em BSA, à temperatura de 4°C, por pelo menos 18h. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas com um anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho (Dako, Califórnia, EUA), durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com o complexo APAAP por 30 minutos (Dako, Califórnia, EUA) e, por fim, revelados em tempo variável com substrato cromogênico Fast-Red. Para o preparo deste último, utilizou-se uma solução de 1 mg de naftol AS-MX fosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 100µl de dimetilformamida, 4,9 ml de solução Tris 0,1 M de pH 8,2, 5 µl de levamisol 1 M e 5 mg de Fast Red. Esse substrato foi aplicado às lâminas à temperatura ambiente, em câmara úmida. A revelação das células positivas foi acompanhada ao microscópio e, para interrompê-la, as lâminas foram lavadas em TBS.

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. Para a detecção da α -actina, utilizou-se o método Streptavidina AP (Streptavidina Fosfatase Alcalina). Após desparafinização e exposição dos epítomos por aquecimento, os cortes foram incubados com soluções para bloqueio da biotina

endógena tecidual (Dako, Califórnia, EUA). Em seguida, as lâminas foram incubadas com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA), diluído a 2% em solução de leite desnatado a 2% em TBS, durante 30 minutos. Após a retirada do excesso de soro, os cortes foram incubados com o anticorpo anti- α -actina de músculo liso (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) produzido em camundongos, na proporção de 0,12% em BSA, à temperatura de 4°C, durante 18h. No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo produzido em cavalo (Vector Laboratories, Califórnia, EUA), respectivamente, por 45 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com o complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Dako, Califórnia, EUA) durante 30 minutos, sendo revelados com substrato cromogênico à base de Fast Red, como descrito anteriormente.

A identificação das células em atividade de proliferação foi realizada através da avaliação da presença do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Após a desparafinização e a recuperação antigênica, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena através de incubação com uma solução de Peróxido de Hidrogênio em Álcool Metílico durante 30 minutos. Os tecidos foram então submetidos a bloqueio de epítomos inespecíficos com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) diluído em uma solução de leite desnatado a 2% e, em seguida, incubados por 18 horas a 4°C com anticorpo anti-PCNA produzido em camundongos (Dako, Carpinteria, CA, EUA), também diluído, na proporção de 0,01%, em leite desnatado a 2%. No

dia seguinte foi aplicado o complexo Envision™ (Dako, Carpinteria, CA, EUA) sobre os tecidos e 30 minutos depois a revelação das lâminas foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA).

Após a reação, as células em atividade de proliferação (marcadas em marrom), foram quantificadas em 25 campos histológicos consecutivos localizados no córtex renal, em um aumento final de 200x. A densidade dessas células foi expressa em células/mm². As células positivas para E-caderina (proteína de adesão intercelular) foram identificadas de maneira semelhante. Após a desparafinização e a recuperação antigênica, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena conforme descrito anteriormente, seguido pelo bloqueio dos epítomos inespecíficos com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) diluído em solução de leite desnatado a 2%. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-E-caderina produzido em camundongos (Dako, California, EUA), diluído na proporção de 4% em BSA, à temperatura de 4°C, durante 18h. No dia seguinte foi aplicado o complexo Envision™ (Dako, Carpinteria, CA, EUA) sobre os tecidos e, 30 minutos depois, a revelação das lâminas foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA).

Análise da expressão gênica por RT PCR em tempo real

Extração e purificação do RNAm

Os tecidos renais foram retirados conforme descrito anteriormente, colocados em tubos de poliestireno de 1,5 ml (Eppendorf®) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A seguir, foi realizada a extração do RNA total utilizando o reagente Qiazol (QIAGEN) seguindo especificamente as instruções do manual do fabricante.

Fragmentos de aproximadamente 50-100 mg de rins congelados em nitrogênio líquido foram triturados com o homogenizador POLYTRON® (Kinematica, Luzern, Alemanha) e ressuspensos em 1 ml de TRizol (Invitrogen, EUA). O método utiliza solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, que lisa e dissolve componentes celulares mantendo a integridade do RNA. A cada tubo de 1 ml contendo o extrato de tecido macerado, adicionou-se 200 µl de clorofórmio e procedeu-se centrifugação a 12.000 g, 4°C para a obtenção de duas fases: uma rosa e outra incolor, na qual se concentra o RNA total. Essa fase incolor foi transferida para um novo tubo ao qual se adicionou 500 µl de isopropanol. Após nova centrifugação (a 12.000 g, 4°C) obtivemos um precipitado de RNA isolado que foi então ressuspensionado em água bidestilada livre de RNase e DNase (20-50 µL) (GIBCO).

Quantificação do RNA

Alíquotas de 1-2 μ L do RNA total de cada amostra de tecido renal foram quantificadas por meio da leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (THERMO Scientific, EUA), nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A concentração de RNA foi calculada automaticamente pelo software integrado ao espectrofotômetro. Finalmente, a pureza do RNA foi determinada pela razão das absorbâncias 230nm, 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280} e $A_{260}/230$), considerando de boa qualidade as amostras cuja razão situou-se entre 1,8 e 2.

