Amanda Helen Albino

**Resposta imune inata na doença renal crônica que se segue à
recuperação de uma lesão renal aguda induzida por gentamicina**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo

2020

Amanda Helen Albino

**Resposta imune inata na doença renal crônica que se segue à
recuperação de uma lesão renal aguda induzida por gentamicina**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Albino, Amanda Helen

Resposta imune inata na doença renal crônica que se segue à recuperação de uma lesão renal aguda induzida por gentamicina / Amanda Helen Albino. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Nefrologia.

Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.Gentamicina 2.Lesão renal aguda 3.Imunidade inata 4.Insuficiência renal crônica 5.NF-kappa B 6.Inflamassoma NLRP3

USP/FM/DBD-148/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico essa dissertação à minhas
queridas avós Inês e Maria e ao meu
irmão Gustavo, por me ensinarem o que é
amor, força, resiliência e por darem
sentido a minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof Dr Roberto Zatz pelo auxílio no desenvolvimento do meu trabalho, pela paciência e apoio desde o início. Obrigada pela oportunidade de aprender com você. Você é um exemplo!

À Dra Clarice Fujihara por todos os conselhos e por sua imensa ajuda em analisar de maneira extremamente cuidadosa meus dados. Obrigada por me ajudar a construir e desenvolver esse trabalho.

Ao Prof Dr Niels Olsen Saraiva Câmara pela colaboração e sugestões tão importantes para esse trabalho. Obrigada por ver em mim uma pesquisadora.

À Dra Denise Malheiros, pelas análises histológicas e colaboração no trabalho.

Ao Dr. Orestes Foresto Neto, por sua amizade especial e por toda paciência e todo cuidado com que me ensinou tantas coisas. Obrigada por ser o exemplo de pesquisador que eu tenho e um grande amigo!

À Fernanda Zambom, por todo o auxílio no desenvolvimento do trabalho, por ser tão “mão na massa” e não hesitar nunca em me ajudar. Melhor segunda autora que eu poderia ter. Obrigada pelas inúmeras vezes que me disse que eu conseguiria, e não é que eu consegui?! Obrigada por ser um exemplo para mim. Que sorte a minha em ter você, minha querida amiga. Amo você, Fefe.

À Dra Simone Arias pela sua companhia e por todo o apoio desde o início do meu trabalho. Agradeço por todo apoio no laboratório e pelas alegrias compartilhadas.

Agradeço aos alunos Helena, Ana Paula, Viviane e Karin com quem pude dividir não só a bancada, mas momentos alegres e de descontração ao longo desses anos; e aos colegas do LIM 16, Janice, Claudia, Wagner, Newton, Rosimeire, Luciene e Dra Vanda, pelo apoio técnico, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos queridos, Victor Ávila que me apresentou o laboratório e que é um exemplo profissional e pessoal para mim, obrigada por estar presente em muitos momentos da minha vida nesses 11 anos de amizade e que venham muitos mais. E Ivone Oliveira por seu bom-humor, positividade diária, sua simplicidade e apoio. Obrigada por todo o carinho, sempre.

Aos meus amigos da vida, com quem eu cresci e divido momentos especiais, Matheus, Flávia, Maikon, Gustavo, Joana, Rodrigo, Paulo e especialmente a Bárbara e a Cíntia pela nossa longa, linda e especial amizade. Obrigada por tudo, amo vocês.

Agradeço a minha querida terapeuta, Maria Lívia por me ajudar com todo carinho e profissionalismo, a enfrentar momentos difíceis, a me “re-conhecer” e me apoiar nesse longo caminho para ser a melhor forma de mim, todos os dias. Obrigada.

Agradeço aos meus sogros, Monica e Armando por todo apoio, torcida e amor. Obrigada por criarem um filho tão especial e me acolher como filha na família de vocês.

Agradeço as minhas avós Inês e Maria, tenho muito de vocês em mim. Que orgulho de ser neta de vocês. Espero ter esse amor no meu coração para toda a minha vida. Amo vocês tanto que até dói.

Agradeço especialmente à minha mãe, por me ensinar a ser uma mulher forte desde criança, você faz parte de mim; e ao meu pai do coração, Milani, você é sem dúvida um ser humano de luz, sempre abraçou meus sonhos como se fossem seus, tenho orgulho de ser sua filha. Se não fosse vocês nada disso seria possível, amo vocês!

Agradeço ao maior amor da minha vida, meu irmão Gustavo. Você me mostrou o sentimento mais puro e mais forte que já senti, você me dá força todos os dias para continuar. Quero ser seu exemplo e sua força também. Torço por você com todo meu amor, para sempre meu Gulão!

Agradeço especialmente ao meu amor e parceiro: Bruno. Eu sinceramente não sei o que seria dos meus dias sem você, sem seu apoio e sem sua força. Você escolhe acreditar em mim e em nosso amor todos os dias e me motiva e me mostra o quanto sou capaz e o que realmente importa nessa vida. Você é um parceiro incrível, ser humano fantástico. Aprendo todos os dias com você. Obrigada pela Filó e Charles, nossos amores, nossa família Clopal. Eu te amo!

Agradeço a mim, pelas minhas escolhas, pela minha determinação, por me respeitar e me ouvir sempre que foi preciso durante todo o caminho que trilhei até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processos nº 2013/12256-0, nº 2012/10926-5 e nº 2015/24991-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa e a produção desta tese.

*“It doesn't matter who you are, where you come from.
The ability to triumph begins with you - always.”*

- Oprah Winfrey

Sumário

- Lista de Abreviaturas

- Lista de Figuras

- Resumo

- Abstract

<i>1) Introdução</i>	12
<i>Doença Renal Crônica – DRC</i>	12
<i>Lesão renal aguda como causa de DRC</i>	13
<i>Papel da inflamação na patogênese da LRA</i>	14
<i>Papel da inflamação na patogênese da DRC</i>	15
<i>Do insulto inicial à inflamação: o papel da Imunidade Inata</i>	16
<i>Imunidade Inata e LRA</i>	19
<i>Imunidade Inata e DRC</i>	20
<i>LRA experimental: o modelo de LRA por GT</i>	21
<i>2) Objetivos</i>	24
<i>3) Material e Métodos</i>	25
<i>4) Resultados</i>	37
<i>5) Discussão</i>	50
<i>6) Conclusões</i>	57
<i>7) Referências Bibliográficas</i>	58

Lista de Abreviaturas

% EG	Porcentagem de Glomérulos Escleróticos
% ISQ	Porcentagem de Glomérulos Isquêmicos
ALB	Albuminúria
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Recruitment Domain Adaptor Protein
BSA	Albumina Sérica Bovina
Col-1	Colágeno-1
CREAT	Creatinina Sérica
DRC	Doença Renal Crônica
FE	Fração de Excreção
GT	Gentamicina
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IR	Isquemia/Reperusão
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
LRA	Lesão Renal Aguda
Mϕ	Macrófago
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine-rich Repeatand Pyrindomain containing-3
NTA	Necrose Tubular Aguda
Osmol	Osmolalidade
PAS	Ácido Periódico de Shiff
PC	Pressão Caudal
PDTC	Ditiocarbamato de Pirrolidina
PE	Peso Corpóreo
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TLR4	Toll-like Receptor 4
α-SMA	Alfa Actina de Músculo Liso

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i> Vias intracelulares de sinalização do sistema NF- κ B e do inflamassoma NLRP3	20
<i>Figura 2.</i> Peso Corpóreo	38
<i>Figura 3.</i> Pressão Caudal	39
<i>Figura 4.</i> Albuminúria	39
<i>Figura 5.</i> Creatinina Sérica	40
<i>Figura 6.</i> Concentração Sérica e Fração de Excreção de Sódio e Potássio	41
<i>Figura 7.</i> Osmolalidade (Osmol)	42
<i>Figura 8.</i> Conteúdo renal de KIM-1	42
<i>Figura 9.</i> Microfotografias representativas do tecido renal	43
<i>Figura 10.</i> Porcentagem de glomérulos isquêmicos (ISQ) e escleróticos (GS) ...	43
<i>Figura 11.</i> Microfotografias representativas de células positivas de macrófagos totais (ED-1) e do subtipo M2 (CD206) no córtex renal	44
<i>Figura 12.</i> Intensidade da infiltração do córtex renal por macrófagos totais (ED-1) e do subtipo M2 (CD206)	44
<i>Figura 13.</i> Microfotografias representativas de células positivas para Ang II no córtex renal	45
<i>Figura 14.</i> Intensidade da infiltração do córtex renal por células positivas para Ang II	45
<i>Figura 15.</i> Microfotografias representativas da expressão renal intersticial de α -SMA	46
<i>Figura 16.</i> Expressão renal intersticial de α -SMA	46
<i>Figura 17.</i> Microfotografias representativas da expressão renal intersticial de Colágeno-1 e Fibronectina	47
<i>Figura 18.</i> Expressão renal intersticial de Colágeno-1 e Fibronectina	47
<i>Figura 19.</i> Expressão proteica de TLR4, NF- κ B nuclear e IL-6	48
<i>Figura 20.</i> Expressão proteica de NLRP3, Caspase-1 e IL-1 β	49

Resumo

Albino AH. *Resposta imune inata na doença renal crônica que se segue à recuperação de uma lesão renal aguda induzida por gentamicina* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A alta incidência de Doença Renal Crônica (DRC) em pacientes que desenvolveram lesão renal aguda (LRA) indica que há uma tendência a desenvolver fibrose renal associada a eventos inflamatórios. Independentemente do insulto que desencadeou a LRA, a intensa necrose tubular promove a ativação de vias da imunidade inata, como a TLR4/NF- κ B e a do inflamassoma NLRP3/IL-1 β . A gentamicina (GT), um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, induz LRA por um efeito nefrotóxico. Estudos anteriores sugerem que eventos inflamatórios contribuem para a transição LRA-DRC. No presente estudo, investigamos o comportamento das vias NLRP3 e NF- κ B na progressão para DRC da LRA induzida por GT. Ratos machos Munich-Wistar adultos receberam injeção subcutânea de GT, 80 mg/kg/dia, durante 9 dias. Um grupo Controle (CN) recebeu apenas solução salina. Os animais foram examinados 1 (Dia 1), 30 (Dia 30) e 180 (Dia 180) dias após o tratamento com GT. No Dia 1, os ratos GT exibiram albuminúria acentuada e retenção de creatinina, alterações na fração de excreção de Na⁺ e K⁺, necrose tubular aguda (NTA) com aumento da abundância renal de KIM-1, lesões glomerulares, inflamação intersticial e ativação das vias TLR4/NF- κ B e NLRP3/IL-1 β . No Dia 30, a NTA regrediu e houve recuperação da função renal, mas a deposição cortical de colágeno-1 e fibronectina se manteve, em associação com a presença de células AngII⁺ e da ativação do sistema NF- κ B. No Dia 180, os ratos voltaram a apresentar albuminúria e lesões glomerulares como esclerose segmentar e colapso do tufo, enquanto a fibrose intersticial se manteve. Essas alterações associaram-se novamente à presença de células AngII⁺, indicativa de ativação local do sistema renina-angiotensina, e à ativação do sistema NF- κ B. Essas alterações podem mediar a transição de LRA a DRC após tratamento com GT.

Descritores: Gentamicina; Lesão renal aguda; Imunidade inata; Insuficiência renal crônica; NF-kappa B; Inflamassoma NLRP3.

