

Helena Mendonça Tessaro

O papel da imunidade inata no envelhecimento renal

Dissertação de 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

2023

Helena Mendonça Tessaro

O papel da imunidade inata no envelhecimento renal

Dissertação de 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

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tessaro, Helena Mendonça
O papel da imunidade inata no envelhecimento
renal / Helena Mendonça Tessaro. -- São Paulo, 2023.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1. Envelhecimento 2. Insuficiência
renal crônica 3. Proteína 3 que contém domínio de
pirina da família NLR

USP/FM/DBD-331/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu marido por todo seu apoio incondicional nesta jornada, e aos meus filhos, que o futuro de vocês siga sendo pautado pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Roberto Zatz, primeiramente por estender a oportunidade desta vivência acadêmica, por ter compartilhado de suas ideias, seus ensinamentos e por ter me orientado nesta jornada. Sou uma grande admiradora de sua genialidade.

Agradeço à Doutora Fernanda Florencia Fregnam Zambom por de maneira sempre generosa compartilhar seus conhecimentos técnicos, de maneira paciente me ensinar sobre os procedimentos laboratoriais desde como manipular uma micropipeta até a realização de procedimentos de maior complexidade e por ser uma grande companheira na condução deste projeto. Considero sua amizade um dos maiores presentes que ganhei durante a execução deste mestrado.

Ao meu amado esposo, Rodrigo Barros da Rocha Martins, gostaria de agradecer por seu apoio incondicional neste processo, por sempre me incentivar nos momentos de desânimo, se alegrar nos momentos felizes e ser meu “porto seguro” nos momentos difíceis.

Aos meus pais agradeço, em especial à minha mãe a quem dedico este trabalho, por, desde a minha primeira infância, apesar dos poucos recursos, terem se dedicado em proporcionar a mim e ao meu irmão as melhores escolas e as melhores vivências estudantis. Sou muito grata por terem me inculcido a noção de que o ensino mudaria minha vida. Vocês também possuem um grande mérito neste trabalho.

Obrigada Doutora Clarice Kazue Fujihara por suas orientações, ideias e ensinamentos no desenvolvimento, orientação e condução deste projeto.

Janice Pião, agradeço imensamente por todo o cuidado com “meus velhinhos” (ratos integrantes do experimento), obrigada pelas risadas e pelos bons momentos que passamos no biotério

Agradeço a toda a equipe integrante do Laboratório de Fisiopatologia Renal, LIM 16, por terem me acolhido de maneira muito hospitaleira, pela disposição em orientar, ensinar e ajudar sempre que necessário. Obrigada pelas boas conversas e os ótimos momentos vividos.

Agradeço às políticas governamentais, como o PROUNI, que universalizam o ensino universitário. Graças a este programa, realizei um sonho de me graduar como médica veterinária, uma das grandes paixões da minha vida.

“Não há nada a temer na vida, apenas tratar de compreender.”

— Marie Curie

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Alterações estruturais e morfológicas do envelhecimento renal	12
1.2	Patogênese da Nefropatia do Envelhecimento	14
2	OBJETIVOS.....	19
3	MÉTODOS.....	20
3.1	Obtenção do modelo experimental.....	20
3.2	Grupos Experimentais	21
3.3	Procedimentos Gerais	21
3.4	Análises bioquímicas.....	22
3.5	Análises Histológicas.....	22
3.6	Estudo Imuno-histoquímico do tecido renal.....	23
3.7	Análise do conteúdo proteico do tecido renal.....	26
3.8	Análise por Western Blot	27
3.9	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Parâmetros gerais	30
4.2	Estudo histomorfométrica do tecido renal	34
4.3	Estudo imuno-histoquímico do Tecido Renal: Inflamação.....	36
4.4	Expressão proteica dos componentes da imunidade inata	42
4.5	Componentes do Sinal 1 da Imunidade Inata.....	44
4.6	Componentes do Sinal 2 da Imunidade Inata.....	45
4.7	Expressão proteica de marcadores de stress oxidativo	46
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

Tessaro HM. O papel da imunidade inata no envelhecimento renal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A patogênese da nefropatia do envelhecimento ainda não foi elucidada. A Angiotensina-II (AngII) intrarrenal e a ativação das vias do inflamassoma NF- κ B e NLRP3 exercem papel patogênico relevante na progressão da doença renal crônica. Procuramos investigar se a monoterapia com Losartan e o tratamento combinado com Losartan e o inibidor de NF- κ B pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) atenuariam a nefropatia do envelhecimento. Ratos Munich-Wistar machos foram distribuídos em quatro grupos: 12M (n=10), ratos com 12 meses de idade; 15M (n=10), ratos de 15 meses de idade; 15M_{Los} (n=10), ratos recebendo Losartan (50 mg/d) e 15M_{Los+PDTC} (n=10), ratos recebendo Losartan e PDTC (15 mg/d). Todos os tratamentos foram administrados por via oral dos 12 aos 15 meses de idade. O grupo 15M exibiu uma leve diminuição da pressão caudal e um aumento acentuado da albuminúria, glomérulos esclerosados, deposição cortical de colágeno-1 e infiltração por miofibroblastos, células AngII-positivas e macrófagos M1 pró-inflamatórios, enquanto a quantidade de macrófagos M2 anti-inflamatórios se mostrou reduzida. Além disso, a abundância renal de TLR4, p65 nuclear e IL-6 estava aumentada, indicando ativação da via NF- κ B, sem evidência de ativação simultânea da cascata NLRP3. O tratamento com Losartan diminuiu a deposição de colágeno-1 cortical, miofibroblastos e células positivas para AngII e restaurou parcialmente o M2 renal, mas não teve efeito significativo sobre a albuminúria, a glomeruloesclerose ou a ativação de NF- κ B. O tratamento combinado Losartan+PDTC preveniu todas as anormalidades observadas. O bloqueio da AngII renal associado à inibição da via NF- κ B pode ser uma alternativa para limitar o declínio da função renal com a idade.

Palavras-chave: Envelhecimento. Insuficiência renal crônica. Proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR.

ABSTRACT

Tessaro HM. The role of innate immunity in aging kidney [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

The pathogenesis of aging nephropathy is yet to be elucidated. Intrarenal Angiotensin-II (AngII) and activation of the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways exert a relevant pathogenic role in the progression of chronic kidney disease (CKD). We sought to investigate whether monotherapy with Losartan and combined treatment with Losartan and the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) would attenuate experimental aging nephropathy. Male Munich-Wistar rats were distributed among four groups: 12M (n=10), 12-month-old rats; 15M (n=10), 15-month-old rats; 15M_{Los} (n=10), rats receiving Losartan (50 mg/d) and 15M_{Los+PDTC} (n=10), rats receiving Losartan and PDTC (15 mg/d). All treatments were given by mouth from 12 to 15 months of age. Group 15M exhibited slightly decreased tail-cuff pressure, and marked increase in albuminuria, sclerotic glomeruli, cortical collagen-1 deposition and infiltration by myofibroblasts, AngII-positive cells and proinflammatory M1 macrophages, whereas the amount of anti-inflammatory M2 macrophages was reduced. In addition, the renal abundance of TLR4, nuclear p65 and IL-6 was increased, indicating activation of the NF- κ B pathway, without evidence of simultaneous activation of the NLRP3 cascade. Losartan treatment decreased cortical collagen-1 deposition, myofibroblasts and AngII-positive cells, and partially restored renal M2, but had no significant effect on albuminuria, glomerulosclerosis or NF- κ B activation. Combined Losartan+PDTC prevented all the observed abnormalities. Concomitant blockade of renal AngII and inhibition of the NF- κ B pathway can be an alternative to limit the decline of renal function with age.

Keywords: Aging. Renal insufficiency, chronic. NLR family, pyrin domain-containing 3 protein.

1 INTRODUÇÃO

A longevidade é uma das conquistas mais notáveis da humanidade. Avanços no desenvolvimento econômico e social, bem como estratégias mais eficazes no controle da mortalidade materna, na prevenção e tratamento de doenças infantis, além do manejo de afecções que acompanham o envelhecimento permitiram à maioria dos seres humanos uma expectativa de vida superior aos 60 anos. De acordo com a *United Nations Decade of Healthy Ageing (2021–2030)* elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019 aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo possuíam 60 anos ou mais. Dados prospectivos desse estudo estimam um crescimento de 34% dessa parcela populacional em uma década e que em 2050 ela atinja 2.1 bilhões. Além disso, estima-se que o número de idosos aumente de maneira mais acelerada em países em desenvolvimento: em 2050 projeta-se que 80% da população idosa mundial viverá em países em desenvolvimento (Lloyd-Sherlock *et al.*, 2019).

Ainda que a longevidade seja algo valioso, o envelhecimento populacional eleva as demandas por serviços de saúde e sociais, além de exigir recursos econômicos para lidar com enfermidades incapacitantes que acompanham o envelhecimento (Fulop *et al.*, 2019). Embora haja um grande esforço mundial, ainda não conseguimos entender o processo de envelhecimento integralmente e são necessários novos estudos que auxiliem na elucidação deste processo, bem como na elaboração de estratégias para um envelhecimento saudável (Rubio-Aliaga, 2020)

Mais de 300 definições tentam explicar o envelhecimento (Fulop *et al.*, 2019) O envelhecimento biológico é o processo de mudança no organismo ao longo do tempo, diminuindo a probabilidade de sobrevivência e reduzindo a capacidade fisiológica de autorregulação, reparo e adaptação às demandas ambientais (Schroots and Birren, 1988)

Os rins estão entre os órgãos-alvo do envelhecimento, resultando em alterações estruturais e declínio funcional, que deixam o idoso mais suscetível a lesões renais agudas e ao agravamento de lesões crônicas (Chang-Panesso, 2021) Nos parágrafos que se seguem descreveremos alterações macro e microestruturais

que ocorrem no envelhecimento renal, bem como alguns mecanismos moleculares envolvidos nessas mudanças.

1.1 Alterações estruturais e morfológicas do envelhecimento renal

Estima-se que, já aos 30 anos de vida, inicia-se um lento processo de diminuição do volume renal, com perda de néfrons e substituição do parênquima por tecido fibroso, provocando uma redução na taxa de filtração glomerular (TFG) de 0,4 a 1,0 ml/min/ano/1,73 m² de superfície corpórea (Choudhury and Levi, 2011). Em um processo natural de envelhecimento renal, uma larga parcela dos néfrons terá sido perdida aos 75 anos, devido a esclerose glomerular difusa. Os glomérulos restantes são sobrecarregados por hiperfuncionamento compensatório, o que acaba por lesá-los, perpetuando o processo (Musso and Jauregui, 2016).

Em 1973, Darmady e colaboradores desenvolveram estudos *post mortem* da estrutura renal desde o nascimento até a senescência. Em seus achados são relatados um declínio no número de glomérulos normais, perda de túbulos, alterações vasculares e aumento da frequência de divertículos tubulares em idosos, mesmo aparentemente saudáveis (Darmady *et al.*, 1973).

Em 2017, Denic e colaboradores, por meio de tomografia computadorizada e biópsia do córtex renal, estudaram os rins de 1638 doadores vivos. Os grupos foram delineados de acordo com a faixa etária a que pertenciam (18-29 anos, 30-39 anos, 40-49 anos, 50-59 anos, 60-69 anos e 70-75 anos). Os resultados demonstraram que, comparados à faixa etária de 18 a 29 anos, os doadores de 50-59 anos exibiam diminuição de aproximadamente 9% do volume cortical e redução de 17% do número de néfrons, enquanto 3% dos glomérulos apresentavam esclerose difusa. No grupo de doadores de 70-75 anos, houve diminuição de 16% do volume cortical, 48% do número de néfrons e uma porcentagem de esclerose glomerular de 15%. Esses achados demonstram uma redução substancial do número de néfrons e um aumento no percentual de glomeruloesclerose durante o processo de envelhecimento renal, mesmo em indivíduos saudáveis (Denic *et al.*, 2017).

Contra-pondo-se em parte à noção de que o envelhecimento é acompanhado por uma perda significativa de néfrons, em 2020 foi publicado um estudo desenvolvido pela *Monash University* (Hughson *et al.*, 2020), no qual foi investigado em autópsias o rim direito de 319 indivíduos com idade entre cinco semanas e 89 anos de vida. Os dados da série Monash não demonstraram um declínio tão acentuado no número de glomérulos após os 40 anos de idade. Apenas as faixas etárias de 40 a 49 anos e ≥ 70 anos foram significativamente diferentes. Entretanto, vale ressaltar que a série Monash apresentou um número diminuto de rins de pessoas com 65 anos de idade ou mais.

A glomeruloesclerose, a fibrose cortical e a arteriosclerose são características da nefropatia ligada ao aumento da idade. (Rule *et al.*, 2011). As lesões precursoras da glomeruloesclerose secundária ao envelhecimento aparentam ter um forte componente de isquemia glomerular, uma vez que as paredes das artérias/arteríolas apresentam espessamento em decorrência da deposição subendotelial de fibras hialinas e colágeno (Hommos *et al.*, 2017). Os glomérulos afetados desenvolvem espessamento e enrugamento da membrana basal, com retração do tufo glomerular em direção ao polo vascular juntamente com fibrose periglomerular, acompanhada por deposição de colágeno no espaço de Bowman (Rule *et al.*, 2011). Esses glomérulos podem vir a ser reabsorvidos, fato que explicaria o número diminuído de glomérulos em idosos em comparação com indivíduos mais jovens. Os glomérulos remanescentes apresentam hipertrofia compensatória, o que também contribui para perpetuar o processo (Glassock and Rule, 2012).

