UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

Guilherme José Bottura de Barros

Efeitos do acetato na inflamação e proteção contra lesão renal aguda induzida por cisplatina em *zebrafish*

São Paulo - SP

2019

Guilherme José Bottura de Barros

Efeitos do acetato na inflamação e proteção contra lesão renal aguda induzida por cisplatina em zebrafish

Dissertação de Mestrado apresentado ao curso de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Orientação: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

São Paulo - SP

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bottura de Barros, Guilherme José
Efeitos do acetato na inflamação e proteção contra lesão renal aguda induzida por cisplatina em zebrafish / Guilherme José Bottura de Barros; orientador Niels Olsen Saraiva Câmara; coorientador Tatiana Takiishi. -- São Paulo, 2019.
62 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Lesão renal aguda. 2. Zebrafish. 3. Acetato. 4. Macrófagos. I. Olsen Saraiva Câmara, Niels, orientador. II. Takiishi, Tatiana, coorientador. III. Título.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunobiologia dos Transplantes (LIT) do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), aprovado pela comissão de ética (42/2017).

Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São *Paulo* (FAPESP) pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização do projeto (processos n°2017/05687-5 e 2017/05264-7).

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT v
1. INTRODUÇÃO 11
1.1. Lesão Renal 12
1.1.1 Lesão Renal Induzida por cisplatina 12
1.2. Zebrafish como modelo biológico 14
1.3. Macrófagos e Lesão Renal 16
1.4. Impacto da Microbiota na Lesão Renal 18
2. OBJETIVOS 20
2.3. Objetivos específicos 21
3.MATERIAL E MÉTODOS 22
3.1. Síntese do delineamento experimental 23
3.2. Animais 24
3.3. Lesão renal aguda induzida por cisplatina 24
3.4. Curva de Sobrevida 24
3.5. Análise histológica 25
3.6. Análise de integridade tubular 25
3.7. Ensaio de TUNEL 25
3.8. Imunofluorescência 25
3.9. Citometria de fluxo 26
3.10. Análise estatística 26
4. RESULTADOS 27
4.1. Determinação da dose de cisplatina e indução da Lesão Renal Aguda 28
4.2. Determinação da taxa de morte e de proliferação celular após indução de lesão 30
4.3. Avaliação do infiltrado inflamatório após 24 horas de lesão 33
4.4. Avaliação da proliferação de células MPO+ 34
4.5. Sobrevida dos animais tratados com acetato 36
4.6. Avaliação da lesão renal após o tratamento com acetato 37
4.7. Infiltrado de células MPO+ após o tratamento com acetato 38
4.8. Avaliação do perfil das células infiltrantes 39
5. DISCUSSÃO 42
6. CONCLUSÃO 47
6.1. Conclusões específicas 48

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49
8. ANEXOS 55
8.1. Parecer da comissão de ética em experimentação animal 56
8.2. Ficha do Aluno 57
9.ATIVIDADES ACADÊMICAS, CIENTÍFICAS E 59
9.1 Formação complementar 60
9.2 Capítulo de livros 60
9.3 Prêmios 60

RESUMO

BARROS, G. B. **Influência do acetato na ativação de macrófagos na lesão renal aguda induzida por cisplatina em *zebrafish*.** 2019. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2019.

Os rins são órgãos responsáveis por gerir um conjunto de tarefas fisiológicas que mantém a homeostase do organismo, dentre elas a remoção de metabólitos tóxicos do sangue, produção de hormônios e a regulação do balanço de eletrólitos. As lesões renais agudas (LRA) levam a uma rápida perda das funções do órgão, em horas ou dias. Durante o processo de lesão tecidual, o sistema imune atua, muitas vezes, de forma prejudicial ao órgão. Uma das principais células envolvidas nesse processo de lesão tecidual são os macrófagos, que participam durante a primeira fase da LRA, já diferenciados em um perfil mais pró inflamatório, descritos como macrófagos M1, e, também, durante a fase de reparo do tecido, diferenciados em macrófagos M2. Produtos como o acetato, um dos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) mais abundantes, oriundos do metabolismo de bactérias pertencentes à microbiota intestinal são capazes de modular a resposta inflamatória em modelos de lesão tecidual, porém a influência desses produtos, na função, migração e diferenciação dos macrófagos no contexto da LRA ainda não foi bem descrita. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do acetato nas funções biológicas dos macrófagos na LRA. Para isso, desenvolvemos um modelo de LRA induzida por cisplatina em peixes *Danio rerio* adultos, injetando intraperitonealmente (ip) diferentes doses de cisplatina e avaliando sobrevida e progressão da doença por histologia, imunofluorescência e análise do infiltrado celular. Em seguida para avaliar o efeito do acetato na LRA, os animais foram submetidos ao tratamento com acetato, por gavagem, e depois, injetados com cisplatina para analise de sobrevida, extensão da lesão renal por histologia e infiltrado de células do sistema imune no rim. Os resultados mostraram que a injeção de cisplatina (0,1275 mg/g) induz lesão tecidual no rim 24 hrs pós-injeção com perda de estrutura tubular, levando a morte de 80% dos animais. Porém, os animais sobreviventes foram capazes de regenerar o tecido lesado oito dias após a injeção. Também se observou aumento do infiltrado inflamatório e alta taxa de morte celular, concomitantes a altas taxas de proliferação de células não imunes. O acetato foi capaz de aumentar a sobrevida dos animais injetados com cisplatina e reduzir o dano induzido pela droga no rim, por outro lado, não alterou a atuação das células inflamatórias do sistema imune. Em conclusão, o modelo de injeção intraperitoneal de cisplatina foi capaz de induzir uma LRA em *zebrafish* adulto, com o máximo de prejuízo às 24 hpi e com recuperação e regeneração do tecido renal em uma semana, demonstrando ser um ótimo modelo para o estudo da regeneração no rim. O acetato parece ser promissor no tratamento da LRA experimental, pois diminui a taxa de morte induzida pela cisplatina.

