

Gizely Cristina da Silva Moreira

**Papel da imunidade inata na doença renal crônica
que se segue ao tratamento temporário com uma
sobrecarga de adenina na dieta**

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

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Gizely Cristina da Silva

Papel da imunidade inata na doença renal crônica que se segue ao tratamento temporário com uma sobrecarga de adenina na dieta / Gizely Cristina da Silva Moreira. -- São Paulo, 2016.

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

Programa de Nefrologia.

Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.Nefrite intersticial 2.Insuficiência renal crônica 3.Adenina
4.Imunidade inata 5.Angiotensinas 6.NF-Kappa B

USP/FM/DBD-437/16

DEDICATÓRIA

À Deus, por me fazer tão forte em meio à tudo. Todas as minhas conquistas devo à Ele.

Aos meus pais, Delma e Robson, dedico tudo o que conquistei... e pelo apoio incansável para que tudo desse sempre certo. Estou aqui, e venci por vocês. Amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof Dr Roberto Zatz que me recebeu tão bem e com quem aprendo a cada dia a amar a ciência. Seu amor por ela é lindo e contagiante. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela enorme paciência e bom humor durante todo esse tempo.

À querida Dra Clarice Fujihara (Clá) que me fez crescer como pessoa e profissional. Obrigada pela paciência, pelos inúmeros puxões de orelha e por todos os elogios. Obrigada por toda a colaboração e contribuição neste estudo. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof Dr Niels Olsen Saraiva Câmara pela parceria neste estudo, por discutir diversas vezes os meus dados e por suas valiosas sugestões. Um pesquisador que admiro imensamente pela competência, inteligência, simplicidade e bom-humor.

À Dra Denise Malheiros pela enorme colaboração. Muito obrigada por, pacientemente, analisar as lâminas incontáveis vezes e por discutir os achados. Agradeço imensamente sua ajuda em todos os momentos.

Aos meus eternos amigos e companheiros, Lisy e Neto. Vocês fizeram total diferença na minha vida e no meu aprendizado durante esse tempo. Obrigada pela paciência, ombro amigo, sugestões e risadas de todos os dias. Amo vocês demais!

Aos meus queridos companheiros de bancada, Karin, Amanda, Simone, Viviane, Fernanda e Camilla, obrigada por estarem sempre pertinho e pelo cuidado de sempre. Obrigada pelas conversas e divertimento no dia-a-dia.

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

Ao Victor Ávila por todo cuidado no preparo dos cortes histológicos.

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

À Vivian pelo cuidado na manutenção do biotério e dos animais utilizados nesse estudo.

Ao Wagner por sempre estar pronto a ajudar e pelo cuidado com todos os detalhes que são tão importantes.

À Denise, Solange, Pedro e Eliana pela assistência com toda a parte burocrática.

À minha irmã Nathallya e meus queridos avós paraenses, Gemima e Dilson, pelas palavras de força e por estarem sempre ao meu lado. Vocês foram sempre indispensáveis, mesmo a tantos km de distância. Eu amo muito vocês!

Ao meu amor, Marcelo, obrigada por todo incentivo, paciência e cuidado durante esse tempo... você fez diferença e também faz parte dessa conquista! Amo você!

*E quando as coisas boas e desejadas começam a nos acontecer, que percebemos o quanto foi preciso certas perdas, certos distanciamentos, certas indiferenças, certas atitudes, certas decisões. Deus sempre nos faz enxergar o óbvio, Ele sempre nos faz compreender que mesmo cercados por uma multidão, nem todos estão torcendo pela gente, nem todos estão do nosso lado, nem todos vão nos acompanhar até o fim, e que a necessidade de estarmos confiantes é grande para não deixarmos de prosseguir. Que Deus nos livre sempre do mal e jamais nos permita desistir...
amém...*

Cecília Sfalsin

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	14
<u>1.1 Doença renal crônica e fatores de risco.....</u>	14
<u>1.2 DRC por excesso de adenina.....</u>	16
<u>1.3 Imunidade inata e DRC.....</u>	19
<u>1.4 Papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona na DRC.....</u>	24
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
<u>3.1 Modelo experimental e grupos de estudo.....</u>	26
<u>3.2 Protocolo experimental.....</u>	28
<u>3.3 Análises histológicas.....</u>	29
<u>3.4 Histomorfometria renal.....</u>	30
<u>3.5 Análises imuno-histoquímicas.....</u>	30
<u>3.6 Análise do conteúdo proteico renal (Western Blot).....</u>	34
<u>3.7 Análise da translocação nuclear do dímero p65 - NFκB (Western Blot)....</u>	36
<u>3.8 Análise do conteúdo proteico renal (ELISA).....</u>	37
<u>3.9 Análises por RT-PCR.....</u>	38
<u>3.10 Análises bioquímicas.....</u>	43
<u>3.11 Análise estatística.....</u>	43
4. RESULTADOS.....	44
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
DRC	Doença Renal Crônica
ADE	Adenina
TLR2	Toll like receptor 2
TLR4	Toll like receptor 4
IL1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
2,8-DHA	2,8-Dihidroxiadenina
ECM	Matriz extracelular
EG	Esclerose glomerular
AMP	Monofosfato de adenosina
APRT	Adenina fosforribosil transferase
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
PDTC	Pirrolidina Ditiocarbamato
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
PE	Peso corpóreo
PC	Pressão caudal
ALB	Albuminúria
Scr	Creatinina sérica
APAAP	Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina
AngII	Angiotensina II
BSA	Soro fetal bovino
RT-PCR	PCR em tempo real
ANOVA	Análise de variância
K+	Potássio sérico
Ht	Hematócrito arterial
PR/PE	Relação peso renal pelo peso corpóreo
M ϕ	Macrófagos
Col-1	Colágeno-1 intersticial
AngII+	Células positivas para Angiotensina II

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lista de primers utilizados no trabalho	42
Tabela 2.	Parâmetros gerais de função renal e sistêmica	44
Tabela 3.	Análise morfológica do tecido renal	51
Tabela 4.	Estudo imuno-histoquímico	56
Tabela 5	Análise da expressão proteica e gênica renal de componentes da imunidade inata dos animais	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Estrutura do inflamassoma NLRP3	23
Figura 02.	Esquema do protocolo experimental	28
Figura 03.	Gráfico - Evolução do peso corpóreo dos animais	45
Figura 04.	Gráfico - Evolução da pressão sistólica caudal dos animais	47
Figura 05.	Gráfico - Evolução da excreção urinária de albumina dos animais	48
Figura 06.	Gráfico - Concentração de creatinina sérica dos animais	49
Figura 07.	Gráfico - Concentração de potássio sérico dos animais	50
Figura 08.	Gráfico - Hematócrito arterial dos animais	51
Figura 09.	Microfotografias representativas de cristais	52
Figura 10.	Gráfico - Contagem de cristais de 2,8-DHA no tecido renal dos animais.	53
Figura 11.	Gráfico - Relação do peso renal e corpóreo dos animais	54
Figura 12.	Microfotografias representativas de glómerulos	55
Figura 13.	Gráfico - Esclerose Glomerular dos animais	56
Figura 14.	Microfotografias representativas da infiltração intersticial de macrófagos	57
Figura 15.	Gráfico - Infiltração túbulo-intersticial de macrófagos no tecido renal dos animais.	58
Figura 16.	Microfotografias representativas da expressão de Colágeno	59
Figura 17.	Gráfico - Expressão de Colágeno-1 no tecido renal dos animais	59
Figura 18.	Microfotografias representativas da presença de células positivas para Ang 2	60
Figura 19.	Gráfico - Células positivas para Angiotensina 2 no tecido renal dos animais	61
Figura 20.	Gráfico - Expressão proteica e gênica renal de IL-1 β dos animais	63
Figura 21.	Microfotografias representativas de marcação positiva IL-1 β	63
Figura 22.	Gráfico - Expressão proteica e gênica renal de TLR4 dos animais	64
Figura 23.	Microfotografias representativas de marcação positiva TLR4	65
Figura 24.	Gráfico - Expressão proteica e gênica renal de NLRP3 dos animais	66
Figura 25.	Microfotografias representativas da presença de células positivas para NLRP3	67
Figura 26.	Gráfico - Expressão gênica renal de IL-6 dos animais	68
Figura 27.	Gráfico – Translocação nuclear do dímero p65 (NF- κ B)	69

RESUMO

Moreira GCS. *Papel da imunidade inata na doença renal crônica que se segue ao tratamento temporário com uma sobrecarga de adenina dietética* [Tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

O excesso de adenina na dieta (ADE) promove precipitação intratubular de cristais, levando a uma nefrite intersticial progressiva com perda de função renal. Estudo recente demonstrou que esse processo requer ativação do sistema NF- κ B. No presente estudo investigamos o possível envolvimento de outros componentes da imunidade inata, além do NF- κ B. Verificamos também a hipótese de que a nefropatia associada aos cristais continua a progredir mesmo depois de cessada a sobrecarga de adenina. Foram estudados ratos Munich-Wistar machos e adultos sem tratamento (C) ou recebendo 0.5% de ADE na dieta. Após 1 semana, a ADE foi removida da dieta e os animais foram seguidos por 4 ou 24 semanas. A administração de ADE por 1 semana promoveu uma inflamação intersticial aguda, com perda de função renal, alteração da pressão caudal, sem alterações glomerulares. Os mediadores da imunidade inata, como TLR2, TLR4, inflamassoma NLRP3, IL1 β e IL-6, apresentaram-se ativados sem, no entanto, ativar o sistema NF- κ B. Após cessada a sobrecarga de ADE, a inflamação persistiu, com infiltração por macrófagos, expressão elevada de AngII, deposição progressiva de colágeno e, na fase mais tardia, glomeruloesclerose, caracterizando um processo inflamatório crônico, autônomo, que não contou com a participação do eixo NLR/IL1 β . Em contraste, o sistema NF- κ B foi ativado, sendo um dos possíveis estímulos a produção intra-renal de AngII. Dois mecanismos patogênicos podem ser identificados neste estudo: 1) agudo, associado à ativação do eixo NLR-IL1 β ; 2) crônico, associado à produção de AngII renal e à ativação do sistema NF- κ B.

Descritores: nefrite intersticial; insuficiência renal crônica; adenina; imunidade inata; angiotensinas; NF-Kappa B.

SUMMARY

Moreira GCS. *The role of innate immunity in chronic kidney disease following the treatment with a temporary overload dietary adenine* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Excess adenine in the diet (ADE) promotes intratubular crystal precipitation, leading to progressive interstitial nephritis and loss of renal function. A recent study has shown that this process requires activation of the NF- κ B system. In the present study we investigated the possible involvement of other components of innate immunity, in addition to NF- κ B, as well as whether nephropathy associated with excess adenine continues to progress even after dietary cessation. Male Munich-Wistar rats without treatment (C) or receiving 0.5% of ADE in the diet were studied. After 1 week, ADE was removed from the diet and the animals were followed for 4 or 24 weeks. Administration of ADE for 1 week promote acute interstitial inflammation, with loss of renal function, alteration of caudal pressure, without glomerular changes. Mediators of innate immunity, such as TLR2, TLR4, NLRP3 inflamassome, IL1 β and IL-6 , were shown to be activated, with no apparent activation of the NF- κ B system. In the late phases of the model, the inflammation persisted, with significant infiltration by macrophages, high expression of AngII, progressive collagen deposition and glomerulosclerosis, characterizing a chronic, autonomic inflammatory process that did not involve the participation of the NLR/IL1 β axis. By contrast, the NF- κ B system was activated, with intra-renal AngII production as a possible stimulus. Two mechanisms operated this study: 1) an acute one, associated with activation of the NLR-IL1 β axis; 2) a chronic one, associated with intrarenal AngII production and NF- κ B activation.

Descriptors: Nephritis, interstitial; renal insufficiency, chronic; adenine; immunity, innate; angiotensins; NF-Kappa B.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica e fatores de risco

A Doença Renal Crônica (DRC) emerge em anos recentes como um sério problema de saúde nas populações contemporâneas, sendo considerada uma “epidemia” de crescimento alarmante. Dados de 2007 indicaram que mais de 2 milhões de brasileiros são portadores de algum grau de disfunção renal [1]. Estima-se que em todo o mundo cerca de 2.000.000 de pacientes necessitem de terapia de substituição renal. No Brasil, cerca de 130.000 pacientes dependem de diálise crônica para sobreviver, enquanto outros 30.000 pacientes/ano são incluídos nesses programas [2].

Sabe-se que a DRC é caracterizada por uma perda progressiva da função renal, atrofia de túbulos, inflamação (recrutamento de leucócitos), rarefação microvascular e deposição de matriz extracelular (ECM) no espaço intersticial, levando à fibrose tecidual generalizada [3]. De uma forma geral, os mecanismos que desencadeiam a perda de função renal estão relacionados a fatores hemodinâmicos e inflamatórios e, sabendo-se que a progressão da fibrose renal resulta na perda irreversível da função renal [4], compreender os mecanismos que levam às nefropatias progressivas é fundamental.

Uma série de fatores de risco para o desenvolvimento da DRC tem sido descrita na literatura, tais como doenças pré-existentes, histórico familiar, além de variáveis demográficas e de comportamento. Uma vez desenvolvida a doença, a perda progressiva da filtração glomerular, principal marcador da DRC, é associada a um conjunto extenso e complexo de alterações fisiológicas, as quais resultam em um grande número de complicações e morbidades [5]. Entre as patologias que podem

conduzir à DRC destacam-se o diabetes melittus, a hipertensão arterial e as glomerulonefrites [6, 7, 8, 9].

Fatores hemodinâmicos e inflamatórios são capazes de promover hipertrofia glomerular, expansão de matriz mesangial e lesão de podócitos, culminando com o desenvolvimento de esclerose glomerular (EG). Além das lesões glomerulares, a fibrose intersticial e a atrofia tubular também participam do processo que leva à perda progressiva da função renal [4].

A fibrose intersticial é uma complicação comum de glomerulopatias avançadas, e determina a progressão da nefropatia. No entanto, a fibrose intersticial crônica pode se iniciar na ausência de lesões glomerulares. É o caso das nefrites intersticiais crônicas, que podem ser causadas por infecções, medicamentos, desordens imunes, toxinas, nefropatias induzidas por distúrbios metabólicos, assim como doenças tubulointersticiais hereditárias [10].

Independente do processo que iniciou a lesão renal, a fibrose tubulointersticial é o resultado final da ação combinada de uma série de fatores patogênicos [11]. A deposição de matriz intersticial, com acúmulo de fibroblastos, colágeno (tipos I e III) e fibronectina nos espaços intersticiais [11, 13], associada à infiltração por células inflamatórias, perda de células tubulares e rarefação da microvasculatura peritubular, é característica da fibrose renal [12]. A retração tecidual resulta da ação de microfilamentos como os de α -actina de músculo liso e de outras proteínas do citoesqueleto [14]. Nesse contexto, fibroblastos e, possivelmente, células tubulares podem sofrer alterações fenotípicas, diferenciando-se em miofibroblastos, capazes de expressar α -actina [15, 16]. A produção de proteínas da matriz extracelular pode também originar-se em macrófagos, os quais são

importantes na liberação de citocinas e de fatores de crescimento, e no recrutamento de células inflamatórias. Uma série de vias intracelulares está envolvida no processo de fibrogênese associado à DRC.

É amplamente conhecida a natureza progressiva da DRC: uma vez iniciado, o processo tende a progredir mesmo depois de cessado o insulto inicial. Os mecanismos que fazem com que as nefropatias crônicas tendam a se perpetuar são ainda pouco conhecidos.

1.2 DRC por excesso de adenina

O esforço para elucidar o caráter progressivo da DRC, e a busca de novas estratégias terapêuticas, baseiam-se fortemente na utilização de modelos animais que simulem manifestações clínicas de doenças renais em humanos [17]. Um modelo experimental de DRC com fibrose intersticial, cada vez mais utilizado, é o da sobrecarga de adenina. Dentre as bases nitrogenadas encontradas nos ácidos nucleicos, a adenina é a única relativamente tóxica [18], sendo responsável por causar inflamação intersticial crônica, dilatação tubular, necrose e fibrose intensa, acompanhada de disfunção renal [19, 20]. A adenina é produzida endogenamente como um subproduto da via da poliamina e pela reação de adenosina com S-adenosil-homosisteína hidrolase [20]. Em mamíferos, a adenina proveniente da degradação de nucleotídeos é utilizada para ressintetizar esses compostos. Um passo importante desse processo é a conversão da adenina a monofosfato de adenosina (AMP), através da ação da adenina fosforribosil transferase (APRT). A deficiência dessa enzima, em animais de laboratório ou em seres humanos, pode ter sérias consequências adversas.

A deficiência da APRT é um erro inato raro do metabolismo da adenina, de natureza autossômica recessiva [21] e resulta na geração de grandes quantidades de 2,8 dihidroxiadenina (2,8-DHA), composto com baixa solubilidade, levando à formação de cálculos no trato urinário e ao desenvolvimento de uma nefropatia cristalina [22, 23]. A deficiência de APRT foi descrita pela primeira vez em 1968 por Kelley e cols [24], que relataram deficiência parcial da enzima em quatro indivíduos assintomáticos. A doença já foi observada em todos os grupos étnicos, embora a maioria dos casos conhecidos tenha ocorrido no Japão, França, e Islândia [22]. É uma causa rara, mas definida de calculose renal e DRC, evoluindo rapidamente para um quadro de insuficiência renal em uma proporção significativa de pacientes não tratados [25].

