

Tárcio Teodoro Braga

**Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a  
contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4  
e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da  
fibrose renal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão original

São Paulo  
2014

## RESUMO

Braga TT. Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4 e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da fibrose renal. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A doença renal crônica é uma doença mediada pelo sistema imune e caracterizada por fibrose. O tecido lesado libera moléculas, como o ácido úrico solúvel, resultantes da degradação da matriz extracelular ou células mortas, que podem ativar TLR e NLR, o que leva à translocação de MyD88 em muitos tipos de células. Esta modulação do sistema imune interfere na ativação de diferentes subtipos de macrófagos e na atividade das células TCD4<sup>+</sup>, com o paradigma Th1/Th2 considerado um possível mecanismo efetor de fibrose. Camundongos deficientes em TLR2, TLR4, MyD88 e NLRP3 se mostraram protegidos, quando comparados aos animais selvagens, frente ao dano renal e à deposição de colágeno após serem submetidos à obstrução unilateral do ureter (UUO). Além disso, os camundongos protegidos exibiram menor produção de citocinas relacionadas com um perfil imune Th2 e apresentaram menor acúmulo de macrófagos do subtipo M2. Verificamos que o desenvolvimento da fibrose correlaciona-se com a infiltração de células imunes e que os macrófagos possuem papel ativo em tal processo. Inicialmente, creditamos aos macrófagos M2 o papel de macrófagos formadores de fibrose uma vez que tal subpopulação é encontrada em maior número aos sete dias após a UUO em animais WT, porém, vimos que os personagens centrais no desenvolvimento da fibrose são macrófagos M1, encontrados no início da lesão renal, mesmo que tais células possam mudar seu fenótipo com a cronicidade da doença. A participação dos macrófagos M1 para o desenvolvimento da fibrose foi confirmada com a injeção de M1 deficientes em Stat6 em camundongos Rag KO anteriormente depletados com clodronato e submetidos à UUO, nos quais observamos maior proteinúria e maior deposição de colágeno. Além disso, vimos que o ácido úrico é a molécula capaz de induzir a troca de fenótipo de M1 para M2 ao longo da UUO, além de ser capaz de ativar a via do inflamassoma, com consequente produção de IL1 $\beta$ . Animais selvagens cuja xantina desidrogenase foi inibida demonstram menor ativação da via do inflamassoma e menor fibrose, enquanto que animais injetados com ácido úrico demonstram piores prognósticos frente à UUO. O ácido úrico solúvel é liberado em um contexto de hipóxia subsequente à obstrução mecânica do ureter e ele é capaz de ativar o complexo do inflamassoma NLRP3 por mecanismos diferentes, mas complementares. Portanto, o dano renal observado com a sinalização do ácido úrico solúvel via receptores da imunidade inata presente em macrófagos infiltrantes traz como consequência a deposição de proteínas no interstício renal e formação de um quadro de fibrose.

Palavras-chave: Fibrose renal. Ácido úrico solúvel. Inflamassoma. Macrófagos. Resposta imune Th2.

## ABSTRACT

Braga TT. Involvement of different subtypes of macrophages and the contribution of soluble uric acid, the receptors TLR2 and TLR4 and MyD88 and NLRP3 molecules to the development of renal fibrosis. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chronic kidney disease is an immune mediated disease characterized by fibrosis development. The damaged tissue releases molecules such as soluble uric acid resulting from the degradation of extracellular matrix or dead cells, which activate TLR and NLR, leading to the translocation of MyD88 in many cell types. This modulation of the immune system interferes with the activation of different subtypes of macrophages and activity of CD4<sup>+</sup> T cells, with the Th1/Th2 paradigm as a possible effector mechanism of fibrosis. TLR2, TLR4, MyD88, and NLRP3 deficient mice are protected against renal damage and collagen deposition after being submitted to unilateral ureteral obstruction (UUO), when compared to wild type animals. Moreover, protected mice exhibited less production of Th2 related cytokines and reduced accumulation of M2 macrophages. We found that the development of fibrosis correlates with the infiltration of immune cells and macrophages possess an active role in this process. Initially, we hypothesized M2 macrophages are responsible for fibrosis formation since this subset is found in greater numbers seven days after UUO in WT mice, however, we observed the central characters on the development of fibrosis are M1 macrophages found in the onset of renal injury, even if such cells can change their phenotype through the chronicity of the disease. The participation of macrophages M1 for the development of fibrosis was confirmed by the injection of Stat6 KO M1 into Rag deficient mice previously depleted with clodronate and subjected to UUO, in which we observed higher proteinuria and increased collagen deposition. We also observed that uric acid is able to induce the exchange of phenotype from M1 to M2 along the UUO, besides being able to activate the inflammasome pathway. WT animals whose xanthine dehydrogenase was inhibited showed less activation of the inflammasome pathway and less fibrosis, whereas animals injected with uric acid demonstrate poorer prognosis opposite UUO. Soluble uric acid is released in the context of hypoxia and activates the NLRP3 inflammasome complex by different, but complementary mechanisms. Therefore, the renal damage releases soluble uric acid, which signals via innate immune receptors present in infiltrating macrophages, and the damage brings as a consequence the deposition of proteins in the renal interstitium, culminating in fibrosis.

Keywords: Renal fibrosis. Soluble uric acid. Inflammasome. Macrophages. Th2 immune response.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença Renal Crônica

A incidência de Doença Renal Crônica terminal (DRC) está aumentando em todo mundo (1). A constatação, a partir da década passada, da alta incidência e prevalência da DRC, que necessitam de tratamento pela diálise e ou pelo transplante renal, vem mobilizando a comunidade científica mundial e autoridades de Saúde Pública, na busca de estratégias adequadas de prevenção da doença. Em 1994, 24.000 pacientes eram mantidos em diálise e em 2004 esse número atingiu 59.153 (dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia). De acordo com a SBN, em 2002 o Brasil mantinha 54.523 pacientes em diálise, com prevalência média no país de 312 pacientes pmp ([www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)). O custo anual do Ministério da Saúde, com o programa de terapia renal substitutiva (TRS) no Brasil, foi de 663.200.400,00 reais em 2000 e atualmente está em torno de 1,4 bilhões de reais ao ano. O custo médio mensal de um paciente renal crônico em TRS está em torno de 1.800,00 reais (1).