Palavras chave: Lesão Renal Aguda, Acetato, Zebrafish, Macrófagos

ABSTRACT

BARROS, G. B. **The influence of acetate on the activation of macrophages in acute renal injury induced by cisplatin in zebrafish.** 2019. Dissertation – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2019.

The kidneys are organs responsible for managing a set of physiological tasks that maintain the homeostasis of the organism, among them the removal of toxic metabolites from the blood, production of hormones and the regulation of electrolyte balance. Acute kidney injury (AKI) leads to a rapid loss of organ function in hours or days. During the process of tissue injury, the immune system often initially acts in a detrimental way to the organ. One of the main cells involved in this process of tissue injury are macrophages, which participate during the first phase of AKI, already differentiated in a more proinflammatory profile, described as macrophages M1, and then during the tissue repair phase, differentiated into macrophages M2. Products derived from the metabolism of bacteria belonging to the intestinal microbiota, such as acetate, one of the main short chain fatty acids (SCFA), are able ofmodulating the inflammatory response in tissue injury models, but the influence of these products on the function, migration and differentiation of macrophages in the context of the AKI has not yet been well described. Thus the objective of this work was to evaluate the effect of acetate on the biological functions of macrophages in AKI. First, we developed a cisplatin-induced AKI model in Danio rerio adult fish, injecting different doses of cisplatin intraperitoneally (ip) and evaluating the survival and progression of the disease by histology, immunofluorescence and analysis of the cellular infiltrate. Subsequently, the animals were treated with acetate by gavage and then injected with cisplatin and analyzed for survival, the extent of the renal lesion by histology and the immune cell infiltrate in the kidney. The results showed that the injection of cisplatin (0,1275 mg/g) induced tissue damage in the kidney 24 h post-injection with loss of tubular structure, leading to the death of 80% of the animals. However, the surviving animals were able to regenerate the injured tissue eight days after the injection. There was also an increase in inflammatory infiltrate and a high rate of cell death, concomitant with high rates of proliferation of non-immune cells.

The acetate was able to increase the survival of the animals injected with cisplatin and reduce the damage induced by the drug in the kidney, on the other hand, did not alter the performance of inflammatory cells of the immune system. In conclusion, the intraperitoneal cisplatin injection model was able to induce AKI in adult zebrafish, with maximum damage at 24 hpi and recovery and regeneration of renal tissue in one week, proving to be a good model for the study of regeneration in the kidney. Acetate appears to be promising in the treatment of experimental AKI, as it decreases the rate of cisplatin-induced death.

Keywords: Acute Kidney Injury. Acetate. Zebrafish. Macrophages

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Renal

Os rins são os órgãos responsáveis por diversas tarefas fisiológicas que mantêm o balanço do organismo. Estas incluem a excreção urinária de metabólitos, a conservação de nutrientes, regulação hidroeletrolítica e o balanço ácido/base. As lesões no tecido renal podem ocorrer de diversas modos, que dependendo da gravidade podem levar a uma rápida perda das funções em horas ou dias, causando o que se conhece como lesão renal aguda (LRA) (1). Clinicamente, a LRA é definida como uma queda na taxa de filtração glomerular e consequente comprometimento da depuração do sangue, e é, clinicamente, diagnosticada pela detecção de níveis elevados séricos de creatinina e sanguíneos de ureia (2). As características morfológicas da LRA estabelecidas incluem a obliteração e perda da borda em escova do túbulo proximal, áreas focais de dilatação tubular proximal e presença de cilindros tubulares. A necrose é discreta e restrita às regiões medulares altamente suscetíveis a hipóxia (3, 4).