A partir de um excesso de adenina na dieta, pode ocorrer um acúmulo dessa purina no organismo, com consequências semelhantes às da inativação da APRT. Em 1952, Phillips e cols foram pioneiros na observação de que um excesso de adenina na dieta de ratos e camundongos causava lesões renais graves, acompanhadas por elevação da ureia plasmática e diminuição do peso corpóreo [18]. Estudos posteriores encontraram resultados semelhantes, como Story e cols em 1977 [26]. Entretanto, foi apenas em 1986 que Yokozawa e cols padronizaram um modelo de DRC induzida pela administração oral de adenina. Nesse estudo, os animais receberam uma dieta contendo adenina a 0,75% durante um período de 8 semanas. Após 4 semanas, era possível observar a presença de cristais de 2,8-DHA e a formação de granulomas de corpo estranho no interstício renal, associada a uma fibrose acentuada desse compartimento e a uma elevação progressiva das concentrações plasmáticas de ureia e creatinina, que atingiram níveis mais de 5 vezes

superiores ao normal. Apesar dessa perda acentuada de função renal, e do comprometimento da barreira de filtração, as alterações glomerulares observadas nesses ratos foram surpreendentemente escassas, não passando de uma redução discreta do seu número e de um espessamento moderado da cápsula de Bowman [27].

Apenas recentemente o modelo de sobrecarga de adenina descrito por Yokozawa e cols passou a ser utilizado em maior escala para o estudo da patogênese da DRC [28]. No entanto, os mecanismos que levam à nefrite intersticial crônica e à insuficiência renal associada ao excesso de adenina ainda não foram completamente elucidados. Uma provável justificativa seria a obstrução intratubular maciça por cristais de 2,8-DHA [27]. Porém, esse mecanismo não explica o fato de que pelo menos uma parte dos cristais observados nesse modelo se encontra no interstício renal, provocando a formação de granulomas de corpo estranho [27, 29, 30], em vez de permanecer no lume tubular. O mecanismo dessa translocação dos cristais do lume tubular ao interstício é pouco conhecido. Okabe e cols [31] propuseram que a translocação dos cristais de 2,8-DHA, de início intratubulares, ocorre pelo deslocamento destes para o interstício, em um processo complexo que pode envolver a oclusão completa e desintegração do túbulo ou, mais frequentemente, a formação de um neopitélio que segrega essas formações do lume tubular (ver adiante).

A deposição de cristais no parênquima renal rim induz à infiltração local de macrófagos. Sabe-se que a infiltração de células inflamatórias está associada à produção de MCP-1, RANTES, α -actina [32, 33], de citocinas e fatores de crescimento, como TNF- α , TGF- β e fator de crescimento de fibroblastos [34], ativando mecanismos fibrogênicos, e cursando com produção e deposição de

colágeno por fibroblastos no interstício. Outros investigadores demonstraram a participação de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e IFN-g [35] e genes relacionados à inflamação como a C10, uma proteína responsável pela migração de linfócitos T, monócitos e eosinófilos em camundongos knockout para APRT [36].

Uma característica importante do modelo de sobrecarga de adenina é seu caráter inusitadamente agressivo, que leva à perda rápida da função renal. A razão para esse comportamento é a permanência do insulto, uma vez que em quase todos os estudos desse modelo a administração de adenina foi ininterrupta. No entanto, sabe-se que a inflamação do interstício renal, em decorrência seja de uma nefrite intersticial crônica, seja de uma glomerulopatia, pode progredir mesmo cessado o insulto inicial. Os mecanismos que asseguram essa perpetuação são pouco conhecidos.

Outra característica do modelo de sobrecarga de adenina é a completa ausência de lesões glomerulares. Essa característica é atribuída ao caráter eminentemente intersticial do processo. No entanto, não se sabe se em fases mais avançadas os glomérulos também são acometidos, como ocorre em outros modelos de nefropatia intersticial [37, 38, 39].

1.3 Imunidade inata e DRC

Durante as duas últimas décadas a ciência básica trouxe à tona uma nova compreensão de como patógenos podem desencadear inflamação, ativando a chamada imunidade inata, um sistema de defesa contra a invasão de tecidos por patógenos, inespecífico mas complexo, e extremamente conservado na evolução. Esse sistema compreende desde simples barreiras físicas até a produção de

mediadores químicos que recrutam células especializadas e ativam a imunidade adaptativa [40].

Até os anos 1980, acreditava-se que o funcionamento da imunidade inata era desencadeado essencialmente por moléculas derivadas de microorganismos, hoje conhecidas pela designação genérica de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). No entanto, desde a descoberta dos toll-like receptors (TLR) [40], tornou-se claro que é comum a ativação da imunidade inata na ausência de patógenos [41, 42]. Além disso, a imunidade inata pode ser ativada por cristais microscópicos, como os de ácido úrico (e presumivelmente de 2,8-DHA), que são introduzidos nas células através de vesículas endocitóticas e podem ser parcial ou totalmente dissolvidos em lisossomas. Em seu conjunto, essas moléculas, detritos moleculares anômalos e outras alterações da homeostase intracelular são conhecidos pela sigla DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), ou seja, constituem padrões de risco ou de dano celular. Esses padrões podem ser reconhecidos por receptores presentes no citosol, como os NOD-like receptors (NLR) que através de um mecanismo de oligomerização e associação, formam grandes complexos moleculares conhecidos por inflamassomas, como o NLRP3 [43] que ativam enzimas como a caspase-1 que, por sua vez, catalisam a síntese de potentes mediadores, como as interleucinas 1 α , 18 e 33 [44], desencadeando uma sequência de eventos inflamatórios que independe da ativação da imunidade adquirida.

Inflamassomas são complexos multiproteicos intracitoplasmáticos acionados diante de situações de risco às células [41, 45]. A família NLR inclui 23 genes humanos e 34 genes de ratos, vários dos quais envolvidos na montagem de inflamassomas [46, 47]. Dentre todos os NLRs, o NLRP3 é o mais bem estudado e

caracterizado. Ele compreende um domínio central NACHT, circundado por LRRs c-terminais e caspases N-terminais, domínios de recrutamento e ativação (CARD) e domínios PYD (molécula adaptadora de apoptose associada à proteína speck-like), e a caspase-1 (Figura 1) [48].

A montagem do inflamassoma NLRP3 é apenas parte de um processo complexo que culmina com a produção das Interleucinas 1- β (IL-1 β) e 18 (IL-18), que são potentes mediadores inflamatórios. Esse processo se inicia com a detecção de PAMPs, DAMPs, espécies reativas de O₂ ou outras perturbações intracelulares pelo próprio NLRP3, que sofre um rápido processo de oligomerização, originando o inflamassoma NLRP3. Este funciona como um catalisador da produção da caspase-1 a partir de uma molécula precursora, a procaspase-1. A caspase-1 catalisa então a produção da IL-1 β e IL-18 a partir de seus respectivos precursores, proIL-1 β e proIL-18. Por sua vez, essas moléculas precursoras necessitam da ativação de um outro grande sistema: o NF- κ B [49, 50].

O sistema NF- κ B é uma das mais importantes vias intracelulares associadas à imunidade inata e foi identificado inicialmente em linfócitos B. Esse sistema é constituído por vários heterodímeros estáveis, o mais importante e mais bem estudado dos quais é aquele formado pelas subunidades conhecidas como p50 e p65. Esse heterodímero é na verdade um fator de transcrição que, uma vez no interior do núcleo, ativa uma série de genes que codificam proteínas direta ou indiretamente envolvidas no processo inflamatório, como citocinas e quimiocinas [51, 52], a ciclooxigenase-2 (COX-2) [53, 54], moléculas de adesão [53, 55] a iNOS [56], entre muitas outras. Essa translocação ao núcleo é normalmente impedida pela presença de uma terceira proteína, o I- κ Ba, que constitui assim um fator inibidor desse processo

[57]. Para que o sistema NF- κ B seja ativado, é necessário que a subunidade I- κ Ba seja fosforilada por uma quinase especial, a IKK, o que a torna suscetível à ubiquitinação e posterior degradação pelo proteasoma, liberando assim o complexo p65/p50.

O NF- κ B pode ser assim ativado em diversos tipos de células expostas à ação de estímulos fisiológicos e patológicos, tais como citocinas, agentes mitogênicos, vírus, estresse mecânico ou estresse oxidativo e a angiotensina II (AngII) [52, 58]. O sistema pode também ser posto em movimento de forma indireta pela ação de certos TLRs, como o 2 e o 4, acionados por partículas de microrganismos ou detritos celulares. Assim, não surpreende que esse sistema esteja ativado em doenças inflamatórias crônicas [59], assim como em várias doenças renais, como a glomerulopatia de lesões mínimas [60], a glomerulonefrite membranosa [60], a nefropatia diabética [61] e, de modo geral, condições clínicas e experimentais que evoluem para DRC [62, 63].

Como o sistema NF- κ B é necessário à produção de proIL-1 β e proIL-18, sua ativação passou a ser conhecida como Sinal 1, enquanto a montagem do inflamassoma NLRP3 é conhecida como Sinal 2. (Figura 1).

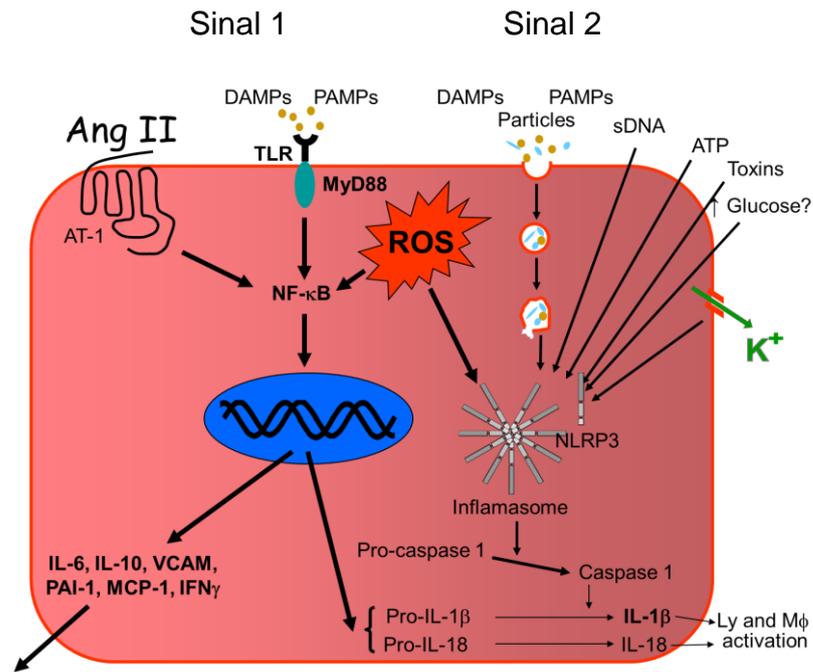


Figura 1. Estrutura e ativação do inflamassoma NLRP3.

Evidências recentes sugerem que, em roedores que receberam sobrecarga de adenina na dieta, a imunidade inata é ativada e participa ativamente do processo inflamatório que leva à lesão estrutural e à insuficiência renal características desse modelo [64].

Recentemente, este Laboratório publicou um estudo no qual uma sobrecarga de adenina foi administrada a ratos durante 3 semanas [31]. Ao final desse período, uma difusa deposição de cristais foi observada no lúmen tubular e no interstício renal, juntamente com a formação de granulomas intersticiais, acúmulo de colágeno, intensa proliferação túbulo-intersticial e aumento da expressão intersticial de mediadores inflamatórios. Parte dos cristais foi segregada do lúmen tubular por uma camada de células recém-formadas e, em fases mais avançadas, pareceu ser “expulsa” para o interstício. A translocação nuclear do dímero p50/p65 e o aumento da expressão da IKK- α indicaram ativação do sistema NF- κ B. O tratamento com PDTC normalizou a IKK- α e impediu essa migração, limitando o deslocamento do

cristal para o interstício e atenuando fortemente a fibrose/inflamação intersticial. Esses achados indicam que os complexos fenômenos inflamatórios associados a esse modelo dependem, pelo menos em parte, da ativação do sistema NF- κ B. No entanto, não está estabelecido se outros componentes da imunidade inata, tais como a formação de inflamassomas e a ativação da caspase-1 e da interleucina-1, também participam desse processo.

1.4 Papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona na DRC

A função “clássica” do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é manter a homeostase circulatória. Os efeitos fisiopatológicos da AngII, que é a principal substância ativa do SRAA, são mediados essencialmente pelo receptor AT1, tais como a vasoconstrição, que leva à hipertensão sistêmica e glomerular, e a conservação de sódio, por ação direta nos túbulos renais ou via aldosterona. Diversos estudos clínicos [65, 66] e experimentais [67, 68] indicaram que a AngII participa da progressão da DRC. Além de seus efeitos hemodinâmicos, a AngII tem sido descrita também como tendo um papel relevante no processo inflamatório associado à DRC [69, 70, 71], através da ativação de diversas vias de sinalização, tais como a mobilização de cálcio, ativação de quinases [72], da proteína ativadora -1 (AP-1) e do sistema NF- κ B [52, 73, 74].

Sabe-se que no modelo de nefropatia crônica por sobrecarga de adenina ocorre o desenvolvimento de hipertensão arterial e também a inflamação do interstício renal [27]. No entanto, o papel do SRAA, e mais especificamente o da AngII, nas alterações hemodinâmicas e no processo inflamatório observados nesse modelo não foi ainda estudado.

2. OBJETIVOS

Na nefropatia por excesso de adenina, procuramos avaliar:

1. Se a nefropatia associada ao excesso de adenina continua a progredir mesmo depois de cessada essa sobrecarga;
2. Se ocorre lesão glomerular em fases avançadas desse modelo;
3. Se outras vias da imunidade inata, além do NF- κ B, estão ativadas, tal como em outros modelos de inflamação associada à presença de corpos estranhos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos da linhagem Munich-Wistar obtidos de uma colônia estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos à temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h, tendo livre acesso à ração convencional para roedores (Nuvital, Curitiba, PR) e água. Os procedimentos utilizados nesse estudo seguiram as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo nº. 272/12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como diretrizes internacionais para manutenção e cuidado de animais de laboratório.

3.1 Modelo Experimental e grupos de estudo

Utilizamos ratos da cepa Munich-Wistar, pesando entre 280 – 320g (3-4 meses). O modelo experimental de DRC utilizado neste estudo consistiu na administração de adenina (base livre grau - referência A8626 - Sigma-Aldrich, Saint Luis, USA) misturada à ração oferecida aos animais (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) acrescida de caseína a 15%, durante um período de 1 semana (ADE). A porcentagem de adenina acrescentada à ração foi de 0,50%. Um grupo de animais, que recebeu apenas dieta padrão (DP) acrescida de 15% de caseína, foi utilizado como controle (C).

Os seguintes grupos experimentais foram estudados:

- Grupo 1 semana:

- C_{1sem.}: ratos que receberam dieta padrão, sem acréscimo de adenina.
- ADE_{1sem.}: ratos que receberam dieta padrão acrescida de 0,50% de adenina durante uma semana.

- Grupo 4 semanas:

- C_{4sem.}: ratos que receberam dieta padrão durante uma semana, e depois foram acompanhados por mais quatro semanas. Estes animais serviram como controle de tempo para verificar alterações relacionadas ao envelhecimento.
- ADE_{4sem.}: ratos que receberam a ração padrão acrescida de 0,50% de adenina durante uma semana, após este período a sobrecarga de adenina foi retirada e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais quatro semanas.

- Grupo 24 semanas:

- C_{24sem.}: ratos que receberam dieta padrão durante uma semana, e depois foram acompanhados por mais vinte e quatro semanas. Estes animais serviram como controle de tempo para verificar alterações relacionadas ao envelhecimento.
- ADE_{24sem.}: ratos que receberam a ração padrão acrescida de 0,50% de adenina durante uma semana. Após esse período a sobrecarga de adenina foi retirada e os animais foram mantidos com dieta padrão por mais vinte e quatro semanas.

3.2 Protocolo experimental

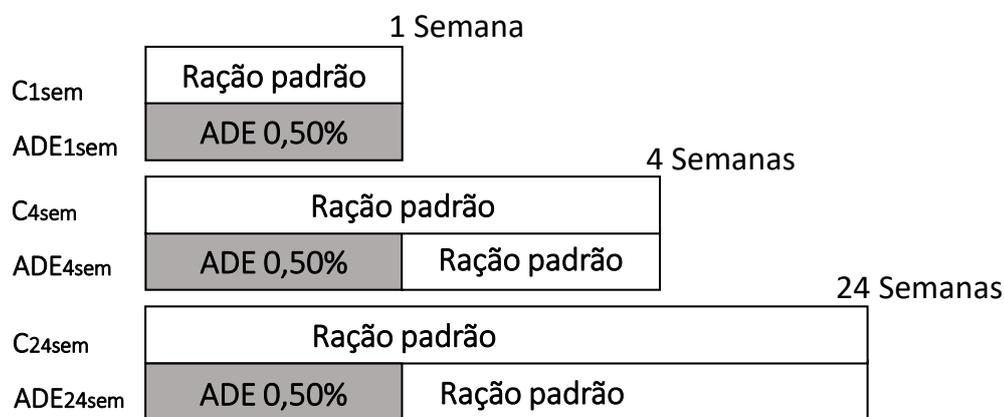


Figura 2. Esquema do protocolo experimental

Na Figura 2 está exposto esquematicamente o protocolo experimental que foi seguido neste estudo.