Durante o processo de envelhecimento renal ocorre uma queda do número de podócitos, além de hipertrofia dos remanescentes (Shankland *et al.*, 2021). Hodgin e colaboradores desenvolveram camundongos transgênicos AA-4EBP1, um modelo análogo ao processo de envelhecimento renal. Nesse estudo observou-se que a densidade média dos podócitos diminuiu progressivamente com o passar dos anos, levando à hipertrofia das dessas células remanescentes e ao colapso dos tufos glomerulares (Hodgin *et al.*, 2015).

Os túbulos também são acometidos pelo processo de envelhecimento. Entre as alterações observadas, essas estruturas podem apresentar degeneração gordurosa, espessamento irregular da membrana basal, fibrose e atrofia (Glassock

and Rule, 2012). Essas alterações estruturais comprometem o funcionamento adequado dos rins, levando a uma diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e tornando idosos mais propensos ao desenvolvimento de lesões renais.

1.2 Patogênese da Nefropatia do Envelhecimento

1.2.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Embora os mecanismos que levam ao envelhecimento renal ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a ativação da imunidade inata e o processo inflamatório instaurado são fatores causais importantes (Song *et al.*, 2016). Além disso, a estimulação local do sistema renina-angiotensina pode levar à ativação de parte da imunidade inata e, conseqüentemente, contribuir para a evolução das nefropatias em geral, bem como da nefropatia da senescência, conforme iremos explicar a seguir.

Por muitos anos, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) foi considerado apenas como um componente endócrino do sistema circulatório, mas, com o avanço das pesquisas, descobriu-se o papel fundamental do SRAA na nefrogênese durante a vida embrionária humana e durante a vida adulta, desempenhando um importante papel na regulação hidroeletrolítica. A renina liberada pelas células justaglomerulares cliva o angiotensinogênio, originando a Angiotensina I, que é convertida em Angiotensina II (AngII) graças à enzima conversora de angiotensina (ECA). Na adrenal, a AngII promove a liberação de aldosterona. Assim, o SRAA desempenha um papel central na regulação do tônus vascular, da pressão arterial e da homeostase eletrolítica (Patel *et al.*, 2017).

Embora o SRAA possua um importante papel fisiológico, a ativação intrarrenal desse sistema é responsável por acelerar a progressão de patologias renais. A AngII pode ser produzida a partir do angiotensinogênio circulante ou pelo SRA intrarrenal, aumentando a geração de radicais livres, elevando a pressão capilar glomerular, promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e, finalmente, fibrose glomerular e tubular (Lumbers *et al.*, 2013).

O receptor AT1 (AT-1R) é uma proteína transmembrana da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), presente na musculatura vascular lisa, no endotélio, no coração, cérebro, rim, glândula suprarrenal e tecido adiposo. Em seu papel fisiológico, o AT-1R medeia a maioria das funções atribuídas pela AngII (Forrester *et al.*, 2018). Já em seu papel fisiopatológico, a interação da AngII com o AT-1R promove a ativação do fator nuclear NF- κ B e, conseqüentemente, produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e o fator de crescimento beta (TGF- β). O influxo de células inflamatórias ao parênquima renal eleva ainda mais a produção de Interleucina-1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), e MCP-1, o que resultará novamente na atração e proliferação de células inflamatórias, levando à esclerose glomerular e fibrose tubulointersticial (Lumbers *et al.*, 2013). Após o estabelecimento da reação inflamatória crônica, ocorre o processo de reparação tecidual e fibrose progressiva que levam ao agravamento do dano renal (Lumbers *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2019).

O Losartan (Los) atua como um antagonista competitivo da AngII no AT-1R, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e inibindo a migração de células inflamatórias para o parênquima renal (Ripley and Hirsch, 2010). Em nosso laboratório, demonstramos o efeito nefroprotetor dos bloqueadores do AT-1R em modelos experimentais de nefropatia crônica, como ablação 5/6 (Fujihara *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2013) e nefropatia diabética (Teles *et al.*, 2009), entre outros. Demonstramos também que o uso contínuo de um inibidor da enzima conversora de Angiotensina (IECA), enalapril, em ratos Munich-Wistar dos 3 aos 30 meses de vida promoveu nefroproteção em decorrência da redução das pressões capilares sistêmicas e glomerulares e retardou significativamente o desenvolvimento de albuminúria e o surgimento de lesões estruturais (Anderson *et al.*, 1994). Esses achados conferem aos bloqueadores do AT-1R e aos inibidores da enzima conversora de Angiotensina um importante papel na terapêutica das nefropatias progressivas.

1.2.2 Imunidade Inata

Nos mamíferos, o sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos, representando uma resposta sistêmica fundamental para prevenir

infecções e manter a homeostase orgânica, enquanto concomitantemente ativa e regula a resposta imune adaptativa (Lamkanfi and Dixit, 2014). Os elementos da imunidade inata incluem barreiras físicas externas, mecanismos efetores celulares e mecanismos humorais (Riera Romo *et al.*, 2016). É interessante notar que, durante o envelhecimento a resposta da imunidade adaptativa diminui significativamente (imunossenescência), enquanto a imunidade inata parece ser ativada (Salminen *et al.*, 2008).

Para efetuar sua resposta, o sistema imune inato depende de uma série de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Cada tipo de célula expressa um conjunto específico de PRRs acoplados às membranas. (Pelka and De Nardo, 2018). Essas estruturas compreendem os receptores Toll-like (TLRs), os receptores de lectina do tipo C (CLRs) e várias famílias de sensores citosólicos. Esses PRRs são responsáveis pelo reconhecimento de uma série de ligantes conhecidos como padrões moleculares associados a lesões (do inglês "*Damage-associated molecular patterns*", os DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (do inglês "*Pathogen-associated molecular pattern*", os PAMPs) (Losappio *et al.*, 2020). A resposta imune inata tem por objetivo a eliminação do patógeno, a remoção de restos de tecidos lesados, a prevenção de novos danos, alertando as células vizinhas e ativando a imunidade adaptativa. A ligação de DAMPs ou PAMPs a um receptor PRRS inicia uma cascata de sinalização que leva à ativação e secreção de citocinas e quimiocinas. No entanto, o funcionamento excessivo da imunidade inata pode até levar à morte celular (Mogensen, 2009) e acarretar efeitos deletérios ao organismo (Lim and Staudt, 2013).

1.2.2.1 Via TLR4/NF- κ B/IL-6 – Sinal 1

A família dos receptores transmembrana do tipo TLR está entre os grupos mais bem caracterizados de receptores da imunidade inata (Lim and Staudt, 2013). Estes receptores expressam-se em células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas (Barton and Kagan, 2009).

O TLR4 foi o primeiro receptor Toll-like a ser caracterizado em mamíferos, sendo expresso predominantemente em células do sistema imune e

funcionando como um transdutor de sinal (Medzhitov, 2001). A ligação de DAMPs ou PAMPs ao TLR4 leva à ativação do NF- κ B (Menghini *et al.*, 2014).

O sistema NF- κ B compreende uma família de fatores de transcrição que integram uma complexa rede de vias de sinalização, cuja ativação resulta na transcrição de centenas de genes relacionados à inflamação, imunidade, apoptose, proliferação celular e diferenciação. Nos mamíferos são 15 homo ou heterodímeros que formam os cinco membros da família NF- κ B (Sanz *et al.*, 2010).

Na maioria das células, o complexo NF- κ B é retido no citoplasma por meio de inibidores das proteínas κ B (I κ B), que impedem sua translocação nuclear. A ativação do NF- κ B é induzida por uma série de fatores como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1) e AngII. Ela envolve a fosforilação do I κ B por meio de quinases específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK). Com isso, o dímero p50/p65, principal componente do sistema NF- κ B, pode ser fosforilado e migra ao núcleo, onde se liga a pontos específicos do DNA e induz a transcrição de inúmeros genes-alvo. Essa sequência de eventos amplifica fortemente o estímulo inicial e leva ao recrutamento maciço de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células dendríticas, promovendo assim um robusto processo inflamatório conhecido como Sinal 1 da imunidade inata (Hayden and Ghosh, 2008).

1.2.2.2 Via de sinalização do inflamassoma NLRP3 – Sinal 2

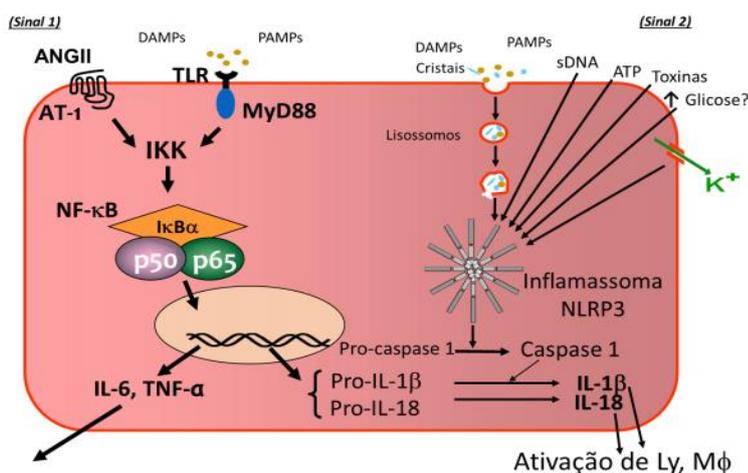
Os inflamassomas são complexos proteicos multiméricos situados no citosol, capazes de ativar potentes citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a IL-18 (Petrilli *et al.*, 2005). Os inflamassomas conhecidos são divididos em três categorias principais: a família NLRP, a família NLRC e os inflamassomas não-NLR (Lamkanfi and Dixit, 2014).

A ativação destes complexos ocorre através de uma forma de PRRs denominada NLRS (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*) (Martinon *et al.*, 2009). Os NLRS são um conjunto de proteínas solúveis responsáveis por detectar eventos indicadores de dano celular, tais como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a ruptura de lisossomas e a perda de potássio pela célula

(Martinon *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2016). Após a ativação dos NLRs, seus componentes sofrem um processo de oligomerização, levando à formação de inflamassomas. No caso do inflamassoma mais conhecido, o NLRP3 (do inglês *NOD*, *LRR*- and *pyrin domain-containing protein 3*), o processo leva à ativação da caspase-1, que, por sua vez, interage com as citocinas inativas pró-IL-1 β e pró-IL-18, clivando-as e originando citocinas maduras que serão liberadas no plasma extracelular, amplificando o estímulo inicial e contribuindo para intensificar a resposta inflamatória (Martinon *et al.*, 2009). A ativação dessa via constitui o chamado Sinal 2 da imunidade inata (Shimada *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que essas duas vias da imunidade inata, sinal 1 (TLR4/ NF- κ B/IL-6) e sinal 2 (NLRP3/Caspase-1/IL-1 β) não atuam de maneira independente. Em diversos pontos essas vias interagem, tornando mais ágil a resposta a ameaças externas, muito antes da ativação da resposta imune adaptativa (Salminen *et al.*, 2008). Essas sequências de eventos que culminam com a ativação da imunidade inata e um intenso processo inflamatório estão representadas esquematicamente na Figura 1:

Figura 1: Vias de sinalização do sistema NF- κ B e do inflamassoma NLRP3.



Sinal 1: A ativação de TLRs por DAMPs ou PAMPs, ou do AT-1R pela AngII, leva à ativação da proteína IKK por meio da fosforilação da enzima inibitória I κ B. Com isso, o dímero fosforilado p50/p65, principal componente do sistema NF- κ B, migra ao núcleo, induzindo a transcrição de genes que codificam moléculas inflamatórias, como IL-6, TNF- α e as precursoras da IL-1 β e da IL-18. **Sinal**

2: Além de DAMPs e PAMPS, espécies reativas de oxigênio (ROS), dano lisossomal e perda de potássio, entre outros, levam à oligomerização do inflamassoma NLRP3 e à ativação da caspase-1, que, por sua vez, converte as citocinas inativas pró-IL-1 β e pró-IL-18 a suas formas ativas, promovendo a ativação de macrófagos e linfócitos e amplificando o processo inflamatório. (Zambom, 2018)

Vários estudos anteriores de nosso laboratório trouxeram evidências do envolvimento da imunidade inata na patogênese da lesão renal observada em modelos experimentais como a ablação renal de 5/6 (Fujihara *et al.*, 2007; Fanelli *et al.*, 2017), a nefrite túbulo-intersticial por sobrecarga de adenina (Okabe *et al.*, 2013), a inibição crônica do óxido nítrico associado à sobrecarga de sal (Zambom *et al.*, 2019) e em um modelo de nefropatia diabética induzida por estreptozotocina (Foresto-Neto *et al.*, 2020). Outros estudos também mostraram esse envolvimento da imunidade inata na patogênese das nefropatias progressivas (Kurts *et al.*, 2013; Leemans *et al.*, 2014).

Nossos estudos também demonstraram que o emprego nesses modelos experimentais de um inibidor do NF- κ B, a pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), preveniu a glomeruloesclerose e atenuou a inflamação/fibrose renal, levantando a possibilidade de que inibidores do sistema NF- κ B possam ser utilizados na terapêutica das nefropatias progressivas.

Em relação à nefropatia da senescência, vários estudos demonstraram a ativação da imunidade inata em modelos experimentais, bem como sua correlação com a migração de células inflamatórias ao parênquima renal e com a fibrose renal (Song *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017). O presente estudo é o primeiro a tentar retardar o desenvolvimento da nefropatia senil por meio de um bloqueio do sistema NF- κ B. Para tanto, administramos PDTC, em associação com Los, a ratos em processo de envelhecimento, avaliando o possível impacto positivo desse esquema terapêutico no surgimento de lesões renais.