As doenças renais (DR) são tipicamente classificadas como agudas ou crônicas (DRC). Enquanto as LRA são mais comumente associadas com infecções bacterianas, sepse, exposição a drogas potencialmente nefrotóxicas e dano causado por isquemia-reperfusão (I/R), podendo progredir para forma crônica (5-7), a forma crônica, mais comumente, resulta de complicações relacionadas à diabetes, hipertensão e glomerulonefrites (7). As lesões agudas têm sido palco para diversas pesquisas uma vez que sua incidência tem aumentado nos últimos anos chegando a 200 a 300 pessoas por milhão de habitantes precisando de métodos de substituição do órgão (8). Dentre as LRA, uma importante porcentagem dos casos se deve a nefrotoxicidade e por isso um dos modelos de maior importância para os estudos de lesão renal usam a cisplatina como indutor da lesão.

1.1.1 Lesão Renal Induzida por cisplatina

A cisplatina é um fármaco usado para o tratamento de diversos tipos de neoplasias, como testículo, ovário e garganta. Seu mecanismo de ação se baseia na ligação ao DNA e a consequente indução de vias de morte celular. Porém, devido ao seu baixo peso molecular, sendo sua massa igual a 300g/mol, e dissociado de carga, a cisplatina é facilmente filtrada pelos glomérulos e acumula nas células parenquimais renais. A concentração da cisplatina nessa região chega a ser cinco vezes maior que a concentração no soro, e esse acúmulo no rim contribui de forma fundamental para a nefrotoxicidade. Por esse motivo, a nefrotoxicidade decorrente do tratamento com cisplatina chega a 30% dos pacientes, sendo que tal marca foi atingida somente

após o desenvolvimento de técnicas de diálise e hidratação, uma vez que antes desses mecanismos de prevenção, a nefrotoxicidade atingia 100% dos pacientes (9).

A incorporação da cisplatina pelas células renais é feita de maneira ativa por transportadores, dentre os quais os principais são os Ctr1 e a família dos "Organic cation transporters" (OCTs) (10, 11). Uma vez dentro das células, a cisplatina se torna altamente reativa e pode se ligar a moléculas como a glutationa, ao RNA, ao DNA e, também, a proteínas. A ligação com o DNA inibe a replicação e transcrição de genes, tornando, assim, o dano ao DNA um dos principais componentes da toxicidade da cisplatina (12, 13). A fisiopatologia da LRA induzida por cisplatina envolve quatro principais mecanismos: o primeiro é o dano ao túbulo proximal, o segundo decorre do estresse oxidativo, o terceiro mecanismo provém do processo inflamatório e, por fim, o quarto se deve ao dano vascular no rim (14).

O dano ao túbulo proximal ocorre principalmente em decorrência da ativação de vias apoptóticas nas células, como por exemplo, a ativação de Bax e de p53. Estudos mostraram que em concentrações baixas, a cisplatina leva a morte celular por apoptose, porém, em altas concentrações, ela pode levar a morte por necrose (14).

Já o estresse oxidativo pode acontecer de duas principais formas, a primeira se deve a ligação da cisplatina com a glutationa, levando a sua depleção e impossibilitando sua oxidação, o que gera um processo pró-estresse oxidativo (12). A segunda maneira acredita-se ser decorrente de alterações na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, levando a uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (15).

O processo inflamatório por sua vez, deriva da produção de diversas citocinas como IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-33 e IL-18. A produção de citocinas pró-inflamatórias pode ser decorrente dos processos de estresse oxidativo e/ou da necrose secundária durante o dano ao túbulo proximal (16).

O dano vascular, por fim, tem sido atribuído a vasoconstrição causada pela disfunção endotelial, gerada principalmente por um acúmulo de cálcio nas células mesangiais nos glomérulos, o que gera uma lesão tecidual por baixa perfusão com hipóxia (17).

Experimentalmente, a lesão renal induzida por cisplatina envolve diversos mecanismos. Recentemente, Watanabe e colaboradores (18) relacionaram uma proteína envolvida na coagulação, chamada *Protease-activated receptor 2*, com o dano no tecido renal induzido pela cisplatina. Em seu experimento, o grupo utilizou camundongos *knockout* para a proteína e identificaram uma redução no processo inflamatório após o insulto tóxico. A relação entre a lesão renal por cisplatina e os efeitos inflamatórios envolvidos no processo também foi discutino

por Magaiver e seus colaboradores (19), em artigo publicado recentemente, os autores discutem o papel de dois receptores fundamentais para o sistema imunológico, *Toll like receptor 2 e Toll like receptor 4*. O grupo identificou que os receptores teriam papeis diferentes no processo da lesão, sendo que o TLR2 teria um papel protetor, uma vez que ele estimula o processo de autofagia.

1.2 *Zebrafish* como modelo biológico

Durante muitos anos as pesquisas científicas se estabeleceram utilizando mamíferos como modelos experimentais, como ratos e camundongos, pela sua proximidade genética com os seres humanos e pela fácil manipulação. Porém, nos últimos 15 anos, o *zebrafish*, um pequeno peixe teleósteo tropical, tem surgido como uma excelente ferramenta para estudar algumas doenças humanas (20).