- **1 semana:** 1 semana após o início da administração da dieta com sobrecarga de adenina, o peso corpóreo (PE) foi avaliado e os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a determinação de albuminúria de 24 horas (ALB). Posteriormente, após um breve aquecimento foram realizadas medidas de pressão sistólica caudal (PC), utilizando o método óptico-eletrônico (BP 2000 BloodPressureAnalysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, EUA). Em seguida, os animais foram anestesiados com ketamina (Cristália®, 50 mg/kg) e Xilazina (Agener União®, 10 mg/kg), foram coletadas amostras de sangue da aorta para medidas da concentração sérica de creatinina (Scr), e da concentração plasmática de potássio e sódio. O rim esquerdo foi perfundido inicialmente com solução salina para remover o sangue dos vasos e, em seguida, fixado in situ com solução de Duboscq-Brasil. O tecido renal foi

dividido em 2 ou 3 segmentos coronais e pós-fixado em formaldeído a 10% diluído em tampão fosfato e preparados para exame histológico e imuno-histoquímico.

- **4 semanas:** Ao término do protocolo experimental (4 semanas), avaliamos os mesmos parâmetros descritos no protocolo anterior.

- **24 semanas:** Ao término do protocolo experimental (24 semanas), avaliamos os mesmos parâmetros descritos no protocolo anterior.

3.3 Análises histológicas

Após desidratação, diafanização e impregnação em parafina utilizando um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica ments GmbH, Alemanha), o tecido renal foi incluído em blocos de parafina e cortado em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha), produzindo secções de 4 µm de espessura que foram montadas sobre lâminas previamente silanizadas e coradas pelo Ácido Periódico de Shiff (PAS) e pelo Tricômio de Masson.

Para o processo de silanização, as lâminas foram colocadas em um banho de álcool 96° durante 1 minuto, seguido de banhos sucessivos de acetona PA durante 1 minuto e silano 6% durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em 2 banhos de acetona e 2 banhos de água destilada, sendo posteriormente secadas em estufa a 60°C durante 1 dia.

Para o processo de coloração histoquímica, os cortes de tecido renal foram submetidos a um processo de desparafinização, sendo inicialmente mantidas por 24

horas em estufa a 60°C. Em seguida, foram submetidas a 3 banhos seguidos de xilol. Após a desparafinização seguiu-se a reidratação dos tecidos, com banhos sucessivos em misturas etanol/água com proporções decrescentes de etanol e, finalmente, água destilada. Findo esse processo, iniciaram-se as colorações propriamente ditas.

A reação do ácido periódico de Schiff (PAS) foi utilizada para a avaliação da esclerose glomerular (EG). Os cortes foram submetidos à oxidação por solução de ácido periódico 0,5% por 15 minutos e lavadas em água destilada. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução de reagente de Schiff (solução aquosa de fucsina básica a 0,5% acrescido de 15 ml de ácido clorídrico 1N e 9g de metabissulfito de sódio a cada 100ml da solução) por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina de Carazzi (solução aquosa 20% de glicerina, 0,1% de hematoxilina, 5% de sulfato de alumen e potássio e 0,02% de iodato de potássio) por 5 minutos. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com permount.

3.4 Histomorfometria renal

A quantificação da esclerose glomerular (%EG) foi realizada em lâminas coradas pela reação de PAS, por meio da determinação da porcentagem de glomérulos apresentando lesões esclerosantes. Foram analisados 200 glomérulos por corte, sob aumento de 400X.

3.5 Análises imuno-histoquímicas

Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados em cortes histológicos de 4 µm de espessura, montados sobre lâminas previamente silanizadas. Essas lâminas

foram desparafinizadas e reidratadas através de aquecimento (em estufa a 60°C durante 30 minutos) seguido por uma bateria de banhos de xilol e etanol em concentrações decrescentes. Ao término desta sequência as lâminas foram mantidas em água destilada por no mínimo 5 minutos e, para recuperação antigênica, foram posteriormente submetidas a calor úmido, em solução de ácido cítrico 10 mM tamponado, em pH 6,0, a uma temperatura aproximada de 95°C, durante 30 minutos. Para todos os marcadores utilizamos a solução salina tris-tamponada TBS (0,05 M de Tris e 0,15 M de cloreto de sódio pH 7,6) como tampão de lavagem. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

Os métodos utilizados para o estudo imuno-histoquímico foram o APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina), a técnica da Estreptavidina – Fosfatase Alcalina e a técnica da Peroxidase. Alguns dos anticorpos que foram empregados para caracterização do processo inflamatório: Anti-ED1 (monócitos e macrófagos), Anti-colágeno tipo I (colágeno tipo 1), Anti-AngII (angiotensina II) e Anti-NLRP3.

- Infiltração de Macrófagos (MØ)

A identificação de células positivas para macrófagos foi realizada pelo método de APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina). Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA), em concentração 1:20 por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-ED-1 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200, à temperatura de 3-8°C durante um período

de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho - RAM (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:50 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados com o Complexo APAAP na diluição 1:70 por 30 minutos. Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Permanent-Red. As células positivas para o epítipo ED-1 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Permanent-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de macrófagos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

- Identificação de Colágeno I (COL-1)

A identificação de COL-1 intersticial foi realizada utilizando o método da Peroxidase. Após a desparafinização e recuperação antigênica procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Após serem lavadas com tampão TBS, os cortes foram incubados com soro não imune de cavalo na diluição de 1:50 para bloqueio de marcação inespecífica por 30 minutos. Retirou-se o excesso de soro e os tecidos renais foram incubados com o

anticorpo primário anti-colageno tipo I (Abcam®, Cambridge, UK) diluído na proporção de 1:200 em solução de BSA a 1% em TBS, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-Merck) durante 2 minutos. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados.

- Identificação de células positivas para AngII

Para avaliação da expressão de AngII foi empregada a técnica de Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em leite a 5% em TBS por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-AngII (Península Laboratories, San Carlos, CA), diluído em BSA 1% na proporção de 1:400. No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-coelho biotilado (Vector BA-1000), diluído em BSA 1% na proporção de 1:1000, durante 45 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Streptavidina-AP (Vector Vectastain ABC-AP #AK5000) e por fim, revelados com substrato cromogênico Fast Red com

tempo variável. A quantificação das células intersticiais positivas para AngII foi realizada através da contagem de células marcadas no córtex renal, ao microscópio com aumento de 400x. Foram analisados 20 campos para cada lâmina. Os resultados foram apresentados como células positivas por milímetro quadrado (cel/mm²).

- Identificação de células positivas para NLRP3

Para avaliação da expressão de NLRP3 foi empregada a técnica da Peroxidase. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio com peroxidase com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Depois, foram incubados com 80µl de solução Dako Protein Block (#X0909). Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-NLRP3 (Sigma, St Louis, MO), diluído em BSA 1% na proporção de 1:400. No dia seguinte, os cortes foram incubados com 80µl de Envision Rabbit HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA). durante 45 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-Merck) durante 2 minutos. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. Os resultados foram apresentados como células positivas por milímetro quadrado (cel/mm²).

3.6 Análise do conteúdo protéico do tecido renal (Western Blot)

Para a detecção de proteínas, 100-200mg de amostras de rim foram pesadas, adicionadas à tubinhos específicos contendo beads de cerâmica juntamente com

tampão RIPA (thermo scientific), contendo inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche Applied Science), para serem lisadas no aparelho OMNI BEAD RUPTOR 24. O teor protéico foi determinado utilizando o kit “Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit” seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra, foram utilizados 100 µg de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIO RAD), para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), que se completou em 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, o gel foi transferido (transferência úmida) a uma membrana de nitrocelulose, durante 2 horas a 400mA. Após a transferência, a membrana foi corada com Solução de Ponceau para conferir a transferência. Posteriormente lavada três vezes com solução de TBSt (TBS [10x] Água destilada Tween 20, pH 7.4), e bloqueada por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de BSA 5% em TBS (NaCl Glicina Tris-Base). Após o bloqueio, foi realizada a incubação da membrana com o anticorpo primário, diluído em BSA a 1% em TBS, na seguinte proporção: anti-TLR4 (Santa Cruz) 1:250. A incubação teve duração aproximada de 18 horas (over night) e foi realizada a temperatura de 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com solução de TBSt por 10 minutos e incubada com o anticorpo secundário (Anti-rabbit-HRP: 1:5000, Sigma), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 10 minutos com TBSt. Em seguida a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce #34078), e as imagens foram registradas com o aparelho fotodocumentador UVITED Cambridge. Foram utilizados os programas Alliance – [Aquisition] (Uvitec

Cambridge) e Uvisoft-UvibandMax (Uvitec Cambridge) para identificar, analisar e quantificar as bandas.

3.7 Análise da translocação nuclear do dímero p65 - NFκB (Western Blot)

Para a separação da porção nuclear a citoplasmática, foi pesado 100 mg de tecido, adicionado 1000 µL da solução A (HEPES [10X], KCl [10X], MgCl₂ [10X], Sacarose [5X], glicerol PA, NP-40 PA + inibidores) e homogeneizado no gelo com o Dounce Homogenizer. O conteúdo foi transferido para um eppendorf pré-refrigerado, misturando bem. O conteúdo foi centrifugado por 10', 4 °C, 1000G. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um tubo pré-refrigerado (FRAÇÃO CITOPLASMÁTICA). Ressuspendeu-se o pellet em 1000 µL do tampão A misturando bem, centrifugou-se por 10', 4 °C, 1000G, descartou-se o sobrenadante retirando toda a parte líquida e novamente ressuspender em 200 µL, mas dessa vez, no tampão B (Sacarose, SDS, Tris-HCl [10X], Bromo-phenol-blue, etilmercaptoetanol PA), até quebrar por completo. Centrifugou-se a 10', 4 °C, 1500G. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo pré-refrigerado (FRAÇÃO NUCLEAR) e procedeu-se com a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), que se completou em 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, o gel foi transferido (transferência semi-dry) a uma membrana de nitrocelulose, durante 45 minutos a 20V. Após a transferência, a membrana foi corada com Solução de Ponceau para conferir a transferência. Posteriormente lavada três vezes com solução de TBSt (TBS [10x] Água destilada Tween 20, pH 7.4), e bloqueada por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de Leite3% + BSA3% em TBSt. Após o bloqueio, foi realizada a incubação da membrana com o anticorpo primário,

diluído em BSA a 1% em TBS, na seguinte proporção: anti-p65 fosforilado (CellSignaling #3033S) 1:100. A incubação teve duração aproximada de 18 horas (over night) e foi realizada a temperatura de 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com solução de TBSt por 10 minutos e incubada com o anticorpo secundário (Anti-rabbit-HRP: 1:5000, Sigma), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 10 minutos com TBSt. Em seguida a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce #34078), e as imagens foram registradas com o aparelho fotodocumentador UVITED Cambridge. Foram utilizados os programas Alliance – [Aquisition] (Uvitec Cambridge) e Uvisoft-UvibandMax (Uvitec Cambridge) para identificar, analisar e quantificar as bandas.

3.8 Análise do conteúdo proteico do tecido renal (ELISA)

Para a detecção de proteínas, 100-200mg de amostras de rim foram pesadas, adicionadas a tubinhos específicos contendo beads de cerâmica juntamente com tampão RIPA (thermo scientific), contendo inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche Applied Science), para serem lisadas no aparelho OMNI BEAD RUPTOR 24. O teor protéico foi determinado utilizando o kit “Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit” seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra, foram utilizados 100 µl de proteína do extrato tecidual. A análise do conteúdo proteico de IL-1 β no tecido renal foi determinado através do método Elisa Sanduíche, utilizando kit comercial (R&D systems). O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas seguiram as recomendações do fabricante.

3.9 Análise por RT-PCR

A expressão gênica de alguns dos componentes da resposta imune inata foi analisada através de PCR quantitativo (qPCR) em fragmentos de tecido renal obtido durante o sacrifício dos animais estudados. Esses fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e armazenados a -80°C até o uso.

- Extração e purificação do RNA renal

Para a extração de RNA, utilizamos o kit RNeasy QIAGEN® #74106 seguindo-se estritamente as recomendações do fabricante. Fragmentos de córtex renal congelado pesando entre 20 e 30 mg foram colocados em tubos de polipropileno reforçado, contendo microesferas de cerâmica (OMNI 19-628). A estes, se adicionou o tampão de extração RLT do kit RNeasy, previamente acrescido de β -mercaptoetanol. Os tubos foram vedados e submetidos à agitação no equipamento OMNI BEAD RUPTOR 24 durante 60 segundos para total homogeneização do tecido. Esse homogenato foi então centrifugado a 12.000G, 4°C, durante 3 minutos e o sobrenadante produzido foi transferido para um novo eppendorf. Ao sobrenadante resgatado, adicionou-se igual volume de etanol 70% em gelo. Após homogeneização por inversão, 700 μ L dessa mistura foram transferidos para uma coluna de extração “Mini Spin Column” do kit RNeasy e a mesma foi centrifugada por 15 segundos a 8000G, 4°C. Após a centrifugação, o conteúdo do coletor (líquido que ultrapassou a coluna) foi descartado e adicionou-se à coluna 350 μ L do tampão RW1. O processo de centrifugação foi repetido e o conteúdo do coletor foi novamente descartado. Nesta etapa, restam no elemento filtrador da coluna de extração apenas os ácidos nucleicos da amostra processada.

A fim de eliminar o DNA genômico (DNAg) presente nas colunas, estas foram submetidas a uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente com um volume de 80 μL de solução de degradação de DNA “RNAse free DNase Incubation Mix”, após a qual, adicionou-se novamente 350 μL do tampão RW1 às colunas e o processo de centrifugação foi repetido. O conteúdo do coletor foi então descartado e o elemento filtrador da coluna foi lavado 2 vezes com tampão RPE através da adição de 500 μL do tampão, seguida de centrifugação. Após o descarte do conteúdo dos tubos coletores, as colunas foram finalmente submetidas à secagem por centrifugação rápida (1 minuto, 12000G, 4°C). Por fim, as colunas foram transferidas para novos eppendorfes e, a cada coluna foi adicionado 50 μL de água RNAse free. As colunas foram centrifugadas a 8.000G, 4°C durante 2 minutos, e o líquido coletado em tubos de Eppendorf (solução de RNA) foi suavemente homogeneizado e armazenado para posterior quantificação e análise da integridade do RNA.

- Análise Qualitativa e Quantitativa do RNA Obtido no Processo de Extração

Alíquotas de 1,5 μL de solução de RNA total obtida através da etapa anteriormente descrita foram submetidas à leitura em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (THERMO Scientific, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A concentração de RNA foi calculada em ng/ μL pelo software integrado ao equipamento. Adicionalmente, a pureza do RNA obtido foi determinada através do cálculo da razão das absorbâncias a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}), considerando-se um extrato de RNA de boa qualidade, aquele cuja razão A_{260}/A_{280} se manteve entre 1,9 e 2,1.

Para verificação da integridade das amostras de RNA obtidas, realizou-se uma corrida eletroforética em gel de agarose desnaturante contendo 0,004% de brometo de etídio. O gel foi fotografado através do transiluminador ultravioleta (UV) do equipamento Fotodocumentador (UVITECH®) e, foram consideradas amostras de RNA íntegras, aquelas nas quais foi possível visualizar com nitidez e sem arraste as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. Somente as amostras com concentração de RNA satisfatória e de boa qualidade, ou seja, sem vestígios de degradação, foram utilizadas para as reações subsequentes de RT-PCR em tempo real.

- Transcrição Reversa (RT)

A partir do RNA obtido na extração, realizou-se a reação de Transcrição Reversa (RT), objetivando-se a síntese de um DNA de fita simples, complementar ao RNA mensageiro (RNAm) presente na amostra original (cDNA). Para a reação de RT utilizamos o kit Qiagen® Rt² Easy First Strand #330401 e as recomendações do fabricante foram seguidas estritamente. Para cada reação, utilizamos uma massa de 500 ng de RNA total, que foi previamente tratada com uma solução de DNase RNase free (QIAGEN® #79254) e incubada em termociclador convencional por 5 minutos a 42°C para eliminação de quaisquer vestígios de DNase. Adicionamos a seguir 10 µL do mix de transcrição reversa contendo primers do tipo Oligo-dT que se ligam especificamente à cauda poli-A do RNAm, promovendo a transcrição reversa somente deste subtipo de RNA em cDNA. Essa mistura foi mantida em um termociclador convencional por três ciclos: O primeiro a 42°C por 15 minutos, o segundo a 95°C por 5 minutos e o terceiro a 4°C por no mínimo 1 minuto. Ao

produto da reação adicionou-se 91 μL de água RNase free. O rendimento final da reação foi de 110 μL de cDNA, produzido a partir de 500 ng de RNA total.

- *PCR Quantitativo em tempo real (qPCR)*

A expressão dos genes de interesse no tecido renal estudado foi analisada pela técnica de qPCR utilizando-se o equipamento ViiA7 - Applied Biosystems (Life Technologies) e os softwares que acompanham o equipamento. Foram ainda empregados kits de master mix QIAGEN® #330523 “Rt² Syber Green ROX qPCR Primer Assay”. Para cada reação, adicionamos 6,25 μL de tampão Rt² SYBER Green Mastermix, 5,25 μL de água RNase free e 0,5 μL do par de primers específico para o gene de interesse (Rt² qPCR Primer Assay – vide lista de primers utilizados por gene a seguir). Aplicamos 12 μL dessa mistura a cada poço de uma placa plástica apropriada para reações de qPCR, aos quais foi adicionado 1 μL da amostra de cDNA. As reações foram realizadas em triplicata técnica. Após a pipetagem da placa, a mesma foi selada e centrifugada por 1 minuto a 1000G e introduzida no equipamento ViiA7 para realização da reação. O gene endógeno selecionado como melhor calibrador para as reações (housekeeping gene – HK) foi o Bact, que codifica para a proteína β -actina.