Visualização da integridade do RNA em gel de agarose

Para verificar a qualidade das amostras de RNA foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. Para a montagem do gel 100 mL de água mili-Q foram colocados em um “Erlenmeyer” de 50 mL, adicionando-se em seguida 1 g de agarose (GIBCO, NY, USA). A mistura foi aquecida e transferida para uma forma (BIO-RAD, laboratories). Posteriormente, foram adicionados 2 μ L de solução de Brometo de etídeo 1 mg/mL (PHARMACIA-Biotech, EUA), deixando-se a solução esfriar à temperatura ambiente.

Após a solidificação, o gel foi colocado em uma cuba eletroforética horizontal (BIO-RAD, laboratories) com tampão TAE 1X [24,2 g TRIS] (AMERSHAM-biosciences, EUA), 5,75 mL de ácido acético (MERCK, EUA), 5 mM de EDTA (AMERSHAM-biosciences, EUA) e 100 mL de H₂O mili-Q. Para cada amostra de RNA, foi adicionado o mesmo volume (v/v) de tampão da uma solução estoque: 1 mL TRIS-HCL 1 M, 20 mL de SDS (PHARMACIA-Biotech,

EUA), 0,5 g de sacarose (MERCK, EUA), 60 µL de ortovanato de sódio 0,1 M (CALBIOCHEM, EUA), 10 mg do azul de bromofenol (SIGMA-Aldrich, EUA) e 20 mL de água mili-Q, aplicando-se a mistura foi aplicada a um gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada a 80 Volts, durante 30 min. Ao término da corrida eletroforética o gel foi exposto à luz ultra violeta para aquisição das imagens.

Somente as amostras com alta concentração de RNAs e com boa qualidade, ou seja, sem vestígios de degradação, foram utilizadas para as reações de RT-PCR em tempo real.

Síntese de cDNA

A análise da expressão gênica envolveu duas etapas: 1ª) Realização da síntese do cDNA a partir de aproximadamente 3 µg de RNA total; 2ª) Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit* M-MLV Reverse Transcriptase reaction (PROMEGA), seguindo estritamente as recomendações do fabricante. O RNAm foi separado do RNA total através da utilização de primers Oligo-dT (Invitrogen) que se ligam à cauda poli-A do RNAm. Uma alíquota de 2-4 µg de RNA total foi tratada com DNase I (1U/mL) e incubada por 15 minutos a 25°C. Adicionamos a seguir 2 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ *Primer** (0,1mg/ml) e incubamos a mistura a 65°C por 10 minutos e, em seguida, por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, adicionamos 1 µl de BSA Acetilada (20mg/mL) (Promega, Madison, WI, EUA); 10 µl de 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen); 10 µl de

desoxinucleotídeo trifosfato 10 mM (dNTP Promega) e 2 µl de M- MLV *Reverse Transcriptase* (200 U/ml - PROMEGA). Essa solução foi incubada a 37°C por 1 hora, com posterior incubação a 65°C por 10 minutos e 4°C por 5 minutos.

Para cada amostra testada foi realizado um controle negativo, ou seja, as reações foram realizadas na ausência da transcriptase reversa.

RT-PCR em tempo real

O nível de expressão gênica das amostras foi mensurado pela técnica de RT-PCR em tempo real utilizando dois sistemas distintos. O primeiro consiste no sistema *TaqMan* e o segundo no método *SYBER Green*. Para amplificar os transcritos gênicos, utilizamos *primers* TaqMan, pré-sintetizados especificamente para cada gene (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Por outro lado, para o sistema *SYBER Green*, os *primers* foram projetados baseando-se na seqüência conhecida de bases nitrogenadas descritas no GenBank, sendo posteriormente adequados pelo programa Primer Express da *Applied Biosystems* à técnica de PCR em tempo real. Cada reação foi realizada em triplicata com volume final de 10 µl. Para reações nas quais utilizamos primers TaqMan, adicionamos 5 µl de TaqMan Master Mix, 0,5 µl de primer e 1 µl de cDNA, completando com água até 10 µl. Para as reações do tipo *SYBER Green*, utilizamos o mesmo protocolo, substituindo o reagente TaqMan master Mix pelo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido) sendo que, neste caso, as condições de amplificação foram previamente padronizadas para cada transcrito. Em cada ensaio, foram utilizados controles

negativos (água ao invés de cDNA). A reação foi realizada em aparelho ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystem).

Todos os ensaios foram executados em triplicata para demonstrar a reprodutibilidade das curvas de amplificação. Para as reações de real time PCR o gene endógeno utilizado foi o HPRT.

A curva de dissociação dos produtos amplificados para a determinação da temperatura de “melting” dos mesmos e avaliação da qualidade da amostra foi traçada para todos os genes em que foi utilizado o sistema SYBER green.

Finalmente, os resultados foram analisados pelo método URE de quantificação relativa [48] utilizando o software SDS (APPLIED Biosystems) e a fórmula $ddCt = 10.000/2^{\Delta dCt}$. A lista dos genes e a sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho encontra-se disponível na tabela abaixo.

Tabela 1. Tabela representativa dos genes e seus correspondentes iniciadores usados para análise de expressão gênica comparativa.