2 OBJETIVOS

I. Geral

- a) Investigar o papel da imunidade inata no desenvolvimento das lesões renais provocadas pelo processo de envelhecimento.
- II. Específicos
 - b) Verificar a ativação da via TLR4/ NF- κ B/IL-6 (sinal1) e do inflamassoma NLRP 3 durante o processo de senescência renal.
 - c) Investigar se o bloqueio do sistema SRAA, por meio do Los (bloqueador do AT1R) ou a associação de Los ao bloqueador do sistema NF- κ B, PDTC, atenuam a progressão da nefropatia associada ao envelhecimento.

3 MÉTODOS

3.1 Obtenção do modelo experimental

Utilizamos ratos da linhagem Munich-Wistar, machos e com idade de 12 meses. Os animais foram adquiridos da colônia existente no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos em ambiente com temperatura controlada de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$, em ciclo claro/escuro de 12/12h. Todos os animais integrantes do estudo receberam dieta padrão farelada (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil), com adição de caseína (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil) em uma concentração de 15%. Os experimentos empregados no presente estudo seguiram as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (CAPPesq, protocolo nº1006/2018).

Neste estudo, um grupo de ratos com 12 meses de idade não recebeu nenhuma forma de tratamento e foi utilizado como grupo controle adulto. Um segundo grupo foi acompanhado dos 12 aos 15 meses de vida, sem receber qualquer protocolo terapêutico; esse grupo foi utilizado como grupo controle idoso. Um terceiro grupo, acompanhado dos 12 aos 15 meses, recebeu na água do bebedouro Los, na dose de 50 mg/kg/dia. Um quarto grupo, também observado dos 12 aos 15 meses, recebeu diluído na água do bebedouro Los, 50mg/kg/dia e ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC, Sigma-Aldrich, USA) na dose de 15 mg/dia (aproximadamente 60 mg/kg/dia).

3.2 Grupos Experimentais

- **12M:** 10 ratos estudados aos 12 meses de vida, sem receber nenhuma forma de tratamento.
- **15M:** 10 animais acompanhados dos 12 aos 15 meses de vida, sem tratamento.
- **15M_{Los}:** 10 ratos tratados com LOS, 50 mg/kg/dia, dos 12 aos 15 meses de vida.
- **15M_{Los+PDTC}:** 10 ratos tratados com LOS, 50 mg/kg/dia, e PDTC, 60mg/kg/dia, dos 12 aos 15 meses de vida.

Esquemáticamente:

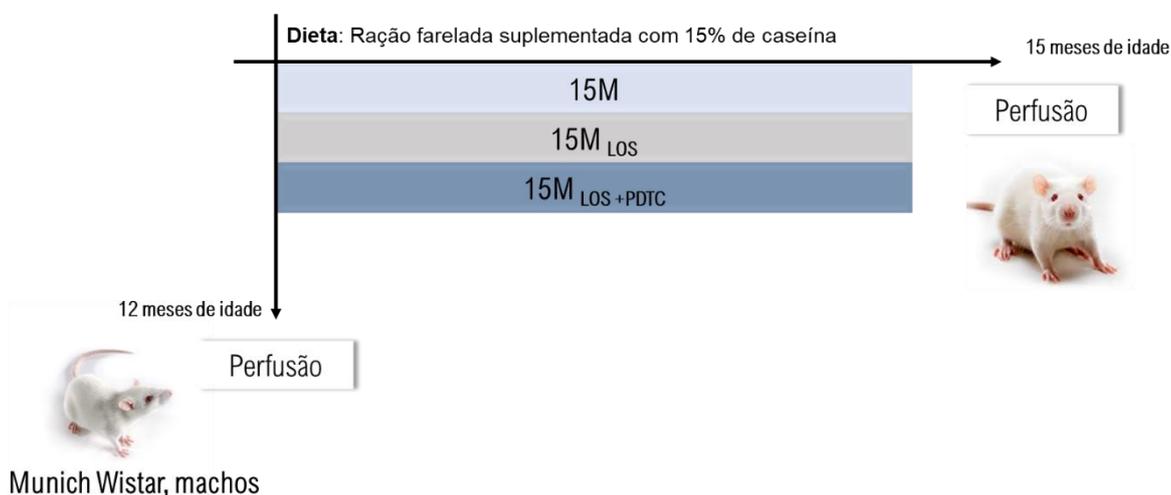


Figura 2. Esquema gráfico representativo do protocolo experimental empregado no presente estudo.

3.3 Procedimentos Gerais

Nos grupos acompanhados dos 12 aos 15 meses de idade, a cada 30 dias foram mensurados o peso corporal, a pressão sistólica caudal (PC) além da determinação da albuminúria de 24 horas (U_{ALB}). A PC foi mensurada depois de breve aquecimento dos animais, empregando o método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos). Para a determinação da U_{ALB} os ratos foram acondicionados em gaiolas metabólicas durante de 24 horas. Após os 90 dias de acompanhamento, os animais foram

submetidos a anestesia com 50 mg/kg de cloridrato de dextrocetamina (Cristália, EUA) e 10mg/kg de cloridrato de xilazina (Bayer, Alemanha) administrados por via intramuscular, e foi realizada a coleta de amostras de sangue e órgãos. As amostras de sanguíneas foram coletadas por meio de punção da aorta abdominal. Em seguida, ambos os rins foram perfundidos com solução salina 0,9% refrigerada. O rim direito foi retirado e acondicionado à -80°C para análises posteriores por Western-Blot e ELISA. O rim remanescente (esquerdo) foi perfundido com solução Du Boscq-Brasil, e preparado para análises histomorfométrica e de imuno-histoquímica.

3.4 Análises bioquímicas

Creatinina sérica - foi quantificada colorimetricamente empregando um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil).

Sódio e Potássio plasmáticos - foram quantificados por meio do analisador seletivo de íons AVL 9140 (AVL Medical Instruments, Suíça).

Albuminúria (U_{ALB})- mensurada utilizando a técnica de imunodifusão radial, por meio de um anticorpo anti-albumina de rato (MPBiomedicals LLC, EUA). (Mancini *et al.*, 1965)

3.5 Análises Histológicas

O rim esquerdo, com solução Du Boscq-Brasil, perfundido em foi pesado, e fatiados em 2 a 3 frações coronais e pós-fixados em solução composta por fosfato e formaldeído a 10%. Para os procedimentos de desidratação, diafanização e impregnação em parafina, utilizou-se um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, 16 Alemanha). Os tecidos parafinizados foram seccionados em cortes na espessura de 4 μ m e montados em lâminas silanizadas para melhor aderência dos tecidos. Nesse processo de silanização, as lâminas passam por três banhos consecutivos de álcool 96° com duração de 1 minuto, acetona durante 1 minuto e silano 6% durante aproximadamente 5 minutos. Em

seguida as lâminas são colocadas novamente em 2 banhos de acetona, seguidos de 2 banhos de água destilada, e permanecem secando em estufa a 60°C por 24 horas.

Coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS)

A reação de PAS foi realizada para avaliar o grau de glomeruloesclerose, o percentual de glomérulos com lesões esclerosantes (GS) sob aumento de 400x. (Teles *et al.*, 2009).

3.6 Estudo Imuno-histoquímico do tecido renal

Diferentes métodos imuno-histoquímicos foram empregados no presente estudo para investigação de biomarcadores pró-inflamatórios, inflamatórios e fibróticos presentes durante a ativação dos sinais 1 e 2 das vias da imunidade inata.

Antes de darmos início às colorações de imuno-histoquímica propriamente ditas, realizamos o processo de desparafinização e recuperação antigênica das lâminas. O processo de desparafinização convencional é realizado em capela de exaustão; as lâminas são mantidas em estufa a 60°C durante 30 minutos, após o que são realizados 3 banhos em xilol PA com duração de 9 minutos cada. Em seguida, as lâminas são mantidas em 4 banhos consecutivos com concentração decrescente de álcool e duração variável entre 3 e 5 minutos, até o último banho em água destilada.

Após os cortes são aquecidos em tampão de citrato com pH 6,0 por aproximadamente 30 minutos e resfriadas em água corrente para recuperação antigênica.

Após marcação por imunohistoquímica com os respectivos anticorpos específicos (primários), o tecido renal foi contracorado com hematoxilina de Harris 100% (Hemalaum-Merck) por 1 minuto e em seguida montado entre lâmina e lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glicergel). As lâminas utilizadas para identificação do colágeno tipo 1 e α -SMA não foram contracoradas.

Infiltração de Macrófagos (Mφ)

Para a identificação de células positivas para macrófagos com antígeno ED-1 utilizamos o método de Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina (APAAP). Primeiramente foi realizada a desparafinização e exposição dos epitopes através do aquecimento das secções em citrato, em seguida foi realizado o bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA)(Avila, 2018). Em seguida, os cortes foram incubados com soro não imune desenvolvido em cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de BSA 1% em TBS por 30 minutos. Após as secções receberam o anticorpo primário anti-ED-1 (MCA341R, Serotec, Oxford, UK) na diluição 1:200, e permanecerem refrigerados à temperatura entre 2 e 8°C, durante aproximadamente 18 horas. Descartado o excesso de anticorpo primário presente nos cortes, seguiu-se um banho em TBS, após os tecidos foram incubados com anticorpo secundário anti-Camundongo biotilado (#BA2001, Burlingame, EUA) na diluição 1:200 em solução de BSA 1%, por 45 minutos e após com o Complexo de fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (Vector Lab, Burlingame, EUA) por 30 minutos. Ao final desse procedimento, os tecidos foram lavados com TBS e revelados com substrato cromogênico Fast Red, com temp variavel (Arias *et al.*, 2016). A quantificação de células positivas foi realizada tanto nos glomérulos como no interstício do córtex renal. Foram examinados 25 glomérulos. Após a obtenção do número bruto de células positivas, foi calculada a média de macrófagos por glomérulo. A quantificação de macrófagos ED-1 no interstício do córtex renal foi realizada com aumento de 400X pela avaliação de 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm² e os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (céls/mm²). (Zambom, 2018)

Infiltração de Macrófagos com fenótipo M2 (receptor de manose - CD206+)

Para a determinação dos macrófagos positivos para CD206, utilizamos o método APAAP. Após desparafinização e recuperação antigênica as lâminas foram acomodadas em câmaras úmidas, e os cortes receberam 80 µL de soro não imune desenvolvido em cavalo (#S-2000 Normal Horse Serum, Vector Lab Burlingame, EUA) na concentração de 1:50. Após o tecido renal foi incubado com anticorpo primário

anti-CD206 (#ab64693, Abcam, Cambridge, UK) na diluição de 1:10.000 em BSA 1% durante aproximadamente 18 horas à temperatura de 4°C. Passado o processo de incubação com anticorpo primário os tecidos foram lavados em TBS e logo após receberam 80 µl de solução Envision Link Rabbit/Mouse (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos. Após, foi realizada nova incubação com 80 µl de solução Enzima AP (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Por fim, os cortes receberam substrato cromogênico Permanent Red (Dako, Carpinteria, CA, EUA) em uma diluição de 1: 100. A identificação e quantificação das células positivas com fenótipo M2 foi realizada pela contagem no córtex renal de 25 campos microscópicos (equivalente a uma área de 1,6 mm²) sob aumento de 400x. Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/m²).

Identificação de Colágeno 1 (Col-1)

Após a desparafinização e exposição de epítomos, iniciamos o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução composta por peróxido de hidrogênio e metanol. Após lavagem com tampão TBS e acondicionamento em câmara úmida, os tecidos receberam soro não imune desenvolvido em cavalo (#S-2000 Normal Horse Serum, Vector Lab Burlingame, EUA) na diluição de 1:50 em solução de BSA 1%. Em seguida as secções foram incubadas com anticorpo primário anti-colágeno tipo I (#34710 polyclonal rabbit anti-collagen type I, Abcam, Cambridge, UK), na diluição de 1:200 em solução de BSA a 1% em TBS, à temperatura de 4°C, por 18 horas, após o qual os cortes foram lavados em TBS, incubados com 80 µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) durante 30 minutos e em seguida com o substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) em proporção de 1:20 (Zambom, 2022). A fração do córtex renal ocupada por Col-1 foi quantificada por um método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos (Jepsen and Mortensen, 1979).

Identificação de células positivas para AngII e α -SMA

As células positivas para AngII foram identificadas com a técnica da Estreptavidina-Biotina; para a marcação de α -SMA utilizamos a técnica da Fosfatase Alcalina. Para ambas as técnicas, realizamos inicialmente a desparafinização, exposição dos epítomos e o bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Em seguida os cortes receberam 80 μ L de solução de soro não imune desenvolvido em cavalo (#S-2000 Normal Horse Serum, Vector Lab Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de leite 5% para AngII e 2% para α -SMA. A seguir, os cortes permaneceram incubados *overnight* com seus respectivos anticorpos primários, anti-AngII (#T4007; Peninsula Laboratories, San Carlos, CA) e anti α -SMA (#A2547, Sigma, St. Louis, MO). Os cortes receberam então seus respectivos anticorpos secundários, antioelho biotilado (#BA-1000, Biotinylated goat anti-rabbit, Vector Laboratories) e anticorpo conjugado biotina anticamundongo (#BA-2001 Biotinylated horse anti-rabbit, Vector Laboratories), diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:1000 e 1:200, respectivamente. Após, os cortes para AngII foram incubados com o Complexo Estreptavidina Fosfatase Alcalina (#AK5000 Vector Vectastain ABC-AP, Vector Lab, Burlingame, EUA) e os cortes para α -Actina com Dako Estreptavidina – AP (Dako Carpinteria, CA, EUA). Por fim, todos os cortes foram tratados com substrato cromogênico Fast Red para revelação, com tempo variável. A quantificação das células positivas para AngII foi realizada por meio da contagem das marcações positivas presentes em 50 campos (área de 3,2 mm²) por lâmina, sob aumento de 400x. Os resultados foram apresentados como céls/mm²). A fração do córtex renal ocupada por α -Actina foi quantificada pelo método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos (Jepsen and Mortensen, 1979).