A DRC é um problema de saúde altamente prevalente na população geral, sendo associada a uma alta taxa de mortalidade, principalmente em decorrência de complicações cardiovasculares (2). Vários modelos animais têm sido utilizados para estudar diferentes características de DRC (3), ao passo que o uso de camundongos geneticamente modificados tem expandido muito a utilidade deste modelo em estudar os mecanismos moleculares subjacentes à resposta renal aos insultos crônicos (4). Especificamente, a DRC induz a infiltração celular para o rim principalmente de macrófagos, que produzem fatores de crescimento e citocinas, que em última análise, induzem o desequilíbrio entre a apoptose e a proliferação das células tubulares, o que favorece a ativação e proliferação de fibroblastos. Fibroblastos ativados produzem componentes da matriz extracelular (ECM) que se acumulam no interstício, e caso o dano seja contínuo, a deposição de ECM torna-se massiva, e a apoptose descontrolada das células resulta na atrofia tubular (4). Este remodelamento da matriz e o estresse celular podem liberar moléculas que finalmente instigam uma resposta inflamatória.

## 1.2 Modelo Experimental da DRC

Um modelo muito popular e de uso crescente (principalmente em ratos e camundongos) para o estudo de fibrose renal é o da obstrução completa e unilateral do ureter (*unilateral*

*ureteral obstruction*, UUU). A UUU obstrui completa e agudamente o ureter. Esse quadro é dificilmente encontrado em humanos, mas apresenta a vantagem de mimetizar de uma maneira acelerada os diferentes estágios da fibrose intersticial. Algumas características desse modelo começam a partir de uma semana após a ligadura do ureter. A UUU resulta em diversos eventos celulares e moleculares característicos do processo inicial de fibrose e de sua progressão, sendo assim um ideal modelo de estudo de doenças renais crônicas. Nesse modelo podemos encontrar: infiltração celular ao parênquima renal, proliferação e apoptose tubular, transição epitélio-mesenquimal (TEM), acumulação de miofibroblastos no parênquima renal, aumento do depósito da ECM e atrofia tubular. Essas características patológicas aparecem rapidamente e são altamente reprodutíveis entre os experimentos.

A inflamação do compartimento túbulo-intersticial, que resulta na fibrose, é um dos principais fatores da perda progressiva da função renal. Aproximadamente 80% do volume renal são constituídos de células epiteliais tubulares e de células do espaço intersticial. A maioria das células não-epiteliais é associada a rica vasculatura renal. Existe também um pequeno número de células mononucleares e de fibroblastos. Após a lesão renal, na tentativa de manter a integridade dos túbulos, há uma ativação da proliferação das células epiteliais (1, 5, 6). Uma vez que as respostas proliferativas ou os fatores homeostáticos desaparecem, as vias de apoptose são ativadas e sobrepõem-se à capacidade das células tubulares de sobreviverem e assim, a atrofia tubular começa.

### **1.3 Fibrose**

O reparo de danos teciduais é um processo biológico fundamental que permite a reposição ordenada de células mortas ou danificadas devido a alguma lesão, mecanismo essencial à sobrevivência. Os danos aos tecidos podem resultar de vários estímulos, agudos ou crônicos, incluindo infecções, reações autoimunes, injúria mecânica ou qualquer estimulação da resposta imunológica. O processo de reparo envolve, tipicamente, dois estágios distintos: uma fase regenerativa, na qual as células lesadas são trocadas por células do mesmo tipo, sem acarretar evidência do dano; e uma fase conhecida como fibroplasia, ou mais comumente chamada de fibrose, na qual o tecido conjuntivo substitui o tecido parenquimatoso normal. Embora inicialmente benéfico, o processo de cicatrização se torna patológico quando se torna contínuo, resultando em substancial remodelamento da ECM e formação da cicatriz permanente. Em alguns casos, isso pode levar à falha ou à falência do órgão (7).

Ao contrário das reações inflamatórias agudas, que são caracterizadas por rápidas mudanças vasculares, edema e infiltração de neutrófilos, a fibrose se origina geralmente de reações inflamatórias crônicas, definida como resposta que persiste por várias semanas ou meses e cuja inflamação, destruição tecidual e processo de reparo ocorrem simultaneamente. Apesar de diferentes etiologias e distinções clínicas, a maioria das doenças fibróticas tem em comum uma inflamação persistente que mantém a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas pró-fibróticas que, juntas, estimulam a deposição de elementos teciduais conjuntivos que remodelam ou destroem progressivamente a arquitetura tecidual normal (8, 9).

Irrelevante da causa inicial, o desenvolvimento da fibrose intersticial é caracterizado pelo aparecimento de fibroblastos ativados positivos para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA), também denominados de miofibroblastos. No parênquima renal, a deposição de produtos da ECM é amplamente atribuída a essas células (10). Interessantemente, enquanto o papel pró-fibrótico dos miofibroblastos é amplamente aceitável, a sua origem ainda é obscura. Três hipóteses foram formuladas a respeito de sua origem (11): 1) as células estromais seriam as células progenitoras desses fibroblastos que através da circulação poderiam migrar e povoar órgãos periféricos (12); 2) os miofibroblastos seriam derivados da ativação de fibroblastos previamente residentes no espaço intersticial, que se proliferam após o dano (10); e 3) os fibroblastos intersticiais seriam gerados a partir da TEM (13).

Um estudo usando quimeras demonstrou que todos esses processos descritos acima estão envolvidos no aparecimento dos fibroblastos intersticiais. Num modelo experimental com UUU, foi observada que 36% desses fibroblastos eram provenientes da TEM, entre 14 a 15% vieram da medula óssea e o restante era provavelmente um resultado da proliferação dos fibroblastos previamente residentes no interstício (14).

A TEM tubular é o processo no qual as células renais tubulares perdem o seu fenótipo epitelial e adquirem características de células mesenquimais, podendo assim se rediferenciar em células miofibroblásticas, passando a expressar  $\alpha$ -sma e o colágeno do tipo I. O processo da TEM envolve quatro eventos-chaves: (1) perda de propriedades da adesão epitelial, (2) expressão de novo de  $\alpha$ -sma e reorganização da actina, (3) aumento da permeabilidade da membrana basal tubular, e (4) aumento da migração e capacidade de invasão celular. Um importante impulsor desse processo de transdiferenciação é o TGF- $\beta$  (15).

O TGF- $\beta$  é o único fator descrito como participante nos quatro eventos da TEM (16) e duas moléculas: o fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*, HGF) (16) e a proteína morfogênica de osso 7 (*bone morphogenic protein-7*, BMP-7) (17) foram demonstradas como capazes de reverter o processo de TEM devido à inibição do TGF- $\beta$  e, conseqüentemente, são capazes de diminuir a fibrose renal.