<i>GENE</i>	<i>SISTEMA</i>	<i>SEQUÊNCIA</i>
<i>IL-6</i>	<i>Taq-Man</i>	Rn00561420_m1
<i>IFN-γ</i>	<i>Taq-Man</i>	Rn00594078_m1
<i>HPRT</i>	<i>Taq-Man</i>	Rn01527838_g1
<i>FSP-1</i>	<i>SYBER Green</i>	<i>F</i> 5'-ATACTCAGGCAACGAGGGTGACA -3' <i>R</i> 5'-GTCCCTGTTGCTGTCCAAGTTGTT -3'
<i>MCP-1</i>	<i>SYBER Green</i>	<i>F</i> 5'-TGCCCACTCACCTGCTGCT -3' <i>R</i> 5'-TGGGGTCAGCACAGATCTCTCTCT -3'
<i>HPRT</i>	<i>SYBER Green</i>	<i>F</i> 5'-CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C-3' <i>R</i> 5'-GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C -3'

Análise da expressão de proteínas por Western Blot

Para a detecção de proteínas, as amostras de rim foram picadas e lisadas com tampão RIPA (50 mM TrisHCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS), contendo inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche Applied Science) utilizando o aparelho Precellys. O teor protéico desse foi determinado utilizando o *kit “Lowry Protein Assay”* (Bio-Rad) seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra, foram utilizados 50 µg de proteína do extrato tecidual para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), que se completou em 1 hora e 30 minutos a 80 Volts (Biorad). Em seguida, o gel foi transferido a uma membrana de nitrocelulose (Biorad), durante 1 hora a 80 Volts. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente em uma solução de leite desnatado a 5% em TBST (Tris HCl 20 mM, NaCl 136 mM, 0,05% Tween 20, pH 7.6). Após o bloqueio, foi realizada a incubação da membrana com os anticorpos primários, diluídos em uma solução de BSA a 5% em TBS (Tris HCl 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7.6), nas seguintes proporções; β -Actina: 1/1000 (Sigma) e IKK- α :1/1000 (Santa Cruz). As incubações tiveram duração aproximada de 18 horas e foram realizadas a temperatura de 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com solução de TBS por 10 minutos e incubada com o anticorpo secundário (Anti-mouse peroxidase: 1/5000, Sigma), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 15 minutos com TBS Tween 20 (0,05%). Em seguida a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizado o *Kit ECL* e as imagens foram registradas

com o aparelho GEN-BOX. Foram utilizados os programas GeneSnap (Syngene, EUA) e Ferramentas de Gene (Syngene, EUA) para identificar, analisar e quantificar as bandas.

Técnicas de análise bioquímica

A concentração de creatinina sérica foi determinada por meio de uma técnica colorimétrica, utilizando um *kit* de análise comercializado pela Labtest Diagnóstica S.A (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As concentrações plasmáticas de potássio foram determinadas em um analisador de eletrólitos (Modelo 9140, AVL Medical Instruments, Schaffhasue, Suíça). A concentração urinária de albumina foi medida utilizando a técnica de imunodifusão radial [49].

Análise Estatística

Os resultados deste estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator com comparações pareadas entre grupos pelo método de Newman-Keuls [50]. Para a comparação do número de cristais de 2,8-DHA e granulomas entre os Grupos C e ADE, utilizamos o teste de *t* de Student para amostras não pareadas. Todos os resultados foram representados como Média±Erro Padrão (EP).

3. RESULTADOS

Alterações estruturais causadas pela precipitação de cristais

A Fig. 2 (A a R) mostra microfotografias representativas das principais alterações morfológicas induzidas pela precipitação intratubular de cristais em ratos com sobrecarga de adenina durante 3 semanas. A Fig. 2-A traz o aspecto geral do córtex renal nesses animais, com a presença de numerosos cristais, localizados no interior dos túbulos ou no interstício, dilatação tubular generalizada e expansão da área intersticial. As alterações glomerulares são mínimas. Na Fig. 2-B o córtex renal aparece corado pelo tricrômico de Masson para melhor visualização da área intersticial, onde além de expansão é possível observar aumento da matriz extracelular e inflamação intensa, frequentemente assumindo a forma de granulomas (setas). O acúmulo de colágeno no interstício cortical desses animais foi tornado evidente por meio da coloração de Picrosirius (Fig. 2-C). Na Fig. 2-D está representado um granuloma tipicamente encontrado na região intersticial de ratos que receberam ADE, formado ao redor de um desses cristais por células mononucleares, células gigantes multinucleadas e, perifericamente, células alongadas. Na Fig. 2-E pode-se observar que um grande contingente dessas células, incluindo as gigantes, é formado por macrófagos, detectados por imuno-histoquímica. Na Fig. 2-F fica evidente que as células alongadas dispostas na periferia do granuloma são miofibroblastos, uma vez que estão marcadas positivamente para α -actina. Nas Figuras 2-G a 2-I é possível