A enzima DNA polimerase utilizada em nossas reações é do tipo “*hot start*”, portanto faz-se necessária a inclusão de um ciclo inicial de 10 minutos a 95°C. Em seguida, foram realizados 40 ciclos de 15 segundos a 95°C / 1 minuto a 60°C. A curva de dissociação dos produtos amplificados para a determinação da temperatura de “melting” dos mesmos e avaliação da qualidade da amostra foi traçada para todos os genes após os 40 ciclos de amplificação.

Tabela 1. Lista de primers utilizados no trabalho:

PROTEÍNA	GENE	Nº NO CATÁLOGO (QIAGEN®)
β -actina	Actb	330001 PPR06570C
IL-1 β	Il1b	330001 PPR06480B
NLRP3	Nlrp3	330001 PPR56639A
TLR4	Tlr4	330001 PPR45931B
IL-6	Il6	330001 PPR06483B

- Análise dos Resultados do qPCR

A expressão gênica de cada gene alvo foi normalizada pela expressão do gene HK na mesma amostra e foi então apresentada como “Fold Change”, ou seja, quantas vezes, em relação ao grupo controle, aquele determinado gene alvo é expresso em um grupo experimental. Para tanto, primeiramente foi estabelecido um *threshold* fixo para cada gene, que é uma reta paralela ao eixo “X” do gráfico e que corta a curva de amplificação gênica em sua fase exponencial. O *threshold* representa um valor arbitrário de fluorescência emitida e determina o ponto da curva de amplificação que será analisado para todas as amostras estudadas para um determinado par de primers (um determinado gene). O número do ciclo de amplificação no qual cada amostra cruza com o *threshold* pré-estabelecido é o Ciclo-*threshold* (CT) daquela amostra. A partir da normalização do CT do gene alvo (*Gene of Interest* ou GOI) pelo CT do gene HK de uma determinada amostra, obtivemos o Δ CT (CT GOI – CT HK) daquela amostra. O Δ CT de cada amostra dos grupos experimentais foi então normalizado pela média dos Δ CTs do grupo controle, para obtenção do $\Delta\Delta$ CT (Δ CT

grupo experimental – ΔCT grupo controle). Por fim, para facilitar a interpretação dos dados, aplicamos a expressão $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, fazendo com que os valores finais sejam expressos como o número de vezes que um determinado gene alvo é expresso em um grupo experimental em relação ao seu grupo controle, conforme mencionado anteriormente.

3.10 Análises bioquímicas

A concentração de creatinina foi determinada através do método colorimétrico utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A.).

As concentrações de sódio e potássio sanguíneo foram determinadas através do analisador de eletrólitos (Modelo 9140, AVL Medical Instruments, Schaffhasue, Suíça).

A presença de albumina na urina foi detectada por imunodifusão radial, empregando anticorpo específico (antialbumina de rato, MPBiomedicals LLC, EUA).

3.11 Análise Estatística

Os resultados deste estudo foram submetidos à análise de variância de dois fatores (ANOVA), com comparações pareadas entre grupos pelo método de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prism®, versão 4.0. O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$. Todos os resultados foram representados como Média \pm Erro Padrão (EP).

4. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos durante o tratamento com adenina (ADE_{1sem}) e seu respectivo controle (C_{1sem}) e após a suspensão (C_{4sem} , ADE_{4sem} , C_{24sem} e ADE_{24sem}). Em todos os parâmetros, foi realizada análise comparativa entre os grupos tratados com ADE e o seu respectivo Controle, indicado com “a” quando $p < 0.05$. Em segunda análise, foi realizada a comparação temporal entre os grupos controles (C_{1sem} , C_{4sem} e C_{24sem}) ou entre os grupos adenina (ADE_{1sem} , ADE_{4sem} e ADE_{24sem}). Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) com relação a Ade_{1sem} e ADE_{4sem} foram indicadas com “b” e “c”, respectivamente.

Parâmetros gerais de função renal e sistêmica

Tabela 2. Parâmetros gerais de função renal e sistêmica.

		C_{1sem}	Ade_{1sem}	C_{4sem}	Ade_{4sem}	C_{24sem}	Ade_{24sem}
PE (g)	(n=12)	304±7	246±6 ^a	322±9	311±11 ^b	388±9	379±11 ^{bc}
PC (mm/Hg)	(n=12)	130±2	157±4 ^a	134±2	141±3 ^b	135±3	151±3 ^{ac}
ALB (mg/dL)	(n=13)	4±1	3±1	3±1	3±1	16±4	45±13 ^{abc}
Scr (g/dL)	(n=14)	0,6±0,1	1,2±0,1 ^a	0,5±0,1	0,5±0,1 ^b	0,5±0,1	0,6±0,1 ^b
K+ (mEq/L)	(n=12)	3,6±0,2	4,7±0,2 ^a	4,1±0,2	3,8±0,1	3,6±0,1	4,6±0,3 ^{abc}
Ht (%)	(n=14)	46±1	55±1 ^a	47±1	46±1 ^b	48±1	50±1 ^b

Medidas de peso corpóreo (PE, g), pressão caudal (PC, mmHg), albuminúria (ALB, mg/24h), creatinina sérica (Scr, mg/dL), potássio sérico (K+, mEq/L) e porcentagem de hematócrito arterial (Ht, %) dos grupos ADE_{1sem} , ADE_{4sem} , ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs Ade_{1s} ; ^c $p < 0,05$ vs Ade_{4s}).

Peso Corpóreo

De acordo com os dados relativos ao peso corpóreo demonstrados na Tabela 2 e Figura 3, observa-se claramente que os animais do grupo ADE_{1sem} apresentaram uma significativa perda de peso quando comparado ao grupo C_{1sem}. Após a suspensão da adenina, o crescimento foi semelhante entre os grupos ADE_{4sem} e C_{4sem} ($p>0.05$) e entre os grupos ADE_{24sem} e C_{24sem} ($p>0.05$). Na análise temporal, os animais do grupo controle apresentaram crescimento contínuo, apresentando significância estatística após 24 semanas ($p<0.05$). Por outro lado, a perda de peso corpóreo apresentada pelo grupo ADE_{1sem} foi recuperada após 4 semanas da suspensão da ADE ($p<0.05$) e manteve o crescimento até 24 semanas ($p<0.05$ vs ADE_{1sem} e ADE_{4sem}).

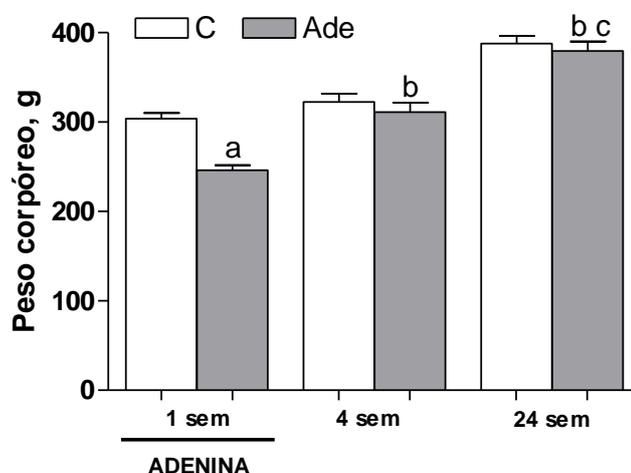


Figura 3. Evolução do peso corpóreo dos animais.

Peso corpóreo (g) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. (^a $p<0,05$ vs C; ^b $p<0,05$ vs Ade_{1s}; ^c $p<0,05$ vs Ade_{4s}).

Pressão caudal

Com relação à pressão caudal, o grupo ADE_{1sem} apresentou aumento significativo em relação ao seu respectivo controle C_{1sem} ($p < 0,05$). Essa hipertensão foi moderada e possivelmente está relacionada à constrição vascular renal associada ao aumento da viscosidade sanguínea e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Após a interrupção de adenina, os animais do grupo ADE_{4sem} apresentaram valores de PC semelhantes ao seu respectivo controle ($p > 0,05$), indicando que a suspensão da ADE normalizou a PC. Já os animais do grupo ADE_{24sem} apresentaram-se hipertensos quando comparados ao seu respectivo controle ($p < 0,05$). Na análise temporal, como esperado, os animais do grupo controle mantiveram normotensos durante todo o estudo. Após 4 semanas de suspensão de ADE, a PC estava normalizada ($p < 0,05$), sugerindo que a hipertensão sistêmica no grupo C_{1sem} estava relacionada a um evento hemodinâmico e não à alteração morfológica no tecido renal (irreversível). Ao contrário, a hipertensão observada no grupo ADE_{24sem} ($p < 0,05$ vs ADE_{4sem}) sugere um comprometimento do parênquima renal.

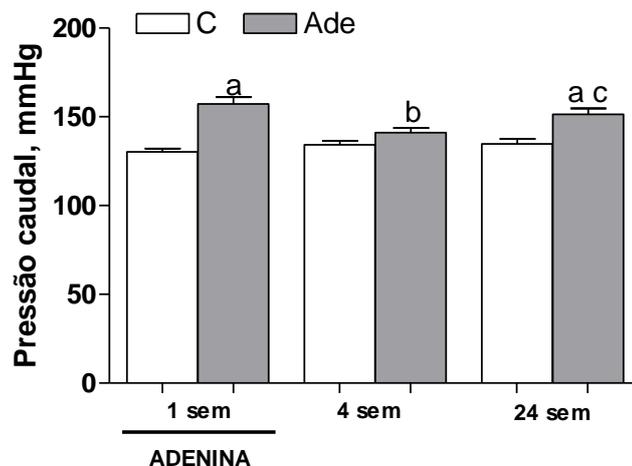


Figura 4. Evolução da pressão sistólica caudal dos animais.

Pressão sistólica caudal (mmHg) dos grupos ADE_{1sem} , ADE_{4sem} , ADE_{24sem} e seus respectivos controles. (^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs Ade_{1s}; ^c $p < 0,05$ vs Ade_{4s}).

Albuminúria

Quanto à excreção urinária de albumina, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os animais ADE_{1sem} e ADE_{4sem} e seus respectivos controles ($p > 0,05$), havendo apenas diferenças entre os animais do grupo ADE_{24sem} e C_{24sem} ($p < 0,05$), sugerindo que o aumento da ALB não é apenas uma consequência do envelhecimento do animal. Na análise temporal, o aumento discreto na ALB do grupo C_{24sem} é devido ao envelhecimento. Com relação aos animais que receberam ADE, a ALB aumentou de maneira significativa após 24 semanas de suspensão de ADE ($p < 0,05$ vs ADE_{1sem} e ADE_{4sem}). Esses resultados sugerem que houve uma alteração na permeabilidade da parede do capilar glomerular, possivelmente uma lesão podocitária.

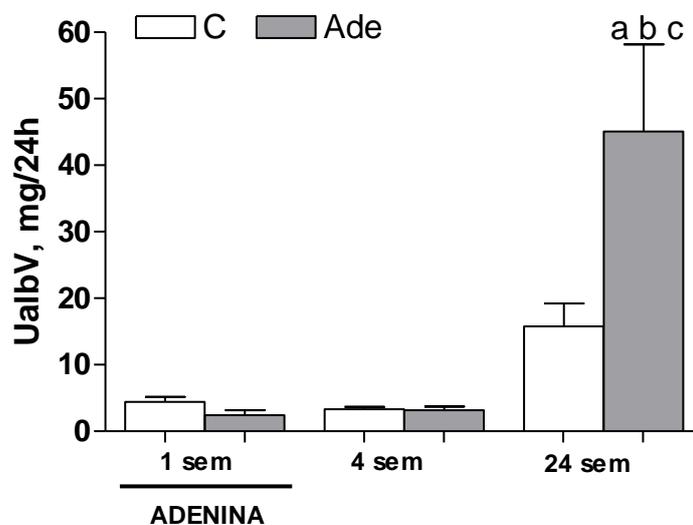


Figura 5. Evolução da excreção urinária de albumina dos animais.

Excreção urinária de albumina (mg/24h) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Concentração sérica de creatinina

Após 1 semana de ADE, os animais apresentaram aumento significativo da Scr quando comparados com seu respectivo controle ($p < 0,05$), indicando redução na função renal durante o período de administração da adenina. Após 4 semanas de suspensão de ADE, a Scr foi semelhante à do grupo controle ($p > 0,05$) e essa normalização da função renal foi mantida até completar 24 semanas ($p > 0,05$). Na análise temporal, como era esperado, os animais dos grupos controle mantiveram a função renal normal durante todo o período do estudo ($p > 0,05$). Por outro lado, o aumento da Scr foi rapidamente normalizado após 4 semanas da retirada do ADE, sugerindo que a perda da função renal durante ADE poderia ser devida às alterações hemodinâmicas, como a constrição vascular, que são reversíveis, ou em decorrência da obstrução intratubular por cristais.

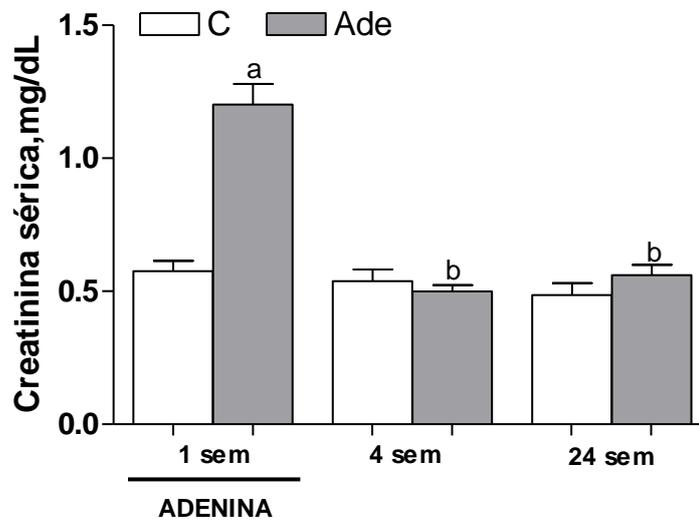


Figura 6. Concentração de creatinina sérica dos animais.

Medidas da Concentração Sérica de Creatinina (mg/dL) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. (^ap < 0,05 vs C; ^bp < 0,05 vs Ade_{1s}; ^cp < 0,05 vs Ade_{4s}).

Concentração plasmática de potássio

A concentração de K⁺ plasmático apresentou-se elevada nos animais ADE_{1sem} quando comparada aos animais C_{1sem} (p < 0,05), provavelmente associada à perda da função renal observada no período avaliado. Após 4 semanas, a concentração de K⁺ estava normalizada (p > 0,05 vs C_{4sem}). No entanto, após 24 semanas os níveis plasmáticos de K⁺ foram significativamente elevados nos animais do grupo ADE_{24sem} quando comparado ao seu respectivo controle (p < 0,05). Na análise temporal, como era esperado, os animais do grupo controle não apresentaram diferenças significativas (p > 0,05). Em relação aos grupos ADE, após 4 semanas houve uma normalização nos valores de K⁺ plasmático (p < 0,05 vs ADE_{1sem}), indicando a reversibilidade das alterações tubulares observadas na vigência de ADE. Após 24 semanas, a concentração de K⁺ plasmático voltou a aumentar de maneira significativa (p < 0,05 vs ADE_{4sem}). Esses resultados sugerem que a hiperpotassemia

observada nesse grupo pode estar relacionada com a presença de lesões tubulares, fator esse que poderia dificultar a excreção de potássio e aumentar a sua concentração plasmática.

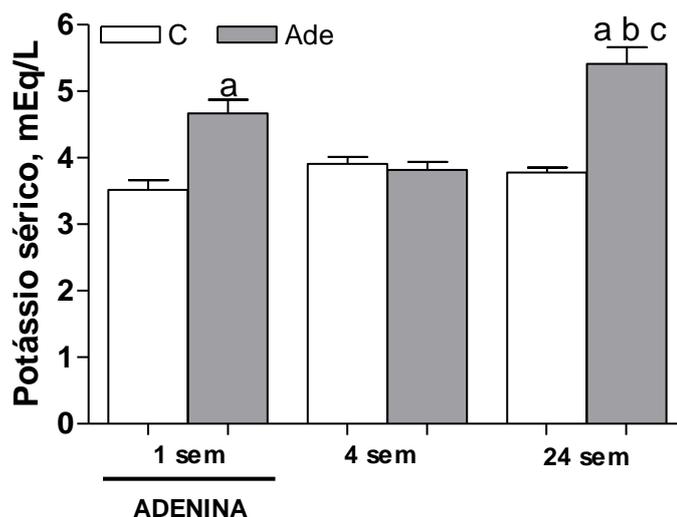


Figura 7. Concentração de potássio sérico dos animais.

Concentração de potássio sérico dos grupos ADE_{1sem} , ADE_{4sem} , ADE_{24sem} e seus respectivos controles. (^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs Ade_{1s} ; ^c $p < 0,05$ vs Ade_{4s}).

Hematócrito arterial

Após 1 semana de ADE, os valores de Ht foram significativamente elevados em relação ao C_{1sem} ($p < 0,05$), o que pode aumentar também a viscosidade sanguínea desses animais. Essa hemoconcentração foi normalizada após 4 e 24 semanas de suspensão de ADE ($p > 0,05$). Na análise temporal, os animais controle mantiveram o Ht semelhante ao longo do estudo ($p > 0,05$). A hemoconcentração observada na vigência de ADE foi normalizada após 4 semanas da sua suspensão ($p < 0,05$ vs ADE_{1sem}). Esses resultados sugerem que 1 semana de ADE é o suficiente para

promover alterações, ainda que reversíveis, na hemoconcentração e em outros parâmetros já apresentados acima.