Abstract

Albino AH. *Innate immune response on CKD recover after acute renal injury induced by gentamicin* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

The slow development of Chronic Kidney Disease (CKD) is a common outcome in patients recovering from acute kidney injury (AKI). The mechanisms underlying this complication are not fully understood and may involve the development of inflammation. Regardless of the initial insult, the intense tubular necrosis activates innate immunity pathways, such as TLR4/NF- κ B and the NLRP3/IL-1 β inflammasome. Gentamicin (GT), a broad-spectrum aminoglycoside antibiotic, induces AKI by a nephrotoxic effect. Previous evidence suggests that inflammation contributes to the AKI-CKD transition. In the present study, we investigated the behavior of the NLRP3 and NF- κ B pathways in the progression of CKD-induced AKI to GT. Adult male Munich-Wistar rats received subcutaneous injection of GT, 80 mg/kg/day, for 9 days. A control group (CN) received saline only. Animals were examined 1 (Day 1), 30 (Day 30) and 180 (Day 180) days after treatment with GT. On Day 1, GT rats exhibited marked albuminuria and creatinine retention, changes in the Na⁺ and K⁺ excretion fraction, acute tubular necrosis (ATN) with increased renal abundance of KIM-1, glomerular lesions, interstitial inflammation and activation of the TLR4/NF- κ B and NLRP3/IL-1 β pathways. On Day 30, ATN regressed and renal function was restored, but the cortical deposition of collagen-1 and fibronectin persisted, in association with the presence of AngII⁺ cells and NF- κ B activation. On Day 180, albuminuria, and glomerular lesions such as segmental sclerosis and tuft collapse relapsed, along with persistence of interstitial fibrosis. These changes were again associated with the presence of AngII⁺ cells, indicative of local activation of the renin-angiotensin system, and with the activation of the NF- κ B system. These abnormalities can mediate the transition from GT-induced AKI to CKD.

Descriptors: Gentamicin; Acute kidney injury; Immunity, innate; Renal insufficiency, chronic; NF-kappa B; NLRP3 inflammasome.

1) Introdução

Doença Renal Crônica – DRC

A Doença Renal Crônica (DRC) caracteriza-se pela redução progressiva no número de néfrons, resultando em perda irreversível da função renal. É uma doença que acomete milhares de pessoas no mundo todo e o aumento no número de pacientes com DRC - em especial dos que necessitam de terapia de substituição renal - é um sério problema social e envolve grandes custos na área da saúde ^{1, 2}. O Censo de 2018 da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) estima que o número de pacientes que necessitam de terapia renal substitutiva ultrapassa 130.000. Apesar dos grandes esforços em pesquisas, os mecanismos envolvidos na progressão da DRC não estão totalmente esclarecidos e ainda estamos longe de obter uma terapia para detê-la ou fazê-la regredir. No entanto, nos últimos 30 anos ficou patente que a perda progressiva da função renal nesses processos está relacionada a fatores hemodinâmicos e inflamatórios, como a infiltração do parênquima renal por macrófagos e linfócitos, produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, independentemente de antígenos microbianos ³⁻⁶. Admite-se atualmente que a ação integrada desses fatores leva ao desenvolvimento de glomeruloesclerose e à fibrose intersticial, com perda inevitável e progressiva da função renal ⁷. Portanto, compreender os mecanismos envolvidos nesse processo é fundamental para buscar novas estratégias que possam auxiliar no tratamento dos pacientes acometidos.

Dados obtidos pela SBN indicam que as principais causas que levam à DRC com necessidade de terapia de substituição renal no Brasil são a hipertensão, a diabetes mellitus e as glomerulonefrites, nessa ordem. Essa é uma tendência mundial, embora em vários países a Doença Renal da Diabetes supere a Nefrosclerose Hipertensiva em importância. Há, no entanto, algumas causas emergentes de DRC que preocupam por seu potencial de aumentar ainda mais a prevalência da doença. Uma delas é a transição de uma Lesão Renal Aguda (LRA) a uma DRC.

Lesão renal aguda como causa de DRC

A LRA é definida como uma redução acentuada ou perda súbita da função renal como resultado de dano tubular e/ou glomerular, manifestando-se, principalmente, como uma redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e/ou do volume urinário.

A LRA é uma causa importante de morbidade e mortalidade no ambiente hospitalar. Dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI), cerca de 30% acabam por desenvolver LRA, podendo necessitar de diálise até que a função renal seja recuperada⁸. Classicamente, a LRA tem sido classificada em três tipos: Pré-renal, que ocorre por uma hipovolemia intensa; Renal, que pode ser isquêmica, nefrotóxica ou inflamatória; e Pós-renal, que ocorre por obstrução das vias urinárias. A principal causa da LRA é a Necrose Tubular Aguda (NTA), que promove graves alterações nas células tubulares, resultando em perda de função e morte celular⁹. A causa mais frequente de NTA é o conjunto de eventos mórbidos conhecidos como isquemia/reperfusão (IR), resultantes de exposição de células tubulares, ávidas consumidoras de energia, a condições em que a oferta de oxigênio é limitada por redução drástica do fluxo sanguíneo.

Recentemente, uma séria consequência em longo prazo da LRA tem atraído a atenção de pesquisadores clínicos e experimentais: mesmo que o paciente sobreviva ao quadro de LRA e recupere em um primeiro momento a função renal, em uma proporção considerável de casos instala-se um lento processo de fibrose renal que progride inexoravelmente para estágios avançados de DRC^{10, 11}. Demonstrou-se em estudos epidemiológicos que, em longo prazo, a incidência de DRC em pacientes que desenvolveram LRA e se recuperaram é significativamente superior à observada na população geral, indicando que, nesses indivíduos, mantém-se uma tendência a desenvolver um processo de fibrose renal, com rebaixamento progressivo do Ritmo de Filtração Glomerular (RFG)¹²⁻¹⁴. Entretanto, as razões para essa evolução ainda não foram investigadas em larga escala e estão longe de serem esclarecidas, embora alguns estudos demonstrem a participação de fenômenos ligados ao ciclo de divisão celular¹⁵. Para melhor compreender a patogênese dessa transição, é necessário examinar detidamente o papel de um importante conjunto de mecanismos que são comuns à LRA e à DRC: a inflamação.

Papel da inflamação na patogênese da LRA

Um aspecto relevante da patogênese da LRA, que pode ter impacto importante sobre a eventual evolução para DRC, é a participação de fenômenos inflamatórios, cuja importância tem-se tornado evidente em anos recentes. Esses fenômenos contribuem para o dano renal na LRA. As células do sistema imune, como por exemplo, neutrófilos e macrófagos, que são recrutadas quando a LRA, isquêmica ou nefrotóxica, é instalada, participam da patogênese da lesão renal. Em modelos experimentais foi demonstrada a presença precoce de células inflamatórias, como neutrófilos, linfócitos e macrófagos, além de moléculas de adesão, que participam da patogênese da LRA e podem contribuir ao desenvolvimento subsequente de fibrose renal¹⁶⁻¹⁸. Independente do insulto que desencadeou a LRA, a intensa necrose das células tubulares e endoteliais⁹ promove a liberação de moléculas resultantes de estresse celular, conhecidas como DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), capazes de desencadear uma resposta imune tanto nas células renais remanescentes como também nas células inflamatórias presentes no tecido renal (macrófagos e neutrófilos)^{19,20}. Essas moléculas sinalizam cascatas inflamatórias, aumentando a síntese de produtos pro inflamatórios, como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1b, IL-23, IL-17, que induzem maior dano renal²¹. Alguns estudos experimentais demonstraram que a injúria celular pode ser atenuada pelo bloqueio de receptores da imunidade inata intracelulares e de membrana^{19, 22-24}. Além disso, citocinas e quimiocinas produzidas localmente favorecem o recrutamento de células inflamatórias e a inibição experimental dessas moléculas atenua a LRA^{25,26}. Em ratos submetidos a IR renal, a depleção de macrófagos tem efeito protetor²⁷. Em consistência, quando a infiltração por macrófagos foi inibida, a inflamação e o dano renal causados pelo efeito nefrotóxico da cisplatina foram atenuados²⁸. Outros estudos indicaram que macrófagos de fenótipo inflamatório possuem o papel patogênico mais importante nas fases iniciais da LRA²⁹.

A patogênese da LRA envolve também a participação de linfócitos e, portanto, da imunidade adquirida. A LRA provocada por IR é fortemente atenuada em camundongos desprovidos de linfócitos T CD4 + e CD8 +³⁰. As células T CD4 + podem se diferenciar em diferentes subconjuntos - células efectoras T-helper (Th) Th1 / Th2 / Th17 ou Treg, de acordo com o microambiente, com a expressão de moléculas coestimuladoras, com a presença de citocinas e, como demonstrado recentemente, com variações no metabolismo celular³¹⁻³³. Em concordância com esses achados, a inibição em células T da IL-17, uma potente citocina pró-inflamatória, ameniza o dano renal associado à sepse experimental³⁴.

Papel da inflamação na patogênese da DRC

A progressão da DRC envolve uma intrincada interação entre fenômenos hemodinâmicos e imunológicos, que culmina com o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico, que não depende da exposição dos tecidos a invasões microbianas, nem do desenvolvimento de disfunções imunológicas. Essa associação foi demonstrada em vários modelos experimentais de DRC, como ablação renal de 5/6 (Nx) ³⁵⁻³⁷, nefropatia diabética ⁶, nefropatia da adriamicina ^{38,39} e obstrução ureteral unilateral ⁴⁰. Dois aspectos desses eventos inflamatórios são particularmente relevantes: o papel do sistema renina-angiotensina (SRA) e o da infiltração tecidual por macrófagos.

O papel do sistema renina-angiotensina (SRA) na progressão da DRC já é bem estabelecido na literatura, tanto em trabalhos clínicos ^{41, 42} como experimentais ^{43, 44}. Sob o estímulo do hormônio Renina, produzido nos rins, o peptídeo Angiotensina I sofre clivagem através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), transformando-se na molécula ativa Angiotensina II (Ang II). Transportada pela corrente sanguínea, a Ang II chega aos tecidos, ligando-se a receptores específicos na membrana celular, principalmente o AT1 ⁴⁵, exercendo suas ações biológicas “clássicas” de vasoconstrição e, nos rins, aumento da reabsorção tubular de sódio por ação direta nos túbulos renais ou via secreção de aldosterona pelas adrenais.

Além desses efeitos hemodinâmicos, a Ang II atua como um importante mediador no processo inflamatório, ajudando a perpetuar a progressão da DRC ⁴⁶⁻⁴⁸. A Ang II atua como uma verdadeira citocina, promovendo aumento da permeabilidade vascular, proliferação celular e recrutamento de linfócitos e macrófagos ⁴⁹⁻⁵¹, além de ativar diversas vias de sinalização, tais como a mobilização de cálcio, a fosforilação de quinases ⁵² e o sistema NF- κ B ⁵³⁻⁵⁷.

O papel dos macrófagos e de seus subtipos têm sido extensamente investigados em diferentes modelos de DRC. Dadas suas propriedades, estabeleceu-se a noção de que, em vários órgãos e modelos experimentais de DRC, os macrófagos ED-1 atuam nas fases iniciais da inflamação e, à medida que esse processo evolui, os macrófagos M2 (CD-206) acabam predominando, promovendo a reparação dos tecidos lesados e a fibrose ⁵⁸. Em consonância

com esse conceito, Braga et al⁵⁹ observaram que, em camundongos com obstrução ureteral unilateral (UUO), a infiltração por macrófagos M1 ocorre logo no início do processo inflamatório, enquanto o acúmulo de macrófagos M2 é observado em fases mais avançadas.

Do insulto inicial à inflamação: o papel da Imunidade Inata

Embora os principais elementos que participam do processo inflamatório sejam bem conhecidos, os mecanismos que o iniciam ainda são objeto de intenso estudo. Em anos recentes, tem crescido a importância atribuída à Imunidade Inata, um amplo conjunto de fenômenos que constituem uma rápida resposta inicial à invasão dos tecidos por patógenos, presente em quase todos os organismos pluricelulares⁶⁰, que os capacita reagir rapidamente a ameaças externas, recrutando e ativando enormes contingentes de células destinadas a conter a agressão muito antes que a imunidade adaptativa possa ser acionada^{61, 62}.