## 1.4 Imunidade Inata: TLR e NLR

### 1.4.1 Receptores do tipo Toll (TLR)

O sistema imune inato é filogeneticamente conservado e está presente em quase todos os organismos multicelulares. Esta primeira linha de defesa se dá através de receptores expressos por macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células “natural killer”, entre outras células (18). A função destes receptores é reconhecer padrões moleculares, muitos dos quais conservados por patógenos, e por isso são designados Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs, do inglês “Pattern Recognition Receptors”). Existem várias classes de PRRs, e entre elas, a família TLR, caracterizadas como glicoproteínas do tipo I integrantes de membranas. Esses receptores transmembrana podem detectar uma grande variedade de moléculas conservadas evolutivamente presentes em patógenos como em vírus, bactérias, fungos, e em parasitas, e são conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês “Pathogen-Associated Molecular Patterns”). Além de PAMPs, vários estudos têm demonstrado que os TLRs também são capazes de reconhecer substâncias endógenas liberadas durante a lesão tecidual, definidas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs, do inglês “Danger-Associated Molecular Patterns”) (18). Os DAMPs incluem a HMGB1, hialuronanas, fibronectina A, e a proteína de choque térmico 70, entre outros. A ativação dos TLRs desencadeia uma série de eventos que levam à expressão de genes com potencial pró-inflamatório. A ligação de agonistas aos TLRs induz a maturação das células dendríticas, que é essencial para a indução da resposta imune adaptativa específica ao patógeno.

Até o momento, foram descritos doze membros da família dos TLRs em mamíferos sendo todos receptores transmembrana com um grande domínio extracelular e um domínio intracelular conhecido como *Toll-interleukin-1 resistance* (TIR), devido a sua similaridade com o receptor de IL-1. O domínio extracelular contém aproximadamente 16 a 28 repetições ricas em leucina (LRR, do inglês “leucine-rich repeats”), e cada LRR consiste de 20 a 30

aminoácidos, envolvidos na ligação ao PAMP ou DAMP. Os TLRs são divididos em dois grupos, baseados em sua localização: aqueles expressos exclusivamente na superfície celular e que reconhecem componentes da membrana microbiana como lipídeos, lipoproteínas e proteínas (TLR1, TLR2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, e TLR-11); e aqueles localizados em vesículas intracelulares como os endossomos, e que reconhecem predominantemente diferentes padrões de ácidos nucleicos (TLR-3, TLR-7, TLR-8, e TLR-9)(19).

Há duas principais vias que podem ser ativadas por TLRs: a via dependente de MyD88, que resulta na ativação do NF- $\kappa$ B e AP-1, e a via dependente de TRIF, resulta na ativação de interferons do tipo I (IFNs  $\alpha/\beta$ )(20). Todos os TLRs, exceto o TLR3, recrutam MyD88. A ligação de TLR5, TLR7, TLR9 e TLR11 à molécula de MyD88 se forma diretamente, enquanto TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 recrutam a proteína adaptadora TIRAP (também chamada de MAL - *MyD88 adaptor-like protein*), que une o MyD88 ao domínio TIR do TLR. O TLR3 recruta somente a proteína TRIF, e o TLR4 também o faz. Além disso, o TLR4 utiliza da molécula adaptadora TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) para comunicar o domínio TIR do TLR4 com o TRIF. Portanto, TLR4 inicia ambas as vias, dependente de MyD88 e dependente de TRIF. O MyD88 recruta proteínas da família IRAK e TRAF 6, o que acaba por desencadear uma sinalização ativadora do complexo IKK, e conseqüentemente, do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Tal sinalização também ativa a via da MAPK. A via de sinalização dependente de TRIF também ativa TRAF 6, e por consequência, induz a ativação de MAPK e a fosforilação de NF- $\kappa$ B. Além disso, na sinalização por TRIF há interação com TRAF 3 e posterior ativação de IRF (*Interferon regulatory factor*). NF- $\kappa$ B e MAPK iniciam a transcrição de genes codificadores de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, enquanto IRF inicia a transcrição de interferon do tipo I. Há possibilidade de uma comunicação entre as vias dependente de MyD88 e de TRIF uma vez que MyD88 pode, por exemplo, ativar TRAF 3, com posterior expressão de interferon do tipo I (21).

#### **1.4.2 Receptores do tipo Nod (NLR)**

Recentemente, os receptores do tipo NOD (NLR, do inglês *Nod like receptors*) foram identificados como um grupo citoplasmático de receptores de reconhecimento de patógenos. Até então, 23 membros da família foram identificados em humanos, apesar de seus ligantes e funções não estarem bem esclarecidos. Mesmo assim, há um consenso de que o principal papel desses receptores é reconhecer, dentro da célula, PAMPs e/ou outros “sinais de perigo” endógenos para iniciar uma resposta imune. Nos NLRs, estão incluídos os NODs (domínio-1



de oligomerização ligador de nucleotídeos), os NALPs (proteínas contendo domínios NACHT, LRR e PYD), IPAF (fator ativador de protease-ICE), NAIPs (fator inibidor de apoptose neuronal) e CIITA. A família dos NLRs é caracterizada por um domínio C-terminal LRR; um domínio central NACHT, e ainda um domínio N-terminal. Baseado no tipo de domínio N-terminal, os NLRs são atualmente classificados como NLRC (domínio CARD), NLRP (domínio PIRINA), NRLB (domínio BIR) e NLRX (domínio desconhecido) (22). Os NLRs podem ser agrupados de acordo com seus domínios efetores, sendo que os NODs e IPAF possuem domínios efetores CARD, os NLRPs contêm domínios PYD, e os NAIPs têm domínios BIR (23).

O mecanismo que permite que os NLRs reconheçam componentes de bactérias não é totalmente compreendido. Os receptores NOD1 e NOD2, os primeiros NLRs identificados, reconhecem peptídeos produzidos durante a degradação de peptidoglicanos (PGN), um componente da parede celular bacteriana. O NOD1 reconhece o ácido  $\gamma$ -D-glutamil-mesodiaminopimérico (iE-DAP), enquanto NOD2 reconhece dipeptídeo muramil (MPD). Quando os NODs detectam os PGN eles rapidamente se oligomerizam, o que promove o recrutamento de uma quinase, a proteína-2 de interação com receptor (RIP-2). Esse complexo NOD-1/RIP-2 ou NOD-2/RIP-2 recruta então o complexo de quinase do inibidor do NF $\kappa$ B (IKK), levando à sua translocação para o núcleo. A ativação do NOD-1 e do NOD-2 também leva à sinalização via ERK e p38. A sinalização do NOD-1 também promove ativação da JNK (24).