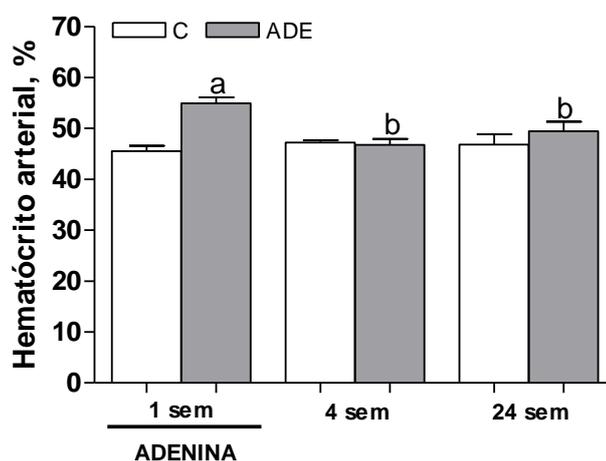


Figura 8. Hematócrito arterial dos animais.

Medidas de Hematócrito (Ht, %) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Análise morfológica do tecido renal

Tabela 3. Análise morfológica do tecido renal.

		Cristais	PR/PE	%EG
C_{1sem}	(n=12)	-	0,5±0,0	0±0
Ade_{1sem}	(n=12)	1,3±0,2 ^a	0,7±0,0 ^a	0±0
C_{4sem}	(n=13)	-	0,5±0,0	0±0
Ade_{4sem}	(n=14)	0,6±0,2 ^a	0,5±0,0 ^b	0±0
C_{24sem}	(n=12)	-	0,5±0,0	0,4±0,4
Ade_{24sem}	(n=14)	0,2±0,1 ^b	0,5±0,0 ^b	4,3±1,3 ^{abc}

Cristais (cristais/mm²), relação peso renal pelo peso corpóreo (PR/PE, g), % de esclerose glomerular (EG, %) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Quantificação do número de cristais no compartimento renal

Como se pode observar na Figura 9, a quantificação de cristais no tecido renal apresentou-se estatisticamente elevada no grupo ADE_{1sem} e, esse número reduz nos grupos ADE_{4sem} e ADE_{24sem}, chegando a valores próximos à normalidade no fim do período de estudo. A quantificação de cristais realizada nesse estudo é extremamente reduzida quando comparado ao trabalho anteriormente realizado nesse laboratório [30], indicando que, o modelo de DRC desenvolvido nesse estudo é um modelo menos agressivo, porém, capaz de promover um processo inflamatório e crônico e independente de cristais. De qualquer forma, ainda não estão claros os mecanismos que permeiam o desaparecimento dos cristais.

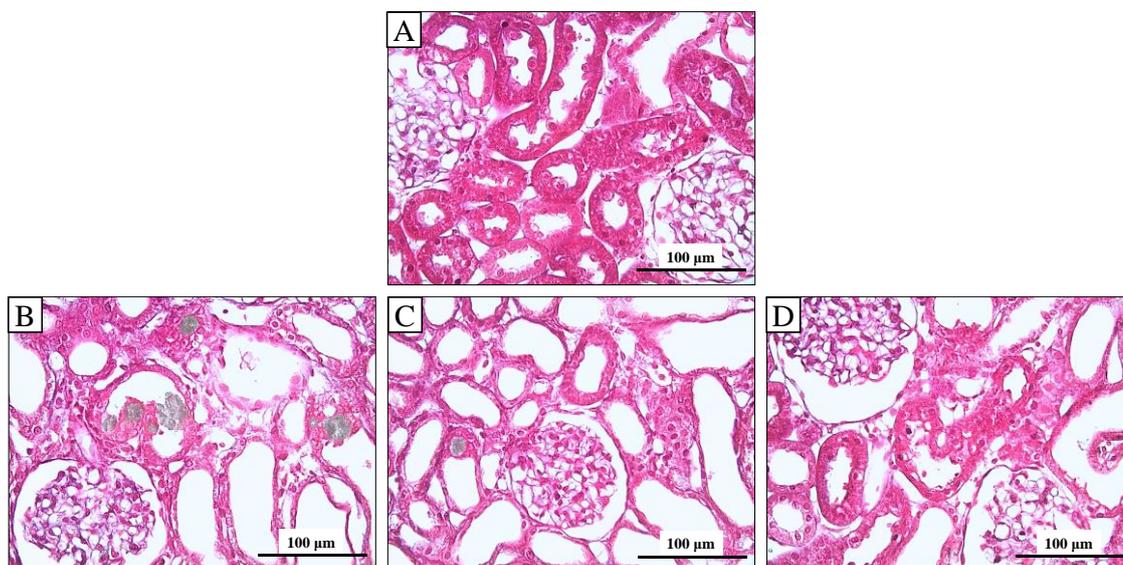


Figura 9. Microfotografias representativas dos cristais: A) glomérulo do grupo controle; B) glomérulo do grupo ADE_{1sem}; C) glomérulo do grupo ADE_{4sem}; D) glomérulo com esclerose no grupo ADE_{24sem}. Coloração PAS. Aumento 400X.

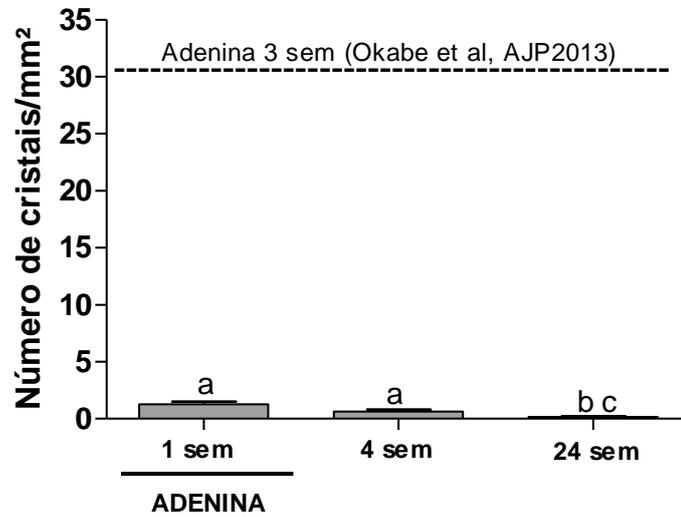


Figura 10. Contagem de cristais de 2,8-DHA no tecido renal dos animais.
 Contagem de cristais (Cristais/mm²) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem}.
 Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Peso renal corrigido pelo peso corpóreo

Observou-se que, na vigência de ADE, os animais apresentaram aumento significativo no PR/PE ($p < 0,05$). Após 4 semanas de suspensão de ADE, os valores de PR/PE estavam normalizados ($p > 0,05$) e se mantiveram até completar 24 semanas. Na análise temporal, como era esperado, o PR/PE foi semelhante entre os grupos controles ($p > 0,05$). Ao contrário, o aumento do peso renal observado na vigência de ADE foi totalmente revertido após 4 semanas de suspensão de ADE ($p < 0,05$ vs ADE_{1sem}). Esses resultados sugerem que aquele aumento de peso é devido à presença de edema, que é reversível (Figura 10).

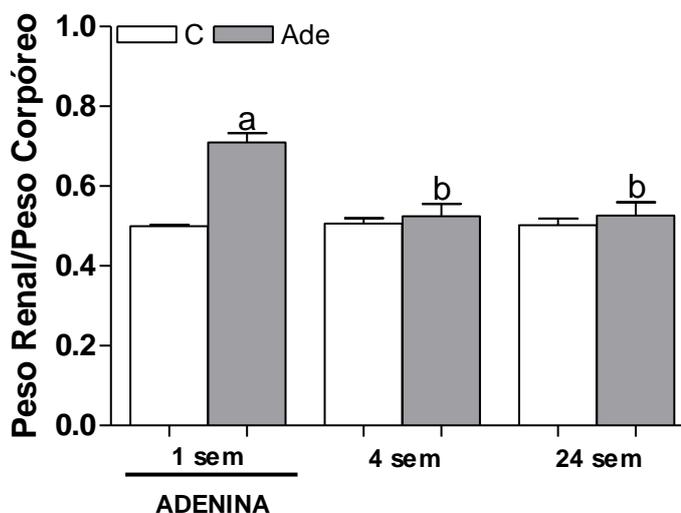


Figura 11. Relação do peso renal e corpóreo dos animais.

Relação do peso renal e peso corpóreo (g) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem}. Resultados apresentados como Média±EP. (^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs Ade_{1s}; ^c $p < 0,05$ vs Ade_{4s}).

Esclerose Glomerular

Sabe-se que o modelo de sobrecarga de adenina não promove lesões no compartimento glomerular, apenas no túbulo-intersticial. Na vigência de ADE e após 4 semanas de suspensão, a %EG apresentava-se nula, assim como nos grupos controles. Após 24 semanas, tornou-se evidente a presença de EG ($p < 0,05$ vs 24sem), indicando a progressão de DRC. Na análise temporal, os animais do grupo C_{24sem} apresentaram um discreto aumento na %EG ($p > 0,05$), o que poderia indicar envelhecimento desses animais. Por outro lado, 24 semanas após a suspensão de ADE, a glomeruloesclerose esteve presente, indicando a manifestação tardia (danos glomerulares) das alterações observadas na vigência de ADE.

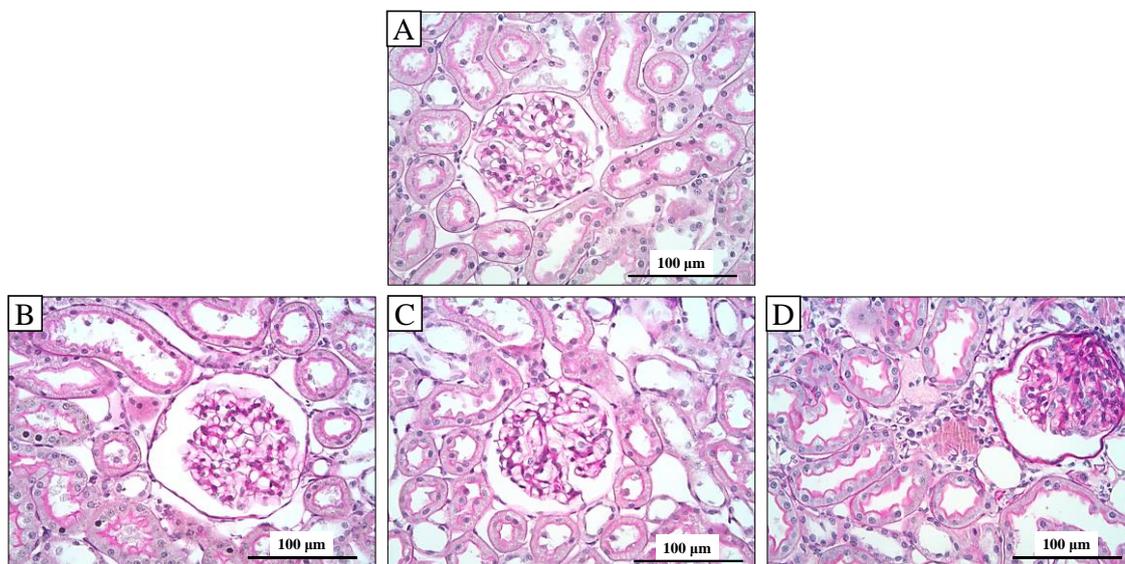


Figura 12. Microfotografias representativas dos glómerulos: A) glomérulo do grupo controle; B) glomérulo do grupo ADE_{1sem}; C) glomérulo do grupo ADE_{4sem}; D) glomérulo com esclerose no grupo ADE_{24sem}. Coloração PAS. Aumento 400X.

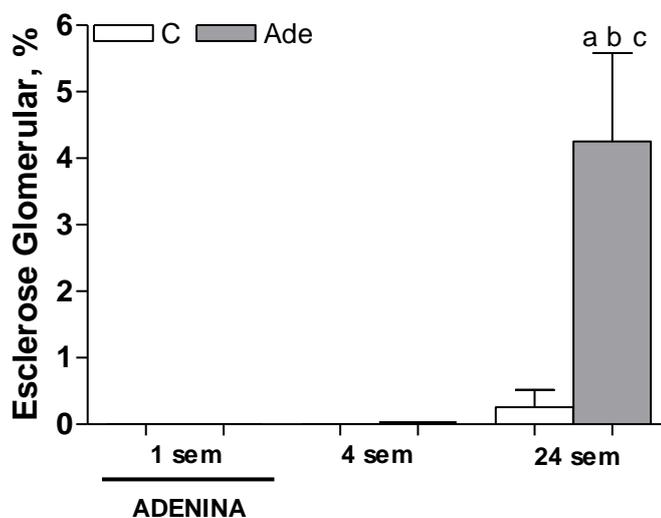


Figura 13. Esclerose Glomerular dos animais.

Valores da esclerose glomerular (EG, %) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Análise imuno-histoquímica (IHQ) do tecido renal

Tabela 4. Estudo imuno-histoquímico.

		Mφ	Col-1	AngII+
C_{1sem}	(n=12)	16±2	2±0,1	2±0,3
Ade_{1sem}	(n=12)	90±8 ^a	4±0,3 ^a	4±0,6
C_{4sem}	(n=13)	24±6	2±0,2	2±0,4
Ade_{4sem}	(n=14)	65±6 ^{ab}	6±0,5 ^{ab}	6±1,3 ^a
C_{24sem}	(n=09)	20±1	2±0,2	2±0,3
Ade_{24sem}	(n=11)	64±7 ^{ab}	8±0,6 ^{abc}	9±1,4 ^{abc}

Medidas de infiltração túbulo-intersticial de macrófagos (Mφ, céls/mm²), % de interstício renal preenchido por colágeno-1 (Col-1, %) e células positivas para AngII túbulo-intersticial (AngII+, céls/mm²) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Infiltração macrófágica intersticial

A inflamação renal é uma das características do modelo de sobrecarga de ADE. Os animais do grupo ADE_{1sem} apresentaram um intenso infiltrado macrófágico ($p < 0,05$ vs C_{1sem}). Após 4 semanas de suspensão de ADE, a infiltração de macrófago estava reduzida, mas ainda significativamente aumentada em relação ao seu controle ($p < 0,05$ vs C_{4sem}) e esse mesmo padrão foi mantido após 24 semanas ($p < 0,05$ vs C_{24sem}). Cabe observar que apesar da regressão, não houve normalização do infiltrado macrófágico ($p < 0,05$ vs C_{4sem}). Esse mesmo padrão foi observado após 24 semanas. O modelo de sobrecarga de adenina está associado a um intenso ambiente inflamatório, especialmente no início do processo.

Os valores da infiltração intersticial de macrófagos estão apresentados na tabela 4 e na figura 14 e 15.

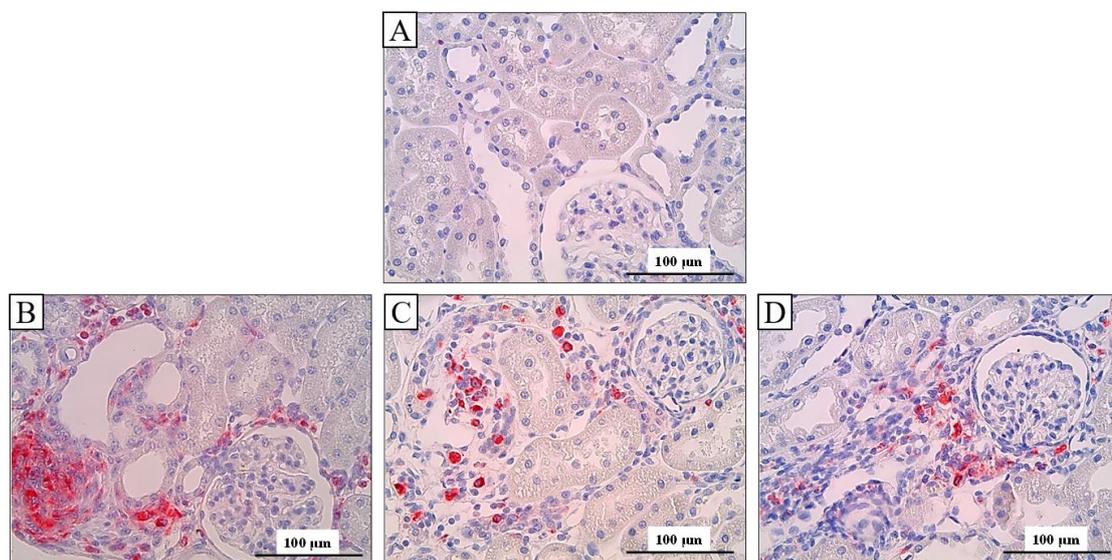


Figura 14. Microfotografias representativas da infiltração intersticial de macrófagos: A) rato pertencente ao grupo controle; B) rato pertencente ao grupo ADE_{1sem}; C) rato pertencente ao grupo ADE_{4sem}; D) rato pertencente ao grupo ADE_{24sem}. Imunohistoquímica para ED-1. Aumento 400X.