3.7 Análise do conteúdo proteico do tecido renal

Extração e quantificação de proteínas teciduais

De cada animal foram coletadas amostras de tecido renal pesando entre 100 e 200 mg, que foram acondicionadas em tubos de propileno reforçado, contendo microesferas de cerâmica (OMNI International Inc. 19-628), juntamente com tampão

RIPA (#89900, Thermo Scientific, Rockford, IL) além de inibidores de proteases e fosfatases (Roche, Mannheim, Germany), para serem processadas no aparelho Homogeneizador por esferas Bead Ruptor 24 Elite (Omni International, Kennesaw, Georgia, EUA). Mensuramos o conteúdo proteico utilizando o kit comercial (Pierce BCA ProteinAssay Kit, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante.

Conteúdo renal de Interleucina 1 β

A quantificação de IL-1 β no tecido renal foi realizada através do método Elisa Sanduíche, utilizando kit comercial (R&D Systems, Minnessota, EUA). O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas seguiram as recomendações do fabricante.

3.8 Análise por Western Blot

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

Para a detecção do conteúdo proteico de TLR4 por Western Blot no tecido renal total, foram utilizadas amostras de 100 μ g de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIORAD). A corrida eletroforética das amostras ocorreu a 120 Volts em gel de poliacrilamida a 10% e se completou em 1 hora e 30 minutos.(Avila, 2018) Após isso o gel foi transferido (transferência úmida) para uma membrana de nitrocelulose durante 2 horas a 400mA. A confirmação da transferência foi realizada por meio da coloração da membrana com Solução de Ponceau (Sigma Aldrich, USA). Posteriormente, a membrana foi lavada com solução de TBSt (TBS [NaCl Glicina Tris-Base ,10x], água destilada, Tween 20, pH 7.4), e foi realizado o bloqueio de marcação inespecífica com BSA a 5% (albumina sérica bovina) diluída em tampão TBS por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação.(Zambom, 2022) Após o bloqueio, a membrana foi incubada a 4°C com o anticorpo primário anti-TLR4 (Santa Cruz) diluído em BSA 1% na proporção de 1:250, durante 18 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com solução TBSt e incubada a 4°C com anticorpo secundário (Anti-rabbit-HRP, Sigma-Aldrich), na proporção de

1:5000, durante 2 horas, sob agitação, seguindo-se nova lavagem em TBSt e revelação por quimioluminescência, utilizando kit comercial (Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA) (Zambom, 2022).

Para determinação por Western blot do conteúdo renal de Caspase-1, NLRP3, IL-6 e HO-1, o bloqueio das marcações inespecífica foi realizado com leite desnatado a 5% em TBSt durante 2 horas. Após, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários, anti-Caspase1 (1:1000, #Sc56036, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), Anti-NLRP3 (1:200, #HPA12878, Sigma, USA) e anti-IL-6 (1:1000 #Ab9324, Abcam, Cambridge, UK) e anti-HO-1 (1:500 #Ab13248, Abcam, Cambridge, UK) por 18 horas à temperatura de 4°C. Após esse período, as membranas foram tratadas conforme descrito anteriormente.

Conteúdo proteico de superóxido dismutase 2 (SOD2)

Foram utilizadas 13 µg de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIORAD). A corrida eletroforética ocorreu conforme descrito acima; os géis foram transferidos (transferência semiúmida) para membranas de nitrocelulose, durante 45 minutos a 20V e a confirmação se deu pela coloração das membranas com Solução de Ponceau, seguida de lavagem em solução de TBSt. O bloqueio das marcações inespecíficas foi feito da maneira descrita no parágrafo anterior. A seguir, as membranas receberam anticorpo primário policlonal desenvolvido em coelho anti-Superoxide dismutase 2 (1:10000, #10011389, Cayman, 202 Michigan, USA) durante 18 horas, à temperatura de 4°C. Após isso, as membranas foram novamente lavadas em TBSt e incubadas com seu anticorpo secundário Anti-coelho HRP (1:5000 Sigma-Aldrich, USA) por 2 horas, a 4°C, e mais uma vez lavadas em TBSt.

Fração nuclear p65 do NF-κB (Western Blot)

Para a detecção do conteúdo nuclear de p65 foi realizada primeiramente a separação das frações nucleares e citoplasmáticas das células do córtex renal. Nesse

procedimento foram utilizados 100 mg de tecido renal homogeneizados em 1000 μ L de solução de lise A (HEPES [10X], KCl [10X], MgCl₂ [10X], Sacarose [5X], glicerol PA, NP-40 PA e inibidores de protease e fosfatase) (Roche, Suíça). O homogenato foi centrifugado a 1000G e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo pré-refrigerado (fração citoplasmática). O pellet (fração nuclear) foi suspenso em 1000 μ L do tampão A e centrifugado por 10 minutos a 4°C e 1000G. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi novamente suspenso em 200 μ L no tampão B (Sacarose, SDS, Tris-HCl [10X], Bromo-phenol-blue e beta mercaptoetanol PA). A solução foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C e 1500G(Neto, 2019). O sobrenadante foi transferido para um tubo pré-refrigerado (fração nuclear) e armazenado a -80%

A corrida eletroforética ocorreu em gel de poliacrilamida 10% durante 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. A transferência semiúmida, bem como sua conferência, ocorreu de maneira semelhante à descrita acima. As marcações inespecíficas foram bloqueadas com solução de leite a 3% + BSA a 3% em TBSt durante 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-p65 fosforilado ((#3033S, Cell Signaling Danvers, USA) diluído em BSA a 1% em TBS na proporção 1:100, durante 18 horas, a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBSt e incubadas com o anticorpo secundário (Anticoelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich, USA), por 2 horas, a 4°C, sob agitação. Finalmente, as membranas foram novamente lavadas com TBSt.

Identificação e quantificação das bandas

A revelação das membranas foi realizada por quimioluminescência, utilizando kit comercial (Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific®, Massachusetts, EUA), e as imagens foram registradas com aparelho fotodocumentador (UVITEC Cambridge®) (Zambom, 2018). A identificação, análise e quantificação das bandas foram realizadas através do software Uvisoft-UvibandMax (UVITEC Cambridge®, UK) (Avila, 2018).A proteína constitutiva β -actina (anti- β -actina, Sigma-Aldrich, 1:5000 em BSA 1%) foi utilizada para a normalização dos resultados das proteínas alvo TLR4, NLRP3, Caspase-1, IL-6, HO-1 e SOD2. Para a normalização dos resultados da proteína alvo p65 fosforilada, foi utilizada a proteína

constitutiva nuclear histona H2B (anti-histona H2B, Abcam®, 1:1000 em BSA 1%).(Zambom, 2022)

3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos no presente estudo foram submetidos à análise de variância de um fator(ANOVA) seguido de comparações pareadas d entre grupos pelo método de Newman-Keuls (Wallenstein *et al.*, 1980), utilizando o *software* GraphPadPrism®, versão 4.0. Foram considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0,05. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros gerais

A seguir serão apresentados os resultados obtidos ao final dos 90 dias de acompanhamento. Os valores de peso, PC e U_{ALB} foram apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 3-5.

Tabela 1. Parâmetros gerais

	12M	15M	15M_{Los}	15M_{Los+PDTC}
	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
Peso (g)	383±4	386±14	372±13	360±10
PC (mmHg)	149±6	137±4 ^a	126±3 ^a	129±3 ^a
U _{ALB} (mg/24h)	29±5	80±19 ^a	74±23	22±8 ^b

Resultados apresentados como média±EP. ^ap<0,05 vs. 12M, ^bp<0,05 vs. 15M, ^cp<0,05 vs. 15M_{Los}.

Peso Corpóreo

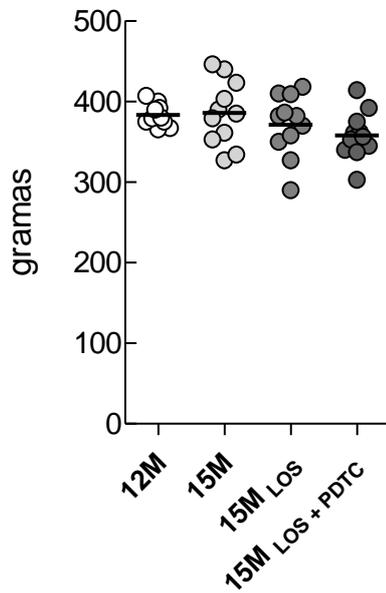


Figura 3. Peso Corpóreo (gramas) dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS} e 15M_{LOS+PDTc}. Resultados apresentados como Média±EP.

Ao final do período de acompanhamento, observamos que os grupos de estudo mantiveram uma média de peso corporal semelhante, sugerindo que o processo de envelhecimento ou os tratamentos propostos não resultaram em diminuição da ingesta alimentar nem em alterações metabólicas capazes de causar retardo do crescimento ou comprometimento do estado geral dos animais.

Pressão Caudal (PC)

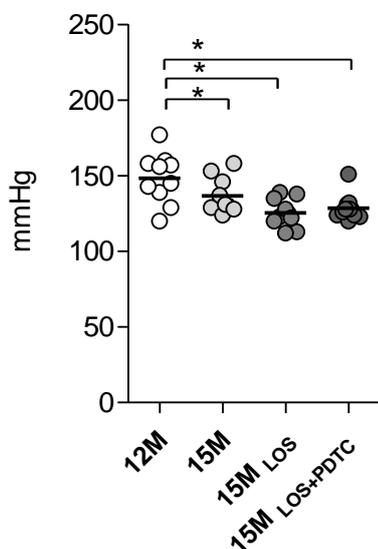


Figura 4. PC (mmHg) dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS} e 15M_{LOS+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP

Durante o período de acompanhamento, verificou-se uma diminuição significativa nos valores de PC dos grupos com 15 meses com ou sem tratamento, em relação ao grupo controle de 12 meses ($p < 0,05$ vs. 12M). Embora os integrantes dos grupos 15M_{LOS} e 15M_{LOS+PDTC} tenham apresentado pressões mais baixas em relação ao grupo controle envelhecido (15M), não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$ vs. 15M).

Albuminúria

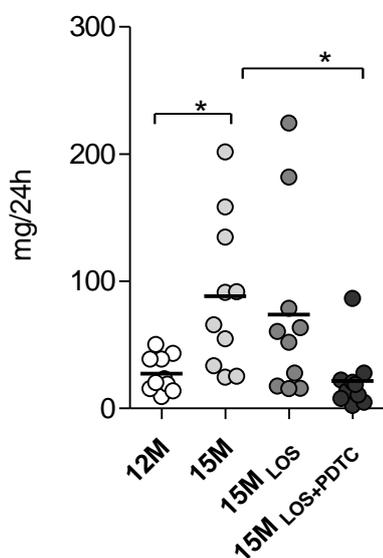


Figura 5. U_{ALB} (mg/24h) dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS} e 15M_{LOS+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP.

Houve um aumento significativo na excreção urinária de albumina do grupo 15M em comparação com o grupo 12M ($p > 0,05$). A terapêutica com Los não reduziu esse parâmetro ($p > 0,05$ vs 15M), mas a associação Los+PDTC atenuou significativamente a albuminúria ($p < 0,05$ vs. 15M), restabelecendo valores médios de U_{ALB} semelhantes aos encontrados no grupo controle 12M ($p > 0,05$).

A Tabela 2 e a Figura 6 descrevem os parâmetros bioquímicos obtidos.

Tabela 2. Resultados da análise bioquímica dos grupos estudados

	12M (n=10)	15M (n=10)	15M _{LOS} (n=10)	15M _{LOS+PDTC} (n=10)
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,5±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1
Na ⁺ (mEq/L)	41±2	141±1	142±1	141±1
K ⁺ (mEq/L)	4,5±0,2	4,6±0,2	4,4±0,3	4,5±0,3

Resultados apresentados como Média±EP. ap<0,05 vs. 12M, bp<0,05 vs. 15M, cp<0,05 vs. 15M_{Los}.

As concentrações séricas de Na⁺ e K⁺ não variaram significativamente entre os grupos avaliados, indicando que o início do processo de envelhecimento renal não está associado a retenção de potássio por perda de massa renal ou alterações tubulares graves.

Creatinina Sérica

Os níveis séricos de creatinina dos grupos 15M, 15M_{LOS} e 15M_{LOS+PDTC} foram semelhantes aos do grupo 12M ($p>0,05$), indicando que, no período estudado, o processo de envelhecimento não chegou a comprometer seriamente a função renal.

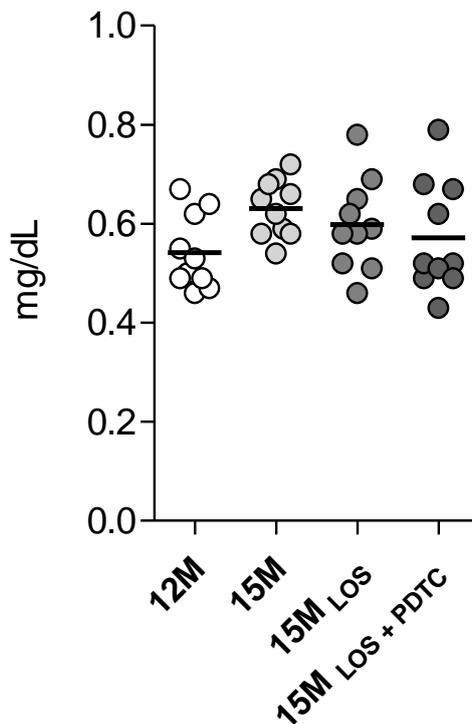


Figura 6. Creatinina Sérica (mg/dL) dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS+PDTC}.

4.2 Estudo histomorfométrica do tecido renal

Na tabela 3 e Figura 7 estão representados os resultados dos estudos de histomorfometria desenvolvidos no presente trabalho.