Figura 2. Alterações estruturais induzidas pela presença de cristais. A) Aspecto geral do córtex renal, observando-se expansão intersticial e numerosos cristais (PAS, x100). B) Granulomas (setas) e aumento da matriz extracelular no interstício cortical (Masson, x100). C) Deposição intersticial de colágeno em tecido renal corado pela técnica do Picrosirius e observado em luz polarizada (x200). A imagem foi processada em Adobe®, PhotoShop, versão 8.0.1, para aumentar a visibilidade das fibras de colágeno e diminuir a dos cristais, que brilham intensamente sob luz polarizada. D) Granuloma intersticial ao redor de um cristal, contendo células gigantes multinucleadas (setas) (PAS, x400). E) Granuloma intersticial contendo numerosos macrófagos (IHQ para ED-1, x400). F) Granuloma intersticial contendo numerosos miofibroblastos em sua periferia (IHQ para α -actina, x400). G) Camada celular envolvendo um cristal e isolando-o do lume tubular. Observe-se a presença de uma nova membrana basal (seta). PAS, x400. H) A membrana basal original se rompeu e o cristal encontra-se diretamente exposto ao interstício. PAS, x400. I) A membrana basal original desapareceu e o cristal parece ter sido “expulso” do túbulo onde se originou. PAS, x400. J a O) IHQ para ED-1 (J, K e L) e α -actina (M, N e O), mostrando a participação de macrófagos e miofibroblastos, respectivamente, nas etapas ilustradas nas Figs. G, H e I. x400. P a R. IHQ para PCNA, mostrando a presença de proliferação celular no córtex renal como um todo (P, x200), nos granulomas (Q, x400) e nas células tubulares que circundam os cristais (R, x400).

observar, em ordem crescente de complexidade, as reações das células tubulares à presença de cristais. Na mais simples delas (Fig.2-G), o precipitado está envolvido por uma camada de células, das quais está separado por uma estrutura semelhante à membrana basal tubular, o que foi confirmado com coloração pela prata (não mostrado). Na Fig. 2-H, a membrana basal tubular original se rompeu parcialmente, expondo o cristal diretamente ao interstício, onde se nota a presença de um infiltrado inflamatório. Na Fig. 2-I, restam apenas vestígios da membrana basal original e a formação celular inicial parece ter formado um “remendo” na parede tubular, fazendo com que o cristal, que parece ter sido “expulso” do túbulo, se encontre plenamente localizado no interstício, já parcialmente envolvido por células inflamatórias. Nas Figs. 2-J a

2-O, é possível observar que, nas três etapas exemplificadas, ocorre uma intensa infiltração junto aos cristais por macrófagos (J a L) e miofibroblastos (M a O). Na Fig. 2-P, a difusa marcação positiva para o PCNA no córtex renal indica a presença de proliferação celular nos túbulos e no interstício. Esse processo é particularmente acentuado nos granulomas intersticiais, como pode ser observado na Fig. 2-Q. As células que recobrem os cristais, isolando-os do lume tubular, também se mostram positivas para o PCNA, indicando que também elas se encontram em proliferação, conforme exemplificado na Fig. 2-R. No exemplo representado na Fig. 3, fica claro que essas células estão marcadas positivamente para E-caderina, indicando serem originárias do próprio epitélio tubular.

Figura 3. Exemplo de estrutura celular formada ao redor dos cristais intratubulares, isolando-os do lume. As células que constituem essa estrutura estão marcadas positivamente para E-caderina, demonstrando sua natureza epitelial e sua provável origem a partir do próprio túbulo. O cristal foi removido durante o processamento do tecido para IHQ x200.

Efeito do tratamento com o PDTC

Conforme observado anteriormente [15], o peso corpóreo ao final do estudo foi limitado nos ratos que receberam excesso de adenina (314 ± 4 no grupo C vs 214 ± 4 no grupo ADE, $p < 0.05$), o que não foi alterado pelo tratamento com o PDTC (214 ± 4 no grupo ADE vs 202 ± 4 no grupo ADE+PDTC, $p > 0.05$). A sobrecarga de adenina não alterou a PC (121 ± 2 no grupo C vs 130 ± 4 no grupo ADE, $p > 0.05$) ou a $U_{alb}V$ (4 ± 1 no grupo C vs 5 ± 1 no grupo ADE, $p > 0.05$). O tratamento com o PDTC não modificou esses parâmetros (130 ± 4 no grupo ADE vs 132 ± 3 no grupo ADE+PDTC, $p > 0.05$; 5 ± 1 no grupo ADE vs 3 ± 1 no grupo ADE+PDTC, $p > 0.05$).

A Tabela 2 traz os resultados obtidos para os principais parâmetros fisiológicos e morfométricos medidos ao final do estudo. O fluxo urinário elevou-se nos animais que receberam adenina na dieta, enquanto o tratamento com PDTC não preveniu esse aumento.

Tabela 2. Resultados após 3 semanas de tratamento.

	F_{Ur}	S_{cr}	PR/PE	V_G	%INT	%COL	PCNA
C (N=17)	29±2	0.6±0.1	0.5±0.1	0.85±0.03	0.2±0.1	0.3±0.1	30±2
ADE (N=17)	60±3 ^a	2.8±0.1 ^a	1.3±0.1 ^a	0.58±0.02 ^a	20.0±1.1 ^a	3.9±0.4 ^a	1178±111 ^a
ADE+PDTC (N=14)	53±4 ^a	1.5±0.2 ^{ab}	1.0±0.1 ^{ab}	0.68±0.02 ^{ab}	9.0±1.2 ^{ab}	2.0±0.2 ^{ab}	720±62 ^{ab}

Fluxo urinário (F_{Ur}, mL/min), creatinina sérica (S_{cr}, mg/dL), peso renal/peso corpóreo (PR/PE), volume glomerular (V_G, x10⁶µm³), área interstício cortical (%INT, %), área ocupada por colágeno (%COL, %) e proliferação túbulo-intersticial (PCNA, células/mm²) nos Grupos C, ADE e ADE+PDTC. Resultados expressos como Média±EP. (^ap<0,05 vs C, ^bp<0,05 vs ADE).