Embora esse sistema atue eficientemente como um vasto e complexo mecanismo de defesa, seu funcionamento inadequado está associado à ativação de macrófagos, linfócitos e da imunidade adaptativa⁶³, levando ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória que tem participação importante tanto no desenvolvimento da LRA como no da DRC.

Um dos principais componentes da imunidade inata são os *Toll-like Receptors* (TLRs), descobertos em meados dos anos 1980⁶⁴. Os TLRs constituem uma numerosa família de receptores celulares superficiais localizados em células inflamatórias, como linfócitos e macrófagos, e de revestimento, como células epiteliais, inclusive tubulares, e endoteliais, entre outros tipos^{8, 65, 66}.

Os TLRs são capazes de detectar moléculas relacionadas a patógenos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), contribuindo assim decisivamente para barrar a invasão de micro-organismos. Além disso, reconhecem situações de estresse celular, detectando estruturas resultantes da destruição e/ou sofrimento de células do próprio organismo (DAMPs), tais como fragmentos de membranas, restos de DNA e moléculas de ATP⁶⁶. PAMPs e DAMPs ligam-se aos TLRs que, com a participação de proteínas intracelulares adaptadoras, como a MyD88, ativam importantes vias inflamatórias intracelulares, cruciais para a amplificação e propagação do sinal pró-inflamatório.

Atualmente, duas grandes vias de sinalização são consideradas essenciais ao processo de ativação da imunidade inata: o sistema NF- κ B e a via do inflamassoma NLRP3.

Papel do sistema NF- κ B (Sinal 1)

Uma das mais importantes vias intracelulares, o sistema NF- κ B tem por função estimular a síntese de muitos mediadores inflamatórios. O sistema NF- κ B pode ser ativado de várias maneiras. Uma delas é a ativação do TLR2 que, por intermédio da proteína adaptadora MyD88, faz com que a subunidade inibidora do sistema NF- κ B, a I κ B, seja fosforilada e degradada. Assim, o principal complexo do sistema NF- κ B, formado pela associação de duas moléculas, a p50 e a p65, migra ao interior do núcleo, atuando como um fator de transcrição e promovendo o aumento da expressão de uma série de citocinas e quimiocinas que ampliam e propagam a resposta inflamatória ^{67, 68}. O fator de transcrição NF- κ B foi inicialmente identificado em linfócitos B ⁶⁸. Ele está presente em diversos tipos celulares, podendo ser ativado por estímulos patológicos e fisiológicos, como por exemplo, partículas virais, citocinas, estresse mecânico, estresse oxidativo e até mesmo o próprio funcionamento dos sistemas antioxidantes naturais ⁶⁹⁻⁷³. Distúrbios na ativação desse sistema podem contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas ^{71, 74} e as evidências dessa ativação podem funcionar como um indicador da progressão de uma nefropatia ^{75, 76}.

A ativação do sistema NF- κ B, com a migração ao núcleo do heterodímero p50-p65, induz a expressão gênica de uma série de moléculas pró-inflamatórias, como a IL-6 e as formas imaturas das interleucinas 1L-1 β e IL-18 ⁷⁷. Além disso, a ativação do sistema NF- κ B aumenta a expressão da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), de várias moléculas de adesão e também da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ^{61, 62, 78}, dentre muitas outras proteínas ligadas direta ou indiretamente ao processo inflamatório.

Papel da via do inflamassoma: NLRP3 (Sinal 2)

Os TLRs não são o único gatilho de ativação da imunidade inata em situações de estresse celular. Há sensores intracelulares igualmente complexos que são expressos em todo o tecido renal, também capazes de reconhecer DAMPs e de ativar vias pró-inflamatórias. Além de reconhecer peptídeoglicanos de paredes bacterianas ³², esses receptores são capazes

de detectar moléculas ou fragmentos moleculares resultantes da alteração da homeostase celular ou da destruição lisossomal, além de sinais endógenos de perigo, como o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), o acúmulo de cristais de ácido úrico ³³, baixas concentrações de potássio intracelular ³², entre outros. Quando ativados, esses receptores citosólicos sofrem um processo de oligomerização, formando complexos moleculares conhecidos como *inflamassomas*. Na sequência, outras enzimas, como a caspase-1, são acionadas, catalisando a síntese de potentes mediadores, como as interleucinas 1 β , 18 e 33, capazes de desencadear uma série de eventos inflamatórios destinados, em última análise, a conter invasões microbianas e remover os produtos resultantes da destruição de células ⁷⁹.

Dentre esses receptores citosólicos, os que mais se destacam atualmente são os NLR (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors*), que formam inflamassomas como NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine-rich Repeat and Pyrin domain containing*) e NLRC (*NOD-Like Receptors, CARD domain containing*) ⁸⁰.

Os receptores NOD1 e NOD2 atuam regulando a expressão transcricional de genes envolvidos na resposta inflamatória ⁸¹ enquanto os receptores NLRPs regulam processos pós-transcricionais que levam à formação de inflamassomas, compostos pela caspase-1 ativa e proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like containing a CARD domain) ⁷⁹. O inflamassoma mais bem estudado é aquele formado pelo NLRP3 ⁸², em vista das evidências de sua ativa participação em diversos modelos de doença renal ^{83, 84}.

Os TLRs e NLRs não agem de maneira totalmente independente, existindo vários pontos de contato entre as sequências de eventos desencadeados por cada uma dessas vias ³¹. Da mesma forma, os elementos envolvidos na ativação dos Sinais 1 e 2 não agem de maneira isolada e independente, existindo vários pontos em comum entre as sequências de eventos deflagradas por cada um deles ⁸⁵.

As complexas vias que constituem os Sinais 1 e 2, assim como os pontos em que pode haver interação entre eles estão representados de modo esquemático na (Figura 1):

Figura 1. Vias intracelulares de sinalização do sistema NF-κB e do inflamassoma NLRP3. Sinal 1: Através da ativação de TLRs por DAMPs ou PAMPs, ou até mesmo do receptor AT1 pela A II, 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 formas inativas da IL-1β e IL-18. Sinal 2: além de DAMPs e PAMPs, cristais, DNA simples, ATP, toxinas, alta concentração de glicose e o efluxo de potássio podem levar a oligomerização do inflamassoma NLRP3, formado pelo próprio NLRP3, pela proteína adaptadora ASC e pela pró-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, levando ao recrutamento de macrófagos e linfócitos ⁸⁵.

Imunidade Inata e LRA

Em vista das considerações precedentes, não chega a surpreender que, frente a um episódio de LRA, as células tubulares respondam com uma ativação intensa e incontrolável de sua imunidade inata, contribuindo assim para a intensa atividade inflamatória associada a esse contexto. Um dos primeiros eventos no desenvolvimento de LRA por IR é a ativação não-microbiana de TLRs e NLRs. Várias evidências experimentais indicam que essa ativação desempenha um importante papel patogênico. A ausência dos receptores TLR4 e/ou TLR2, bem como de sua molécula adaptadora, o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88),

impediu o desenvolvimento de lesão renal em camundongos submetidos à IR ²⁴. Há também evidências da importância dos TLRs em modelos murinos de LRA por sepse²³ e em enxertos renais obtidos de doadores falecidos ^{18, 86, 87}. Os NLRs podem ter participação igualmente destacada na LRA por IR, uma vez que a inativação dos genes que codificam os receptores NOD1, NOD2 e NLRP3 atenua a inflamação e a lesão celular associadas a essa condição ^{22, 88}.

Sejam quais forem os mecanismos patogênicos que atuam na LRA, a lesão celular resultante gera detritos que, interpretados como sinais de perigo ou alarme, tendem a realimentar a ativação da imunidade inata, impedindo a resolução completa do processo inflamatório mesmo depois de superado o quadro agudo. Dessa forma, pode iniciar-se um lento e insidioso processo inflamatório crônico, culminando com o estabelecimento de uma DRC. Pode ser essa, portanto, a explicação para a aparente evolução de uma LRA para uma DRC, discutida previamente. Essa hipótese é reforçada pela observação de que a ativação patológica da imunidade inata também ocorre em vários modelos de DRC.

Imunidade Inata e DRC

Os mecanismos que conduzem do insulto inicial ao desenvolvimento de inflamação e consequente fibrose renal na DRC ainda são pouco compreendidos, podendo envolver, entre outros, agressão mecânica às paredes glomerulares pela pressão intracapilar elevada associada ao aumento do diâmetro capilar; agressão direta a podócitos; exposição de células tubulares a concentrações elevadas de proteínas em decorrência de aumento da permeabilidade glomerular; e a participação de numerosas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além da já citada ativação do SRA.

Nos últimos anos, firmou-se o conceito de que a ativação de algumas vias da imunidade inata, particularmente a do sistema NF- κ B e a do inflamassoma NLRP3, é um elo importante entre eventos iniciais, como hipertensão glomerular e fenômenos avançados, como o desenvolvimento de fibrose renal. Essa associação patogênica foi demonstrada em vários modelos de DRC. A deficiência de NLRP3 atenuou a fibrose renal em camundongos submetidos a obstrução ureteral unilateral (UUO) ⁸⁹. Camundongos submetidos a excesso de adenina foram protegidos da fibrose renal quando os genes que codificam NLRP3, TLR2 ou

TLR4 foram inativados ⁹⁰. No modelo de nefropatia por adriamicina, a ativação do NLRP3 associou-se ao estabelecimento de inflamação renal intensa ³⁸. A ativação dessas vias pode perdurar durante todo o desenvolvimento da DRC, conforme sugerido pelo achado de ativação sustentada, ao longo de pelo menos 60 dias, de várias moléculas relacionadas à imunidade inata no modelo de ablação renal de 5/6 (Nx) ⁶³.

O sistema NF- κ B parece desempenhar um papel particularmente importante na patogênese da DRC. Em 2007, Fujihara e colaboradores administraram um inibidor do sistema NF- κ B, ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), a ratos com ablação renal de 5/6, que desenvolvem uma forma particularmente agressiva de DRC. Como esperado, a expressão renal da subunidade p65, que está aumentada nesse modelo, foi inibida pelo PDTC. Com o tratamento, houve também normalização da pressão arterial sistêmica e redução da albuminúria, da inflamação renal e das lesões glomerulares e intersticiais associadas a esse modelo ⁹¹. Okabe e col ⁹² demonstraram que, em um modelo de nefrite túbulo-intersticial por sobrecarga de adenina, a inibição do NF- κ B atenuou a inflamação, a formação de granulomas e a fibrose do interstício renal, além de reduzir substancialmente a creatinina plasmática (CREAT). Recentemente, Zambom e colaboradores ⁹³ demonstraram que a inibição do NF- κ B tem efeito nefroprotetor também no modelo de inibição crônica do óxido nítrico associada a uma sobrecarga salina, atenuando o processo inflamatório e a perda da função renal.

LRA experimental: o modelo de LRA por Gentamicina

Conforme observado anteriormente, o modelo experimental de LRA mais utilizado é o de IR, que procura mimetizar o que ocorre com maior frequência em pacientes com hipovolemia grave e prolongada. Esse modelo reproduz satisfatoriamente a necrose tubular e a perda de função renal observadas na prática clínica, e tem contribuído significativamente para uma maior compreensão dos mecanismos que atuam na patogênese da LRA. No entanto, o modelo experimental de IR tem duas limitações quando se trata de estudar os mecanismos que atuam na transição da LRA à DRC. Em primeiro lugar, a acentuada hipóxia necessária ao estabelecimento da lesão renal é um fator de agressão celular capaz de, por si só, desencadear a ativação de várias vias da imunidade inata ⁹⁴⁻⁹⁶, o que dificulta a interpretação dos achados: afinal, a eventual persistência da ativação da imunidade inata é uma consequência da lesão

celular ou da hipóxia? Em segundo lugar, é inevitável que, com a isquemia prolongada, surjam algumas pequenas áreas de infarto renal, que são posteriormente tomadas por um processo inflamatório e fibrótico que também pode complicar a interpretação dos resultados, dada a alta probabilidade de que componentes da imunidade inata tenham sua produção aumentada nessas áreas e difundam para os tecidos adjacentes. Por essas razões, modelos experimentais em que as células tubulares representem o alvo do insulto inicial podem ser mais adequados para estudar a hipótese de que a própria lesão celular é o evento ativador da imunidade inata que, por sua vez, dada sua persistência, determina a lenta transição a um processo de DRC. Os modelos de LRA por nefrotoxicidade, como o da administração de aminoglicosídeos, prestam-se bem a essa finalidade.