#### 1.4.2.1 Inflamassoma

O termo “inflamassoma” foi usado a primeira vez em 2002 por Martinon e colaboradores para designar um complexo de proteínas de alto peso molecular capaz de clivar pró-IL1 $\beta$ , de aproximadamente 35 KDa, em sua forma ativa, o IL1 $\beta$  com aproximadamente 17 KDa (25). A composição do inflamassoma é aparentemente variável, assim como a sua distribuição espacial e temporal no citoplasma frente ao reconhecimento de um determinado PAMP/DAMP. O inflamassoma é composto geralmente por uma proteína NLR, que reconhece algum patógeno intracitoplasmático ou ainda algum DAMP, em associação com outra proteína, a caspase-1, que cliva a pró-IL1 $\beta$  em IL1 $\beta$ . Há três tipos bem caracterizados de inflamassomas: aqueles cujo NLRP é o NLRP1, o NLRP3 ou ainda o IPAF. Desses três, apenas o inflamassoma NLRP3 utiliza uma molécula adaptadora, o ASC, para recrutar a caspase-1 (26).

Sabemos que são necessários dois sinais para a ativação do complexo do inflamassoma: o primeiro sinal, mediado por TLR, deve ser capaz de induzir o aumento da expressão de pró-IL1 $\beta$ ; o segundo sinal deve ser responsável pela clivagem de pró-IL1 $\beta$  na sua forma ativa (26). Há várias hipóteses para o segundo sinal de tal ativação. A primeira delas é que a saída de potássio do interior das células é um estímulo para a clivagem de pró-IL1 $\beta$  em IL1 $\beta$  maduro (25, 27). Além disso, sabemos que o ATP extracelular pode funcionar como segundo sinal (28). Cristais de ácido úrico (29, 30) e outros compostos particulados (31, 32) poderiam causar um rompimento da membrana citoplasmática das células da imunidade inata e então funcionar como segundo sinal. Outra hipótese para a clivagem de pró-IL1 $\beta$  em IL1 $\beta$  maduro é o aumento do cálcio intracitoplasmático (33). Além disso, ácido graxos saturados podem ativar inflamassoma (34). Não sabemos se há algum componente em comum entre todos os segundos sinais descritos, como por exemplo, a liberação de ROS, como descrito por Cruz e colaboradores (35). Diversos aspectos da ativação da via do inflamassoma necessitam de um estudo mais profundo e várias perguntas precisam ser respondidas (36) antes de melhor manipularmos tal ativação no contexto de diferentes doenças. Não sabemos, por exemplo, se há alguma molécula que conecte o DAMP/PAMP ao NLRP3.

O estímulo para a ativação de NLRP1 é desconhecido; entretanto, a ruptura mecânica da parede celular é capaz de iniciar a formação do inflamassoma. Parece que os motivos de LRR do NLRP1 são capazes de reconhecer “sinais de perigo”. O inflamassoma NLRP3 é ativado por ATP (28), estresse hipotônico, compostos particulados, (30-32) cálcio intracitoplasmático (33) e ácidos graxos (34), os quais parecem mimetizar “sinais de perigo” endógenos. Recentemente, também foi demonstrado que o NLRP3 consegue reconhecer RNA bacteriano, bem como os componentes R837 e R838 do antiviral imidazoquinolina (37). O inflamassoma IPAF consiste em IPAF e caspase-1, e foi relacionado com a detecção de flagelina intracelular de *S. typhimutium* e *L. pneumophila*. A caspase-1 é o efetor central do inflamassoma, e a ativação desse complexo de proteínas multiméricas resulta na clivagem e ativação dessa protease. Por sua vez, a caspase-1 ativa, cliva e libera as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18.

Algumas vezes a ativação da via do inflamassoma leva à morte celular conhecida como “piroptose”. A palavra é derivada do grego, onde "pyro" (fogo) denota a liberação de mediadores pró-inflamatórios, e "ptose", que significa queda, um termo comumente usado para descrever morte celular foi introduzida para este tipo de morte celular com liberação de IL1 $\beta$  (38). Piroptose é dependente da ativação de caspase-1 e muitas vezes é associada a um estado inflamatório elevado, em contraste com a morte por apoptose e, frequentemente, ocorre

após a infecção com patógenos intracelulares. Tem sido bem estudada no contexto de macrófagos infectados com bactérias flageladas (39). Outro aspecto importante na biologia do inflamassoma é que existem vias não canônicas de sua ativação, como a indução de piroptose de forma independente de caspase-1 (40). Tal ativação é possível porque a caspase-11 induz a secreção de IL-1 $\alpha$  e piroptose em resposta a bactérias Gram-negativas intracelulares, de forma independente de ASC e caspase-1. Paralelamente, em respostas a esses mesmos microorganismos, a caspase-11 é essencial no eixo de clivagem e ativação de caspase-1 dependente de Nlrp3 e ASC, o qual culmina em respostas clássicas como ativação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (40, 41).

### **1.5 Papel de TLR e NLR na Lesão Renal**

No rim, tanto células imunes quanto não imunes expressam os TLR, estando tais receptores envolvidos em uma variedade de doenças como pielonefrite, nefrite por leptospirose, glomerulonefrite por imunocomplexos, lesão de isquemia e reperfusão, rejeição ao enxerto, dentre outras (42-44). Vários trabalhos demonstraram a importância dos TLR na patogênese de várias afecções que acometem os rins. As células tubulares renais em cultura expressam constitutivamente TLR-1-4 e 6 (45, 46). A estimulação com LPS induz a produção de MCP-1 e RANTES, um indicativo de que estas moléculas possam estar envolvidas na migração de leucócitos para dentro do interstício e destruição tubular na presença de infecção renal. Andrade et al. analisaram os níveis de expressão mRNA dos TLR em tecido de pulmão coletado durante isquemia e reperfusão de transplantados e observaram que quando o pulmão do doador era preservado hipotermicamente, os níveis de mRNA dos TLR correlacionavam com os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$ ) (47). Estas observações sugerem que a resposta inflamatória no órgão doador pode afetar a expressão gênica e a atividade dos TLR, ou ainda, a expressão dos TLR e sua ativação pode contribuir para a regulação das expressões de citocinas.