A concentração sérica de creatinina mostrou-se acentuadamente elevada nos ratos tratados com adenina, indicando queda correspondente da função renal. O tratamento com o PDTC atenuou fortemente a retenção de creatinina, sem no entanto chegar a normalizar seu nível sérico. A administração de adenina resultou em aumento acentuado do peso renal, o que também foi atenuado pelo tratamento com o PDTC. O volume glomerular diminuiu significativamente no Grupo ADE em relação ao controle, o que foi parcialmente prevenido no Grupo ADE+PDTC. Em consonância com o observado na Fig. 2, a porcentagem da área cortical ocupada pelo interstício intersticial mostrou-se acentuadamente elevada nos ratos que receberam sobrecarga de adenina, enquanto a análise quantitativa do tecido corado pela técnica do Picrosirius confirmou a existência de um acúmulo de colágeno no

tecido renal desses animais. Mais uma vez, o tratamento com o PDTC mostrou-se capaz de atenuar a doença renal, reduzindo drasticamente a inflamação e a deposição intersticial de colágeno. Finalmente, a proliferação celular, demonstrada por meio da detecção do PCNA, aumentou marcadamente no Grupo ADE, enquanto o tratamento com o PDTC reduziu acentuadamente essa atividade proliferativa.

Na Fig. 4-A a distribuição de cristais no tecido renal do grupo ADE é comparada à verificada no Grupo ADE+PDTC. É possível observar que, no Grupo ADE, os cristais se localizam em proporções comparáveis no interior dos túbulos e na região intersticial, neste último caso principalmente no centro de granulomas, enquanto no Grupo ADE+PDTC a grande maioria dos cristais se encontra no lume dos túbulos. Essa impressão visual é confirmada pela contagem dos cristais (Fig. 4-B). Digno de nota é o fato de que a quantidade total de cristais é semelhante nos dois grupos, indicando que o efeito do PDTC não se deveu a uma redução do número de cristais. Em consistência com essas observações, uma quantidade expressiva de granulomas foi observada no Grupo ADE, enquanto o tratamento com o PDTC reduziu drasticamente o número dessas formações (Fig. 4-C).

Figura 4. A) Presença de cristais no córtex renal. No Grupo ADE, a maior parte dos cristais encontra-se no interstício, principalmente no centro de granulomas. No Grupo ADE+PDTC, a maior parte dos cristais se localiza no interior dos túbulos. PAS, 100x. B) Análise quantitativa dos cristais (por mm²) observados na Fig. 4-A, mostrando maior proporção de cristais intratubulares (em cinza) no Grupo ADE+PDTC. C) Análise quantitativa (por mm²) dos granulomas/mm² presentes nos Grupos ADE e ADE+PDTC. (*p<0,05 vs ADE).

Figura 5. A) Análise por Western Blot da abundância da IKK no tecido renal, usando a β -actina como controle *housekeeping*. B) Quantificação densitométrica das bandas expressas na Fig. 5-A. (^ap<0,05 vs C, ^bp<0,05 vs ADE, ED, escore densitométrico).

Na Figura 5-A, a abundância da IKK- α , indicativa de ativação do sistema NF- κ B, é demonstrada por meio da técnica do *Western Blot*. Pouco visível nos animais controle, a IKK- α aparece em bandas densas no Grupo ADE, enquanto no Grupo ADE+PDTC essas bandas se mostram rarefeitas e comparáveis às observadas nos ratos normais. A quantificação dessas bandas por densitometria é mostrada em forma gráfica na Fig. 5-B, na qual as diferenças apontadas são mais claramente visíveis.

Figura 6. Análise por RT-PCR da expressão de IL-6 (A), IFN- γ (B), FSP-1 (C) e MCP-1 (D). ^ap<0,05 vs C, ^bp<0,05 vs ADE.

Na Fig. 6 estão representadas as expressões no tecido renal, determinadas por meio da técnica de PCR, de quatro importantes mediadores inflamatórios, a interleucina-6, IL-6 (Fig. 6-A), o interferon- γ , IFN- γ (Fig. 6-B), a proteína específica para fibroblastos, FSP-1 (Fig. 6-C) e a proteína quimiotática para macrófagos, MCP-1 (Fig. 6-D). A expressão renal de cada uma dessas

moléculas aumentou em várias vezes no Grupo ADE em relação ao controle, sendo atenuada, e até mesmo normalizada, no caso do IFN- γ , pelo tratamento com o PDTC.

4. DISCUSSÃO

Conforme esperado, os ratos tratados com ADE mostraram profundas alterações da função renal, com grande aumento do peso renal, elevação acentuada da concentração sérica de creatinina e poliúria, indicando dificuldade em concentrar a urina. Apesar dessas alterações, não verificamos aumento da albuminúria ou da pressão arterial, provavelmente como reflexo da natureza da lesão estrutural renal observada nesse modelo, que consiste basicamente em expansão e inflamação intersticial, com formação de granulomas e deposição de colágeno, mas com pouco ou nenhum dano aos tufo glomerulares, embora o volume destes tenha diminuído.