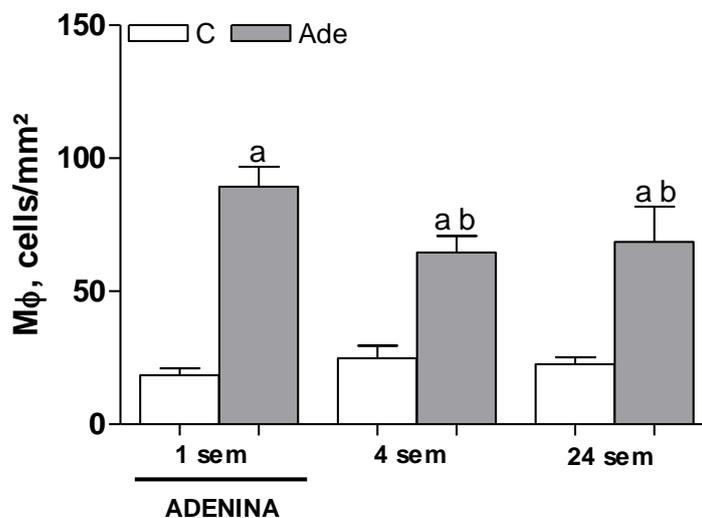


Figura 15. Infiltração túbulo-intersticial de macrófago no tecido renal dos animais. Quantificação da infiltração túbulo-intersticial renal de macrófagos (cell/mm²) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Espaço intersticial ocupado por Colágeno-1

Após 1 semana de ADE, a expressão de COL-1 já se apresentou elevada de forma significativa ($p > 0,05$). Com suspensão da ADE, a expressão de COL-1 elevou-se ainda mais ($p > 0,05$), progredindo 24 semanas após a suspensão da ADE, de forma que a diferença do grupo Ade_{24sem} com o seu controle era bem mais evidente e significativa ($p < 0,05$ vs C_{24sem}), sugerindo que após 24 semanas, os animais desenvolveram fibrose renal. Nos animais controle, a expressão de COL-1 é constitutiva e está restrita aos vasos do tecido renal. A fibrose intersticial foi uma das principais características tardias observadas nesse modelo induzido por dieta rica em adenina.

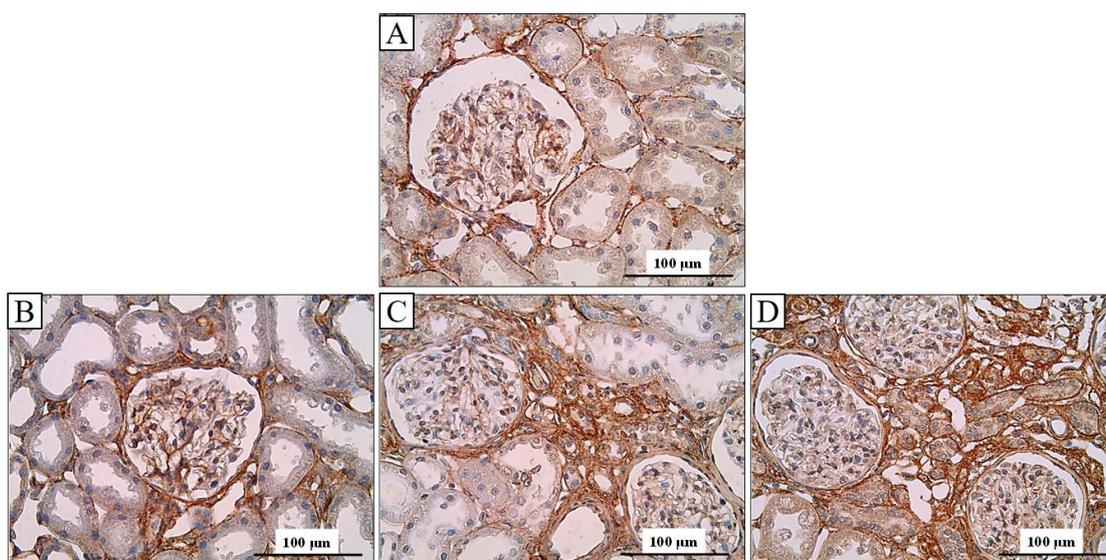


Figura 16. Microfotografias representativas da expressão de Colágeno 1: A) rato pertencente ao grupo controle; B) rato pertencente ao grupo ADE_{1sem}; C) rato pertencente ao grupo ADE_{4sem}; D) rato pertencente ao grupo ADE_{24sem}. Imunohistoquímica. Aumento 400X.

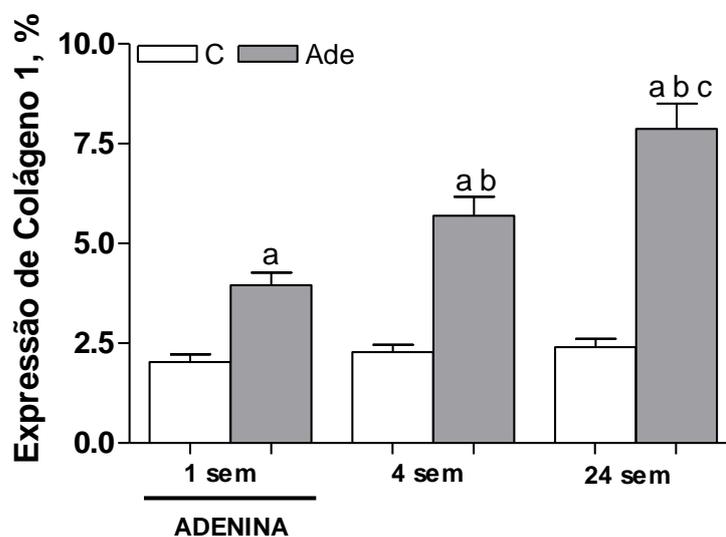


Figura 17. Expressão de Colágeno-1 no tecido renal dos animais.

Valores da % de colágeno-1 intersticial (COL-1, %) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Células positivas para Angiotensina II intersticial

Após 1 semana de ADE, a presença de células positivas para AngII+ no tecido renal foi elevada de forma significativa quando comparada ao seu respectivo controle ($p > 0,05$), e manteve-se em níveis significativamente elevados nos grupos Ade_{4sem} e Ade_{24sem} quando comparados aos seus respectivos controles. Esses achados sugerem que a AngII participa dos mecanismos inflamatórios envolvidos na progressão da DRC nesse modelo.

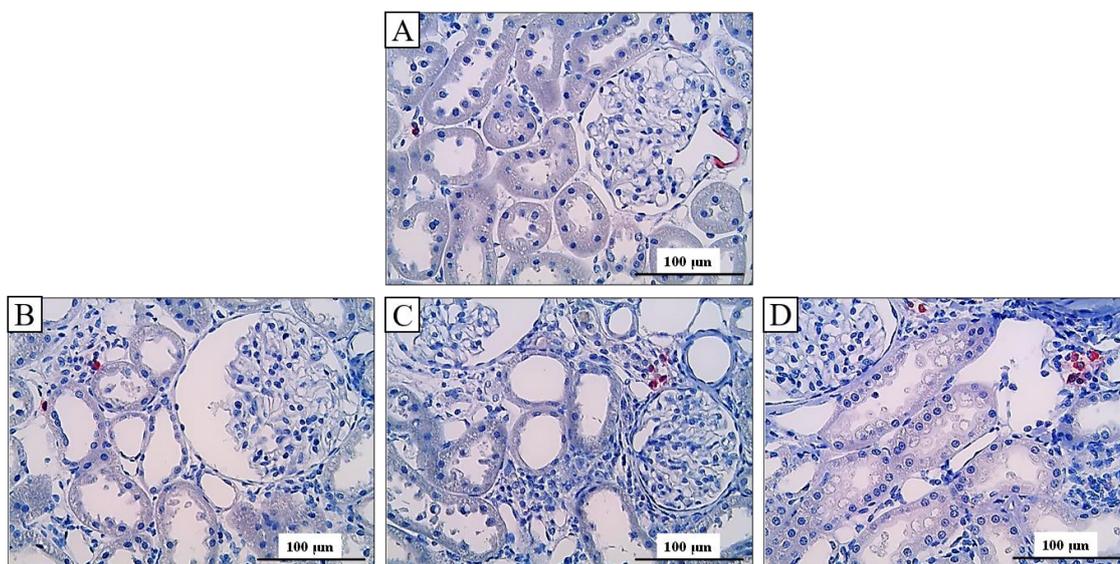


Figura 18. Microfotografias representativas da presença de células positivas para AngII: A) rato pertencente ao grupo controle; B) rato pertencente ao grupo ADE_{1sem}; C) rato pertencente ao grupo ADE_{4sem}; D) rato pertencente ao grupo ADE_{24sem}. Imunohistoquímica. Aumento 400X.

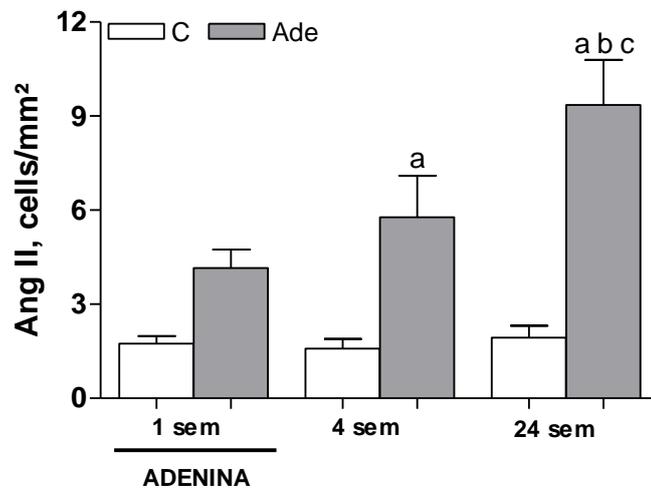


Figura 19. Células positivas para AngII no tecido renal dos animais.

Valores da quantificação de células positivas para AngII no tecido renal (AngII, cell/mm²) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Expressão proteica e gênica dos componentes da imunidade inata

Tabela 5. Análise da expressão proteica e gênica renal de componentes da imunidade inata dos animais.

		IL-1β (pg/mg)	IL-1β (2^{-$\Delta\Delta$Ct})	TLR4 (x\bar{C})	TLR4 (2^{-$\Delta\Delta$Ct})	NLRP3 (cells/mm²)	NLRP3 (2^{-$\Delta\Delta$Ct})	IL-6 (2^{-$\Delta\Delta$Ct})
C_{1sem}	(n=08)	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3
Ade_{1sem}	(n=08)	6,7 \pm 1,1 ^a	2,3 \pm 0,3 ^a	3,6 \pm 0,8 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a	2,6 \pm 0,2 ^a	2,0 \pm 0,1 ^a	4,9 \pm 0,9 ^a
C_{4sem}	(n=08)	1,1 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3
Ade_{4sem}	(n=07)	3,0 \pm 0,6 ^b	2,2 \pm 0,4 ^a	1,0 \pm 0,1 ^b	1,5 \pm 0,1 ^a	1,2 \pm 0,2 ^b	1,5 \pm 0,1 ^{ab}	1,8 \pm 0,3 ^b
C_{24sem}	(n=08)	1,6 \pm 0,6	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3
Ade_{24sem}	(n=07)	1,4 \pm 0,4 ^b	1,3 \pm 0,1 ^b	1,2 \pm 0,2 ^b	1,4 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4 ^b	1,2 \pm 0,1 ^b	1,1 \pm 0,2 ^b

Valores da expressão gênica e proteica renal de componentes da imunidade inata: IL-1 β (pg/mg), IL-1 β (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}), TLR4 (fold increase, x \bar{C}), TLR4 (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}), NLRP3 (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}), IL6 (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}) dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média \pm EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

De acordo com os resultados expressos na Tabela 5, pode-se observar clara ativação da imunidade inata, a partir da expressão proteica de IL-1 β , TLR4 e NLRP3 no grupo Ade_{1sem} quando comparado ao grupo C_{1sem}. Além da expressão proteica, a significativa expressão gênica desses componentes, assim como da interleucina 6 (IL-6) também foram observados no grupo Ade_{1sem}. 4 e 24 semanas após a interrupção da oferta da dieta rica em adenina, observa-se significativa redução da expressão proteica e gênica dos componentes citados, indicando que a ativação da imunidade inata ficou restrita apenas à fase aguda da lesão renal, sugerindo ser a iniciadora do processo inflamatório, que se tornou crônico por outros mecanismos.

Interleucina 1-beta (IL-1 β)

A expressão proteica (por ELISA) e gênica (mRNA) de IL-1 β ficaram restritas apenas à fase aguda do modelo - Fig 19. A IHQ para a molécula em questão apresentou-se positiva em todo o compartimento renal (túbulo, interstício e glomérulo) - Fig 20.

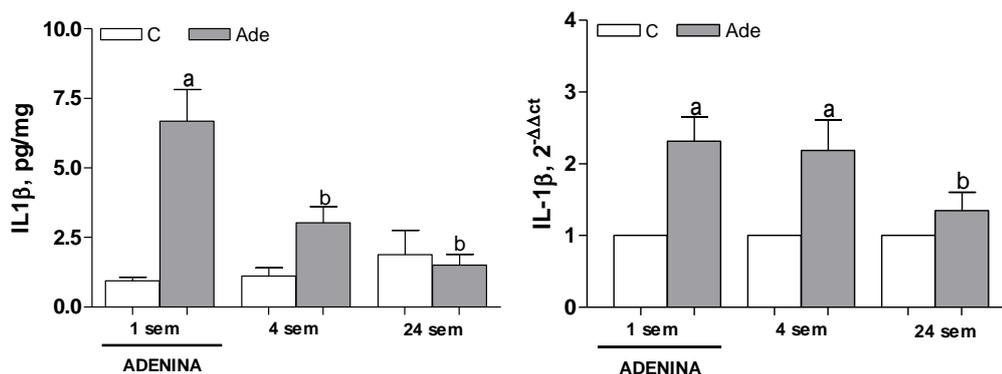


Figura 20 – Expressão proteica e gênica renal de IL-1 β dos animais.

Medidas da expressão proteica (IL-1 β , pg/mg) e gênica (IL-1 β , $2^{-\Delta\Delta Ct}$) de IL-1 β dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Média \pm EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

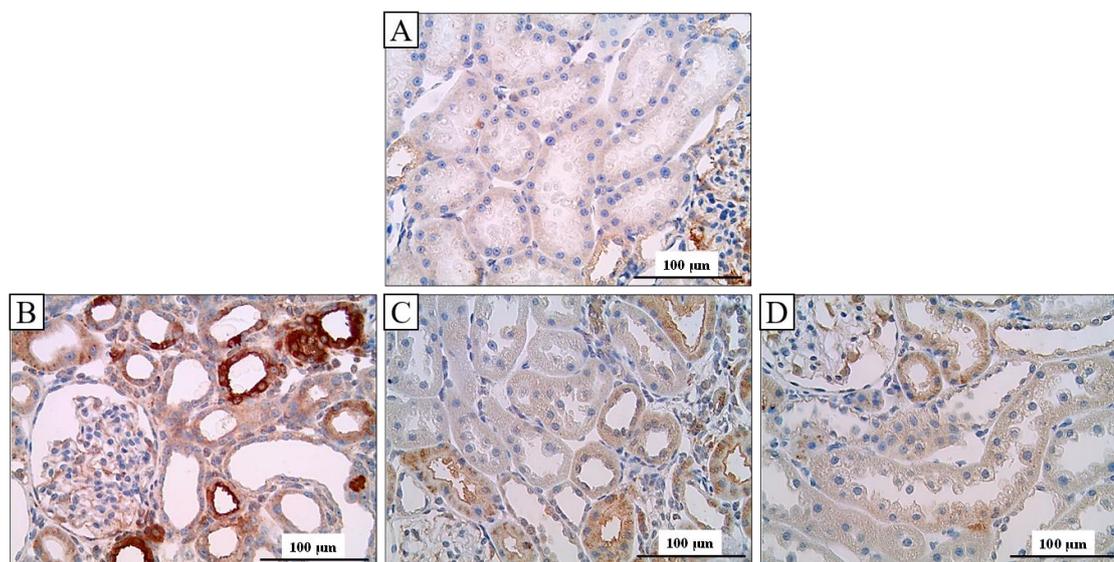


Figura 21. Microfotografias representativas de marcação positiva IL-1 β : A) rato pertencente ao grupo controle; B) rato pertencente ao grupo ADE_{1sem}; C) rato pertencente ao grupo ADE_{4sem}; D) rato pertencente ao grupo ADE_{24sem}. Imunohistoquímica. Aumento 400X.

Toll-like receptor 4 (TLR4)

Como já exposto, a expressão proteica (por Western Blot) e gênica (mRNA) de TLR4 ficaram restritas apenas à fase aguda do modelo, como pode-se observar na figura 21. A imunohistoquímica para a molécula em questão apresentou-se positiva em todo o compartimento renal (túbulo, interstício e glomérulo), como pode ser observada nas microfotografias apresentadas na figura 22.

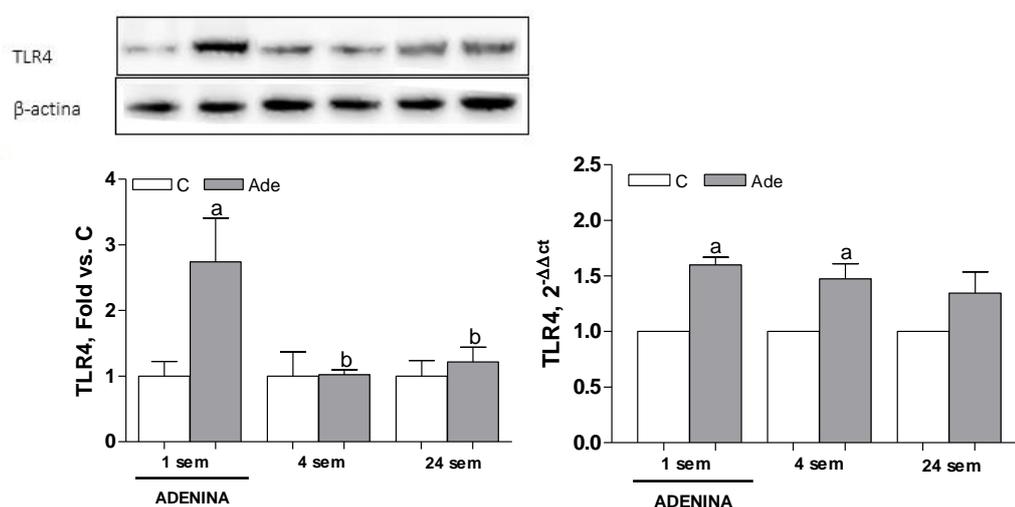


Figura 22 – Expressão proteica e gênica renal de TLR4 dos animais.