Uma série de estudos sugere que o inflamassoma NLRP3 em células dendríticas intrarenais e macrófagos desencadeia inflamação renal. Componentes do inflamassoma NLRP3 também são expressos pelas células renais, mas a sua contribuição para a sinalização da via canônica do inflamassoma permanece incerta (48). Pulskens e colaboradores utilizaram animais deficientes em NLRP3 em um modelo de UUO, no qual eles afirmam que NLRP3 previne o edema intersticial e reduz a permeabilidade vascular (49). Porém, os mecanismos

desencadeados pelo NLRP3 e a via canônica da ativação do inflamassoma precisam ser melhor entendidos em um contexto de fibrose renal.

## **1.6 Balanço Th1/Th2 no Desenvolvimento da Fibrose**

Reações inflamatórias crônicas são tipicamente caracterizadas por um grande infiltrado de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos, eosinófilos e células do plasma. Embora a inflamação tipicamente preceda o desenvolvimento da fibrose, resultados de vários modelos sugerem que a fibrose não é sempre caracterizada como uma inflamação persistente, implicando que os mecanismos que regulam a fibrose são, até certo ponto, distintos daqueles que regulam a inflamação (50-52). No atual trabalho, propusemos entender a contribuição de células tipicamente envolvidas com a inflamação e células historicamente envolvidas com o desenvolvimento de uma resposta fibrótica no desenvolvimento de uma doença de caráter crônico.

Vários modelos experimentais de fibrose documentam a potente atividade anti-fibrótica das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12, associadas ao padrão de resposta imune Th1. Nahas e colaboradores (53) concluíram que a administração de doses diárias de IFN- $\gamma$  acarreta uma forte inibição da liberação dos componentes da ECM pelos miofibroblastos e que possíveis resultados de tal inibição seriam a redução da fibrose renal e manutenção da função dos rins. Resultados de outros grupos de pesquisa sugerem ser possível o desenvolvimento de vacinas anti-fibróticas, uma vez que o efeito pró-fibrótico da resposta tipo Th2 poderia ser minimizada em prol de uma resposta do tipo Th1 (54, 55). Estudos que investigam o padrão de expressão de genes em tecidos fibrosados encontraram diferença marcante entre a polarização dos genes relacionados às citocinas de padrão Th1 e Th2 induzidos em tais tecidos (56, 57). Dois grupos de genes foram identificados como sendo os principais em camundongos com predominância de resposta do tipo 1; aqueles associados com reações agudas e os associados com apoptose, o que explica o excessivo dano tecidual comumente observado quando a resposta do tipo Th1 permanece incontrolada. Por outro lado, vários genes envolvidos no mecanismo de cura de feridas e fibrose foram regulados positivamente em animais que exibem um perfil de resposta predominantemente do tipo Th2 (56, 57). Restamos melhor entender qual a relação entre os diferentes grupos de genes e como genes inicialmente inflamatórios poderiam desencadear a expressão de genes predominantemente envolvidos no mecanismo de cura de feridas e fibrose com a cronicidade do dano.

Estudos do grupo do Prof. Wynn e de colaboradores mostraram que a diminuição da fibrose está associada com a diminuição da produção de IL13 e de IL4, além do aumento do perfil de resposta imunológica do tipo Th1 (7). Estudos *in vitro* mostraram que IL13 é um potente ativador da produção de colágeno pelos fibroblastos (58). Os efeitos da IL13 podem atuar diretamente, e não através de outros mediadores pró-fibróticos ou de alterações do balanço Th1/Th2.

A IL4 é o fator de diferenciação central para o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 (59). A IL4 tem como uma das funções a ativação de produção da IL13, mesmo que já tenha sido descrita a produção desta última independente de IL4, o que acaba por explicar algumas divergências encontradas em camundongos deficientes em IL4 ou deficientes na cadeia alfa do receptor da IL4. A IL13 é produzida em níveis muito maiores do que a IL4, o que explica o motivo de IL13 atuar como uma chave efetora do perfil Th2 *in vivo*, na ausência de sinalização via IL4 (60-62).

Como dito anteriormente, artigos recentes têm mostrado redução da fibrose em camundongos deficientes em TLR4 (63) e TLR2 (64), com uma diminuição no número de miofibroblastos intersticiais na fase posterior de nefropatia. Resta-nos saber se tal controle da fibrose é dependente do balanço Th1/Th2. TLR2 e TLR4 sinalizam através da molécula intracelular adaptadora MyD88, embora poucos estudos demonstram um papel de MyD88 na fibrose (65). Nossa hipótese é que a sinalização via MyD88 altere o balanço Th1/Th2 e consequentemente, modifique o padrão de deposição dos componentes da ECM e formação de fibrose nos rins obstruídos.

## 1.7 Subtipos de Macrófagos

Macrófagos são consideradas células efectoras imunes importantes. Élie Metchnikoff, que ganhou o Prêmio Nobel há mais de 100 anos por sua descrição da fagocitose, propôs que a chave para a imunidade era "estimular os fagócitos" (66). Desde esta descoberta, os imunologistas se ocupam com o conceito de macrófagos como células efectoras imunes e com a compreensão de como estas células participam na defesa do hospedeiro. No entanto, ao focar nas funções imunes dos macrófagos, imunologistas as vezes ignoram suas funções homeostáticas vitais, que são independentes do seu envolvimento nas respostas imunes (67). Os macrófagos têm a sua gênese na medula óssea, a partir de uma célula progenitora comum aos neutrófilos: a CFU-GM (do inglês, *colony former unity – Granulocyte/Monocyte*) (68). A

primeira célula dessa linhagem é o monoblasto, ainda pouco diferenciado, que origina o pró-monócito. Esta célula apresenta capacidade pinocítica e expressa receptores característicos de macrófagos, como o receptor para a porção Fc da imunoglobulina IgG e também o receptor de C3b. Elas dão origem aos pró-monócitos e estes dividem-se e originam os monócitos, que permanecem na medula óssea por 24 horas e depois caem na circulação sanguínea (69). No homem, os monócitos possuem meia vida de 70 horas e de 18 horas nos camundongos. Essas células migram constantemente para os diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais e adquirem propriedades funcionais tecido-específicas, permanecendo como células residentes (70). Hoje sabemos que macrófagos teciduais podem se dividir dependendo do estímulo a que são submetidos de forma dependente de M-CSF (do inglês, *monocyte-colony stimulating factor*) (71) ou IL4 (72). Dessa maneira, há populações teciduais que são originadas de forma independente dos monócitos circulantes.