Os mecanismos que levam à intensa expansão/inflamação intersticial e ao declínio de função renal em ratos com sobrecarga de adenina ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que os cristais de 2,8-DHA formam-se no interior do lume tubular, o que pode ocorrer em vários segmentos do néfron, conforme demonstrado anteriormente [11, 15, 51, 52], e que esse processo se continua com a infiltração do tecido renal por macrófagos, com o aparecimento de células gigantes multinucleadas e, por fim, com a formação de granulomas [16, 17, 45]. No entanto, não se conhecem os eventos que levam da precipitação intratubular inicial à grave inflamação intersticial característica do modelo. É possível que um primeiro passo nessa sequência seja a obstrução de um grande número de túbulos pelos cristais, o que também ajudaria a explicar o comprometimento da função renal [16, 53]. Encontramos, no presente estudo, alguns perfis tubulares

cujo lume estava inteiramente ocupado por cristais, frequentemente cercados por macrófagos e miofibroblastos, corroborando estudos anteriores [16, 20]. Além disso, verificamos a presença de dilatação tubular generalizada, mais uma vez em confirmação a observações anteriores [16], indicando ser esse um possível mecanismo de lesão estrutural e comprometimento funcional nesse modelo. No entanto, foi mais frequente no presente estudo: o achado de que os cristais de 2,8-DHA aparecem frequentemente rodeados por um “neoepitélio” aparentemente originado do próprio epitélio tubular, sem que o lume se mostrasse ocluído pelo precipitado. O exame minucioso dessas formações e das estruturas vizinhas, associado a algumas observações da literatura, levam-nos a propor uma sequência de eventos que podem ajudar a entender melhor a patogênese da nefrite intersticial crônica associada à sobrecarga de adenina. De acordo com essa concepção, logo após a precipitação dos cristais junto à parede tubular, os mesmos são rodeados por células cujas características morfológicas lembram as de células epiteliais e que em alguns casos apresentam-se positivas para E-caderina, sugerindo serem oriundas do próprio segmento do néfron em que ocorreu a formação dos cristais. Em paralelo à formação dessa estrutura, macrófagos e miofibroblastos aparentemente provenientes do interstício renal infiltram a região e também cercam o cristal. Com o tempo, ainda de acordo com essa postulação, as células tubulares que fazem contato com o cristal sofrem um processo de desestruturação [15], apoptose [54] ou necrose, talvez por internalizar parte do precipitado [55], talvez pela própria ação mecânica do mesmo. O próximo passo nessa sequência é a ruptura da membrana basal

tubular [15]. Dessa maneira, abre-se o caminho para que os mesmos ganhem o interstício, após o que o epitélio se reconstrói, formando uma nova membrana basal e “segregando” os cristais. Uma vez no interstício, estão dadas as condições plenas para que se organizem os extensos granulomas que caracterizam o modelo [16, 45], envolvendo miofibroblastos e macrófagos, que continuam a rodear os cristais, inclusive com a formação de células gigantes multinucleadas. Essa hipótese, baseada essencialmente nas imagens que sugerem a sequência proposta, é consistente com o achado de que a maior parte dos cristais observada no tecido renal se encontra fora dos túbulos, embora a precipitação inicial ocorra no lume tubular [11, 15, 53]. Esse mecanismo assemelha-se ao proposto para a patogênese da nefrocalcinose [19], sugerindo existir um denominador comum para as reações do tecido renal à formação de precipitados de qualquer natureza.

O significado da intensa proliferação túbulo-intersticial observada nos ratos que receberam sobrecarga de adenina é incerto, podendo refletir regeneração tubular [56], transdiferenciação epitélio-mesenquimal [20] ou mesmo multiplicação local de células inflamatórias [57]. De grande importância é o achado de que as células que recobrem os cristais também se apresentam em intensa atividade proliferativa, em consonância com a hipótese de que essas células são oriundas do próprio epitélio tubular, também elas marcadas positivamente para o PCNA.

O intenso ambiente inflamatório associado à sobrecarga de adenina, necessário ao início e propagação dos fenômenos que a acompanham, é evidenciado pela expressão aumentada, no interstício renal, de mediadores

conhecidos, como IL-6, IFN- γ e MCP-1 , assim como pela intensa infiltração por macrófagos, especialmente nas proximidades dos cristais, e por miofibroblastos, sugerindo a possível participação nesse processo da transformação epitélio-mesenquimal [20]. Um achado importante do presente estudo, que vem confirmar nossas observações anteriores em camundongos [21], é o de que a expressão do IKK- α , uma quinase que fosforila a unidade inibidora do heterotrímero I- κ B-p65-p50, também está aumentada nos ratos que receberam excesso de adenina, indicando ativação do sistema NF- κ B. Esse sistema, que constitui parte importante da imunidade inata, responde a vários estímulos, incluindo o acúmulo de espécies ativas de oxigênio [58], a presença de angiotensina II [59] e a ativação de TLRs [45]. É provável que a presença de cristais também acabe por estimular indiretamente o sistema NF- κ B através de componentes de um dos inflamassomas, o NLRP3 [60]. É possível que a ativação do sistema NF- κ B nas células tubulares as tenha levado a expressar uma série de citocinas e moléculas de adesão, promovendo assim a afluência maciça de células inflamatórias e a intensificação e progressão do processo [61]. Por outro lado, os próprios mediadores inflamatórios podem promover a ativação do NF- κ B, em um processo de realimentação positiva [61, 62]. É interessante notar que a formação de granulomas em outros tecidos e em decorrência de outros processos patológicos também envolve a ativação do sistema NF- κ B, indicando ser esse mecanismo comum a processos inflamatórios em geral [63].