Medidas da expressão proteica (TLR4, Fold x C) e gênica (TLR4, 2^{-ΔΔCt}) renal de TLR4 dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

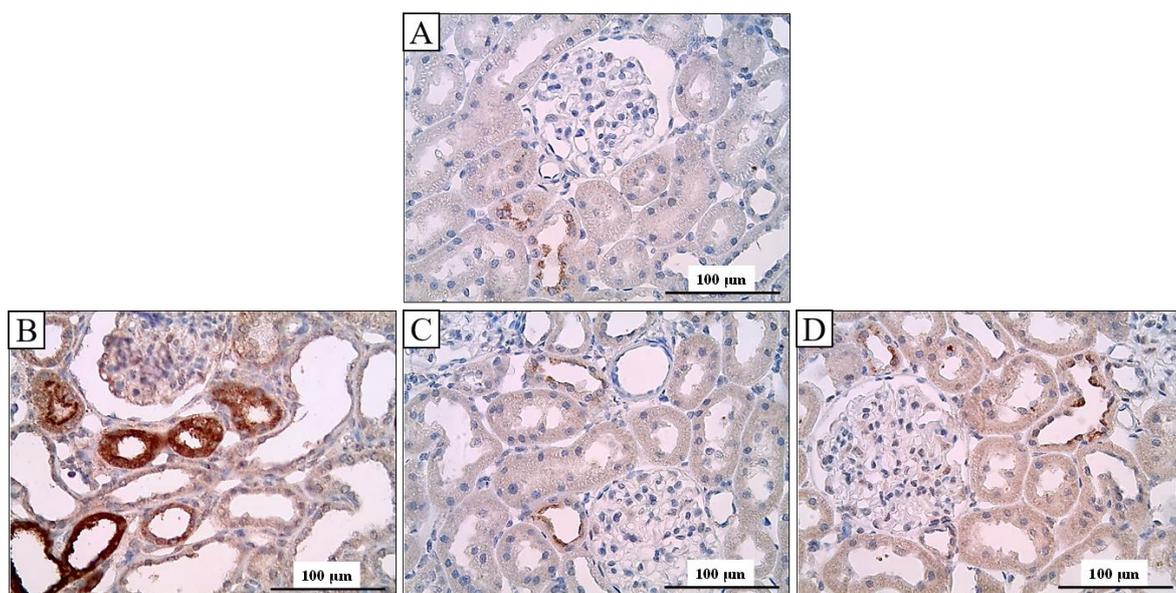


Figura 23. Microfotografias representativas de marcação positiva TLR4: A) rato pertencente ao grupo controle; B) rato pertencente ao grupo ADE_{1sem}; C) rato pertencente ao grupo ADE_{4sem}; D) rato pertencente ao grupo ADE_{24sem}. Imunohistoquímica. Aumento 400X.

Inflamassoma NLRP3

Como observado, a expressão proteica (por IHQ) e gênica (mRNA) de NLRP3 ficaram restritas apenas à fase aguda do modelo, como pode-se observar na figura 23. Foi considerado marcação positiva as células marcadas no compartimento intersticial, como pode ser observada nas microfotografias apresentadas na figura 24.

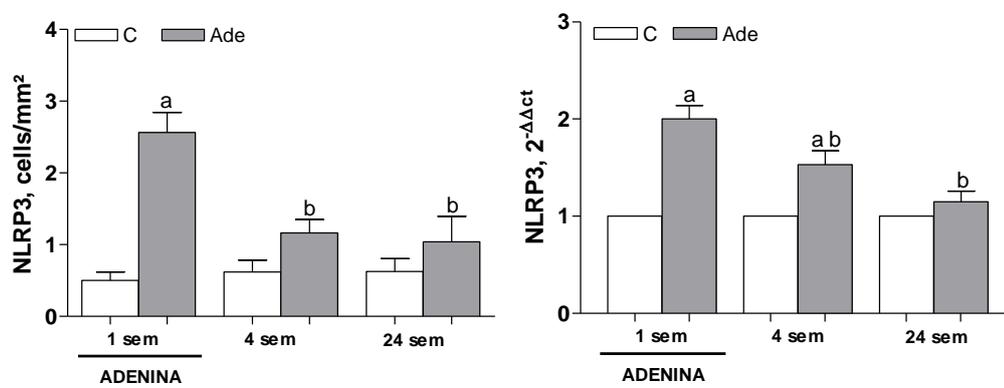


Figura 24. Expressão proteica e gênica renal de NLRP3 dos animais.

Medidas da expressão proteica (NLRP3, cells/mm²) e gênica (NLRP3, 2^{-ΔΔCt}) renal de NLRP3 dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

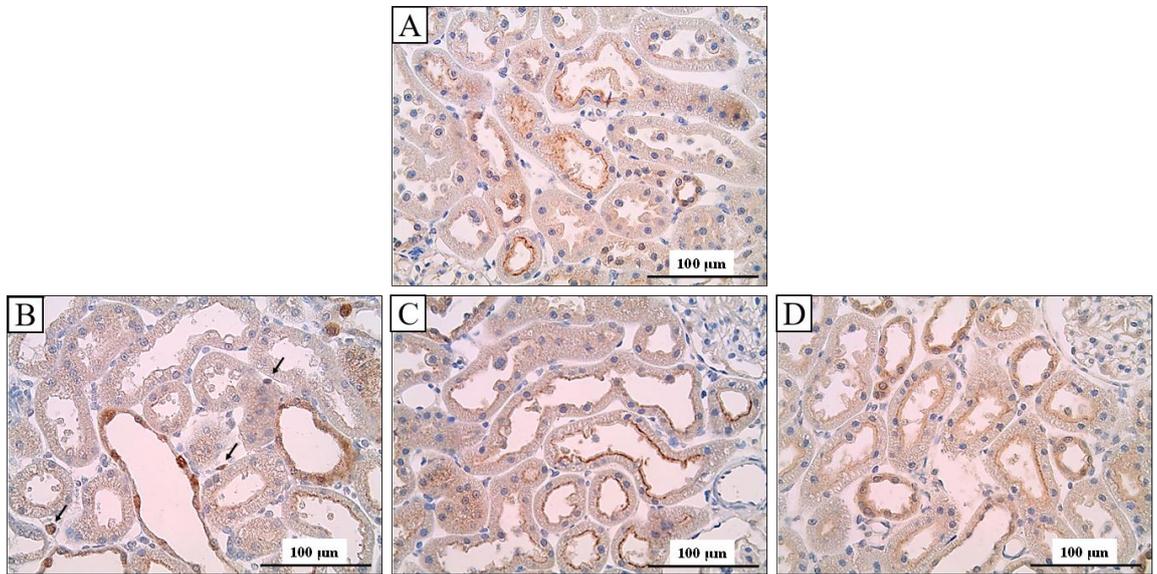


Figura 25. Microfotografias representativas da presença de células positivas para NLRP3: A) rato pertencente ao grupo controle; B) rato pertencente ao grupo ADE_{1sem}; C) rato pertencente ao grupo ADE_{4sem}; D) rato pertencente ao grupo ADE_{24sem}. Imunohistoquímica. Aumento 400X.

Interleucina 6 (IL6)

Na Figura 25 estão expostos dados de mRNA para IL-6. Como se pode observar, assim como os demais componentes da imunidade inata, sua expressão gênica ficou restrita apenas à fase inicial do modelo, não havendo diferença significativa na fase tardia do modelo.

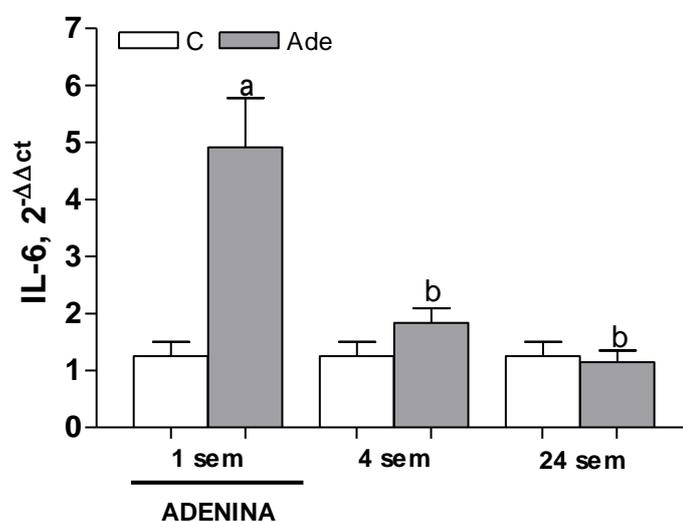


Figura 26. Expressão gênica renal de IL-6 dos animais.

Medidas da expressão gênica (IL-6, 2^{-ΔΔct}) renal de IL-6 dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

Translocação nuclear do componente p65 (NF-κB)

Na Figura 26 estão expostos dados de expressão proteica do dímero p65 do Sistema NF-κB. Como se pode observar, apenas os animais do grupo Ade_{24sem} apresentaram expressão elevada de forma significativa quando comparado ao seu respectivo C, indicando que a ativação desse sistema ficou restrita apenas a fase

crônica do modelo, diferentemente dos outros componentes da imunidade inata, que apresentaram-se ativados na fase inicial do modelo. Presume-se que essa ativação se deu sobre a ação da angiotensina 2 intra-renal, cuja expressão foi observada também nessa fase do estudo.

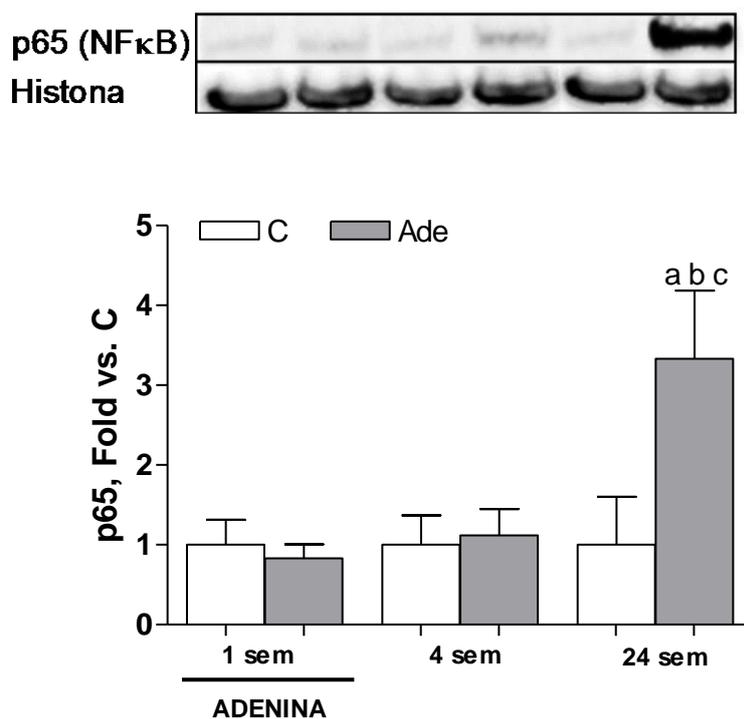


Figura 27. Expressão proteica renal de p65 (NF-κB) dos animais.

Medidas da expressão proteica (p65, Fold vs. C) renal do dímero p65 do sistema NFκB dos grupos ADE_{1sem}, ADE_{4sem}, ADE_{24sem} e seus respectivos controles. Resultados apresentados como Média±EP. (^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Ade_{1s}; ^cp<0,05 vs Ade_{4s}).

5. DISCUSSÃO

Conforme demonstrado anteriormente, a administração de adenina durante uma semana promoveu uma inflamação intersticial aguda. No entanto, não se observaram alterações nos níveis de albuminúria, nem lesões glomerulares perceptíveis à microscopia ótica, provavelmente como reflexo da natureza da lesão estrutural renal observada nessa fase, que consiste basicamente em inflamação intersticial. O processo inflamatório agudo caracterizou-se por infiltração de macrófagos, com pouca deposição de colágeno, resultado que corrobora estudos anteriores [18, 33, 75]. No entanto, a disfunção renal, indicada pelo aumento das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina, foi evidente nos ratos tratados com excesso de adenina.

Como esperado, observamos, nessa fase inicial, uma intensa infiltração de macrófagos no tecido renal dos animais que receberam sobrecarga de adenina. No entanto, os mecanismos que levam a essa intensa expansão/inflamação intersticial ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que os cristais de 2,8-DHA formam-se no interior do lume tubular, o que pode ocorrer em vários segmentos do néfron [18; 76, 77, 78], e que esse processo se continua com a infiltração do tecido renal por macrófagos [27, 29], com o aparecimento de células gigantes multinucleadas e, por fim, com a formação de granulomas de corpo estranho [16, 17, 44]. No entanto, não estão ainda definidos os eventos que levam da precipitação intratubular inicial à grave inflamação intersticial característica do modelo. Okabe e cols (2013) demonstraram alguns perfis tubulares cujo lume estava inteiramente ocupado por cristais, frequentemente cercados por macrófagos e miofibroblastos. Além disso,

Yokozawa e cols (1986) observaram a presença de dilatação tubular generalizada, indicando ser a obstrução tubular um possível mecanismo de lesão estrutural e comprometimento funcional nesse modelo.

O intenso ambiente inflamatório associado à sobrecarga de adenina, necessário ao início e propagação dos fenômenos que a acompanham, é evidenciado no presente estudo pela expressão aumentada de mediadores da imunidade inata, como TLR2, TLR4, inflamassoma NLRP3, IL1 β e IL-6, sem que, no entanto, o sistema NF- κ B tenha sido ativado, como demonstrado anteriormente [31]. Essa diferença em relação a observações anteriores decorre possivelmente da menor intensidade da sobrecarga de adenina utilizada neste estudo.

Trabalhos anteriores demonstraram que o inflamassoma NLRP3 desempenha um papel importante em modelos de isquemia/reperfusão [79] e de DRC [80] e, em conjunto com a ASC e a caspase-1, promove a maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β . Além disso, nos últimos anos, a hipótese de que a ativação do TLR4 induzida por ligantes endógenos está envolvida na fibrogênese renal foi apoiada por vários estudos [65; 82, 83]. Em camundongos submetidos a sobrecarga de adenina, observou-se aumento da atividade de TLR4, TLR2 e do inflamassoma NLRP3. Em consistência com essas observações, mostramos anteriormente que a inativação dos genes que codificam os TLRs 2 e 4 preveniu o desenvolvimento de fibrose intersticial nesse modelo [35].

Em seu conjunto, essas observações indicam que, num primeiro momento, a reação inflamatória à precipitação intratubular de cristais de 2,8-DHA envolve a montagem do inflamassoma NLRP3, sem que o sistema NF- κ B seja acionado. É importante ressaltar que um dos ativadores desse sistema é a AngII, especialmente

quando sua produção não está relacionada à conservação de sódio, e sim inserida em um processo inflamatório. Nessa fase inicial, a quantidade de células positivas para AngII em ratos tratados com adenina não diferiu significativamente da observada no grupo controle. Outros estimuladores do sistema NF- κ B, como o estresse oxidativo, não foram avaliados neste estudo, mas sua ação pode ter sido modesta ou nula, tendo em vista que essa ativação não se concretizou.

Quatro semanas após cessada a administração da dieta rica em adenina, havia ocorrido uma normalização da pressão arterial, da creatinina sérica, do hematócrito arterial e do potássio plasmático. Tomados isoladamente, esses resultados sugerem que houve regressão do processo agudo observado inicialmente, que parecia depender exclusivamente da manutenção da sobrecarga de adenina. Sob esse aspecto, nossos resultados corroboram observações anteriores [76]. No entanto, essa normalização era apenas aparente: a presença de colágeno 1, que estava moderadamente aumentada na primeira semana, se intensificara. A infiltração renal por macrófagos, embora modestamente reduzida em relação à semana inicial, mantinha-se muito acima do normal, enquanto a infiltração por células positivas para AngII, indefinida na primeira semana, era agora evidente. Essas anormalidades caracterizavam a persistência silenciosa da inflamação iniciada durante a primeira semana do estudo, que se mantinha mesmo depois de transcorridas algumas semanas desde a cessação do excesso de adenina. Esse processo inflamatório continuado não pode ser atribuído à presença de cristais de 2,8-DHA, cuja quantidade, já muito baixa na fase aguda, caiu ainda mais nas etapas subsequentes, através de um mecanismo que não está claro, mas que pode envolver a ação de macrófagos [84]. Portanto, a continuidade desse processo inflamatório crônico túbulo-intersticial deve refletir a

persistência de fatores patogênicos desencadeados por aqueles cristais durante a primeira semana do estudo.