Os macrófagos exercem suas diversas ações por meio de receptores presentes na membrana, tais como os receptores para mediadores endógenos, receptores opióides, adrenérgicos, para prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e fator de ativação plaquetária (PAF), receptores para reconhecimento de bactérias gram-negativas e positivas, ácidos graxos livres (TLR e CD14) e receptores de células apoptóticas (receptores “*scavengers*” e CD36) (70, 73). Durante o processo inflamatório, ocorre aumento no número de monócitos circulantes que é acompanhado pela migração destas células para o foco da lesão. No desempenho de suas funções, estas células liberam uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes e microbicidas, além de liberar mediadores inflamatórios, tais como os eicosanoides e citocinas (70, 74).

Os macrófagos podem ser polarizados de acordo com diferentes estímulos que posteriormente os subdividem em duas populações principais, mas com outras intermediárias. Macrófagos clássicos M1 possuem função tumoricida e os macrófagos alternativos M2 promovem angiogênese, remodelamento tecidual, dentre outras funções (67). Com base no processo de cicatrização de feridas, Anders *et al.* propuseram quatro tipos diferentes de macrófagos. Estes grupos são os macrófagos M1, induzidos em um contexto de uma infecção renal e necrose celular, os macrófagos M2c/supressores que são induzidos por captação de células apoptóticas, os macrófagos M2a/cicatrizadores, induzidos pela secreção de abundantes fatores de crescimento, e macrófagos fibrolíticos, envolvidos no processo de redução da cicatriz (75). Macrófagos M1 se diferenciam quando são expostos a IFN- $\gamma$  produzido pelas células T ou células *Natural Killers* (76, 77), em conjunto com o TNF- $\alpha$  produzidos pelas APC, que foram ativadas através dos TLRs (77). Além disso, a sinalização de TLR que

resulta na secreção de TNF- $\alpha$  pode ativar diretamente as células M1. Essas células são distinguidas pela expressão de níveis elevados de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (78). Após sua ativação, macrófagos do tipo M1 produzem IL1, IL6, IL12 e IL23, citocinas pró-inflamatórias potentes que podem induzir a inflamação do tecido e podem também resultar na ativação de células Th17. Finalmente, estes macrófagos são responsáveis pela morte de uma variedade de agentes patogênicos, incluindo as bactérias, vírus e parasitas, tais como *Leishmania sp.* Macrófagos M2, mais especificamente, os M2a, são ativados por IL4 que são produzidos por basófilos e mastócitos em resposta à lesão no tecido, bem como a quitina, um polímero de polissacarídeo encontrado em alguns parasitas e fungos. IL4 também pode ser produzida pelos linfócitos Th2 em conjunto com a IL13. A IL4 estimula a atividade da arginase, que converte arginina em ornitina, o que acaba por aumentar a produção de colágeno (76). Macrófagos do tipo M2 também podem ser caracterizados pela expressão do receptor da manose CD36, CD206 e IL-10 (79). A exposição *in vitro* de macrófagos diferenciados com IL4 e IL13 resulta na produção de matriz extracelular e incapacidade de matar patógenos intracelulares (79).

## 1.8 Contribuições de Macrófagos na DRC

O desenvolvimento das DRC tem sido associado com a presença de uma lesão renal aguda prévia. Tendo em vista que as lesões renais agudas apresentam um contexto inflamatório, a presença de leucócitos infiltrantes e seus produtos podem estar relacionados com a progressão da lesão, podendo ser resolvida ou tornando-se crônica (80, 81). Os macrófagos são personagens importantes no desenvolvimento tanto de doenças renais agudas quanto crônicas. No contexto das DRCs, vários estudos têm sido feitos para se determinar a participação dos macrófagos no desenvolvimento da fibrose e também na regeneração. Mais do que avaliar a participação dos macrófagos em modelos de doença crônica, hoje se busca principalmente as características dos macrófagos presentes no contexto da doença.

Nesse âmbito, o atual projeto procurou investigar a associação entre a modulação de subtipos de macrófagos e a participação de componentes da imunidade inata no contexto da DRC. Nossa hipótese é que componentes endógenos liberados durante a obstrução mecânica do ureter e a consequente morte de células renais possam se ligar a TLR e NLR, presentes principalmente em macrófagos renais, e tal resposta favoreça um perfil imune associado com o desenvolvimento de fibrose. Buscamos, portanto, qual DAMP é o responsável por iniciar a

resposta imune inata, além de averiguar o papel de células infiltrantes renais em comparação com células residentes para o desenvolvimento da fibrose. Ainda, investigamos a contribuição direta de macrófagos M1 e M2 para a deposição de componentes da ECM.



## 6 CONCLUSÕES

Tendo como base nossos resultados, podemos concluir que a formação da fibrose depende da modulação da população de macrófagos e da ativação de diferentes componentes da imunidade inata.

### 6.1 Quanto à participação das moléculas TLR2, TLR4 e MyD88 no desenvolvimento da fibrose

- ✓ A deficiência em TLR2, TLR4 ou MyD88 gera um quadro de menor fibrose renal; e
- ✓ a deficiência em tais receptores gera um menor perfil de resposta imune do tipo Th2 durante o desenvolvimento da fibrose.

### 6.2 Quanto à participação de diferentes subpopulações de macrófagos no desenvolvimento da fibrose

- ✓ Macrófagos são as células responsáveis diretamente pelo desenvolvimento da fibrose;
- ✓ Macrófagos M1, encontrados no início da injúria renal, se tornam macrófagos M2 com a cronicidade da doença; e
- ✓ A presença de macrófagos M1 no início da doença é preditiva de um quadro de fibrose observada no período tardio.

### 6.3 Quanto à participação do ácido úrico solúvel na ativação do inflamassoma NLPR3 e posterior desenvolvimento da fibrose

- ✓ O ácido úrico solúvel é um ligante endógeno liberado no contexto da lesão crônica devido a um quadro de hipóxia;
- ✓ A via do inflamassoma de NLPR3 é ativada pelo ácido úrico solúvel na UUU;
- ✓ O ácido úrico solúvel é capaz de modular macrófagos e induzir um quadro de fibrose; e
- ✓ NLPR3 é ativado por diferentes mecanismos durante o estímulo com ácido úrico.