A importância da ativação do sistema NF- κ B nos ratos que receberam excesso de adenina fica ainda mais evidente quando examinamos o acentuado efeito protetor obtido com o tratamento com o PDTC. Esse composto claramente bloqueou a ativação do sistema NF- κ B, conforme indicado pela queda acentuada da expressão do IKK- α , embora não seja possível discernir, com base nos dados do presente estudo, se essa inibição decorreu exclusivamente de um efeito direto ou se foi também mediada por uma ação antioxidante do PDTC [41-43]. O tratamento com o PDTC não alterou parâmetros sistêmicos como peso corpóreo, pressão arterial ou fluxo urinário, mas atenuou fortemente o aumento do peso renal, a expansão intersticial e a deposição de colágeno, além de melhorar a função renal nos animais que receberam excesso de adenina. O tratamento com o PDTC também atenuou a contração dos glomérulos, provavelmente em decorrência de menor vasoconstrição renal, em analogia com observações anteriores em outros modelos experimentais [39]. No entanto, os efeitos mais conspícuos do tratamento com o PDTC foram observados no interstício renal, que teve sua expansão fortemente limitada, enquanto o número de granulomas e a expressão de mediadores inflamatórios foram acentuadamente diminuídos. Esses efeitos foram observados sem que o total de cristais presentes no tecido renal fosse alterado. No entanto, o tratamento com o PDTC atenuou fortemente o deslocamento de cristais dos túbulos ao interstício, indicando que o conjunto de processos que conduz da adesão dos cristais às paredes tubulares à formação de granulomas necessita da ativação do sistema NF- κ B para se desenvolver.

É importante observar que, embora a inflamação renal provocada pelo excesso de adenina tenha sido fortemente atenuada pelo tratamento com o PDTC, quase todos os parâmetros inflamatórios observados permaneceram elevados em relação ao controle, indicando que, apesar de sua participação inegavelmente importante, o sistema NF- κ B não é o único a ser ativado nesse processo. Deve-se lembrar, nesse sentido, que em estudos anteriores com o modelo de excesso de adenina foi possível demonstrar um aumento da expressão e da produção de TLR4 [45]. De outro lado, o pleno funcionamento de inflamassomas pode por sua vez necessitar da ativação do sistema NF- κ B [64], ilustrando a complexa e recíproca interação entre esses dois componentes da imunidade inata. Em consistência com esses achados, demonstramos anteriormente que a inativação dos genes que codificam os TLRs 2 e 4, assim como várias moléculas que participam da montagem do inflamassoma NLRP3, promove renoproteção em camundongos submetidos a sobrecarga de adenina [21]. Em seu conjunto, essas observações indicam que a reação inflamatória à precipitação intratubular de adenina envolve a ativação integrada da imunidade inata como um todo, ajudando a explicar por que a inibição de qualquer dessas vias atenua tão fortemente esse processo.

Em resumo, a NI associada à sobrecarga de adenina é um processo multifatorial, que compreende profundas alterações fenotípicas de células tubulares, um complexo deslocamento de cristais do lume tubular ao interstício e a ativação do sistema NF- κ B. A inibição deste último atenua em grande parte os

fenômenos inflamatórios e a perda de função renal associados a esse processo, mas o fato de que tal proteção é incompleta corrobora achados anteriores de que outros aspectos da imunidade inata são igualmente importantes para que o processo se desenvolva.

5. CONCLUSÕES

- 1) Os cristais de 2,8-DHA, de início intratubulares, deslocam-se ao interstício, em um processo complexo que pode envolver a oclusão completa do túbulo ou, mais frequentemente, a formação de um neoepitélio que segrega essas formações do lume tubular.
- 2) Uma vez no interstício, esses cristais promovem um intenso processo inflamatório, com a produção de mediadores e o recrutamento de macrófagos e miofibroblastos, culminando com a formação de extensos granulomas.
- 3) O sistema NF- κ B contribui substancialmente para o desenvolvimento desse processo, que no entanto necessita também da ativação de outros mecanismos ligados à imunidade inata.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zatz R, Romao JE, Jr. End-stage renal failure and national resources: the Brazilian experience. *Ren Fail* 2006; 28: 627-629.
2. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Exp Nephrol* 1996; 4 Suppl 1: 34-40.
3. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991; 39: 550-556.
4. Bohle A, Christ H, Grund KE, *et al.* The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 1979; 16: 109-114.
5. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2495-2508.
6. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, *et al.* Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1359-1368.
7. Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, *et al.* Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1967-1974.
8. Zhang G, Moorhead PJ, el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 1995; 3: 308-318.