Os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos foram descobertos na década de 1940. Em 1963 surgiu a Gentamicina (GT), um aminoglicosídeo de amplo espectro até hoje utilizado na prática clínica ⁶⁰. Apesar de sua eficácia, a GT tem como importante reação adversa a nefrotoxicidade, que pode ser grave a ponto de levar à insuficiência renal ⁹⁷⁻¹⁰⁰. Os mecanismos dessa nefrotoxicidade ainda não foram totalmente elucidados. Sabe-se que uma fração da droga administrada é retida nas células epiteliais dos túbulos proximais, onde é absorvida através da sua ligação com a megalina – um receptor endocítico, que promove a internalização da droga e posterior acúmulo no interior das células ^{69, 101, 102}. Por se ligar à membrana fosfolipídica, a GT causa uma redução na atividade das fosfolipases e na produção de fosfolipídios. Além disso, a GT internalizada leva a uma alteração do processo de respiração que ocorre nas mitocôndrias ^{70, 102}. Como resultado, a GT promove a perda de células, por apoptose ou necrose, levando ao desenvolvimento de LRA.

O modelo experimental de LRA por GT resulta em perda de peso, aumento acentuado mas transitório da creatinina plasmática e, no tecido renal resulta em necrose, dilatação do lúmen tubular e infiltração por células inflamatórias que, como no caso da IR, contribui para a perda da função renal ^{16, 17, 100}. Volpini e colaboradores ¹⁷ demonstraram que ratos que receberam GT desenvolveram NTA, perda transitória de função renal e, depois de 30 dias, fibrose intersticial. Em um grupo em que o sistema NF- κ B foi inibido com PDTC, a infiltração por células inflamatórias e a nefrite tubulointersticial induzida pela GT foram atenuadas. Embora o período de observação tenha sido curto e o comportamento de outros componentes da imunidade inata não foram estudados, esses achados indicam que a ação tóxica da GT, ainda que transitória e circunscrita a células tubulares, pode resultar no desenvolvimento de

fibrose renal e DRC no longo prazo. Além disso, esse estudo sugere que o sistema NF- κ B tem uma participação importante na transição entre a LRA induzida pela GT e o subsequente desenvolvimento de uma DRC progressiva.

Hipótese

O presente projeto de pesquisa testou a hipótese de que, após a recuperação de uma LRA induzida por GT, ocorre progressão, em maior ou menor grau e em ao menos parte dos animais afetados, a um quadro de fibrose renal e DRC. De acordo com essa concepção, essa evolução está relacionada a uma ativação persistente, inicialmente pelo próprio insulto e depois autônoma, - do Sinal 1 (Sistema NF- κ B) e/ou do Sinal 2 (Inflamassoma NLRP3) - da imunidade inata no tecido renal.

2) Objetivos

- Investigar a possível evolução da LRA desencadeada pela administração de GT para uma DRC em longo prazo;

- Verificar a ativação do eixo TLR4-NF- κ B (Sinal 1) e da via de sinalização que envolve o inflamassoma NLRP3 (Sinal 2).

3) Material e Métodos

Para a realização do estudo foram utilizados ratos Munich-Wistar machos com 2-3 meses de vida, obtidos de uma colônia do biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos em Biotério com 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 utilizados estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e registrados pelo protocolo de pesquisa nº 057/16.

Obtenção do Modelo Experimental

O modelo experimental de LRA adotado neste estudo consiste na administração do aminoglicosídeo GT (Gentatec-Chemitec). A administração do antibiótico foi realizada durante 9 dias, através de injeções subcutâneas na dose de 80 mg/kg/dia para um grupo de 32 animais (Grupo GT). Uma coorte de 31 ratos que receberam injeções subcutâneas de solução salina 0,15M durante 9 dias foi utilizada como grupo Controle. Todos os animais tiveram livre acesso a água e a ração farelada (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil), acrescida de caseína (Labsynth) a uma concentração de 15%.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos para observação em diferentes períodos conforme descrito:

- ***CN Dia 1-*** Ratos controles, com a administração subcutânea de solução salina 0,15M durante 9 dias, recebendo água e dieta padrão e estudados 1 dia após cessada a administração (n=10);
- ***GT Dia 1-*** Ratos com a administração subcutânea de GT, durante 9 dias, recebendo água e dieta padrão e estudados 1 dia após cessada a administração (n=10);
- ***CN Dia 30-*** Ratos controles, com a administração subcutânea de solução salina 0,15M durante 9 dias, recebendo água e dieta padrão e acompanhados por 30 dias após cessada a administração (n=10);
- ***GT Dia 30 -*** Ratos que receberam administração subcutânea de GT, durante 9 dias, recebendo água e dieta padrão e acompanhados por 30 dias após cessada a administração (n=10);
- ***CN Dia 180 -*** Ratos controles, com a administração subcutânea de solução salina 0,15M, durante 9 dias, recebendo água e dieta padrão e acompanhados por 180 dias após cessada a administração (n=11);
- ***GT Dia 180 -*** Ratos que receberam administração subcutânea de GT, durante 9 dias, recebendo água e dieta padrão e acompanhados por 180 dias após cessada a administração (n=12).

Procedimentos Gerais

Um dia após o término da administração de GT, e a cada tempo mencionado na descrição dos grupos experimentais, determinamos o peso corpóreo (PE), pressão sistólica caudal (PC), excreção urinária de albumina de 24 horas (ALB).

Após breve aquecimento dos animais, a PC foi avaliada utilizando o método optoeletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos) no qual são feitas 10 aferições consecutivas e obtenção da média da PC de cada animal. Para coleta de urina, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 24h, com acesso normal a água e ração.

Posteriormente, os animais foram anestesiados com Ketamina (Cristália-EUA, 50 mg/kg) e Rompun (Bayer-Alemanha, 10 mg/kg) intramuscular e submetidos ao procedimento de coleta de sangue e órgãos. Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal para dosagens de eletrólitos e análises bioquímicas. Após a perfusão dos dois rins *in situ* com solução 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 proteica (Western Blot e ELISA). Em seguida, o rim esquerdo foi perfundido *in situ* com a solução Du Boscq-Brasil, para fixação. Na sequência, o rim esquerdo foi pesado, fatiado em segmentos coronais e fixado em tampão fosfato com formaldeído a 10%. O tecido renal foi então desidratado, diafanizado e incluído em parafina em um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Alemanha). Os blocos de parafina contendo os tecidos renais foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) na espessura de 4 µm e montados sobre lâminas secas para as análises histológicas e sobre lâminas silanizadas para as análises imuno-histoquímicas.

Para o processo de silanização, as lâminas foram colocadas em um banho de álcool 96° por um minuto, seguido de banhos sucessivos de acetona PA durante um minuto e silano 6% (3-Aminopropil-trietoxi-silano, Sigma, St. Louis, EUA) durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em dois banhos de acetona e dois banhos de água destilada, sendo posteriormente mantidas em estufa a 60°C durante 24 horas para secagem.

Para o processo de histologia e imuno-histoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e mantidas inicialmente em estufa a 60°C durante 24 horas e 30 minutos, respectivamente. Após a desparafinização, as lâminas foram submetidas a três banhos seguidos de xilol. Após esse processo, foi realizada a reidratação dos tecidos, com banhos em etanol/água em proporções decrescentes de etanol e ao final, um banho em água destilada.

Análises histológicas

Após o processo de desparafinização, as lâminas foram coradas pela reação de Ácido Periódico de Shiff (PAS) para análise das lesões glomerulares. Os cortes foram submetidos a oxidação por solução de ácido periódico 0,5% durante 15 minutos e em seguida lavadas em água destilada. Após esse procedimento, as lâminas foram coradas com solução de PAS (solução aquosa de fucsina básica a 0,5%, 15 ml de ácido clorídrico 1N e 9 g de metabissulfito

de sódio a cada 100mL da solução) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina de Harrys (Hemalaum-Merck) durante cinco minutos. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com Permount.

A frequência de lesões glomerulares (% esclerose e % isquemia glomerular) de cada animal foi avaliada em cerca de 200 glomérulos em aumento de 400X¹⁰³.

Análises imuno-histoquímicas

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para detecção de mediadores inflamatórios e fibrose. Após 30 minutos em estufa a 60°C, os tecidos passaram pelo mesmo processo de desparafinização e reidratação adotado para as análises histológicas.

A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor durante 30 minutos em uma temperatura de 98 °C, em solução de ácido cítrico 10 mM de pH 6,0. As incubações foram realizadas em câmara úmida a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

Infiltração de Macrófagos totais: ED-1 (MØ)

O método da Fosfatase Alcalina foi utilizado para a identificação de células positivas para MØ. Após a desparafinização e recuperação antigênica, 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 BSA 1% em TBS 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. Em seguida, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti Camundongo Biotinilado (Vector, #BA2001, Burlingame, EUA) na diluição 1:200 em solução de BSA 1%, sob temperatura ambiente, por 45 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Vector Lab, Burlingame, EUA). Ao final desse procedimento, os tecidos foram lavados com TBS e estavam prontos para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico FastRed filtrado (1 mg de naftol AS-MX fosfato (Sigma 067K5300), 100 µl 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 FastRed). Os macrófagos positivos para o epítipo ED-1 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do FastRed presente no substrato cromogênico. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris (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 através da contagem de células marcadas no córtex renal em aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, o que corresponde a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram apresentados em células por milímetro quadrado (cél/s/mm²).

Infiltração de Macrófagos: CD 206 - Fenótipo M2

O método da Fosfatase Alcalina também foi utilizado para a identificação dos macrófagos de fenótipo M2. Após desparafinização convencional e recuperação antigênica, o bloqueio de marcações inespecíficas foi realizado com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de Leite desnatado 5% em TBS durante 50 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti receptor de Manose (#AB64693Abcam, Cambridge, UK) 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), por 30 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl da solução Enzima AP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos. Em seguida, uma nova lavagem em TBS foi realizada e 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) por 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 através da contagem de células marcadas no córtex renal em aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, o que corresponde a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/s/mm²).

Identificação de Colágeno I (Col-1) e Fibronectina

Para a identificação de Col-1 e Fibronectina foi utilizado o método da Peroxidase Endógena. Após a desparafinização e recuperação antigênica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena durante 30 minutos com solução de peróxido de hidrogênio acrescida de metanol. As lâminas foram lavadas com tampão TBS e posteriormente incubadas para bloqueio das marcações inespecíficas, durante 30 minutos com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na diluição de 1:50 em solução de BSA 1% para colágeno-1 e solução de ProteinBlock (Dako, Carpinteria, CA, EUA) para fibronectina. Após o bloqueio retirou-se o excesso de soro e as lâminas foram incubadas em anticorpo primário anti colágeno tipo I (#34710, Abcam, Cambridge, UK) diluído na proporção de 1:200 e em anticorpo primário anti Fibronectina (#2413, Abcam, Cambridge, UK) diluído na proporção 1:50, ambos em solução de BSA a 1% em TBS, à temperatura de 3-8°C por um período de 18 horas. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), por 30 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 para revelação das lâminas. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram montados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e devidamente identificados.