O *zebrafish* possui o sequenciamento completo do genoma, com uma semelhança de 70% com genoma humano (21). Além disso, o zebrafish é ideal para trabalho experimental por características como: tamanho pequeno do adulto (≈4-5 cm), alta fecundidade (um só cruzamento pode gerar mais de 200 ovos), gestação ex útero, transparência óptica da larva durante seu desenvolvimento e a rápida organogênese, permitindo a aplicação de técnicas de imagem, para análises in vivo em tempo real. Além disso, o custo de manutenção do *zebrafish* é menor que outros animais de experimentação.

O *zebrafish* tem vida média de 5 a 6 anos e é caracterizado como um peixe de água doce. Sendo assim, os animais ficam imersos em um meio hipotônico, com baixa concentração de sais, o que faz com que por osmose eles absorvam uma grande quantidade de água. Portanto, é uma das principais funções do rim desses animais filtrar essa água e não deixar que ela acumule no interior do peixe.

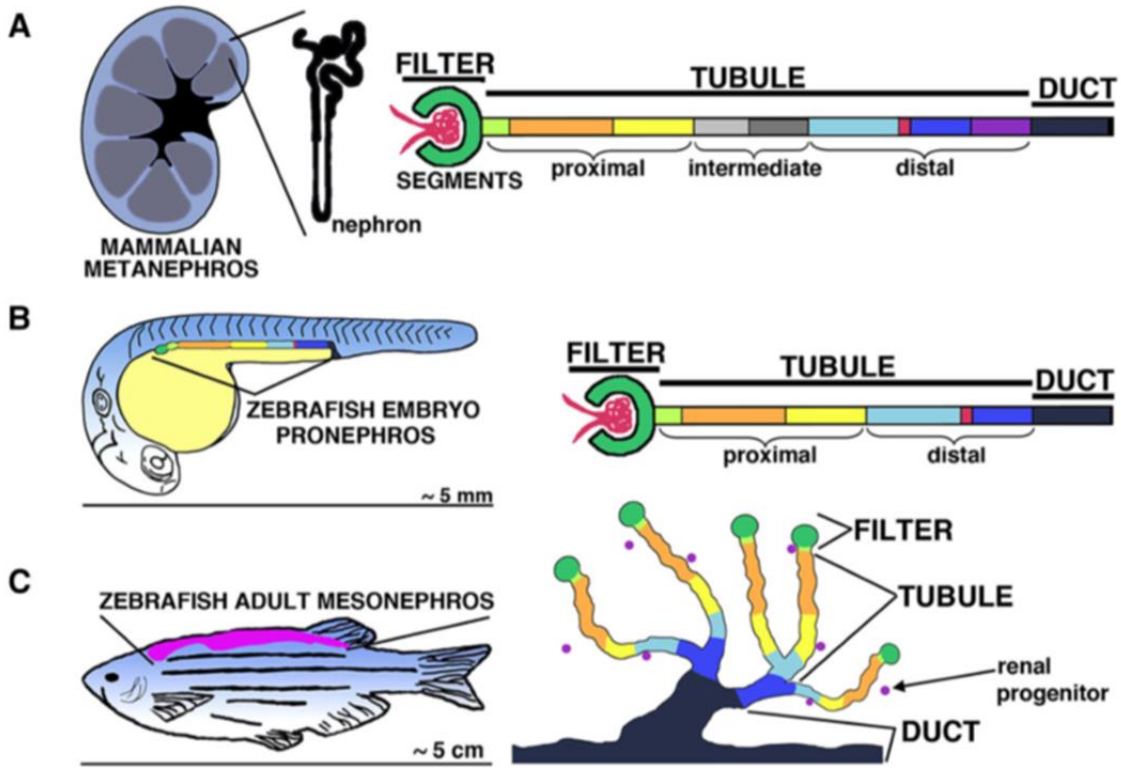


Figura 1: A morfologia do rim é conservada entre os vertebrados. A. Rim de um mamífero. **B.** Pronefros da larva de *zebrafish*, composto por apenas dois néfrons, sendo este, um glomérulo, o túbulo proximal, o distal e um ducto coletor. **C.** O rim do *zebrafish* adulto apresenta a complexidade funcional similar ao dos mamíferos, apesar de sua diferença anatômica, o rim possui diversos glomérulos ligados aos túbulos que por sua vez se ligam ao ducto. Ilustração obtida de McKee, et.al Current Pathobiology Reports 3:2 (2015).

A formação do rim do *zebrafish* se inicia nas larvas, que geram um par de nefrons bilaterais e sem o segmento intermediário do túbulo (Figura 1 B). Conforme o peixe se desenvolve, novos nefrons surgem para suprir a necessidade de filtração do animal adulto até que passa do estágio de pró-néfron para mesonéfron, que se caracteriza por um único órgão central aplanado localizado na região dorsal do corpo (Figura 1 C). Este tem funções de filtração de água e do sangue e de órgão hematopoiético, equivalente à medula ossea em mamíferos.