Esclerose Glomerular

Corroborando os dados encontrados na literatura e em estudos anteriores do grupo, observamos uma porcentagem significativamente elevada de glomeruloesclerose no grupo controle idoso (15M) em relação ao grupo controle 12M ($p < 0,05$). Observamos ainda que a adição de PDTC ao protocolo terapêutico promoveu um significativo efeito nefroprotetor por reduzir a porcentagem de glomeruloesclerose em comparação ao grupo 15M ($p < 0,05$ vs. 15M).

Tabela 3. Percentual de glomeruloesclerose dos grupos 12M, 15M, 15M_{Los}, 15M_{Los}+PDTC.

	12M	15M	15M _{Los}	15M _{Los} +PDTC
	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
% GS	2,3±0,7	8,6±1,0 ^a	5,6±1,7	2,4±0,7 ^b

Resultados apresentados como média±EP. ^a $p < 0,05$ vs. 12M, ^b $p < 0,05$ vs. 15M, ^c $p < 0,05$ vs. 15M_{Los}.

A Figura 7. mostra microfotografias representativas de glomérulos nos quatro grupos estudados. A quantificação das lesões glomerulares é apresentada na Figura 8

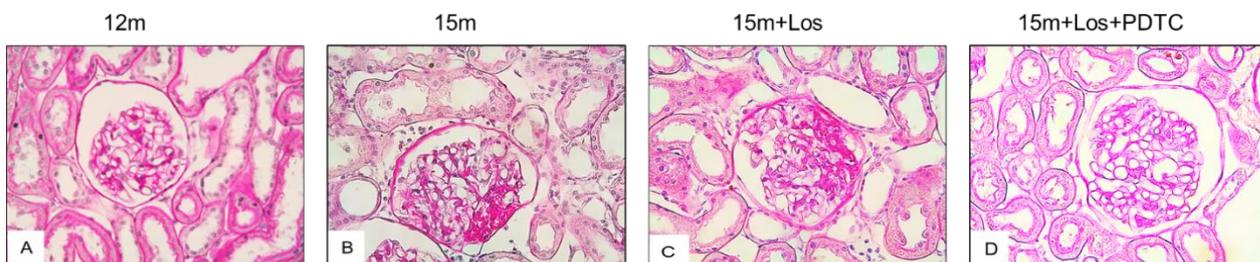


Figura 7. Microfotografias representativas de glomérulos nos grupos estudados

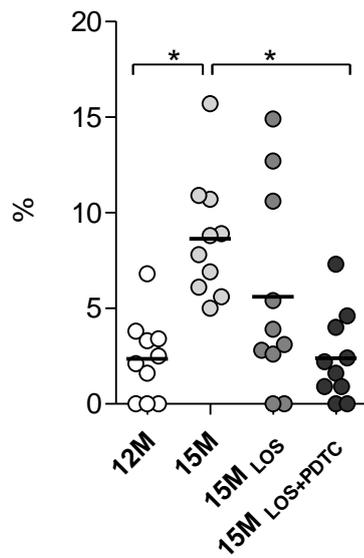


Figura 8. Porcentagem de glomérulos com lesões esclerosantes (GS) nos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP.

4.3 Estudo imuno-histoquímico do Tecido Renal: Inflamação

Na tabela 4 e nas Figuras 9-16 estão representados os resultados obtidos das análises imuno-histoquímicas empregados para caracterizar a inflamação renal.

Tabela 4. Quantificação, nos glomérulos e no interstício renal, de células positivas, para ED-1 (Mφ do Tipo 1), CD206 (Mφ do Tipo 2), AngII Col-1 e α-SMA dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS}+PDTC

	12M	15M	15M _{LOS}	15M _{LOS} +PDTC
	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)
AngII INT (céls/mm ²)	2,9±0,3	6,6±0,6 ^a	4,9±0,6 ^a	3,4±0,4 ^{b,c}
Mφ ED-1 _{GLO} (céls/glo)	1,3±0,2	4,2±0,7 ^a	3,5±0,6 ^{a,b}	2,3±0,4 ^b
Mφ ED-1 _{INT} (céls/mm ²)	21,9±2,0	65,3±6,8 ^a	42,4±3,4 ^{a,b}	23,5±4,9 ^{b,c}
% Mφ CD206/ Mφ ED-1 _{GLO}	41,0±6,6	10,1±1,0 ^a	19,9±5,7 ^a	39,2±6,3 ^b
% Mφ CD206/ Mφ ED-1 _{INT}	38,4±5,8	5,8±1,3 ^a	20,0±3,5 ^{a,b}	29,7±6,4 ^{b,c}
Col – 1 _{INT} (%)	4,3±0,3	9,0±0,5 ^a	6,0±0,3 ^{a,b}	4,8±0,3 ^{b,c}
A-SMA (%)	1,0±0,1	3,5±0,3 ^a	2,6±0,2 ^{a,b}	1,7±0,2 ^{a,b,c}

Resultados apresentados como Média±EP (ap<0,05 vs. 12M, bp<0,05 vs. 15M, cp<0,05 vs. 15M_{LOS}).

Expressão renal de AngII intersticial

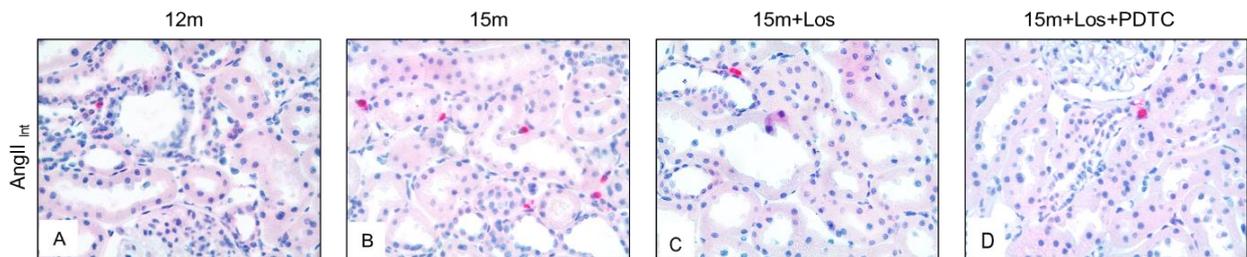


Figura 9. Microfotografias representativas da infiltração de células AngII+. Aumento de 400X.

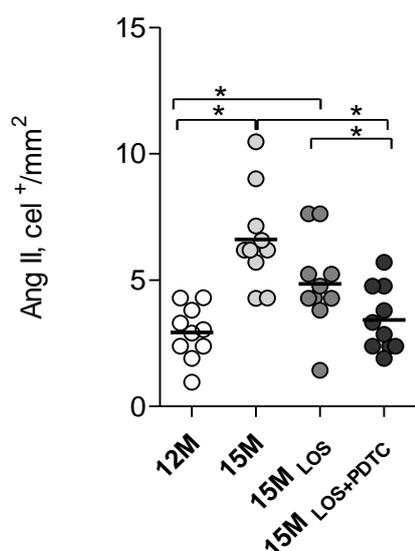


Figura 10. Infiltrado de células AngII + dos grupos 12M, 15M, 15M_{Los}, 15M_{Los+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP.

Em nosso estudo constatamos um evidente aumento no número de células intersticiais positivas para AngII do grupo 15M em relação ao grupo 12M. ($p < 0,05$). O tratamento com Los atenuou de maneira significativa o infiltrado intersticial de células AngII + em comparação com o grupo 15M ($p < 0,05$ vs 15M), mas a infiltração seguiu aumentada em comparação com o grupo 12MK ($p < 0,05$ vs 12M). O protocolo terapêutico de Los associado ao bloqueador do sistema NF- κ B, PDTC, promoveu uma significativa redução na expressão de células positivas para AngII, em comparação com o grupo 15M ($p < 0,05$) e o grupo 15M_{Los} ($p < 0,05$ vs 15M_{Los}).

Infiltração de Macrófagos (ED-1) no Córtex Renal

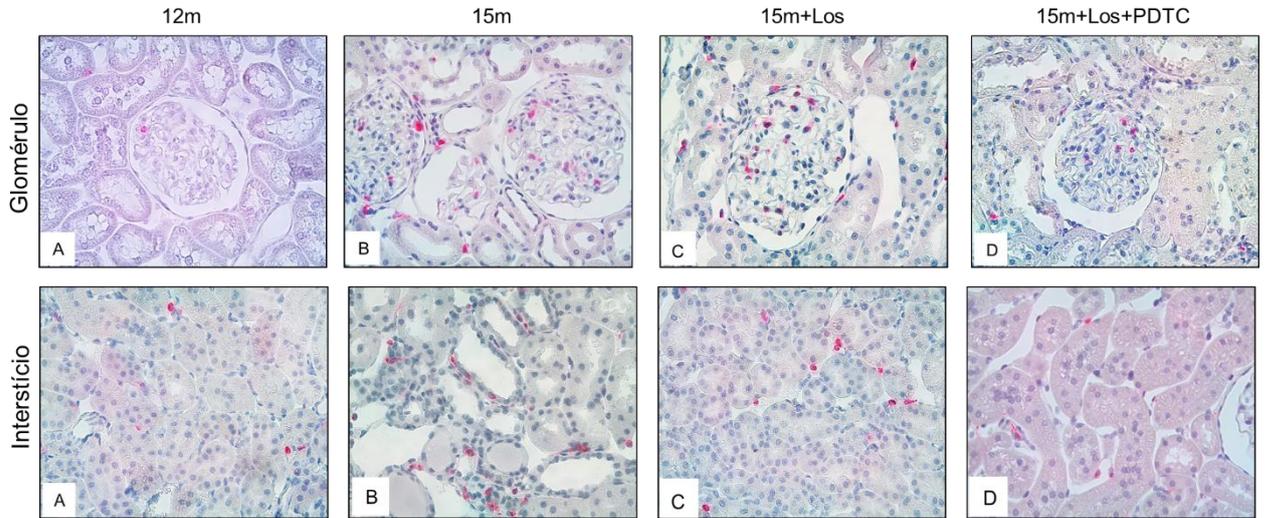


Figura 11. Microfotografias representativas da infiltração renal por macrófagos. Aumento de 400X.

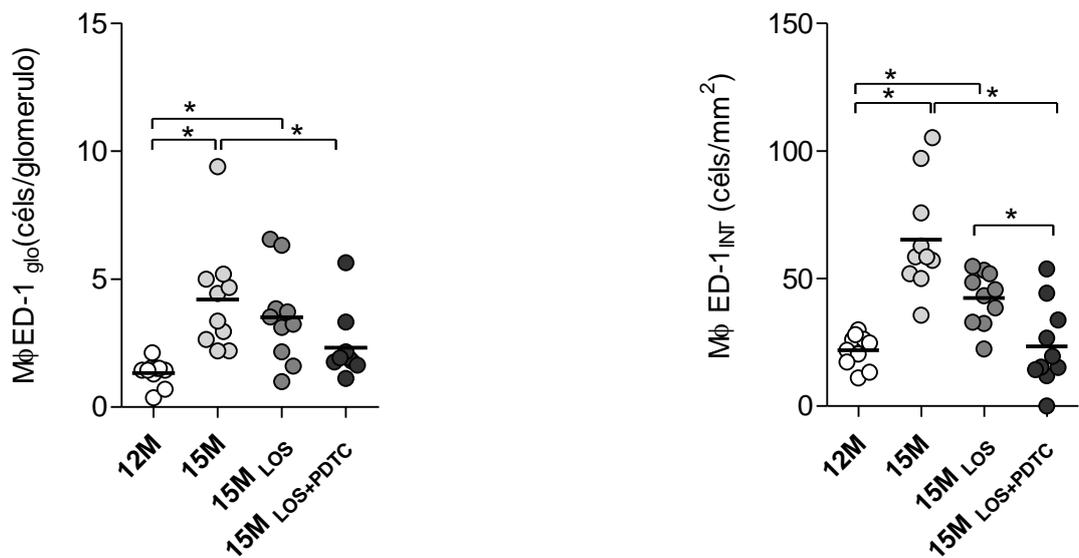


Figura 12. Quantificação do infiltrado de macrófagos (Mφ ED-1+) nos compartimentos glomerular e intersticial dos grupos 12M, 15M, 15MLOS, 15MLOS+PDTC. Resultados apresentados como Média±EP

Os resultados do presente estudo demonstram um significativo aumento no infiltrado de macrófagos tanto no compartimento glomerular como no intersticial do grupo controle idoso (15M) em comparação ao grupo adulto controle (12M) ($p < 0,05$)

vs.12M). A monoterapia com Los associou-se a uma redução numérica do número de $M\phi$ em relação ao Grupo 15M, enquanto o tratamento com PDTC associado ao Los trouxe uma significativa redução do infiltrado macrófágico intersticial em comparação com os grupos 15M, 15M_{Los}, ($p < 0,05$) retomando índices semelhantes aos encontrados no grupo controle 12M ($p > 0,05$, vs 12M).

Infiltração de Macrófagos (CD206) no Córtex Rena

Em contraste com os resultados obtidos com os macrófagos marcados apenas para ED-1, o presente estudo mostrou uma redução acentuada da presença de macrófagos com fenótipo M2 (positivos para CD-206) no grupo 15M ($p < 0,05$ vs 12M). Ambos os tratamentos proporcionaram um aumento significativo da intensidade da infiltração por macrófagos com perfil M2 ($p < 0,05$ vs 15M), mas a associação LOS+PDTC mostrou-se superior à monoterapia com Los, especialmente quando considerado o compartimento intersticial ($p < 0,05$ vs 15M_{Los}).