A fração do córtex renal ocupada por Col-1 e Fibronectina foi quantificada pelo método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, em aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos¹⁰⁴ e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Identificação de células positivas para Ang II e para α -Actina de Músculo Liso (α -SMA)

A técnica da Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina foi empregada para avaliar a expressão de Ang II e α -SMA. Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (X0590, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Após o bloqueio, os tecidos foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector Lab,

Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de Leite desnatado 5% (para Ang II) e 2% (para α -SMA) em TBS por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com anticorpos primários; anti-AII (Península Laboratories #T4007) e anti- α -SMA (Sigma-Aldrich), diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:400 e 1:800. Em seguida, os cortes foram incubados com seus anticorpos secundários, anti-coelho biotinilado (Vector BA-1000) e anti Camundongo Biotinilado (Vector BA-2001), respectivamente, diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:1000 e 1:200, respectivamente, durante 45 minutos. Após esse período, os cortes para Ang II foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Vector Lab, Burlingame, EUA) e os cortes para α -SMA com Dako Estreptavidina Fosfatase Alcalina (Dako Carpinteria, CA, EUA). Todos os cortes foram revelados com substrato cromogênico FastRed, preparado conforme descrito anteriormente, com tempo variável para cada marcação. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram montados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel) e devidamente identificados.

A quantificação da infiltração das células intersticiais positivas para Ang II foi realizada através da contagem de células marcadas no córtex renal, com aumento de 400x. Foram analisados 25 campos microscópicos para cada lâmina, correspondente à área de 1,6 mm². Os resultados foram apresentados como células positivas por milímetro quadrado (cél/mm²).

A quantificação da porcentagem de área intersticial renal ocupada por α -SMA foi realizada através do método de contagem de pontos. Foram analisados 25 campos microscópicos consecutivos, em um aumento de 400x, com auxílio de ocular graticulada de 144 pontos ¹⁰⁴. A positividade nas artérias e arteríolas é considerada constitutiva, por essa razão as marcações positivas nessas estruturas foram desconsideradas.

Análises bioquímicas

Albuminúria de 24h

A concentração de Albumina na urina (ALB) foi determinada através da técnica de imunodifusão radial, empregando anticorpo específico (antialbumina de rato, MP Biomedicals LLC, Santa Ana, EUA) ¹⁰⁵.

Creatinina Sérica

As concentrações de creatinina sérica (CREAT) foram determinadas por análise colorimétrica, utilizando kits disponíveis comercialmente (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil).

Sódio, Potássio e Osmolalidade

As concentrações plasmáticas de sódio e potássio foram determinadas com um analisador de eletrólitos (9140 AVL Medical Instruments, Schaffhausen, Suíça). As concentrações urinárias desses eletrólitos foram determinadas com um fotômetro de chama (FC 280, CELM® - São Paulo, Brasil). As frações de excreção (FE) de cada eletrólito foram calculadas utilizando fórmulas convencionais. A osmolalidade (Osmol) urinária foi determinada pelo método da variação do ponto de congelamento.

Análises do conteúdo proteico renal

Extração e quantificação de proteínas teciduais

Em tubos de polipropileno reforçado, contendo microesferas de cerâmica (OMNI 19-628), amostras de rim pesando entre 100 e 200 mg foram colocadas com tampão RIPA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e inibidores de proteases/fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche®), para serem homogeneizados no aparelho OMNI BEAD RUPTOR 24. Para determinar o teor proteico total foi utilizado um kit comercial (Pierce BCA ProteinAssay Kit, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) e Interleucina 1 β (IL-1 β)

O conteúdo de KIM-1 e de IL-1 β no tecido renal foi dosado pelo método de Elisa Sanduíche, utilizando respectivo kit comercial disponível (R&D systems, Minneapolis, USA). As análises seguiram o protocolo e as recomendações do fabricante disponibilizado no kit e para cada amostra, a concentração encontrada foi corrigida pelo conteúdo proteico total obtido anteriormente.

Western Blot

Conteúdo proteico de TLR4, NLRP3, Caspase-1(Casp-1) e IL-6

Para cada amostra, 100 μ g 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 padronizada pelo laboratório, que se completou em uma hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, os géis foram transferidos (transferência úmida e semiúmida, respectivamente) para membranas de nitrocelulose, durante duas horas a 400mA para transferência úmida e 45 minutos a 20V para transferência semiúmida. Após a transferência, as membranas foram coradas com Solução de Ponceau (Sigma Aldrich, USA) para confirmar a transferência. Posteriormente, foram lavadas três vezes com solução de TBSt (TBS [NaCl Glicina Tris-Base ,10x], Água destilada, Tween 20, pH 7.4), e bloqueadas durante duas horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de BSA 5% em TBSt para TLR4 e Leite 5% em TBSt para NLRP3, Casp-1 e IL-6. Após o bloqueio, foi realizada a incubação das membranas com os respectivos anticorpos primários, diluídos em BSA a 1% em TBSt, na seguinte proporção: anti-TLR4 (Santa Cruz) 1:250, anti-NLRP3 (Novus Biologicals) 1:200, anti-Caspase-1 (Santa Cruz) 1:1000 e anti-IL-6 (Sigma Aldrich) 1:1000. A incubação teve duração aproximada de 18 horas (overnight) e foi realizada à temperatura de 4°C sob leve agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBSt por cinco minutos e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Anti-Coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich; Anti-Camundongo HRP: 1:15000, Sigma-Aldrich), por duas horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de cinco minutos com TBSt.

Translocação Nuclear da fração p65 do NF- κ B

Adicionamos 100 mg de tecido renal em 1000 μ L 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 com o Dounce Homogenizer (Sigma Aldrich, USA) em gelo. O conteúdo foi transferido para um tubo pré-refrigerado, e centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 1000G. O sobrenadante foi transferido para um tubo pré-refrigerado (fração citoplasmática) e armazenado. O pellet foi suspenso em 1000 μ L do tampão A e centrifugado a 4 °C e 1000G durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 200 μ L no tampão B (Sacarose, SDS, Tris-HCl [10X], Bromo-phenol-blue e beta-mercaptoetanol PA) e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 4 °C, e 1500G. O sobrenadante foi transferido para um tubo pré-refrigerado (fração nuclear) e armazenado.

O material foi submetido a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), durante 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, o gel foi transferido (transferência semiúmida) para uma membrana de nitrocelulose, durante 45 minutos a 20V. Para conferir a transferência, a membrana foi corada com Solução de Ponceau. A membrana foi lavada por três vezes com solução de TBSt (TBS [10x] água destilada Tween 20, pH 7.4), e bloqueada com solução de Leite 3% + BSA 3% em TBSt sob leve agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-p65 fosforilado (Cell Signaling, Massachusetts, EUA) diluído em BSA a 1% em TBS na proporção 1:100, por aproximadamente 18 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com solução de TBSt e incubada durante 2 horas, com o anticorpo secundário (Anti-coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich), a 4°C, sob leve agitação, seguindo de três lavagens de 5 minutos com TBSt.

Conteúdo proteico de α -SMA

Foram diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIORAD), 100 μ g de proteína do extrato tecidual. Essas amostras foram utilizadas para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em concentração previamente padronizada pelo laboratório, a 120 Volts durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, os géis foram transferidos

para membranas de nitrocelulose (transferência semiúmida), a 20V, durante 45 minutos. Após a transferência, as membranas foram coradas com Solução de Ponceau para conferir a transferência. Posteriormente, foram lavadas por 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 BSA 5% em TBSt. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário, anti- α -SMA (Dako) 1:1000 em BSA 1%, diluídos em TBSt. A incubação teve duração aproximada de 18 horas em uma temperatura de 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBSt por 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário, Anti-Camundongo HRP na proporção de 1:15000 (Sigma-Aldrich), por 2 horas, a 4°C, sob leve agitação, seguida de três lavagens de 5 minutos com TBSt.

Identificação e quantificação das bandas

As membranas foram previamente incubadas para bloquear marcações inespecíficas e após retirar o excesso e os respectivos anticorpos primários. Em seguida, foram lavadas com TBSt e incubadas com os respectivos anticorpos secundários para posterior revelação.

A revelação das membranas foi feita por quimioluminescência, com o kit comercial (Pierce Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific®), e as imagens foram registradas com aparelho fotodocumentador (UVITEC Cambridge®). A identificação, análise e quantificação das bandas foram realizadas através do software Uvisoft-Uviband Max (UVITEC Cambridge®, UK).

Para a normalização dos resultados das proteínas alvo TLR4, Caspase-1, IL-6, foi utilizada a proteína constitutiva β -actina (anti- β -actina, Sigma-Aldrich, 1:5000 em BSA 1%). Para a normalização dos resultados da α -SMA, foi utilizada a proteína constitutiva GAPDH (anti-GAPDH, Santa Cruz, 1:1000 em BSA 1%). 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%).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a Análise de Variância de uma via (One-way ANOVA), com pós-teste pelo método de Tukey. Foram considerados significativos os valores de “p” inferiores a 0,05. Os cálculos foram efetuados através do software GraphPad Prism® versão 6.01 e os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão.

4) Resultados

Para indução do modelo de LRA, ratos Munich-Wistar machos receberam injeções subcutâneas de GT à concentração de 80 mg/kg durante 9 dias, sendo examinados 1, 30 e 180 dias após cessado o tratamento. Paralelamente, um segundo grupo de animais, que não recebeu a droga, foi utilizado como Controle (CN), sendo acompanhados e examinados durante os mesmos períodos.

Parâmetros Gerais de Função Renal e Sistêmica

Peso Corpóreo (PE)

Figura 2. Peso Corpóreo: Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p<0,05$ vs respectivo CN; **b** $p<0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p<0,05$ vs. Dia 30.

O grupo CN apresentou ganho de peso significativo ao longo do tempo de estudo. Os animais do grupo GT apresentaram menor ganho de peso, comparados ao grupo CN, nos dias 1 e 30 após a última injeção de GT. Porém, ao final do protocolo de estudo os animais de ambos os grupos apresentaram um ganho de peso semelhante.

Pressão Caudal (PC)

Figura 3. Pressão Caudal: Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p<0,05$ vs respectivo CN; **b** $p<0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p<0,05$ vs. Dia 30.

Após 1 e 30 dias de cessado o tratamento com GT, animais CN e GT apresentaram valores de PC semelhantes. Porém, no Dia 180 os animais GT apresentaram elevação significativa da pressão caudal em comparação com os resultados no Dia 1, embora permanecessem normotensos.

Albuminúria (ALB)

Figura 4. Albuminúria: Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p<0,05$ vs respectivo CN; **b** $p<0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p<0,05$ vs. Dia 30.

Os ratos do grupo GT apresentaram, no primeiro dia, excreção urinária de albumina significativamente elevada em relação aos animais do grupo CN. Aos 30 dias, esse parâmetro normalizou-se. Porém, aos 180 dias os níveis obtidos para o Grupo GT voltaram a se mostrar significativamente elevados comparados ao respectivo Grupo CN e aos animais do Dia 30.

Creatinina Sérica (CREAT)

No Dia 1, a concentração sérica de Creatinina dos animais do grupo GT mostrou elevação acentuada em comparação com o respectivo CN. Esse parâmetro normalizou-se no Dia 30 e assim se manteve 180 dias após término do tratamento.

Figura 5. Creatinina Sérica: Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p<0,05$ vs respectivo CN; **b** $p<0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p<0,05$ vs. Dia 30.

Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺): concentração sérica e Fração de Excreção (FE)

Figura 6. Concentração Sérica e Fração de Excreção de Sódio e Potássio: Resultados apresentados como Média±EP, **a** p<0,05 vs respectivo CN; **b** p<0,05 vs. Dia 1 e **c** p<0,05 vs. Dia 30.