Anatomicamente, o rim de um peixe adulto consiste em três partes principais: a cabeça, o tronco e a cauda, que tem organização funcional como a do córtex e da medula renal em humanos. Os néfrons apresentam conservação anatômica dos segmentos e da composição celular, são altamente bifurcados e drenam para um único ducto coletor (22-24). Entretanto, o rim do zebrafish possui algumas propriedades interessantes que não são encontradas em mamíferos, como a capacidade de regeneração do órgão sem a formação de uma cicatriz

fibrótica e a habilidade de gerar néfrons durante toda sua vida (neonefrogênese), o que faz este animal ser muito usado em estudos de processos de recuperação e regeneração pós lesão renal. Apesar das vantagens desse modelo de estudo, o *zebrafish* ainda é pouco utilizado no país, e estudos acerca do papel dos macrófagos no percurso da lesão renal ainda caminham, tendo sido caracterizados no *zebrafish* os perfis de macrófagos M1 e M2, apenas recentemente (25).

1.3. Macrófagos e Lesão Renal

Os macrófagos são classificados como fagócitos mononucleares e são considerados originários de um progenitor mielóide comum na medula óssea no adulto. Macrófagos são responsáveis por uma ampla gama de papéis críticos à homeostase do organismo, como: vigilância e resposta imune, reconhecimento de agentes patogênicos, agressões, indução de inflamação e reparo tecidual (26,27). Estas células estão presentes no início do desenvolvimento renal, e, experimentalmente, a adição de *colony stimulating factor 1* (CSF-1), impulsionam o desenvolvimento de néfrons, sugerindo a participação dos macrófagos no desenvolvimento renal embrionário (28).

Eles são um componente essencial da imunidade inata e também, por serem células apresentadoras de antígenos, fazem a comunicação com o sistema imune adaptativo, recrutando outras células como os linfócitos. Macrófagos são células altamente heterogêneas e são divididos em subpopulações com base em distintas funções e localização anatômica (29). Os macrófagos podem alterar seu fenótipo e função em resposta a sinais microambientais durante infecções ou lesões teciduais (30). A diversidade de funções dos macrófagos levou a diferentes sistemas de classificação, sendo comumente referidos como macrófagos clásicamente ativados (macrófagos M1), diferenciados após exposição à LPS ou IFN-γ, e macrófagos ativados alternativamente (macrófagos M2), induzidos por citocinas, como IL-4 e IL-10 (31)(Figura 2).

Os macrófagos M1 produzem grandes quantidades e um grande número de mediadores pró-inflamatórios que medeiam respostas antimicrobianas e a imunidade antitumoral. Em contraste, os macrófagos M2 têm funções pró-resolutivas e estão envolvidos na contenção de parasitas, na cicatrização de feridas e na fibrose (30,32). Os macrófagos ativados alternativamente podem ser subdivididos em pelo menos três subgrupos: macrófagos M2a induzidos por IL-4 e/ou IL-13, macrófagos M2b induzidos por complexos imunes e macrófagos M2c induzidos por IL-10, TGF-β ou glicocorticóides (33). No entanto, essas classificações *in vitro* de macrófagos não refletem necessariamente seus verdadeiros fenótipos *in vivo*. Acredita-se que os macrófagos apresentam um espectro de fenótipos ativados, ao invés de subpopulações estáveis (34, 35).

Em relação ao processo da lesão renal, os macrófagos, dependendo do seu perfil de ativação, podem exacerbar a inflamação ou auxiliar na regeneração renal (36, 37). Macrófagos M1 secretam citocinas pró-inflamatórias e ROS, que amplificam a resposta inflamatória e agravam a lesão renal (36-38). Inversamente, macrófagos M2 liberam moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β e fatores de crescimento que atenuam a inflamação renal e promovem a regeneração tecidual. Dessa forma, a polarização dos macrófagos é um determinante decisivo no desfecho da DRC e LRA (36, 37).

Numerosas pesquisas durante esta última década evidenciam que os macrófagos M1 agravam a doença renal. Alguns estudos, por exemplo, reportaram um grau de correlação entre infiltração destas células e severidade da doença renal, tanto em humanos quanto em camundongos (39-45). Posteriormente, ensaios pré-clínicos, utilizando a depleção de macrófagos observaram a redução do infiltrado no parênquima renal e melhora nos parâmetros de função renal (37). Por esses motivos, frequentemente os macrófagos têm sido associados com o papel patogênico durante a inflamação renal. Porém, esta mesma célula pode ter um papel oposto na lesão renal. Os macrófagos caracterizados como M2 já foram identificados como células envolvidas no reparo e na remodelação do tecido renal após a lesão tecidual (27,46). Wang et al. mostraram que a injeção da subclasse M2a em camundongos com glomerulonefrite reduzia o dano renal, com menor disfunção renal, proteinúria e dano tubular (47). Ainda, a transferência dos M2a reduziu a expressão de moléculas pró-inflamatórias, e, consequentemente, menor infiltração renal de macrófagos.