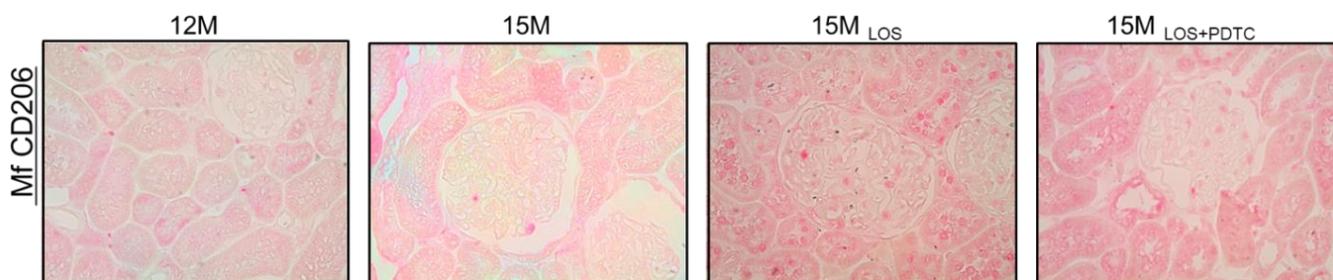


Figura 13. Microfotografias representativas da infiltração de macrófagos com fenótipo M2. 400X

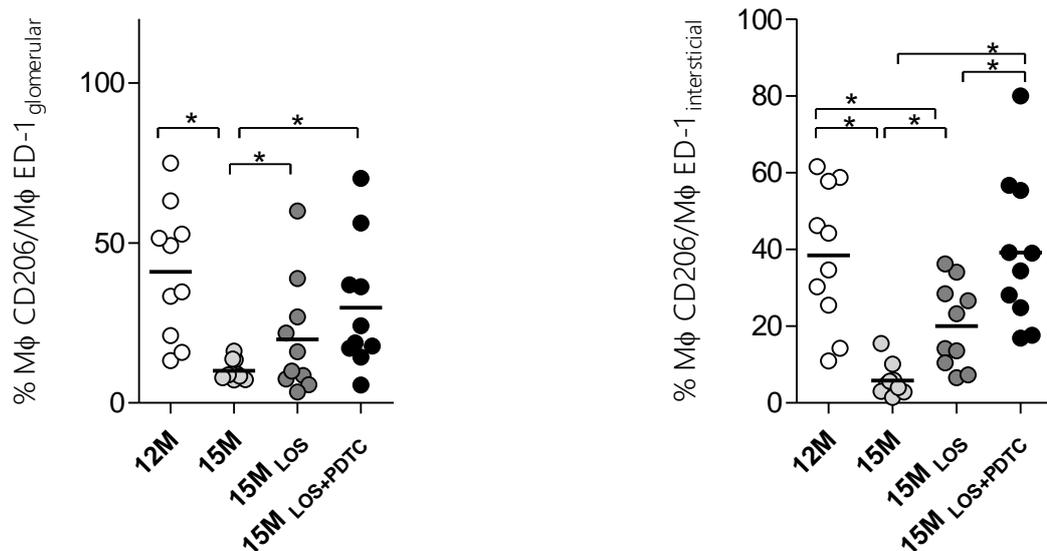


Figura 14. Porcentual dos Mφ CD206 em relação ao total de Mφ ED-1 nos compartimentos glomerular e intersticial dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS+PDTc}. Resultados apresentados como Média±EP.

Deposição de Col -1 e α-SMA no córtex renal

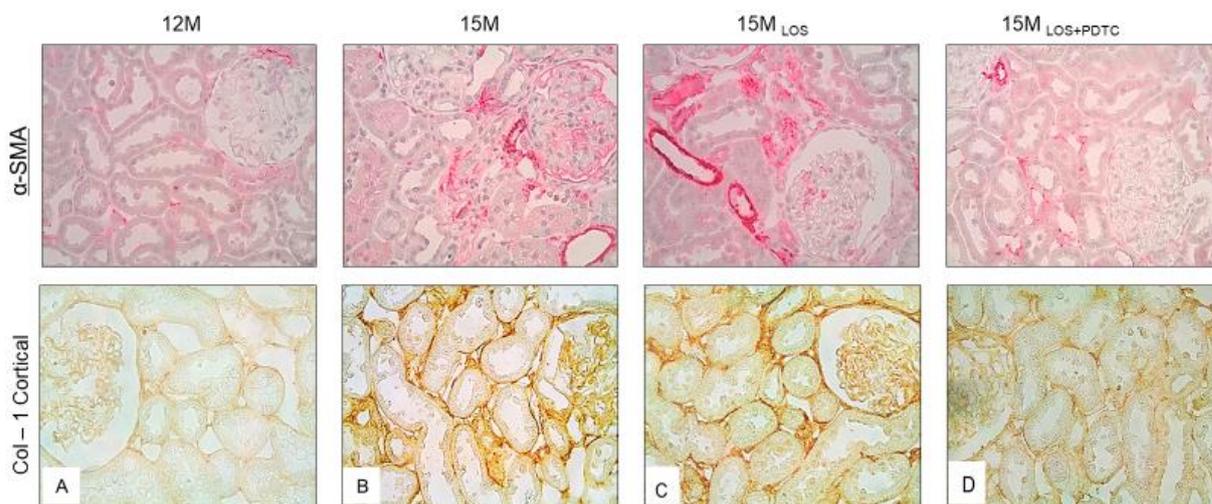


Figura 15 Microfotografias representativas da deposição cortical de α-SMA e Col-1 dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS+PDTc}.15

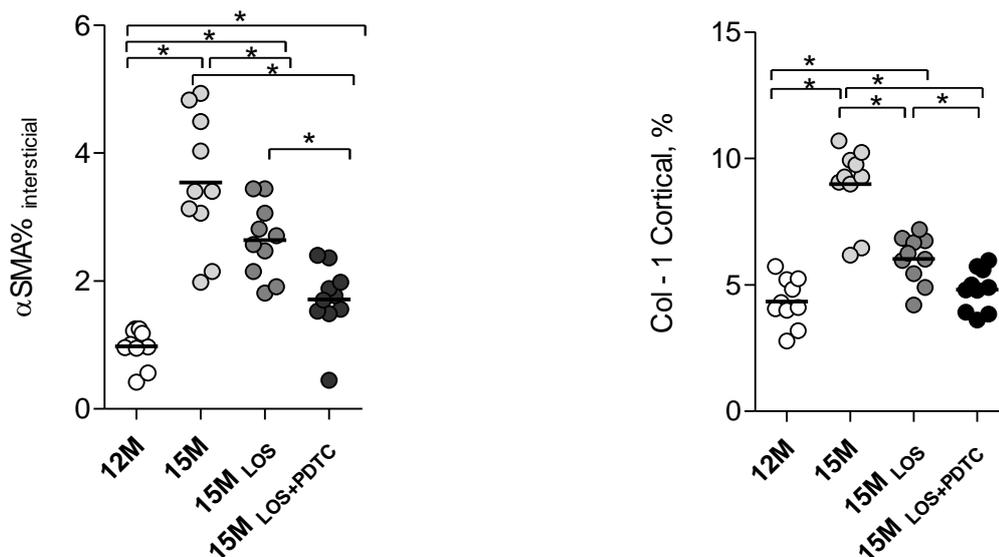


Figura 16. Deposição cortical de α -SMA e Col-1 dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS+PDTC}. Resultados apresentados como Média \pm EP.

Os animais do grupo 15M apresentaram maior deposição de Col-1, principal marcador de fibrose intersticial, em comparação com o grupo 12M ($p < 0,05$). Comportamento semelhante foi observado com relação à α -SMA, marcadora da presença de miofibroblastos no interstício cortical. Ambos os tratamentos reduziram a infiltração intersticial por células α -SMA+ e a deposição intersticial de Col-1 em relação ao grupo 15M ($p < 0,05$).

4.4 Expressão proteica dos componentes da imunidade inata

Buscando compreender os mecanismos de inflamação no envelhecimento renal, avaliamos os componentes das principais vias de sinalização (Sinal 1 e Sinal 2) da imunidade inata. A tabela 5 e as Figuras 16 e 17 mostram os resultados das análises desses componentes por meio das técnicas de Western Blot e ELISA.

Tabela 5. Expressão proteica dos componentes da Imunidade Inata.

	12M (n=10)	15M (n=10)	15M_{Los} (n=10)	15M_{Los+PDTC} (n=10)
TLR4 (fold increase)	1,0±0,1	1,5±0,3	0,9±0,1	0,6±0,1 ^b
NF- κB Nuclear (fold increase)	1,0±0,1	4,0±1,4 ^a	2,6±0,5 ^a	1,3±0,2 ^{b, c}
IL- 6 (fold increase)	1,0±0,1	1,8±0,3 ^a	1,7±0,3 ^a	0,9±0,1 ^{b, c}
NLRP3 (fold increase)	1,0±0,1	1,2±0,2	0,9±0,8	0,7±0,1
Casp -1 (fold increase)	1,0±0,1	2,0±0,2	2,0±0,6	1,2±0,2
IL - 1β (pg/mg)	2,1±0,3	3,3±1,0	2,3±0,4	2,4±0,4

Análise dos componentes da imunidade inata por técnicas de Western Blot e ELISA dos grupos 1 dos grupos 12M, 15M, 15M_{Los}, 15M_{Los+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP (p^a<0,05 vs. 12M, p^b<0,05 vs. 15M, p^c<0,05 vs. 15M_{Los}).

4.5 Componentes do Sinal 1 da Imunidade Inata

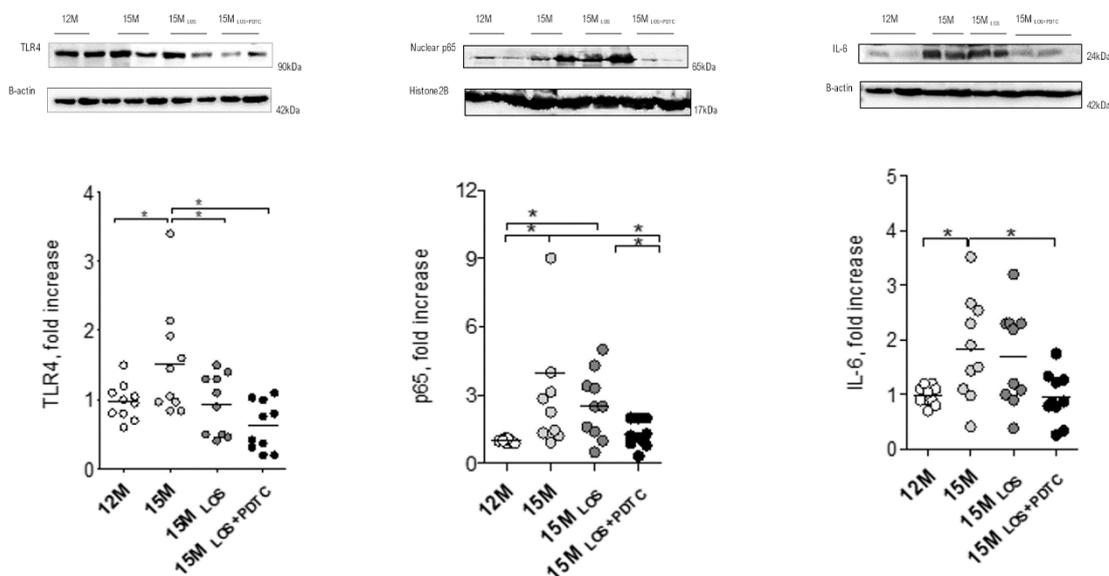


Figura 17. Expressão proteica dos componentes do sinal 1 (TLR4/NF- κ B/IL-6) obtidos do tecido renal dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS}+PDTC. Resultados apresentados como Média \pm EP.

A expressão de TLR4 no tecido renal dos idosos do grupo controle (15M) apresentou-se significativamente elevada em relação ao grupo 12M ($p < 0,05$ vs. 12M). Ambos os protocolos terapêuticos atenuaram de maneira significativa o aumento na expressão de TLR4 ($p < 0,05$ vs. 15M).

A expressão da subunidade p65 fosforilada na fração nuclear estava significativamente elevada, nos animais do grupo 15M ($p < 0,05$ vs. 12M), indicando a ativação do NF- κ B durante o processo de envelhecimento renal. Esses níveis não foram significativamente alterados pela monoterapia com Los ($p < 0,05$ vs. 15M). Já o tratamento com a associação Los+PDTC reduziu significativamente a ativação do sistema NF- κ B em relação ao grupo 15M e em relação ao grupo tratado somente com Los ($p < 0,05$).