No Dia 1 após a última aplicação de GT, a concentração sérica de Na⁺ mostrou-se discreta, mas significativamente reduzida no Grupo GT em comparação com o Grupo CN, enquanto um forte aumento da FE_{Na⁺} foi observado, um achado compatível com a presença de lesão tubular. Ambos os parâmetros foram normalizados aos 30 dias e continuavam em níveis comparáveis aos do Grupo CN aos 180 dias, sugerindo a ocorrência de regeneração tubular. Em concordância com esse achado, o Grupo GT exibiu um intenso aumento na FE_{K⁺} no Dia 1, sugerindo mais uma vez a presença de intenso dano tubular. Como no caso do Na⁺, a FE_{K⁺} mostrou-se semelhante ao valor controle aos 30 e 180 dias depois de cessado tratamento com GT.

Osmolalidade (Osmol)

Figura 7. Osmolalidade (mOsm/KgH₂O): Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

Após 1 dia do término do tratamento com GT, o Grupo GT apresentou redução significativa da osmolalidade urinária em comparação com o Grupo CN. Aos 30 e 180 dias os animais do Grupo GT recuperaram a capacidade de concentrar a urina, apresentando-se com osmolalidade urinária semelhante à observada nos animais CN.

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)

Figura 8. Conteúdo renal de KIM-1 (pg/mg): Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

Conforme esperado, os níveis de KIM-1 no tecido renal, indicativos de lesão tubular-proximal, estavam substancialmente elevados no grupo GT quando comparados ao seu respectivo controle no Dia 1. Após 30 dias, esse parâmetro normalizou-se e assim permaneceu após 180 dias, indicando mais uma vez que o dano celular induzido pela GT foi reversível.

Análises Histológicas

Isquemia (ISQ) e Esclerose Glomerular (%EG)

Figura 9. Microfotografias representativas do tecido renal. Em A, observa-se a presença de intensa necrose tubular dos animais no Dia 1; glomérulo normal (B) do grupo CN; glomérulo isquêmico (C) e um glomérulo com uma lesão esclerosante segmentar (D), ambos obtidos no grupo GT aos 180 dias. PAS, 400X.

Figura 10. Porcentagem de glomérulos isquêmicos (ISQ) e escleróticos (GS): Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

A porcentagem de glomérulos com lesões esclerosantes foi, em média, sempre inferior a 2%. No entanto, observou-se um aumento nesse parâmetro no Dia 1, com redução numérica após 30 dias e recrudescimento após 180 dias. Já as lesões isquêmicas tornaram-se evidentes apenas após 180 dias do término do tratamento com GT.

Inflamação e Imunidade Inata

Infiltração Túbulo-intersticial de Macrófagos ($M\phi$)

Figura 11. Microfotografias representativas de células positivas de macrófagos totais (ED-1) e do subtipo M2 (CD206) no córtex renal, detectada por imuno-histoquímica, nos grupos CN (A) e GT Dia 1 a (B), Dia 30 (C) e Dia 180 (D). Aumento de 400x.

Figura 12. Intensidade da infiltração do córtex renal por macrófagos totais (ED-1) e do subtipo M2 (CD206). Detectada por imuno-histoquímica. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP, a $p < 0,05$ vs respectivo CN; b $p < 0,05$ vs. Dia 1 e c $p < 0,05$ vs. Dia 30.

Um dia depois de cessada a administração de GT, houve um aumento significativo da infiltração no córtex renal por macrófagos. Aos 30 dias, esses valores reduziram-se, mas permaneceram significativamente elevados quando comparados ao CN. Aos 180 dias, a

redução foi ainda maior, embora ainda houvesse uma diferença entre os ratos GT e os CN, o infiltrado de macrófagos era muito inferior do que o observado após 1 dia.

Quanto aos macrófagos do subtipo M2, identificados pela presença do antígeno CD206, notamos que a quantidade dessas células era muito baixa em relação ao número total de macrófagos infiltrados, um dia depois de cessada a administração de GT. No entanto, a densidade dessas células no Dia 30 foi mais de 5 vezes maior do que em ratos CN, e que correspondiam a metade do total de macrófagos infiltrados, indicando a existência de intensa atividade reparadora no tecido renal. Essa atividade havia cessado após 180 dias, com a normalização da infiltração por essas células.

Células positivas para Angiotensina II (Ang II)

Figura 13. Microfotografias representativas de células positivas para Ang II no córtex renal, detectada por imuno-histoquímica, nos grupos CN (A) e GT 1 dia (B), 30 dias (C) e 180 dias (D) após cessado o tratamento com GT. Aumento de 400x.

Figura 14. Intensidade da infiltração do córtex renal por células positivas para Ang II, detectada por imuno-histoquímica. Resultados apresentados como Média±EP, a p<0,05 vs respectivo CN; b p<0,05 vs. Dia 1 e c p<0,05 vs. Dia 30.

Um dia após cessado o tratamento com GT, a intensidade da infiltração de células positivas para Ang II no córtex renal foi significativamente maior quando comparada a seu respectivo CN. Esse parâmetro manteve-se elevado ao longo de todo o estudo, indicando a ocorrência de uma ativação incessante do sistema renina-angiotensina local.

Alfa Actina de Músculo Liso (α -SMA)

Figura 15. Microfotografia representativa da expressão renal intersticial de α -SMA, detectada por imuno-histoquímica, nos grupos CN (A) e GT 1 dia (B), 30 dias (C) e 180 dias (D) após cessado o tratamento com GT. Aumento de 400x.

Figura 16. Expressão renal intersticial de α -SMA, detectada por imuno-histoquímica e Western Blot, respectivamente. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

A presença no córtex renal do Grupo GT de células com marcação positiva para α -actina de músculo liso, detectada tanto por imuno-histoquímica quanto por Western Blot, foi

acentuada no Dia 1, indicando a ocorrência de infiltração por miofibroblastos. Observou-se um aumento significativo da presença de miofibroblastos nessa fase. Esse fenômeno perdeu intensidade aos 30 dias, refluindo totalmente após 180 dias do término do tratamento com GT.

Deposição intersticial de Colágeno-1 (Col-1) e Fibronectina

Figura 17. Microfotografia representativa da expressão renal intersticial de Colágeno-1 e Fibronectina, detectada por imuno-histoquímica, nos grupos CN, GT 1, 30 e 180 dias após cessado o tratamento com GT. Aumento de 400x.

Figura 18. Expressão renal intersticial de Colágeno-1 e Fibronectina, detectada por imuno-histoquímica. Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

A deposição de colágeno no córtex renal, detectada por imuno-histoquímica, foi observada desde o Dia 1, aumentando acentuadamente aos 30 dias e persistindo aos 180 dias. A deposição cortical de Fibronectina seguiu perfil muito semelhante, ajudando a caracterizar a ocorrência de uma fibrose renal crônica após o tratamento com GT.

Ativação da Imunidade Inata após o tratamento com GT

SINAL 1

Figura 19. Expressão proteica de TLR4, NF-κB nuclear e IL-6, detectada por Western Blot. Resultados apresentados como Média±EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

Um dia após o término do tratamento com GT, foi detectado um aumento significativo do conteúdo renal de TLR4 em relação ao grupo CN. A abundância renal de TLR4 retornou

a níveis normais aos 30 dias, e manteve-se assim ao final do estudo, após 180 dias do término do tratamento com GT. Já a expressão da subunidade p65 fosforilada na fração nuclear mostrou-se aumentada desde o Dia 1, mantendo-se nesses níveis aos 30 e 180 dias, indicando que a ativação do sistema NF- κ B persistiu ao longo de todo o estudo. A abundância renal da Interleucina 6 (IL-6) esteve elevada no Dia 1, e apesar de apresentar uma redução aos 30 dias, elevou-se novamente após 180 dias, acompanhando a expressão da subunidade p65.

SINAL 2

Figura 20. Expressão proteica de NLRP3, Caspase-1 e IL-1 β , detectada por Western Blot e ELISA, respectivamente. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP, **a** $p < 0,05$ vs respectivo CN; **b** $p < 0,05$ vs. Dia 1 e **c** $p < 0,05$ vs. Dia 30.

Os ratos que haviam recebido GT exibiram, no Dia 1, expressão renal elevada do inflamassoma NLRP3 e Caspase 1 em relação aos animais CN, sugerindo ativação dessa via. Após 30 dias de interrupção, houve normalização da abundância desses parâmetros, mas no Dia 180 novamente mostraram-se elevados, embora com intensidade bem menor do que no Dia 1.

A abundância renal da IL-1 β também se mostrou marcadamente aumentada no Dia 1. Esse aumento continuou a ser notado aos 30 e 180 dias, embora em nível menos acentuado neste último. No entanto, o método de dosagem detecta tanto a forma ativa, quanto a inativa (pró-IL-1 β).

5) Discussão

Conforme observado anteriormente^{16, 17, 106}, os ratos que receberam tratamento com GT desenvolveram um quadro agudo consistente com uma LRA por nefrotoxicidade, com limitação ao crescimento e elevação acentuada da concentração sérica de creatinina. Em associação com esse quadro, foi possível demonstrar a presença de inequívocos sinais de lesão tubular: o pronunciado aumento do conteúdo renal de KIM-1, indicativo de dano ao túbulo proximal, e a presença evidente de necrose tubular aguda disseminada pelo parênquima renal. Essas alterações estruturais tubulares fizeram-se acompanhar de uma severa limitação funcional, com elevação intensa das frações de excreção de sódio e de potássio, bem como uma queda drástica da osmolalidade urinária, indicativa de perda da capacidade de concentração. Além dessas acentuadas alterações estruturais e funcionais tubulares, fizeram-se notar também albuminúria moderada (em comparação com a observada em outros modelos experimentais) e lesões glomerulares esclerosantes de baixa intensidade, provavelmente refletindo uma ação direta da GT.

É digna de nota a presença, nessa fase aguda, de sinais inflamatórios evidentes, sendo o mais notório deles uma infiltração maciça por macrófagos. Dessa infiltração não participou o subtipo M2, indicando que, nessa fase, os macrófagos tiveram um comportamento eminentemente pró-inflamatório, como observado em estudos anteriores neste modelo^{16, 17} e em outros modelos de DRC^{38, 92, 93, 107}. Células com marcação positiva para α -SMA, presumivelmente miofibroblastos, também foram detectadas nessa fase, em concordância com estudos anteriores, tanto no modelo de GT¹⁶ como no de IR¹⁰⁸. Esses achados são plenamente consistentes com inúmeras observações anteriores de que a NTA, e em particular aquela decorrente de exposição à aminonucleosídeos, associa-se a um quadro inflamatório exuberante^{16, 102, 109-111}. Além dessas alterações, foi possível demonstrar um discreto, porém

significativo, acúmulo de colágeno e fibronectina, indicando estar em andamento, já na fase precoce, um incipiente processo de fibrose renal.

A inflamação renal observada no Dia 1 acompanhou-se de infiltração, não demonstrada anteriormente em associação com a nefrotoxicidade da GT, por células marcadas positivamente para Ang II, que sabidamente exerce uma ação pró-inflamatória, atuando praticamente como uma citocina ^{17, 47}. Esse achado indica que houve ativação do SRA em nível local, em consistência com observações anteriores de participação desse sistema na nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos ¹¹². O aumento da Ang II pode explicar a superexpressão de α -SMA encontrada no Dia 1, já que esse peptídeo tem a capacidade de promover a transformação de fibroblastos em miofibroblastos e o aumento da produção de componentes da matriz extracelular ¹¹³⁻¹¹⁵. Observações anteriores indicam que a infusão intravenosa da Ang II promove o aumento da expressão de α -SMA nas células intersticiais, causando danos túbulo-intersticial e glomerular progressivo ⁴⁹. O mecanismo pelo qual o SRA local foi ativado nessa fase não é claro, embora a presença de estresse oxidativo, amplamente demonstrada em associação com o uso de GT ^{106, 116, 117}, seja um possível fator.