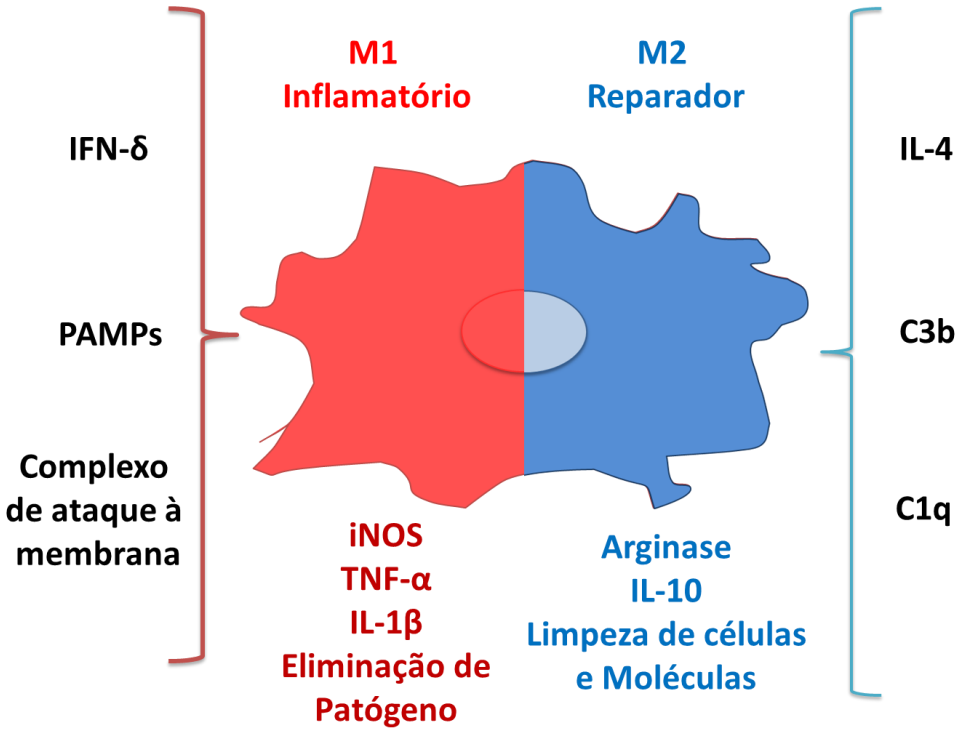


Figura 2: Diferenciação de Macrófagos. Os macrófagos são células plásticas que podem se diferenciar para determinado perfil de ativação dependendo do estímulo que recebe. Seus perfis no geral atuam de forma antagônica sendo um considerado pró inflamatório e o outro anti inflamatório. O perfil M1 é ativado por sinais como PAMPs, IFN-γ e alguns componentes do sistema complemento e por essa razão são estimulados a exacerbar o processo de inflamação, principalmente pela liberação de citocinas como IL-1β e de espécies reativas de nitrogênio. Já o perfil M2, atua no reparo dos tecidos, sendo estimulado por IL-4, mas também por IL-10. Sendo assim o macrófago M2 é responsável pela limpeza do microambiente, removendo células mortas e moléculas potencialmente ativadoras das células do sistema imune. Adaptado de Bohlson SS,. et al. Front. Immunol. (2014)

1.4. Impacto da Microbiota na Lesão Renal

A literatura vem elucidando uma relação estreita entre o intestino e o rim (50, 51). Já existem dados que revelam que modificações na composição da microbiota podem afetar o desenvolvimento de doenças renais e que a inflamação gerada durante o processo de uma doença renal está associada à produção de toxinas e metabólitos e ao aumento de permeabilidade intestinal (52, 53).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são produtos da fermentação de carboidratos complexos proveniente da dieta, pela microbiota intestinal, especialmente por bactérias anaeróbicas (54). Acetato, butirato e propionato são os principais AGCC e eles já foram

relacionados a melhoria em vários modelos experimentais de doenças inflamatórias em diversos órgãos (55-57). A administração desses ácidos graxos em camundongos diminui a lesão renal, após o insulto desencadeado pela I/R (54). Neste trabalho, a administração de bactérias produtoras de AGCC culminaram na proteção tecidual similar a administração direta dos ácidos graxos. Outro artigo, publicado por Wu e colegas identificou que, em modelo animal, uma dieta rica em fibras pode induzir a tolerância ao transplante de rim. No mesmo artigo, os autores atribuíram o fenômeno a capacidade dos AGCC de induzirem uma subpopulação de células T reguladoras (58). A relação entre os ácidos graxos e o rim tem estado cada vez mais clara e confirmando a influência dos produtos originários da microbiota na lesão renal. Recentemente, o grupo do Prof. Hamid Rabb publicou uma revisão que elucida a conversa entre a microbiota intestinal e a LRA (59), enfatizando diversos aspectos importantes da atuação deles no sistema imunológico, como a indução de células T reguladoras e a polarização de macrófagos para um perfil mais reparador.