## REFERÊNCIAS\*

1. Zatz R, Romao JE, Jr., Noronha IL. Nephrology in Latin America, with special emphasis on Brazil. *Kidney international Supplement*. 2003(83):S131-4.
2. Mangione F, Dal Canton A. The epidemic of chronic kidney disease: looking at ageing and cardiovascular disease through kidney-shaped lenses. *Journal of internal medicine*. 2010;268(5):449-55.
3. Nagle RB, Bulger RE, Cutler RE, Jervis HR, Benditt EP. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1973;28(4):456-67.
4. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney international*. 2005;68(3):925-37.
5. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 1995;47(5):1285-94.
6. Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, et al. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int*. 2001;60(3):924-34.
7. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
8. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349-63.
9. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004;1(2):98-105.
10. Liu JY, Li SR, Ji SX. [Effects of connective tissue growth factor antisense oligonucleotides on the cultured human keloid fibroblasts in vitro]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2004;20(6):454-6.
11. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8):2199-210.
12. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
13. Strutz F. Novel aspects of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(9):1526-32.
14. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110(3):341-50.
15. Stahl D, Venetz JP, Lacroix-Desmazes S, Rondeau E, Bonnin E, Kazatchkine MD, et al. Idiopathic membranous glomerulonephritis is associated with altered patterns of self-reactive IgM and IgG antibody repertoires. *Scand J Immunol*. 2001;54(5):534-42.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

16. Yang L, Liu X, Fu H, Qiang O, Huang M. [TGF beta 1 and ET-1 expression in the peripheral blood of patients with cirrhosis]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2001;32(2):202-3, 12.
17. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(6):F1060-7.
18. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-76.
19. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):3-9.
20. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15416-21.
21. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(4):621-5.
22. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008;28(3):285-7.
23. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*. 2009;21(4):317-37.
24. Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO reports*. 2001;2(8):736-42.
25. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 2002;10(2):417-26.
26. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*. 2009;27:229-65.
27. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation*. 2007;14(9):1583-9.
28. Laliberte RE, Egger J, Gabel CA. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(52):36944-51.
29. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003;425(6957):516-21.
30. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(8):2262-71.
31. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876):674-7.

32. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*. 2008;9(8):847-56.
33. Traves PG, Pimentel-Santillana M, Carrasquero LM, Perez-Sen R, Delicado EG, Luque A, et al. Selective impairment of P2Y signaling by prostaglandin E2 in macrophages: implications for Ca<sup>2+</sup>-dependent responses. *J Immunol*. 2013;190(8):4226-35.
34. Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol*. 2013;191(8):4337-47.
35. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(5):2871-9.
36. Lupfer C, Kanneganti TD. Unsolved Mysteries in NLR Biology. *Frontiers in immunology*. 2013;4:285.
37. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;430(6996):213-8.
38. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*. 2005;73(4):1907-16.
39. Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(35):E3321-30.
40. Case CL, Kohler LJ, Lima JB, Strowig T, de Zoete MR, Flavell RA, et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(5):1851-6.
41. Cunha LD, Zamboni DS. Subversion of inflammasome activation and pyroptosis by pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;3:76.
42. Schroppel B, He JC. Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. *Kidney Int*. 2006;69(5):785-7.
43. Yang LS, Yin ZX, Liao JX, Huang XD, Guo CJ, Weng SP, et al. A Toll receptor in shrimp. *Mol Immunol*. 2007;44(8):1999-2008.
44. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*. 2006;439(7073):208-11.
45. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168(3):1286-93.
46. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, et al. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*. 2002;169(4):2026-33.

47. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant.* 2005;5(5):969-75.
48. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2014;29(1):41-8.
49. Pulskens WP, Butter LM, Teske GJ, Claessen N, Dessing MC, Flavell RA, et al. Nlrp3 prevents early renal interstitial edema and vascular permeability in unilateral ureteral obstruction. *PloS one.* 2014;9(1):e85775.
50. Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest.* 1999;104(6):777-85.
51. Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF, Jr., Cheever AW, et al. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest.* 2006;116(7):2044-55.
52. Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW, et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and immunity.* 2006;74(3):1471-9.
53. Oldroyd SD, Thomas GL, Gabbiani G, El Nahas AM. Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int.* 1999;56(6):2116-27.
54. Zardi EM, Vespasiani Gentilucci U, Picardi A, Ambrosino G, Fazio VM, Dobrina A, et al. Iloprost: an adjunctive approach to chronic viral hepatitis treatment. *Medical hypotheses.* 2005;64(1):46-52.
55. Lodillinsky C, Langle Y, Guionet A, Gongora A, Baldi A, Sandes EO, et al. *Bacillus Calmette Guerin* induces fibroblast activation both directly and through macrophages in a mouse bladder cancer model. *PloS one.* 2010;5(10):e13571.
56. Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiaramonte M, Hesse M, Davis EM, et al. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *Faseb J.* 2001;15(13):2545-7.
57. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol.* 2003;171(7):3655-67.
58. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1776-84.
59. Rattner A, Nathans J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(11):860-72.
60. Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, et al. A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest.* 2002;109(2):251-9.

61. Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow derivation of pericyptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut*. 2002;50(6):752-7.
62. Moore BB, Paine R, 3rd, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol*. 2001;167(8):4368-77.
63. Leemans JC, Butter LM, Pulskens WP, Teske GJ, Claessen N, van der Poll T, et al. The role of Toll-like receptor 2 in inflammation and fibrosis during progressive renal injury. *PLoS one*. 2009;4(5):e5704.
64. Pulskens WP, Rampanelli E, Teske GJ, Butter LM, Claessen N, Luirink IK, et al. TLR4 promotes fibrosis but attenuates tubular damage in progressive renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(8):1299-308.
65. Skuginna V, Lech M, Allam R, Ryu M, Clauss S, Susanti HE, et al. Toll-like receptor signaling and SIGIRR in renal fibrosis upon unilateral ureteral obstruction. *PLoS one*. 2011;6(4):e19204.
66. Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nature immunology*. 2008;9(7):695-8. Epub 2008/06/20.
67. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
68. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors*. 2004;22(4):225-31.
69. Johnston RB, Jr. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *The New England journal of medicine*. 1988;318(12):747-52.
70. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
71. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
72. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011;332(6035):1284-8.
73. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.
74. Stefater JA, 3rd, Ren S, Lang RA, Duffield JS. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(12):743-52.
75. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney international*. 2011;80(9):915-25.
76. Ji Y, Sun S, Xu A, Bhargava P, Yang L, Lam KS, et al. Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(17):13561-71.