Outro achado relevante foi o de um pronunciado aumento da fração nuclear da subunidade p65 fosforilada, nos ratos que receberam GT, indicando translocação ao núcleo do dímero p50/p65 e, portanto, ativação do sistema NF- κ B. Esse resultado, reforçado pela demonstração de que a abundância da IL-6, uma das citocinas pró inflamatórias estimuladas pela ativação do sistema NF- κ B, também estava aumentada, é consistente com os achados de Volpini et al ¹⁷, que relataram ativação do sistema NF- κ B 5 dias após a administração de GT. No presente estudo, a ativação desse sistema foi ainda mais precoce, apenas 1 dia após o término das aplicações, indicando tratar-se de um fenômeno diretamente vinculado à lesão/destruição de células.

Em paralelo à ativação do sistema NF- κ B, o tratamento com GT levou a um aumento da abundância renal da IL-1 β . Como o que foi medido foi a IL-1 β total, não há como estabelecer com certeza se o conteúdo renal da forma ativa dessa interleucina também está aumentado. No entanto, como a abundância renal do inflamassoma NLRP3 e a Caspase-1 também aumentaram, é mais do que provável que a da forma ativa da IL-1 β tenha seguido a mesma tendência.

Em seu conjunto, esses resultados indicam que houve uma forte ativação da imunidade inata renal, compreendendo tanto o Sinal 1 como o Sinal 2. Os mecanismos que deflagraram esse processo não foram determinados. Sabe-se que detritos oriundos da destruição de células, tais como restos de membranas e fragmentos de DNA, funcionam como DAMPs, ligando-se a TLRs e ativando tanto a via do NF- κ B quanto a do inflamassoma NLRP3^{19, 67, 79, 85, 118}. Além disso, o sistema NF- κ B pode ter sido ativado pela Ang II¹¹⁹⁻¹²¹ e/ou pela presença de estresse oxidativo, como demonstrado em outros modelos experimentais^{71, 93, 112}. Sejam quais forem os fatores que o iniciaram, esse processo ajuda a explicar o desenvolvimento do exuberante processo inflamatório que tomou os rins durante a fase aguda da intoxicação pela GT.

As alterações estruturais observadas no Dia 1 haviam regredido inteiramente aos 30 dias. As lesões esclerosantes glomerulares praticamente desapareceram, indicando que refletiam processos facilmente reversíveis, tais como a deposição de matriz mesangial, sem alteração estrutural relevante. As alterações funcionais associadas também regrediram, com a normalização da creatinina plasmática, da albuminúria e da pressão arterial. Houve também involução das lesões tubulares, com regeneração de células necrosadas e a virtual normalização da expressão da KIM-1. O mesmo ocorreu em relação às alterações da função tubular, com a normalização da fração de excreção de sódio e de potássio, além da plena recuperação da capacidade de concentrar a urina.

Ao mesmo tempo em que ocorreu a reversão das alterações estruturais e funcionais observadas no Dia 1, os fenômenos inflamatórios refluíram, mas apenas parcialmente. A infiltração por macrófagos perdeu intensidade. Chama atenção, no entanto, o fato de que, enquanto a quantidade total de macrófagos despencava, a de macrófagos do subtipo M2 (células CD-206+) variava em sentido oposto, passando a representar 45% do total, contra apenas 6% no Dia 1. Esses achados indicam que, 1 mês após o insulto pela GT, os macrófagos, em número já bem menor, estavam muito mais orientados a uma ação de reparo tecidual, característica do fenótipo M2^{122, 123}, do que à promoção de uma intensa atividade inflamatória. De outro lado, a infiltração por miofibroblastos também diminuiu em intensidade. Em seu conjunto, tais achados pareciam indicar que o intenso processo inflamatório observado no Dia 1 havia involuído e se encaminhava para resolução. No entanto, a regressão do processo era apenas aparente. A densidade de células positivas para Ang II continuava tão alta quanto no Dia 1. Além disso, a deposição de Col-1, que não chegou a ser detectável no Dia 1, era agora nítida, acompanhada pela deposição de fibronectina, que passou a ocupar uma fração do córtex renal superior ao dobro do controle. Por outro lado, a imunidade inata também se mantinha ativada: embora a abundância do NLRP3, da Caspase-1, da IL-6 e do TLR-4 se normalizasse, a da IL-1 β e a da unidade p65 do sistema NF- κ B conservavam-se nos níveis observados no Dia 1. Portanto, mantinha-se a essa altura um processo inflamatório silencioso, acompanhado e possivelmente alimentado por uma ativação igualmente quiescente de vários componentes da imunidade inata.

No presente estudo, ratos expostos agudamente aos efeitos tóxicos da GT foram acompanhados durante inéditos 180 dias após aquele tratamento. Ao final desse período, os sinais de lesão tubular continuavam ausentes, enquanto a fração de excreção de sódio e potássio, assim como a osmolalidade urinária, mantiveram-se em níveis semelhantes aos encontrados no Grupo CN. Embora a concentração sérica de creatinina (um marcador pouco

sensível a pequenas variações do RFG) se mantivesse próxima ao normal, o envolvimento glomerular era agora aparente: as lesões esclerosantes, que haviam regredido, ressurgiam agora; uma porcentagem expressiva dos glomérulos exibia alterações características de isquemia, com retração do tufo e fechamento de alças capilares; e a albuminúria retornava com a mesma intensidade observada no primeiro dia. Esses achados indicavam que o processo de lesão estrutural desencadeado pela GT não havia sido estancado.

De modo semelhante, o processo inflamatório parecia haver cedido completamente, com o retorno ao normal do número de macrófagos (total e CD206+) e da infiltração por miofibroblastos. No entanto, outros achados indicavam que a inflamação se mantinha, ainda que em baixa intensidade. A infiltração cortical por células positivas para Ang II persistia nos níveis observados anteriormente, indicando que continuava a ocorrer ativação do SRA local, enquanto a deposição de colágeno e de fibronectina se mantinha evidente, indicando a presença contínua de fibrose renal. Quanto à ativação da imunidade inata, a abundância da fração nuclear do componente p65 continuava elevada em relação ao normal, acompanhada por ativação da IL-6, indicando ativação persistente do sistema NF- κ B. Por outro lado, a expressão renal da IL-1 β continuava anormalmente alta, embora em níveis mais modestos do que os observados inicialmente, provavelmente em decorrência de estimulação pelo sistema NF- κ B. É provável que os níveis da fração ativa da IL-1 β também tenham permanecido elevados nesses ratos, uma vez que o conteúdo renal da forma ativa da Caspase-1, que se havia normalizado aos 30 dias, voltou a aumentar no Dia 180, por sua vez refletindo um aumento da atividade do inflamassoma NLRP3, embora não tenha sido possível detectar com segurança um aumento da expressão renal da fração ativa da IL-1 β .

As razões para esse comportamento, com um processo inflamatório insidioso que se mantém por períodos prolongados e leva à fibrose renal, não estão claras. Sabe-se que essa

persistência de um processo inflamatório crônico após um insulto de curta duração ocorre também em outros modelos experimentais de DRC. Rodríguez-Iturbe e col ^{124,125} mostraram que ratos submetidos a tratamento temporário com L-NAME desenvolviam permanentemente hipertensão arterial sal-sensível. Anteriormente, Anderson e col ¹²⁶ haviam relatado o desenvolvimento de glomeruloesclerose progressiva ao longo de um período prolongado que se seguiu a um breve e aparentemente reversível episódio de síndrome nefrótica induzida por puromicina. Fujihara e col ¹²⁷ e Mattar e col ¹²⁸ mostraram que ratos submetidos a inibição crônica do óxido nítrico (NO) por L-NAME durante um curto período desenvolveram um quadro progressivo de glomeruloesclerose e fibrose intersticial.

O caráter persistente da nefropatia crônica observada no presente estudo poderia ser atribuído a um desarranjo da microcirculação glomerular, levando ao desenvolvimento de hipertensão intracapilar. A origem dessa anomalia poderia ser uma redução do número de glomérulos, levando à sobrecarga dos néfrons remanescentes por vicariância, como demonstrado anteriormente para outros modelos de DRC ^{91, 129}. No entanto, essa explicação parece improvável no presente contexto, uma vez que o dano glomerular observado é de intensidade apenas moderada, menos de 2% dos glomérulos exibindo lesões esclerosantes. Uma possibilidade atraente é a ativação permanente do SRA local, mesmo cessado o insulto inicial, o que poderia ajudar a explicar tanto as lesões glomerulares (por hipertensão intracapilar) como túbulo-intersticiais. Essa anomalia já havia sido demonstrada anteriormente em um modelo experimental totalmente diferente, a inibição temporária do NO ¹²⁷. O mecanismo de ativação continuada do SRA após a recuperação de uma NTA é de origem incerta. Deve-se notar que no presente estudo ela se fez acompanhar de ativação igualmente persistente do sistema NF-κB e, em menor grau, da via do inflamassoma NLRP3. É fato bem conhecido que a Ang II é um dos fatores mais importantes de estímulo à ativação do sistema NF-κB, por promover a fosforilação e degradação do complexo IκB, que impede

a migração ao núcleo do complexo p50-p65^{130, 131, 119, 121, 130}. De outro lado, há evidências de que a ativação do sistema NF-κB estimula por sua vez a expressão do receptor AT1^{132, 133}. Essa interação recíproca entre SRA e NF-κB pode ajudar a explicar tanto a ativação simultânea e persistente dos dois sistemas quanto o caráter continuado do processo de fibrose observado em ratos tratados com GT.

Em resumo, ratos que receberam GT por 9 dias mostraram sinais evidentes de injúria renal aguda, com necrose tubular, lesões glomerulares esclerosantes e retenção de creatinina. Embora essas alterações estruturais e funcionais tenham regredido 30 dias após cessado o tratamento com GT, alguns elementos inflamatórios importantes persistiram, como a ativação do SRA, do sistema NF-κB e da via NLRP3. Cento e oitenta dias depois da administração de GT, sinais de lesão estrutural renal, como fibrose renal, voltaram a se manifestar, acompanhados de ativação persistente do sistema NF-κB, da IL-1β e do SRA. Essas observações indicam que a lenta transição entre LRA e DRC ocorre não apenas após lesões causadas por isquemia/reperfusão, mas também na sequência de um processo agudo de lesão nefrotóxica, podendo estar relacionada à ativação simultânea e persistente do SRA e da imunidade inata através do sistema NF-κB e da via do inflamassoma NLRP3.

6) Conclusões

1 – A administração aguda de GT promove de imediato um quadro de NTA associada a um processo inflamatório caracterizado por infiltração de macrófagos e miofibroblastos, bem como fibrose renal incipiente, acompanhado de ativação local do SRA e da imunidade inata renal.

2 – Esse quadro é parcialmente revertido 30 dias após o quadro agudo, com regressão dos danos estruturais e das alterações funcionais associadas. Persiste, no entanto, um processo inflamatório associado, com infiltração de macrófagos, agora polarizados ao fenótipo reparador M2, e de células marcadas positivamente para Ang II, além de agravamento da fibrose intersticial. Tampouco há regressão completa da ativação da imunidade inata renal.

3 – Aos 180 dias após o quadro agudo, as lesões estruturais se agravam, com o envolvimento dos glomérulos, enquanto a fibrose intersticial, a ativação do SRA e a da imunidade inata se mantêm.

4 – Esses resultados indicam que mesmo uma NTA menos agressiva como a provocada pela GT pode trazer sérias sequelas no longo prazo, levando ao desenvolvimento de uma DRC devido à persistente ativação do SRA e da imunidade inata.