Uma vez que a LRA está envolvida com um importante processo inflamatório e os AGCC possuem propriedades antiinflamatórias, nosso intuído foi investigar se o microambiente anti-inflamatório induzido por um AGCC, o acetato, poderiam levar a diferencação de macrófagos para um perfil mais reparador, melhorando o prognóstico da doença.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVO

Estudar a influência do acetato na proteção contra a lesão renal aguda induzida por cisplatina e sobre o infiltrado inflamatório no rim.

2.3. Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo de LRA induzida por cisplatina em adultos de *zebrafish*;
- Verificar a eficiência do tratamento com acetato na LRA;
- Caracterizar o infiltrado mielóide na LRA por cisplatina; e
- Identificar o papel dos macrófagos na lesão e se o tratamento com acetato influência no perfil de ativação dessas células.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese do delineamento experimental

Peixes controles (CTL) e peixes transgênicos com marcadores fluorescentes para a molécula de mieloperoxidade e lisozima foram utilizados nos experimentos propostos buscando identificar populações celulares do sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos (Figura 3A). Resumidamente, os peixes em estágio adulto do desenvolvimento (a partir de 3 meses) foram submetidos à injeção intraperitoneal (ip) de diferentes doses de cisplatina até identificarmos a dose adequada para o projeto (Figura 3B). O rim dos animais foi coletado e direcionado para os diferentes experimentos (Figura 3B). Para os experimentos com acetato os peixes foram submetidos ao processo de gavagem e após dois dias receberam a injeção de cisplatina (Figura 3B)

A)

Descrição dos grupos experimentais			
Peixe	***Background* genético**	**Sexo**	**Idade (meses)**
Controle	AB	Fêmeas	5-9
Tg(MPO:GFP)	AB	Fêmeas	5-9
Tg(Lyz:dsRed)	AB	Fêmeas	5-9
Tg(MPO:GFP;Lyz:dsRed	AB	Fêmeas	5-9
Tg(MPEG:Mcherry;TNF-α:GFP	AB	Fêmeas	5-9

B)

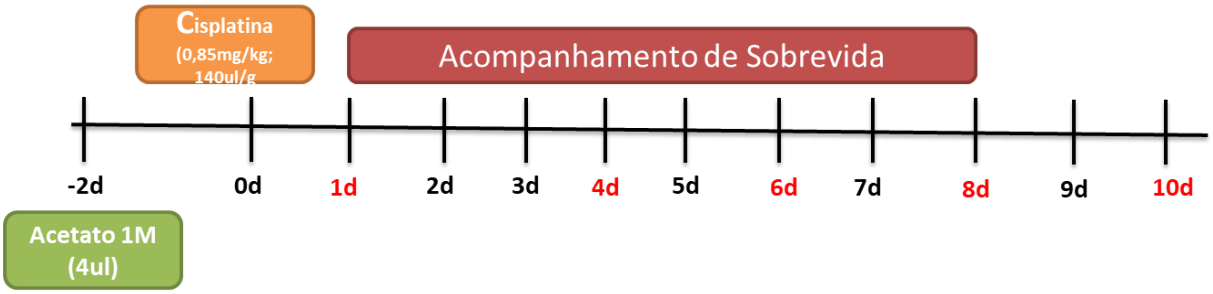


Figura 3. Delineamento experimental. A. Tabela com descrição das linhagens de peixes e dos grupos experimentais utilizados até o momento. **B,** Esquema de indução de lesão renal aguda por cisplatina e do tratamento com acetato. Dias em vermelho representam coleta de material para histologia. Os demais experimentos foram realizados um dia após a injeção de cisplatina.

3.2. Animais

Os experimentos foram realizados com peixes *Danio rerio* fêmeas das linhagens AB (selvagem), adultos (entre 5 a 9 meses), Tg(BAC-MPO:GFP) (marca neutrófilos com fluorescência verde), Tg(Lyz:dsRed) (marca células mieloides com fluorescência vermelha) e o duplo trangênico Tg(BAC-MPO:GFP;Lyz:dsRed)(células mieloides em vermelho e neutrófilos em verde) (Figura 3A).

Os animais foram mantidos em tanques de 3L (15 animais por tanque), com fotoperíodo 14/10 e temperaturas controlados e recebendo dieta balanceada duas vezes por dia, indicados como padrões para manter a saúde dos peixes (https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html). Todos os procedimentos realizados foram de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo n°42/2017).

3.3. Lesão renal aguda induzida por cisplatina

O modelo de LRA foi induzido pela administração de cisplatina (C-PLATIN, Blau Farmacêutica – Cotia, SP), uma droga antitumoral com efeitos adversos para os rins quando atinge doses mais altas que o recomendado. Experimentos que utilizam cisplatina como indutor de lesão renal já foram descritos em camundongos e larvas de *zebrafish* (37, 38), porém ainda não existem dados em adultos de *zebrafish*. Por tanto, a partir das informações extraídas da utilização em camundongos e em larvas, nós testamos diferentes doses e concentrações, injetadas no peritônio, até chegar à dose de 0,1275 mg/g de peso do animal. Controles receberam NaCl 0,9% no mesmo volume dos peixes tratados. Para a injeção, nós anestesiamos os animais, utilizamos um papel filtro para remover a umidade e pesamos os animais, após a pesagem os animais foram posicionados em uma esponja úmida com o ventre voltado para cima, de forma a facilitar a injeção. Após a injeção os animais foram colocados em um tanque oxigenado de recuperação e aguardamos a retomada dos movimentos do animal.