77. Kakutani R, Adachi Y, Takata H, Kuriki T, Ohno N. Essential role of Toll-like receptor 2 in macrophage activation by glycogen. *Glycobiology*. 2012;22(1):146-59.
78. Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cellular immunology*. 2012;280(2):164-70.
79. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, Kristariyanto Y, et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol*. 2013;190(2):565-77.
80. Nelson PJ. The contentious ontogeny of fibrosis in the kidney. *Kidney international*. 2013;84(1):14-5.
81. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. The renal mononuclear phagocytic system. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(2):194-203.
82. Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;443(3):629-34.
83. Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 1970;5(5):494-6.
84. Boltz-Nitulescu G, Wiltschke C, Holzinger C, Fellingner A, Scheiner O, Gessl A, et al. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *Journal of leukocyte biology*. 1987;41(1):83-91.
85. Takai T, Chen X, Xie Y, Vu AT, Le TA, Kinoshita H, et al. TSLP expression induced via Toll-like receptor pathways in human keratinocytes. *Methods in enzymology*. 2014;535:371-87.
86. Scalfone LK, Nel HJ, Gagliardo LF, Cameron JL, Al-Shokri S, Leifer CA, et al. Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*. 2013;81(4):1354-63.
87. Usategui A, Criado G, Izquierdo E, Del Rey MJ, Carreira PE, Ortiz P, et al. A profibrotic role for thymic stromal lymphopoietin in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(12):2018-23.
88. Tan AM, Chen HC, Pochard P, Eisenbarth SC, Herrick CA, Bottomly HK. TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen. *J Immunol*. 2010;184(7):3535-44.
89. Sung SA, Jo SK, Cho WY, Won NH, Kim HK. Reduction of renal fibrosis as a result of liposome encapsulated clodronate induced macrophage depletion after unilateral ureteral obstruction in rats. *Nephron Experimental nephrology*. 2007;105(1):e1-9.
90. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
91. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(2):317-26.

92. Takeda K, Kishimoto T, Akira S. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J Mol Med (Berl)*. 1997;75(5):317-26.
93. Rolling C, Treton D, Pellegrini S, Galanaud P, Richard Y. IL4 and IL13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells. *FEBS letters*. 1996;393(1):53-6.
94. Kim HD, Yu SJ, Kim HS, Kim YJ, Choe JM, Park YG, et al. Interleukin-4 induces senescence in human renal carcinoma cell lines through STAT6 and p38 MAPK. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(40):28743-54.
95. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(36):24035-48.
96. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
97. Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *The Journal of clinical investigation*. 1987;79(6):1564-70.
98. Plank MS, Calderon TC, Asmerom Y, Boskovic DS, Angeles DM. Biochemical measurement of neonatal hypoxia. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(54).
99. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998;9(1):143-50.
100. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. 1997;7(6):837-47.
101. Bartok E, Bauernfeind F, Khaminets MG, Jakobs C, Monks B, Fitzgerald KA, et al. iGLuc: a luciferase-based inflammasome and protease activity reporter. *Nature methods*. 2013;10(2):147-54.
102. Netea MG, van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. The role of NLRs and TLRs in the activation of the inflammasome. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(12):1867-72.
103. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6):397-411.
104. Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Jr., Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological chemistry*. 2012;393(12):1485-512.
105. Pradere JP, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease*. 2010;30(3):232-44.
106. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox TM, et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol*. 1994;153(2):753-9.
107. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annual review of immunology*. 2003;21:425-56.



108. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney international Supplement*. 2010(119):S22-6.
109. Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nature immunology*. 2010;11(4):289-93.
110. Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS, et al. Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney international*. 2010;78(4):351-62.
111. Shappell SB, Gurpinar T, Lechago J, Suki WN, Truong LD. Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1998;9(6):1008-17.
112. Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VW, Ouyang L, Chang DH, et al. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney international*. 2007;72(3):290-9.
113. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, et al. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *Journal of pharmacological sciences*. 2009;111(3):285-92.
114. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21(5):1231-9.
115. Pazar B, Ea HK, Narayan S, Kolly L, Bagnoud N, Chobaz V, et al. Basic calcium phosphate crystals induce monocyte/macrophage IL-1beta secretion through the NLRP3 inflammasome in vitro. *J Immunol*. 2011;186(4):2495-502.
116. Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol*. 2007;179(6):3926-36.
117. Anthony RM, Urban JF, Jr., Alem F, Hamed HA, Roza CT, Boucher JL, et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature medicine*. 2006;12(8):955-60.
118. Stahl M, Schupp J, Jager B, Schmid M, Zissel G, Muller-Quernheim J, et al. Lung collagens perpetuate pulmonary fibrosis via CD204 and M2 macrophage activation. *PloS one*. 2013;8(11):e81382.
119. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):583-94.
120. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001;167(11):6533-44.
121. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS pathogens*. 2009;5(4):e1000371.

122. Pesce JT, Ramalingam TR, Wilson MS, Mentink-Kane MM, Thompson RW, Cheever AW, et al. Retnla (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *PLoS pathogens*. 2009;5(4):e1000393.
123. Oh CK, Geba GP, Molfino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2010;19(115):46-54.
124. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*. 2012;188(11):5752-65.
125. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology*. 2011;12(3):231-8.
126. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(10):1732-44.
127. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
128. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 2011;54(3):999-1008.
129. Kono H, Chen CJ, Ontiveros F, Rock KL. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(6):1939-49.
130. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(6):1791-9.
131. Patschan D, Patschan S, Gobe GG, Chintala S, Goligorsky MS. Uric acid heralds ischemic tissue injury to mobilize endothelial progenitor cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(5):1516-24.
132. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(9):2936-46.
133. Johnson RJ, Lanaspa MA, Gaucher EA. Uric acid: a danger signal from the RNA world that may have a role in the epidemic of obesity, metabolic syndrome, and cardiorenal disease: evolutionary considerations. *Seminars in nephrology*. 2011;31(5):394-9.
134. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(2):675-80.
135. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-41.
136. Shi Y, Galusha SA, Rock KL. Cutting edge: elimination of an endogenous adjuvant reduces the activation of CD8 T lymphocytes to transplanted cells and in an autoimmune diabetes model. *J Immunol*. 2006;176(7):3905-8.

137. Rayamajhi M, Zak DE, Chavarria-Smith J, Vance RE, Miao EA. Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *J Immunol.* 2013;191(8):3986-9.
138. Yang J, Zhao Y, Shi J, Shao F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(35):14408-13.
139. Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol.* 2013;191(10):5230-8.