Conforme descrito anteriormente, a IL-6 é um dos produtos da ativação do sistema NF- κ B e, portanto, o aumento de sua expressão renal era esperado nos animais 15M. Consistentemente, a monoterapia com Los não inibiu o aumento do

conteúdo proteico de IL-6 em relação ao Grupo 12M. Já a associação Los+PDTC reduziu de maneira significativa a expressão renal de IL-6 em comparação com os Grupos 15M e 15M_{Los} ($p < 0,05$)

4.6 Componentes do Sinal 2 da Imunidade Inata

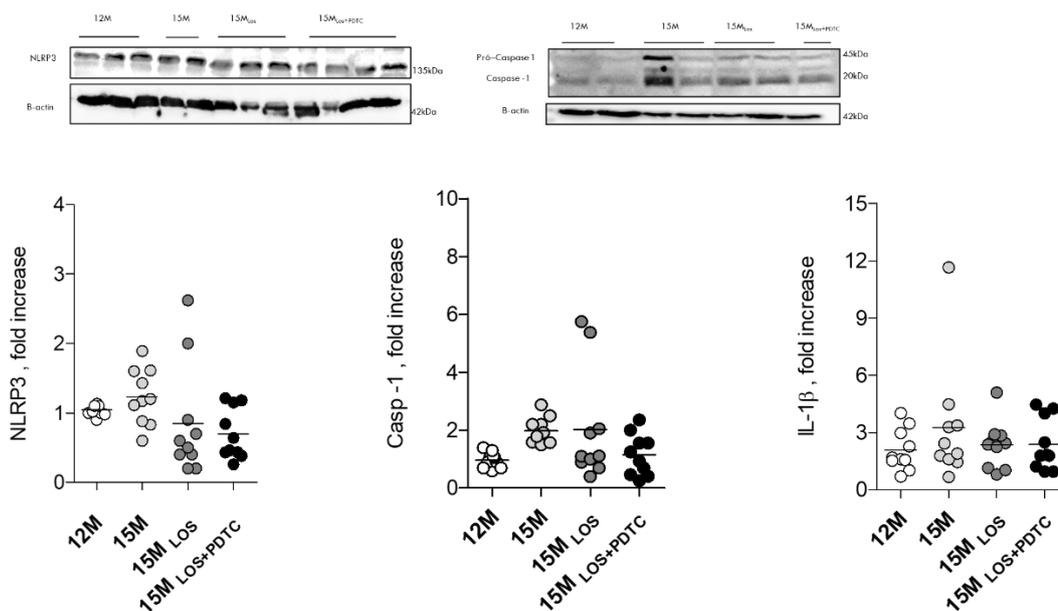


Figura 18. Expressão proteica dos componentes do sinal 2 (NLRP3/Casp-1/IL-1 β) obtidos do tecido renal dos grupos 12M, 15M, 15M_{Los}, 15M_{Los+PDTC}. Resultados apresentados como Média \pm EP.

Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas na expressão proteica de NLRP3 renal entre os grupos 12M e 15M ($p < 0,05$), sugerindo que os componentes do inflamassoma NLRP3 não estão envolvidos na patogênese do processo de envelhecimento renal. Corroborando esse resultado, não observamos diferenças significativas no conteúdo renal de IL-1 β entre os grupos estudados.

4.7 Expressão proteica de marcadores de stress oxidativo

Com o intuito de verificar a possível presença de estresse oxidativo nos Grupo 15M e se os tratamentos com Los e Los+PDTC apresentam atividade antioxidante, quantificamos o conteúdo proteico de Heme oxigenase-1 (HO-1) e Manganês Superóxido Dismutase (SOD2) no tecido renal. A Tabela 6 e a Figura 14 mostram os resultados dessas análises.

Tabela 6. Expressão proteica renal de marcadores de stress oxidativo

	12M (n=10)	15M (n=10)	15M _{Los} (n=10)	15M _{Los+PDTC} (n=10)
HO-1 (fold increase)	1,1±0,2	2,3±0,9 ^a	2,6±2,4 ^a	2,7±0,7 ^a
SOD2 (fold increase)	1,0±0,1	0,9±0,1 ^{a,b}	2,4±0,5	1,4±0,2 ^c

Análise por Western Blot dos marcadores de estresse oxidativo nos grupos 12M, 15M, 15M_{Los}, 15M_{Los+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP (^ap<0,05 vs. 12M, ^bp<0,05 vs. 15M, ^cp<0,05 vs. 15M_{Los}).

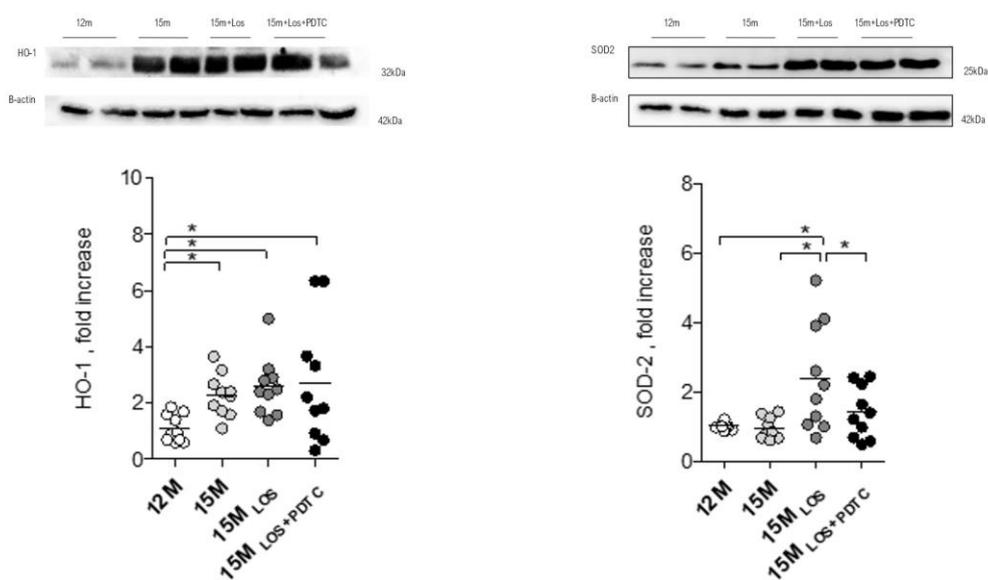


Figura 19. Valores de expressão de HO-1 e SOD2 dos grupos 12M, 15M, 15M_{LOS}, 15M_{LOS+PDTC}. Resultados apresentados como Média±EP.

Houve um aumento significativo nos níveis renais de HO-1 nos grupos 15M, quando comparado com os animais de 12M, sugerindo envolvimento do estresse oxidativo no processo de senescência renal. Os tratamentos com Los e Los+PDTC não afetaram a expressão de HO-1. Em relação à expressão renal de SOD2, os níveis foram semelhantes nos animais de 12M e 15M. Entretanto, nos animais 15M_{LOS} e 15M_{LOS+PDTC} os níveis de SOD2 foram superiores aos dos Grupos 12M e 15M ($p < 0,05$), sugerindo possível efeito antioxidante.

5 DISCUSSÃO

Conforme descrito anteriormente, o processo de envelhecimento está associado a alterações da estrutura renal, denotadas por um aumento na excreção urinária de albumina, pela presença de glomeruloesclerose e por expansão/inflamação intersticial (Weinstein and Anderson, 2010; Bolignano *et al.*, 2014; Musso and Jauregui, 2016; Denic *et al.*, 2017). Ocorre também um declínio funcional, mas em nosso estudo não chegamos a observar elevação dos níveis séricos de creatinina, indicando que, no período estudado, não houve ainda comprometimento da função renal devido à senescência. No entanto, foram evidentes o aumento nos níveis de albuminúria e importantes alterações estruturais no parênquima renal. O tecido renal desses ratos apresentou intensa infiltração de macrófagos e células positivas para AngII, juntamente com aumento da porcentagem de glomérulos com lesões escleróticas, além da presença de fibrose renal, corroborando achados anteriores (Ding *et al.*, 2001; Mei and Zheng, 2009).

Embora os mecanismos relacionados ao envelhecimento renal não estejam totalmente esclarecidos, várias evidências disponíveis na literatura sugerem o envolvimento da resposta imune inata na patogênese da inflamação renal e lesões estruturais associadas. Xi e colaboradores demonstraram um aumento na expressão renal dos TLRs em ratos com 12 e 24 meses de idade, em comparação com animais jovens (3 meses)(Xi *et al.*, 2014). Chung e colaboradores (Chung *et al.*, 2017) haviam

obtido anteriormente evidências de envolvimento do sistema NF- κ B na fibrose renal associada à idade, enquanto Song *et al* demonstraram que os inflamassomas ativados durante o processo de envelhecimento renal podem induzir um processo inflamatório, promovendo a maturação e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Song *et al.*, 2016).

Em consonância com os resultados daqueles estudos, demonstramos aos 15 meses de idade um aumento significativo no conteúdo nuclear do componente p65, indicando ativação do sistema NF- κ B. Em consistência com essas observações, encontramos um aumento concomitante da expressão da citocina inflamatória IL-6 durante o processo de envelhecimento renal. Com relação ao sinal 2 da imunidade inata, não houve uma elevação significativa da expressão do inflamassoma NLRP3, enquanto a expressão da Casp-1 teve um aumento apenas discreto, embora significativo. Esses achados sugerem que a ativação de uma parte da imunidade inata, o Sinal 1 (via do sistema NF- κ B), está envolvida no processo de esclerose glomerular e de inflamação e fibrose do interstício renal, associado ao envelhecimento renal. Já o envolvimento do Sinal 2 (via do Inflamassoma NLRP3) é menos evidente, uma vez que não observamos sinais claros e consistentes de ativação desse sistema.

A presença de estresse oxidativo foi demonstrada em vários modelos experimentais de DRC (Rempel *et al.*, 2019; Zambom *et al.*, 2019), e também na nefropatia do envelhecimento (Schulman *et al.*, 2010). Nossos resultados são consistentes com esses achados, uma vez que houve aumento nos níveis de HO-1, e decréscimo na expressão de SOD2 no Grupo 15M em relação ao Grupo 12M. No entanto, o efeito dos protocolos terapêuticos utilizados no presente estudo sobre o estresse oxidativo foi modesto: a monoterapia com Los, e apenas ela, promoveu um aumento da abundância renal de SOD2, sem afetar a da HO-1. Esses resultados indicam que o estresse oxidativo teve pouca influência sobre o efeito renoprotetor dos tratamentos utilizados no presente estudo, em especial o da associação Los+PDTC.

Como em outros modelos de nefropatia crônica (Fujihara *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2013), a inibição crônica do SRA exerceu um efeito protetor em ratos idosos. Em um estudo anterior (Anderson *et al.*, 1994), demonstramos que ratos idosos tratados dos 12 aos 24 meses com enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina I (IECA), tiveram forte atenuação da hipertensão, da albuminúria e das lesões

glomerulares associadas à idade. Quando o tratamento foi iniciado aos 3 meses de idade, essas anormalidades foram completamente prevenidas. No presente estudo, em consonância com aqueles achados, a monoterapia com Los, iniciada aos 12 meses de idade, teve um nítido efeito renoprotetor, baixando a pressão arterial e atenuando a infiltração por macrófagos e por células intersticiais positivas para AngII, bem como a deposição de Col-1 no córtex renal. Além disso, a monoterapia com Los restaurou parcialmente a presença de macrófagos com perfil M2. No entanto, essa renoproteção ocorreu predominantemente no compartimento intersticial, sem alteração da taxa de excreção de albumina, ou da frequência de lesões glomerulares.

Alguns achados obtidos no presente estudo podem ajudar a explicar os efeitos positivos da inibição do SRA sobre a nefropatia do envelhecimento. O mais óbvio deles é a ação do Los sobre a densidade de células com marcação positiva para AngII, uma vez que esse peptídeo não apenas exerce diretamente um efeito pró-inflamatório (Bolignano *et al.*, 2014) como também age como uma citocina, ajudando a recrutar outras células inflamatórias e ativando linfócitos T (Nataraj *et al.*, 1999). Um mecanismo adicional poderia ser o efeito inibidor do Los sobre o sistema NLRP3/Caspase-1, reduzindo a abundância desta última, embora esse efeito tenha sido apenas modesto, e a ativação desse sistema aos 15 meses não tenha sido claramente evidenciada. Por fim, o Los apresentou efeito antioxidante, indicado pela elevação dos níveis renais de SOD2. No entanto, esse efeito pode ter sido simplesmente secundário à ação inibidora do Los sobre a AngII, um conhecido estímulo à produção de espécies reativas de oxigênio.

A associação entre o PDTC e o Los foi claramente mais eficiente do que a monoterapia com Los em atenuar a nefropatia observada aos 15 meses de idade. O tratamento combinado Los+PDTC preveniu o aumento da albuminúria, bem como o desenvolvimento de esclerose glomerular, mantendo a prevenção da fibrose intersticial, já observada com o tratamento isolado com Los. O tratamento combinado também foi mais eficaz como anti-inflamatório, conforme indicado por seu efeito sobre a densidade da infiltração intersticial de macrófagos, que não diferiu significativamente da observada no Grupo 12M, e pela redução significativa da infiltração por células positivas para AngII. Coerentemente, a terapia combinada promoveu um aumento significativo da presença de macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2), que retornou

a níveis semelhantes aos observados no Grupo 12M, tanto no espaço glomerular como no intersticial.

A maior eficiência renoprotetora do tratamento combinado associou-se à sua ação sobre a imunidade inata, mais especificamente sobre o assim denominado Sinal 1. O tratamento Los+PDTC promoveu uma diminuição significativa da abundância do TLR4 em relação ao Grupo 15M, o que não foi observado com a monoterapia com Los. Mais importante, o tratamento combinado preveniu totalmente o aumento da expressão proteica do componente p65 na fração nuclear, indicando que a ativação do sistema NF-kB foi eficazmente bloqueada. A observação de que a abundância renal da IL-6 foi indistinguível da observada aos 12 meses de idade corrobora esse achado e indica que a inibição do sistema NF-kB limitou fortemente o processo inflamatório que inevitavelmente decorreria de sua ativação. Esse efeito demonstra que a ação do PDTC não se confunde com a do Los e que as vias associadas ao sistema NF-kB e ao SRA, embora possuam pontos em comum, são independentes, de tal modo a permitir um sinergismo entre os respectivos inibidores. É importante notar que a renoproteção trazida pelo PDTC não se associou a uma ação adicional sobre o Sinal 2, uma vez que o efeito da associação Los+PDTC sobre o conteúdo renal de NLRP3 e de caspase-1 não foi superior ao da monoterapia com Los. Da mesma forma, não é possível atribuir a maior eficiência do tratamento combinado a um efeito sobre a IL-1 β , cuja abundância foi, tanto quanto com a monoterapia, diminuída apenas numericamente em relação ao Grupo 12M. É teoricamente possível que a abundância da forma ativa da caspase-1 tenha sido reduzida, um efeito que não pode ser verificado com a metodologia empregada neste estudo. No entanto, é pouco provável que esse hipotético efeito tenha sido relevante, dada a pouca intensidade, se é que existiu, da ativação do Sinal 2 da imunidade inata aos 15 meses. Assim, as evidências obtidas neste estudo sugerem fortemente que o efeito renoprotetor adicional proporcionado pelo PDTC foi especificamente relacionado à sua ação sobre o Sinal 1 da imunidade inata. Tampouco a ação renoprotetora adicional do PDTC pode ser atribuída a um efeito antioxidante, uma vez que não promoveu alteração significativa sobre a expressão da HO-1 ou da SOD-2.