9. Ketteler M, Noble NA, Border WA. Increased expression of transforming growth factor-beta in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: 446-452.
10. Coupris L, Champion G, Duverne C, *et al.* [2,8-dihydroxyadenine lithiasis. 2 new pediatric cases of an unknown metabolic deficit. The use of extracorporeal lithotripsy]. *Chir Pediatr* 1990; 31: 26-31.
11. Philips FS, Thiersch JB, Bendich A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2,8-dioxyadenine in renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 1952; 104: 20-30.
12. Wyngaarden JB, Dunn JT. 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1957; 70: 150-156.
13. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, *et al.* Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5307-5312.
14. Redhead NJ, Selfridge J, Wu CL, *et al.* Mice with adenine phosphoribosyltransferase deficiency develop fatal 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1491-1502.
15. Story DL, Shrader RE, Theriault LL, *et al.* Effects of dietary protein, adenine, and allopurinol on growth and metabolism of rats. *J Nutr* 1977; 107: 1044-1052.
16. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, *et al.* Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 1986; 44: 230-234.

17. Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H, *et al.* Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 651-659.
18. Ataka K, Maruyama H, Neichi T, *et al.* Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am J Nephrol* 2003; 23: 315-323.
19. Vervaet BA, Verhulst A, D'Haese PC, *et al.* Nephrocalcinosis: new insights into mechanisms and consequences. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2030-2035.
20. Tamura M, Aizawa R, Hori M, *et al.* Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. *Histochem Cell Biol* 2009; 131: 483-490.
21. 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.
22. Wang L, Raikwar N, Deng L, *et al.* Altered gene expression in kidneys of mice with 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Kidney Int* 2000; 58: 528-536.
23. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983.

24. Anders HJ, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1007-1018.
25. Goncalves 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.
26. Taniguchi S, Sagara J. Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 231-238.
27. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, *et al.* The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10: 241-247.
28. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, *et al.* Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 1995; 48: 1263-1271.
29. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, *et al.* Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol* 1998; 161: 430-439.
30. 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.

31. Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 98: 100-103.
32. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, *et al.* NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000; 35: 193-201.
33. Spink J, Cohen J, Evans TJ. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270: 29541-29547.
34. 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.
35. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, *et al.* NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1254-1262.
36. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
37. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, *et al.* Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 2001; 60: 1366-1377.
38. 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.

39. 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.
40. Gong R, Rifai A, Tolbert EM, *et al.* Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2868-2881.
41. Elks CM, Mariappan N, Haque M, *et al.* Chronic NF- κ B blockade reduces cytosolic and mitochondrial oxidative stress and attenuates renal injury and hypertension in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F298-305.
42. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, *et al.* Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 51-57.
43. Tapia E, Sanchez-Gonzalez DJ, Medina-Campos ON, *et al.* Treatment with pyrrolidine dithiocarbamate improves proteinuria, oxidative stress, and glomerular hypertension in overload proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1431-1439.
44. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1866-1874.

45. Oyama Y, Hashiguchi T, Taniguchi N, *et al.* High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy. *Lab Invest* 2010; 90: 853-866.
46. Hirose K, Osterby R, Nozawa M, *et al.* Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int* 1982; 21: 689-695.
47. 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.
48. Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, *et al.* Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood* 2003; 102: 3333-3339.
49. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-254.
50. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980; 47: 1-9.
51. Brule D, Sarwar G, Savoie L, *et al.* Differences in uricogenic effects of dietary purine bases, nucleosides and nucleotides in rats. *J Nutr* 1988; 118: 780-786.

52. Evan AP, Bledsoe SB, Connors BA, *et al.* Sequential analysis of kidney stone formation in the Aprt knockout mouse. *Kidney Int* 2001; 60: 910-923.
53. Morishita Y, Ohnishi A, Watanabe M, *et al.* Establishment of acute kidney injury mouse model by 0.75% adenine ingestion. *Ren Fail* 2011; 33: 1013-1018.
54. Shuvy M, Nyska A, Beerli R, *et al.* Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63: 303-306.
55. Schepers MS, van Ballegooijen ES, Bangma CH, *et al.* Crystals cause acute necrotic cell death in renal proximal tubule cells, but not in collecting tubule cells. *Kidney Int* 2005; 68: 1543-1553.
56. Duffield JS, Bonventre JV. Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury. *Kidney Int* 2005; 68: 1956-1961.
57. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, *et al.* Local macrophage proliferation in multinucleated giant cell and granuloma formation in experimental Goodpasture's syndrome. *Am J Pathol* 1995; 147: 1214-1220.
58. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1493-1505.

59. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, *et al.* Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int* 2002; 61: 1986-1995.
60. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.
61. Li Q, Liu BC, Lv LL, *et al.* Monocytes induce proximal tubular epithelial-mesenchymal transition through NF-kappa B dependent upregulation of ICAM-1. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1585-1592.
62. Wang L, Walia B, Evans J, *et al.* IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* 2003; 171: 3194-3201.
63. Sakai Y, Uchida K, Nakayama H. A20 and ABIN-3 possibly promote regression of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)-induced granuloma by interacting with an NF-kappa B signaling protein, TAK-1. *Inflamm Res* 2012; 61: 245-253.
64. 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.