7) Referências Bibliográficas

1. Sesso RC, Lopes AA, Thome FS, *et al.* Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. *J Bras Nefrol* 2016; **38**: 54-61.
2. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, *et al.* Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. *J Bras Nefrol* 2016; **38**: 54-61.
3. Fujihara CK, Denucci G, Zatz R, *et al.* Chronic Nitric-Oxide Synthase Inhibition Aggravates Glomerular Injury in Rats with Subtotal Nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 1995; **5**: 1498-1507.
4. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, *et al.* Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 1986; **77**: 1925-1930.
5. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha II, *et al.* Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension* 2001; **37**: 170-175.
6. Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, *et al.* Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney international* 2003; **63**: 209-216.
7. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Experimental nephrology* 1996; **4 Suppl 1**: 34-40.
8. Goncalves GM, Castoldi A, Braga TT, *et al.* New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scandinavian journal of immunology* 2011; **73**: 428-435.
9. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; **11**: R31.
10. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* 2011; **121**: 4210-4221.
11. Yang L, Humphreys BD, Bonventre JV. Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: maladaptive repair. *Contributions to nephrology* 2011; **174**: 149-155.
12. Hoste EA, Kellum JA. Incidence, classification, and outcomes of acute kidney injury. *Contributions to nephrology* 2007; **156**: 32-38.
13. Srisawat N, Kellum JA. Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. *Current opinion in critical care* 2011; **17**: 548-555.

14. Chawla LS. Acute kidney injury leading to chronic kidney disease and long-term outcomes of acute kidney injury: the best opportunity to mitigate acute kidney injury? *Contributions to nephrology* 2011; **174**: 182-190.
15. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, *et al.* Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature medicine* 2010; **16**: 535-543, 531p following 143.
16. Geleilate TJ, Melo GC, Costa RS, *et al.* Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta endothelin, angiotensin-II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Journal of nephrology* 2002; **15**: 633-642.
17. Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Nephron Physiology* 2004; **98**: p97-106.
18. Quiros Y, Blanco-Gozalo V, Sanchez-Gallego JI, *et al.* Cardiotrophin-1 therapy prevents gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological research* 2016; **107**: 137-146.
19. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, *et al.* The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 738-753.
20. Bolisetty S, Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more. *Kidney Int* 2009; **75**: 674-676.
21. Sato Y, Yanagita M. Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; **315**: F1501-F1512.
22. Kim HJ, Lee DW, Ravichandran K, *et al.* NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; **346**: 465-472.
23. Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, *et al.* TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS One* 2012; **7**: e37584.
24. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, *et al.* TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2007; **178**: 6252-6258.
25. Molitoris BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest* 2014; **124**: 2355-2363.
26. Yalavarthy R, Edelstein CL. Therapeutic and predictive targets of AKI. *Clin Nephrol* 2008; **70**: 453-463.
27. Jo SK, Sung SA, Cho WY, *et al.* Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 1231-1239.

28. Li J, Tang Y, Tang PMK, *et al.* Blocking Macrophage Migration Inhibitory Factor Protects Against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Mol Ther* 2018; **26**: 2523-2532.
29. Lee S, Huen S, Nishio H, *et al.* Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 317-326.
30. Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, *et al.* Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**: F525-531.
31. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in immunology* 2006; **27**: 352-357.
32. Martinon F, Agostini L, Meylan E, *et al.* Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current biology : CB* 2004; **14**: 1929-1934.
33. 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.
34. Lee JW, Bae E, Kwon SH, *et al.* Transcriptional modulation of the T helper 17/interleukin 17 axis ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 2019; **34**: 1481-1498.
35. Floege J, Alpers CE, Burns MW, *et al.* Glomerular cells, extracellular matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Lab Invest* 1992; **66**: 485-497.
36. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, *et al.* Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 1998; **54**: 1510-1519.
37. Fujihara CK, Noronha IL, Malheiros, *et al.* Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 283-290.
38. 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**.
39. Cao Q, Lu J, Li Q, *et al.* CD103⁺ Dendritic Cells Elicit CD8⁺ T Cell Responses to Accelerate Kidney Injury in Adriamycin Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2016; **27**: 1344-1360.
40. Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, *et al.* Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1514-1529.

41. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, *et al.* The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1456-1462.
42. Maschio G, Alberti D, Janin G, *et al.* Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 1996; **334**: 939-945.
43. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *The Journal of clinical investigation* 1986; **77**: 1993-2000.
44. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, *et al.* Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *The Journal of clinical investigation* 1992; **90**: 766-771.
45. Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney international* 1996; **49**: 578-597.
46. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, *et al.* Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *The Journal of clinical investigation* 1999; **104**: 1693-1701.
47. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, *et al.* Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *The Journal of clinical investigation* 1999; **103**: 627-635.
48. 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. *The Journal of clinical investigation* 1994; **93**: 2431-2437.
49. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, *et al.* Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992; **19**: 464-474.
50. Graciano ML, Cavaglieri ReC, Dellê H, *et al.* Intrarenal Renin-Angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1805-1815.
51. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, *et al.* Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 881-900.
52. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, *et al.* Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res* 1995; **76**: 1-15.

53. Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, *et al.* Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 2001; **37**: 1171-1178.
54. Esteban V, Ruperez M, Vita JR, *et al.* Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl* 2003: S33-38.
55. 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.
56. Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, *et al.* An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int* 2005; **67**: 1913-1924.
57. Gonçalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, *et al.* Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F945-954.
58. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010; **30**: 245-257.
59. Braga TT, Correa-Costa M, Azevedo H, *et al.* Early infiltration of p40IL12(+)CCR7(+)CD11b(+) cells is critical for fibrosis development. *Immun Inflamm Dis* 2016; **4**: 300-314.
60. Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, *et al.* Gentamicin, a New Broad-Spectrum Antibiotic Complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1963; **161**: 1-7.
61. 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.
62. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, *et al.* NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000; **35**: 193-201.
63. Fanelli C, Arias SCA, Machado FG, *et al.* Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. *Sci Rep* 2017; **7**: 3192.
64. 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.
65. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**: 381-399.

66. Zhang YX, Zhang JR, Wang ZG. Mycophenolate mofetil affects monocyte Toll-like receptor 4 signaling during mouse renal ischemia/reperfusion injury. *Chinese medical journal* 2013; **126**: 1224-1229.
67. Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 854-867.
68. 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.
69. Watanabe A, Nagai J, Adachi Y, *et al.* Targeted prevention of renal accumulation and toxicity of gentamicin by aminoglycoside binding receptor antagonists. *J Control Release* 2004; **95**: 423-433.
70. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1003-1012.
71. Mezzano S, Aros C, Droguett A, *et al.* NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2004; **19**: 2505-2512.
72. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* 2006; **72**: 1493-1505.
73. Small DM, Coombes JS, Bennett N, *et al.* Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2012; **17**: 311-321.
74. 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.
75. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, *et al.* Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney international* 2001; **60**: 1366-1377.
76. 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.
77. Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, *et al.* Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochimica et biophysica acta* 1996; **1316**: 132-138.
78. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, *et al.* Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney international* 1995; **48**: 1263-1271.

79. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 2009; **27**: 229-265.
80. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology* 2004; **16**: 3-9.
81. Magalhaes JG, Sorbara MT, Girardin SE, *et al.* What is new with Nods? *Current opinion in immunology* 2011; **23**: 29-34.
82. Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nature immunology* 2012; **13**: 352-357.
83. Granata S, Masola V, Zoratti E, *et al.* NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. *PloS one* 2015; **10**: e0122272.
84. Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, *et al.* TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *European journal of clinical investigation* 2015; **45**: 160-169.
85. 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.
86. Andrade-Oliveira V, Campos EF, Goncalves-Primo A, *et al.* TLR4 mRNA levels as tools to estimate risk for early posttransplantation kidney graft dysfunction. *Transplantation* 2012; **94**: 589-595.
87. Jang HR, Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology* 2015; **11**: 88-101.
88. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 20388-20393.
89. Guo H, Bi X, Zhou P, *et al.* NLRP3 Deficiency Attenuates Renal Fibrosis and Ameliorates Mitochondrial Dysfunction in a Mouse Unilateral Ureteral Obstruction Model of Chronic Kidney Disease. *Mediators Inflamm* 2017; **2017**: 8316560.
90. 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.
91. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, *et al.* Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *American journal of physiology Renal physiology* 2007; **292**: F92-99.
92. Okabe C, Borges RL, de Almeida DC, *et al.* NF- κ B activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **305**: F155-163.

93. Zambom FFF, Oliveira KC, Foresto-Neto O, *et al.* Pathogenic role of innate immunity in a model of chronic NO inhibition associated with salt overload. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019.
94. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 667-678.
95. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 609-617.
96. Mishra KP, Ganju L, Singh SB. Hypoxia modulates innate immune factors: A review. *Int Immunopharmacol* 2015; **28**: 425-428.
97. Falco FG, Smith HM, Arcieri GM. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. *The Journal of infectious diseases* 1969; **119**: 406-409.
98. Schultze RG, Winters RE, Kauffman H. Possible nephrotoxicity of gentamicin. *The Journal of infectious diseases* 1971; **124 Suppl**: S145-147.
99. John R, Herzenberg AM. Renal toxicity of therapeutic drugs. *Journal of clinical pathology* 2009; **62**: 505-515.
100. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, *et al.* Animal models of acute renal failure. *Pharmacological reports : PR* 2012; **64**: 31-44.
101. Vandewalle A, Farman N, Morin JP, *et al.* Gentamicin incorporation along the nephron: autoradiographic study on isolated tubules. *Kidney international* 1981; **19**: 529-539.
102. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology* 1990; **40**: 2383-2392.
103. Fujihara CK, Michellazzo SM, de Nucci G, *et al.* Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *The American journal of physiology* 1994; **266**: F697-705.
104. 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.
105. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; **2**: 235-254.
106. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-Naimi MS. Renoprotective effect of irbesartan in a rat model of gentamicin-induced nephrotoxicity: Role of oxidative stress. *J Lab Physicians* 2019; **11**: 200-205.
107. 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.

108. Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, *et al.* Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney international* 2000; **57**: 2375-2385.
109. Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA: Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. In (vol 21), São José do Rio Preto, Braz J Cardiovasc Surg, 2006
110. Prayle A, Watson A, Fortnum H, *et al.* Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax* 2010; **65**: 654-658.
111. Jaikumkao K, Pongchaidecha A, Thongnak LO, *et al.* Amelioration of Renal Inflammation, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Underlies the Protective Effect of Low Dosage of Atorvastatin in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity. *PLoS One* 2016; **11**: e0164528.
112. Heeba GH. Angiotensin II receptor blocker, losartan, ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Pharmacology* 2011; **87**: 232-240.
113. Geleilate TJ, Costa RS, Dantas M, *et al.* Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. *Braz J Med Biol Res* 2001; **34**: 985-991.
114. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996; **7**: 2495-2508.
115. Strutz F, Okada H, Lo CW, *et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; **130**: 393-405.
116. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, *et al.* A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; **450**: 67-76.
117. Nakajima T, Hishida A, Kato A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994; **266**: F425-431.
118. 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.
119. 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.
120. 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.

121. 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.
122. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; **122**: 787-795.
123. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3522-3530.
124. Rodríguez-Iturbe B, Franco M, Tapia E, *et al.* Renal inflammation, autoimmunity and salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; **39**: 96-103.
125. 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.
126. Anderson S, Diamond JR, Karnovsky MJ, *et al.* Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 1988; **82**: 1757-1768.
127. 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.
128. Mattar AL, Machado FG, Fujihara CK, *et al.* Persistent hypertension and progressive renal injury induced by salt overload after short term nitric oxide inhibition. *Clinics (Sao Paulo)* 2007; **62**: 749-756.
129. Arias SC, Souza RA, Malheiros DM, *et al.* An association of losartan-hydrochlorothiazide, but not losartan-furosemide, completely arrests progressive injury in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; **310**: F135-143.
130. Oakley F, Teoh V, Ching-A-Sue G, *et al.* Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2009; **136**: 2334-2344.e2331.
131. Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, *et al.* The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem* 2006; **281**: 13275-13284.
132. Luo H, Wang X, Wang J, *et al.* Chronic NF-κB blockade improves renal angiotensin II type 1 receptor functions and reduces blood pressure in Zucker diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2015; **14**: 76.
133. Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 2000; **75**: S7-14.