Os presentes achados constituem evidência de que a ativação do sistema NFkB pode representar um importante mecanismo de lesão renal progressiva na

nefropatia do envelhecimento, somando-se aos resultados obtidos anteriormente com a ablação renal de 5/6, a nefropatia diabética e a sobrecarga de adenina. Embora o PDTC não seja propriamente uma droga, com propriedades farmacológicas e toxicologia conhecidas, o desenvolvimento de novos inibidores do sistema NF- κ B, com eficiência e segurança comprovadas, pode constituir-se em uma estratégia adicional para a prevenção das lesões e da perda funcional associadas à progressão dessas doenças e, especificamente, à nefropatia da senescência.

Em resumo, os resultados obtidos sugerem que a ativação da via TLR4/NF- κ B/IL-6 (Sinal 1) contribui fortemente à instalação da lesão renal associada ao envelhecimento. A monoterapia com Los atenuou as lesões estruturais e a inflamação renal, com pouco efeito sobre a imunidade inata. O tratamento combinado Los+PDTC inibiu fortemente o sistema NF- κ B e atenuou com maior eficácia a inflamação e as lesões renais associadas ao envelhecimento. Conforme sugerido anteriormente por observações em outros modelos experimentais, a inibição crônica do sistema NF- κ B representa uma possível estratégia terapêutica para prevenir a progressão das nefropatias crônicas e, particularmente, aquela associada ao envelhecimento.

6 CONCLUSÕES

A ativação da imunidade inata, em especial da via TLR4/NF- κ B/IL-6, exerce papel importante na patogênese da nefropatia do envelhecimento.

A inibição do SRA atenua as lesões renais associadas ao envelhecimento.

A inibição da via do NF- κ B potencializa o efeito renoprotetor do bloqueio do SRA, constituindo-se em uma possível nova opção terapêutica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, S.; RENNKE, H. G.; ZATZ, R. Glomerular adaptations with normal aging and with long-term converting enzyme inhibition in rats. **Am J Physiol**, v. 267, n. 1 Pt 2, p. F35-43, Jul 1994. ISSN 0002-9513. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8048562> >.

ARIAS, S. C. et al. An association of losartan-hydrochlorothiazide, but not losartan-furosemide, completely arrests progressive injury in the remnant kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 310, n. 2, p. F135-43, Jan 15 2016. ISSN 1522-1466. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538442> >.

_____. Regression of albuminuria and hypertension and arrest of severe renal injury by a losartan-hydrochlorothiazide association in a model of very advanced nephropathy. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56215, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431367> >.

AVILA, V. F. D. **Modelo de hipertensão arterial decorrente do bloqueio de NF-κB durante a nefrogênese: efeito da sobrecarga salina**. tese (Doutorado em Nefrologia) - Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo 2018.

BARTON, G. M.; KAGAN, J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 535-42, Aug 2009. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556980> >.

BOLIGNANO, D. et al. The aging kidney revisited: a systematic review. **Ageing Res Rev**, v. 14, p. 65-80, Mar 2014. ISSN 1872-9649. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24548926> >.

CHANG-PANESSO, M. Acute kidney injury and aging. **Pediatr Nephrol**, v. 36, n. 10, p. 2997-3006, Oct 2021. ISSN 1432-198X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33411069> >.

CHOUDHURY, D.; LEVI, M. Kidney aging--inevitable or preventable? **Nat Rev Nephrol**, v. 7, n. 12, p. 706-17, Aug 2011. ISSN 1759-507X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21826079> >.

CHUNG, K. W. et al. Involvement of NF- κ B and related cytokines in age-associated renal fibrosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 7315-7327, Jan 2017. ISSN 1949-2553. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28099916> >.

DARMADY, E. M.; OFFER, J.; WOODHOUSE, M. A. The parameters of the ageing kidney. **J Pathol**, v. 109, n. 3, p. 195-207, Mar 1973. ISSN 0022-3417. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4719771> >.

DENIC, A. et al. The Substantial Loss of Nephrons in Healthy Human Kidneys with Aging. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 1, p. 313-320, Jan 2017. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27401688> >.

DING, G. et al. Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats. **Exp Mol Pathol**, v. 70, n. 1, p. 43-53, Feb 2001. ISSN 0014-4800. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170790> >.

FANELLI, C. et al. Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 3192, 06 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28600543> >.

FORESTO-NETO, O. et al. NF- κ B System Is Chronically Activated and Promotes Glomerular Injury in Experimental Type 1 Diabetic Kidney Disease. **Front Physiol**, v. 11, p. 84, 2020. ISSN 1664-042X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32116790> >.

FORRESTER, S. J. et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 98, n. 3, p. 1627-1738, 07 2018. ISSN 1522-1210. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29873596> >.

FUJIHARA, C. K. et al. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 1, p. F92-9, Jan 2007. ISSN 1931-857X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896182> >.

_____. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. **Kidney Int**, v. 67, n. 5, p. 1913-24, May 2005. ISSN 0085-2538. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840039> >.

FULOP, T. et al. Are We Ill Because We Age? **Front Physiol**, v. 10, p. 1508, 2019. ISSN 1664-042X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31956310> >.

GLASSOCK, R. J.; RULE, A. D. The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney: with an emphasis on the glomeruli. **Kidney Int**, v. 82, n. 3, p. 270-7, Aug 2012. ISSN 1523-1755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437416> >.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344-62, Feb 2008. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267068> >.

HODGIN, J. B. et al. Glomerular Aging and Focal Global Glomerulosclerosis: A Podometric Perspective. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, n. 12, p. 3162-78, Dec 2015. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038526> >.

HOMMOS, M. S.; GLASSOCK, R. J.; RULE, A. D. Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 10, p. 2838-2844, Oct 2017. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28790143> >.

HUGHSON, M. D.; HOY, W. E.; BERTRAM, J. F. Progressive Nephron Loss in Aging Kidneys: Clinical-Structural Associations Investigated by Two Anatomical Methods. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 303, n. 10, p. 2526-2536, Oct 2020. ISSN 1932-8494. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31599090> >.

JEPSEN, F. L.; MORTENSEN, P. B. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol**, v. 383, n. 3, p. 265-70, Aug 1979. ISSN 0340-1227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/158870> >.

KURTS, C. et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 10, p. 738-53, Oct 2013. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037418> >.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 2014. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855941> >.

LEEMANS, J. C. et al. Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, v. 10, n. 7, p. 398-414, Jul 2014. ISSN 1759-507X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890433> >.

LIM, K. H.; STAUDT, L. M. Toll-like receptor signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 1, p. a011247, Jan 2013. ISSN 1943-0264. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284045> >.

LLOYD-SHERLOCK, P. et al. WHO's proposal for a decade of healthy ageing. **Lancet**, v. 394, n. 10215, p. 2152-2153, Dec 14 2019. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31784026> >.

LOSAPPIO, V. et al. Molecular Mechanisms of Premature Aging in Hemodialysis: The Complex Interplay Between Innate and Adaptive Immune Dysfunction. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 10, May 12 2020. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32408613> >.

LUMBERS, E. R. et al. The renin-angiotensin system from conception to old age: the good, the bad and the ugly. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 40, n. 11, p. 743-52, Nov 2013. ISSN 1440-1681. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24164175> >.

MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, n. 3, p. 235-54, Sep 1965. ISSN 0019-2791 (Print)

0019-2791 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4956917> >.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040> >.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001/11/01 2001. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://doi.org/10.1038/35100529> >.

MEI, C.; ZHENG, F. Chronic inflammation potentiates kidney aging. **Semin Nephrol**, v. 29, n. 6, p. 555-68, Nov 2009. ISSN 1558-4488. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006787> >.

MENGHINI, R. et al. Toll-like receptor 4 mediates endothelial cell activation through NF- κ B but is not associated with endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99053, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24918924> >.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 240-73, Table of Contents, Apr 2009. ISSN 1098-6618. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366914> >.

MUSSO, C. G.; JAUREGUI, J. R. How to differentiate renal senescence from chronic kidney disease in clinical practice. **Postgrad Med**, v. 128, n. 7, p. 716-21, Sep 2016. ISSN 1941-9260. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27383288> >.

NATARAJ, C. et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. **J Clin Invest**, v. 104, n. 12, p. 1693-701, Dec 1999. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606623> >.

NETO, O. F. **A ativação do sistema NF-kappa B promove inflamação e lesão glomerular na doença renal diabética experimental.** Tese (Doutorado em Nefrologia) - Faculdade de Medicina, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2019.

PATEL, S. et al. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. **Biomed Pharmacother**, v. 94, p. 317-325,

Oct 2017. ISSN 1950-6007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28772209> >.

PELKA, K.; DE NARDO, D. Emerging Concepts in Innate Immunity. **Methods Mol Biol**, v. 1714, p. 1-18, 2018. ISSN 1940-6029. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29177852> >.

PETRILLI, V.; PAPIN, S.; TSCHOPP, J. The inflammasome. **Curr Biol**, v. 15, n. 15, p. R581, Aug 2005. ISSN 0960-9822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085473> >.

REMPEL, L. C. T. et al. Chronic exposure to hypoxia attenuates renal injury and innate immunity activation in the remnant kidney model. **Am J Physiol Renal Physiol**, Aug 2019. ISSN 1522-1466. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31461352> >.

RIERA ROMO, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, D.; CASTILLO FERRER, C. Innate immunity in vertebrates: an overview. **Immunology**, v. 148, n. 2, p. 125-39, 06 2016. ISSN 1365-2567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26878338> >.

RIPLEY, E.; HIRSCH, A. Fifteen years of losartan: what have we learned about losartan that can benefit chronic kidney disease patients? **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 3, p. 93-8, 2010. ISSN 1178-7058. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694934> >.

RUBIO-ALIAGA, I. Phosphate and Kidney Healthy Aging. **Kidney Blood Press Res**, v. 45, n. 6, p. 802-811, 2020. ISSN 1423-0143. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33049732> >.

RULE, A. D.; CORNELL, L. D.; POGGIO, E. D. Senile nephrosclerosis--does it explain the decline in glomerular filtration rate with aging? **Nephron Physiol**, v. 119 Suppl 1, p. p6-11, 2011. ISSN 1660-2137. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21832860> >.

SALMINEN, A. et al. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. **Ageing Res Rev**, v. 7, n. 2, p. 83-105, Apr 2008. ISSN 1568-1637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964225> >.

SANZ, A. B. et al. NF-kappaB in renal inflammation. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 8, p. 1254-62, Aug 2010. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651166> >.

SCHROOTS, J. J.; BIRREN, J. E. The nature of time: implications for research on aging. **Compr Gerontol C**, v. 2, n. 1, p. 1-29, Dec 1988. ISSN 0902-0098. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3076507> >.

SCHULMAN, I. H. et al. Altered renal expression of angiotensin II receptors, renin receptor, and ACE-2 precede the development of renal fibrosis in aging rats. **Am J Nephrol**, v. 32, n. 3, p. 249-61, 2010. ISSN 1421-9670. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689271> >.

SHANKLAND, S. J. et al. Podocyte Aging: Why and How Getting Old Matters. **J Am Soc Nephrol**, v. 32, n. 11, p. 2697-2713, Nov 2021. ISSN 1533-3450. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34716239> >.

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 401-14, Mar 2012. ISSN 1097-4180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342844> >.

SONG, F. et al. The Expression Changes of Inflammasomes in the Aging Rat Kidneys. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 71, n. 6, p. 747-56, 06 2016. ISSN 1758-535X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219846> >.

TELES, F. et al. Regression of glomerular injury by losartan in experimental diabetic nephropathy. **Kidney Int**, v. 75, n. 1, p. 72-9, Jan 2009. ISSN 1523-1755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946500> >.

WALLENSTEIN, S.; ZUCKER, C. L.; FLEISS, J. L. Some statistical methods useful in circulation research. **Circ Res**, v. 47, n. 1, p. 1-9, Jul 1980. ISSN 0009-7330. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7379260> >.

WEINSTEIN, J. R.; ANDERSON, S. The aging kidney: physiological changes. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 17, n. 4, p. 302-7, Jul 2010. ISSN 1548-5609. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610357> >.

XI, Y. et al. Changes in the expression of the Toll-like receptor system in the aging rat kidneys. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96351, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24810370> >.

ZAMBOM, F. F. F. A inibição das vias TLR4/NF-kB e do NLRP3/IL-1beta previne a DRC em um modelo de inibição crônica de NO associado à sobrecarga de sal. Dissertação (Mestrado em Nefrologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2018.

ZAMBOM, F. F. F. Efeito da hipóxia na patogênese da lesão renal em dois modelos experimentais de doença renal crônica: agravamento ou proteção? Tese (Doutorado em Nefrologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 2022.

ZAMBOM, F. F. F. et al. Pathogenic role of innate immunity in a model of chronic NO inhibition associated with salt overload. **Am J Physiol Renal Physiol**, Aug 2019. ISSN 1522-1466. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31411073> >.

ZHAO, Y. et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates both heart and kidney injury in type 2 cardiorenal syndrome. **Kidney Int**, v. 95, n. 4, p. 815-829, Apr 2019. ISSN 1523-1755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30770217> >.