A observação dos efeitos tardios do excesso temporário de adenina, que nunca haviam sido examinados, constitui-se em uma das principais contribuições do presente estudo. Nessa fase avançada, a pressão arterial e o potássio sérico voltaram a se elevar, enquanto a deposição de colágeno se intensificou, confirmando a natureza apenas aparente da recuperação observada com 4 semanas de estudo e indicando que, na verdade, se havia então instalado uma nefropatia crônica insidiosa e progressiva, análoga a algumas situações clínicas. A infiltração por macrófagos e por células positivas para AngII também se acentuou, indicando o caráter inflamatório da nefropatia. Mais uma vez, o processo não pode ser debitado à presença de cristais, quase indetectáveis nessa fase. Tampouco pode ser incriminado o eixo NLR/IL1 β , cuja ativação parece restrita à fase aguda do processo inflamatório. De outro lado, tornou-se evidente nessa fase a translocação nuclear do componente p65, indicando que o sistema NF- κ B, que responde por um segmento importante da imunidade inata e não havia participado da fase aguda da nefropatia, estava agora ativado. Os resultados deste estudo não permitem definir qual estímulo desencadeou o funcionamento do sistema NF- κ B. Sabe-se que esse sistema pode ser posto em marcha pelo acúmulo de espécies ativas de oxigênio [85]. Embora a presença de estresse oxidativo não tenha sido avaliada neste estudo, observações anteriores indicam que essa anomalia ocorre sistematicamente em nefropatias crônicas e, em particular, naquela associada à sobrecarga de adenina [97]. Portanto, a produção exacerbada de radicais livres devido ao estresse oxidativo é uma das possíveis causas para a ativação tardia do sistema NF- κ B observada neste estudo. Quanto à AngII,

uma série de estudos dá conta de que a ação desse peptídeo é um dos principais estímulos à ativação do sistema NF- κ B, através da ligação a receptores AT1 e AT2, promovendo fosforilação e desintegração da unidade inibidora I κ B [86, 87]. Deve-se observar que a produção de AngII intrarrenal, especialmente a que aparece em células inflamatórias, nada tem a ver com a de AngII “fisiológica”, destinada a promover vasoconstrição e conservação de sódio, diretamente ou através da produção de aldosterona. No contexto de uma inflamação crônica como a observada neste estudo, a AngII produzida localmente funciona como um mediador proinflamatório, que influencia fortemente a progressão da DRC [52, 73, 74], estimulando não somente o sistema NF- κ B, mas também a proliferação celular e a infiltração por macrófagos, além de promover a produção de fatores de crescimento e citocinas [52, 69, 70, 71].

Outra alteração proeminente nessa fase avançada foi a presença de albuminúria acentuada. Em consistência com esse achado, uma porcentagem considerável dos glomérulos apresentou lesões escleróticas. As lesões glomerulares que observamos nessa fase tardia constituem um achado novo, não demonstrado em trabalhos anteriores [18, 27, 75, 76], que adotaram períodos de observação bem mais curtos do que no presente estudo. O acometimento de glomérulos foi descrito em nefrites intersticiais crônicas [97] e em outros modelos experimentais de DRC com comprometimento do interstício renal, como a obstrução ureteral [88], a inibição crônica do óxido nítrico [89] e a administração neonatal de losartan [38]. O mecanismo dessas lesões glomerulares é incerto. É provável que nas nefrites intersticiais crônicas ocorra redução considerável do número de néfrons devido à interrupção de túbulos pela fibrose, originando glomérulos atubulares e túbulos

aglomerulares, ambos destinados à atrofia e à desintegração [90]. Como demonstrado no modelo de ablação renal de 5/6 [91], a redução do número de néfrons causa alterações hemodinâmicas que aumentam compensatoriamente a taxa de filtração glomerular por néfron [92]. Dessas, a mais importante é a hipertensão glomerular [93], capaz de lesar a parede dos capilares glomerulares por aumento da tensão mecânica. Essas alterações hemodinâmicas compensatórias podem ainda ser agravadas por uma perda da capacidade autorregulatória dos glomérulos remanescentes, motivada por uma limitação à vasoconstrição da arteríola aferente, possivelmente devido à ação de mediadores inflamatórios produzidos localmente [94]. Outra possibilidade de transmissão da inflamação intersticial aos glomérulos é a difusão de citocinas produzidas no próprio interstício renal, as quais podem exercer nos glomérulos uma ação inflamatória direta [95]. Deve-se lembrar, por fim, que a presença de albuminúria nesse contexto reflete uma quebra da barreira glomerular a macromoléculas, e que a exposição de células tubulares a um excesso de proteínas filtradas estimula a produção de mediadores inflamatórios [96], contribuindo assim para a instalação de um ciclo vicioso que agrava e perpetua o dano crônico ao parênquima renal.

Em resumo, a nefrite intersticial associada à sobrecarga de adenina é um processo multifatorial, que compreende alterações hemodinâmicas e inflamatórias. Em uma primeira fase, a presença de cristais no lúmen tubular promove ativação da imunidade inata, com expressão do inflamassoma NLRP3 e do TLR4, com consequente produção de IL-1 β e IL-6, assim como intensa proliferação de macrófagos, deposição intersticial de colágeno e hipertensão arterial, mas sem alterações glomerulares detectáveis. Quatro semanas após a suspensão do excesso de

adenina, a presença de cristais no parênquima renal, já escassa em comparação com estudos anteriores, reduziu-se ainda mais, acompanhada de regressão da maioria dos parâmetros avaliados. No entanto, a infiltração de macrófagos e a deposição de colágeno se mantiveram, associadas agora a uma infiltração intersticial por células positivas para AngII, indicando que a normalidade não foi restaurada totalmente após a suspensão da ADE. Na fase tardia, 24 semanas após a suspensão, foram observadas várias características da DRC, como esclerose glomerular, albuminúria e hipertensão arterial, apesar de uma significativa redução da atividade da imunidade inata e do virtual desaparecimento dos cristais. Essas alterações intersticiais e glomerulares tardias, assim como a perpetuação do processo inflamatório, parecem ser mediadas, ao menos em parte, pela ativação do sistema NF- κ B, possivelmente em decorrência da produção local de AngII, cuja ação inflamatória direta pode ter contribuído substancialmente à patogênese da nefropatia. As observações do presente estudo, demonstrando a existência de dois mecanismos distintos de inflamação intersticial, podem ajudar a compreender melhor a patogênese da DRC, e a atuar na prevenção de sua ocorrência e/ou de sua progressão.

6. CONCLUSÕES

1. A nefropatia túbulo-intersticial desencadeada pela sobrecarga de adenina na dieta progride mesmo após cessado esse insulto inicial;
2. Durante a vigência da sobrecarga de adenina, ocorre ativação do inflamassoma NLRP3, TLR2 E TLR4, assim como produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β e IL6.
3. Nas fases mais avançadas do modelo, a via do inflamassoma NLRP3 retorna ao normal, enquanto o sistema NF- κ B é ativado. É provável que o estímulo à ativação do sistema NF- κ B tenha sido mediado, ao menos em parte, pela produção local de AngII.
4. Nas fases tardias desse modelo, observaram-se também lesões glomerulares, não descritas anteriormente, provavelmente decorrentes da redução do número de néfrons e/ou da transmissão aos glomérulos da inflamação intersticial;
5. O modelo descrito neste estudo pode contribuir substancialmente a uma melhor compreensão da patogênese da DRC e à busca de estratégias para prevenir sua instalação ou progressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN). Perfil da doença renal crônica o desafio brasileiro 2007. Disponível em: www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/.../Doenca_Renal_Cronica.pdf. Zatz R, Romão JE, Jr. End-stage renal failure and national resources: the Brazilian experience. *Ren Fail* 2006; 28: 627-629.
2. Kida Y, Duffield JS. *Frontiers in Research: Chronic Kidney Diseases: The pivotal role of pericytes in kidney fibrosis*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38: 417-423.
3. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Exp Nephrol* 1996; 4 Suppl 1: 34-40.
4. Bastos MG; Castro WB; Abrita RR; Almeida EC; Mafra D; Costa DMN; Gonçalves JA; Oliveira LA; Santos FR; Paula RB. Doença Renal Crônica: Problemas e Soluções. *J. Bras. Nefrol.* 2004; 26(4):202-215.
5. Cherchiglia M; Machado EL; Szuster DAC; Andrade EIG; Acúrcio FA; Caiaffa WT; Sesso R; Guerra Júnior AA; Queiroz OV; Gomes IC. Perfil Epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil. *Revista de Saúde Pública (USP. Impresso)* 2000-2004, v. 44, p. 639-649, 2010.
6. Ermida VS. Avaliação da Assistência e da Qualidade de Vida do Paciente de Hemodiálise na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. 257 f. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública) Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2009.
7. Romão JR. A Doença Renal Crônica: do Diagnóstico ao tratamento. *Prática Hospitalar* 2007; Ano IX. N. 52.
8. Silva, GD. Avaliação dos gastos realizados pelo Ministério da Saúde com medicamentos de alto custo utilizados no tratamento da DRC por pacientes do SUS no Estado de Minas Gerais – 2000 a 2004. 53 f. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública – área de concentração Políticas de Saúde e

Planejamento) Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

9. Rastegar A, Kashgarian M. The clinical spectrum of tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 1998; 54:313-327.
10. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991; 39: 550-556.
11. Bohle A, Christ H, Grund KE, et al. The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 1979; 16: 109-114.
12. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, et al. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1359-1368.
13. Desmouliere, A, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993; 122: 103-111.
14. Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1967-1974.
15. Zhang G, Moorhead PJ, el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 1995; 3:308-318.
16. Tong Y, Han B, Guo H, Liu Y. Protection of Chinese Herbs Against adenine-induced chronic renal failure in. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2010; 7:331-338.
17. Philips FS, Thiersch JB, Bendich A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2,8-dyoxiadenine in renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 1952; 104:20-30.
18. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, Boivin G, Yum MN, Davies PM, Ying MY, Sahota A, Simmonds HA, Stambrook PJ, TischWeld JA. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5307–5312.

19. Stockelman MG, Lorenz JN, Smith FN, Boivin GP, Sahota A, TischWeld JA, Stambrook PJ. Chronic renal failure in a mouse model of human adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Am J Physiol* 1998; 275:F154–F163.
20. Coupris L, Champion G, Duverne C, et al. 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. 2 new pediatric causes of an unknown metabolic deficit. The use extracorporeal lithotripsy. *Chir Pediatr* 1990; 31:26-31.
21. Edvardsson V, Palsson R, Olafsson I, Hjaltadottir G, Laxdal T. Clinical features and genotype of adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Iceland. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:473–480.
22. Bollee G, Dollinger C, Boutaud L, Guillemot D, Bensman A, Harambat J, Deteix P, Daudon M, Knebelmann B, Ceballos-Picot I. Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21:679–688.
23. Kelley WN, Levy RI, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency: a previously undescribed genetic defect in man. *J Clin Invest* 1968; 47:2281–2289.
24. Nasr SH, Sethi S, Cornell LD, Milliner DS, Boelkins M, Broviac J, Fidler ME. Crystalline nephropathy due to 2,8- dihydroxyadeninuria: an under-recognized cause of irreversible renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:1909–1915.
25. Story DL, Shrader RE, Theriault LL, et al. Effects of dietary protein, adenine, and allopurinol on growth and metabolism of rats. *J Nutr* 1977; 107: 1044-1052
26. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 1986; 44:230-234.
27. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, Boivin G, Yum MN, Davies PM, Ying MY, Sahota A, Simmonds HA, Stambrook PJ, TischWeld JA. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5307–5312.
28. Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H, et al. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcifications in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:651-659.

29. Ataka K, Maruyama H, Neichi T, et al. Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am J Nephrol* 2003; 23:315-323.
30. 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; 15;305(2):F155-63.
31. Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J* 1996; 10:1418–1425
32. Tamura M, Aizawa R, Hori M, et al. Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. *Histochem Cell Biol*. 2009; 131:483-490.
33. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 2001; 59:1626–1640.
34. Correa-Costa M, Braga TT, Semedo P, et al. Pivotal Role of Toll-like Receptors 2 e 4, Its Adaptor Molecule MyD88, and Inflammasome Complex in Experimental Tubule-Interstitial Nephritis. *Plos One* 2011; 6:e29004.
35. Wang L, Raikwar N, Deng L, et al. Altered gene expression in kidneys of mice with 2,8-dihydroxiadenine nephrolithiasis. *Kidney Int* 2000; 58:528-536.
36. Azuma H, Nadeu K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997; 64:190-197.
37. Machado FG, Poppi EP, Fanelli C, Malheiros DM, Zatz R, Fujihara CK. AT1 blockade during lactation as a model of chronic nephropathy: mechanisms of renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294(6):1345-53

38. Fanelli C, Fernandes BH, Machado FG, Okabe C, Malheiros DM, Fujihara CK, Zatz R. Effects of losartan, in monotherapy or in association with hydrochlorothiazide, in chronic nephropathy resulting from losartan treatment during lactation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301(3):580-7
39. 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.
40. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140:821–832. 4.
41. Anders HJ, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:1007-1018.
42. Goncalves GM, Castoldi A, Braga TT, et al. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol* 2011; 73:428-435.
43. Taniguchi S, Sagara J. Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Semin Immunopathol* 2007; 29:231-238.
44. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10:241-247.
45. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28:137– 161.
46. Tian X, Pascal G, Monget P. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* 2009; 9:202.
47. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 2012; 13:333– 332.
48. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 2007; 27:549–559.
49. Lorentz G, Darisipudi MN, Anders H-J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29:41– 48.

50. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, et al. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 1995; 48:1263-1271.
51. 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.
52. 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.
53. Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, et al. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 98:100-103.
54. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, et al. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000; 35:193-201.
55. Spink J, Cohen J, Evans TJ. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270:29541-29547.
56. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, et al. Rapid proteolysis of I kappa Balpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 1993; 365:182-185.
57. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1254-1262.
58. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
59. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, et al. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 2001; 60:1366-1377.
60. Mezzano S, Aros C, Droguett A, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:2505-2512.

64. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, et al. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:92-99.
65. Gong R, Rifai A, Tolbert EM, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2868-2881.
64. Oyama Y, Hashiguchi T, Taniguchi N, et al. High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy. *Lab Invest* 2010; 90:853-866. m
65. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD: The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993; 329:1456-1462.
66. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zuccheli P: Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor in Progressive Renal Insufficiency Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 1996; 334:939-945.
67. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986; 77:1993-2000.
68. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW: Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1992; 90:766-771.
69. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuschastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM: Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest* 1999; 104:1693-1701.
70. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, Fukamizu A, Murakami K: Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 1999; 103:627-635.

71. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transformin growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93:2431-2437.
72. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptor 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.
73. Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J. Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 2001; 37:1171-1178.
74. Esteban V, Ruperez M, Vita JR, Lopez ES, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M: Effect of simultaneous blockade of AT1 e AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl* S38, 2003.
75. Santana AC, Degaspari S, Catanozi S, Dellê H, Lima LS, Silva C, Blanco P, Solez K, Scavone C and Noronha IL. Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 1–9.
76. Shuvy, M et al. Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2011; 63:303-306.
77. Brule D, Sarwar G, Savoie L, et al. Differences in uricogenic effects of dietary purine bases, nucleosides and nucleotides in rats. *J Nutr* 1988; 118:780-786.
78. Evan AP, Bledsoe SB, Connors BA, et al. Sequential analysis of kidney stone formation in the Aprt knockout mouse. *Kidney Int* 2001; 60:910-923.
79. Shigeoka, A. A., J. L. Mueller, A. Kambo, J. C. Mathison, A. J. King, W. F. Hall, Jda. S. Correia, R. J. Ulevitch, H. M. Hoffman, and D. B. McKay. 2010. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.* 185: 6277–6285.

80. Vilaysane, A., J. Chun, M. E. Seamone, W. Wang, R. Chin, S. Hirota, Y. Li, S. A. Clark, J. Tschopp, K. Trpkov, et al. 2010. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21:1732–1744.
81. Shankland, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International* 2006; 69:2131–2147.
82. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, Feng G, Pope RM, Budinger GR, Mutlu GM, Lafyatis R, Radstake T, Feghali-Bostwick C, Varga J: Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-beta responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am J Pathol* 2013; 182:192–205.
83. Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Asanuma H, Vanderbrink BA, Rink RR, Meldrum KK: Toll-like receptor 4: a novel signaling pathway during renal fibrogenesis. *J Surg Res* 2011; 168:e61–e69.
84. de Bruijn W C, Boevé E R, van Run P R, van Miert P P, de Water R, Romijn J C, Verkoelen C F, et al. Etiology of calcium oxalate nephrolithiasis in rats. I. Can this be a model for human stone formation? *Scanning microscopy* 1995; 9 (1): 103-14.
85. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1493-505.
86. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RAK, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-B through AT₁ and AT₂ receptors. *Kidney Int.* 2002; 61:1986–1995.
87. Luft FC. Angiotensin II, the AT₂ receptor, and nuclear factor-κB activation. *Kidney Int.* 2002; 61:2272–2273.
88. Vieira JM Jr, Mantovani E, Rodrigues LT, et al. Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(8):1582-1591.

89. Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of artery hypertension. *Hypertension* 1992; 20(3):298-303.
90. Gandhi M, Olson JL, Meyer TW: Contribution of tubular injury to loss of remnant kidney function. *Kidney Int* 1998; 54:1157–1165.
91. Kujal P, Vernerová Z. 5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number. *Cesk Fysiol.* 2008; 57(4):104-9
92. Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985; 249:F324-37.
93. Paul LC. Glomerular hypertension – an under-appreciated aspect of chronic rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:213-229.
94. Hodgkins KS, and Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2012; 27:901–9.
95. R Pichler et al. The Pathogenesis of Tubulointerstitial Disease Associated With Glomerulonephritis: The Glomerular Cytokine Theory. *Miner Electrolyte Metab* 1995; 21:317-327.
96. Shankland, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International* 2006; 69:2131–2147.
97. Aminzadeh MA, Nicholas SB, Norris KC, Vaziri ND. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(8):2038-45.