3.4. Curva de Sobrevida

O primeiro parâmetro para avaliação do efeito biológico da dose de cisplatina foi o estabelecimento de uma curva de sobrevida. Para isso injetamos (i.p.) 0,1275 mg/g em um grupo e o volume compatível de NaCl (0,9%) em outro grupo que foi utilizado como controle. Para os experimentos com acetato, os animais foram submetidos a gavagem com 4uL de acetato 1M dois dias antes da injeção intraperitoneal. Para a gavagem os animais foram anestesiados e posicionados verticalmente com a cabeça voltada para cima, e para a aplicação do acetato

utilizamos uma pipeta acoplada a uma ponteira microloader (Eppendorf). Após a injeção os animais foram acompanhados durante 10 dias. As curvas foram feitas com 10 animais por grupo e repetidas duas vezes cada.

3.5. Análise histológica

Para os cortes histológicos, os adultos de *zebrafish* foram eutanasiados em diferentes tempos e fixados com paraformaldeído 4%/1xPBS/0,1% DMSO e deixados *overnight* a 4°C. Os rins foram dissecados, lavados em etanol 70% e mantidos a 4˚C. Posteriormente, os rins foram processados para sua inclusão em parafina, cortados em espessura de 5-8um e corados com hematoxilina e eosina.

3.6. Análise de integridade tubular

Para analisar a integridade tubular, nós injetamos cisplatina (i.p.) ou NaCl e após 14 horas foi injetado 20µL de Dextran-FITC (500kD) (Sigma - FD500S) também intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados 24h após a injeção de cisplatina. Dessa forma o FITC-Dextran se manteve no organismo durante 10 horas, tempo necessário para ser filtrado pelo rim. Os rins foram coletados e em seguida visualizados em microscópio de fluorescência.

3.7. Ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL foi realizado em lâminas parafinizadas utilizando o kit enzimático (Roche Diagnostics - 11684795910). As lâminas foram tratadas com uma solução de proteinase K para a permeabilização, para isso foram incubadas com a solução por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Por fim foram incubadas com o mix de *Enzyme Solution e Label Solution* na proporção de 1:10 por duas horas.

3.8. Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada em corte de tecido congelado. Para a preparação do tecido, após a eutanásia dos animais o rim foi coletado, mantendo sua integridade e fixado em Paraformaldeído 4% + DMSO 1% *overnight*. Os rins foram lavados em Dimetilsulfóxido e logo em PBS 1 X, e foram transferidos para sucrose 30% *overnight* a 4˚C e logo em Sucrose 30% + O.C.T na proporção de 1:1 *overnight* a 4˚C e por último em *Tissue Tek O.C.T. overnight* a 4˚C.Posteriormente os rins foram congelados em O.C.T puro e levados para corte de 5-8µm no criostato. Para a imunofluorescência as lâminas foram colocadas em câmara úmida e os cortes separados com caneta hidrofóbica e hidratados com PBS 1x. Em seguida foram permeabilizadas e bloqueadas com Triton 1,5% + SFB 10% + PBS 1x por 45 minutos a temperatura ambiente. Em

seguida foram incubados com os anticorpos primários para Histona H3 fosforilada (Abcam - ab14955) (1:200) e anti-GFP (Invitrogen - ma5-15256) (1:200) por 36 horas. Após a lavagem com PBS as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários por duas horas e então marcadas com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (1:500) por 5 minutos. Por fim foram montadas em meio hidrofílico e seladas com esmalte. A quantificação da imunofluorescência foi feita pela média do número total de células positivas em cada campo de 20x do microscópio. Três campos por amostra foram computados, sendo três amostras por grupo.

3.9. Citometria de fluxo

Para avaliação do infiltrado celular por citometria de fluxo, as células renais de animais transgênicos (BAC-MPO:GFP) foram dissociadas do rim após passarem pelo *cellstrainer* e em seguida incubadas com marcador de viabilidade (LIVE&DEAD, Life Technologies, USA) por 30 minutos a 4ºC. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas por 5 minutos a 300x*g* e levadas para leitura em citômetro de fluxo. A aquisição das células marcadas foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Bioscience, EUA) e as análises realizadas pelo software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA). Para as análises, o posicionamento das seleções (*gates*) foram inicialmente feitas em FSC-H vs. FSC-A, seguida da seleção de todas as células na avaliação FSC-A vs. SSC-A e depois em células negativas para a marcação Live&Dead.

3.10. Análise estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com auxílio do software Graphpad Prism® 6. Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea utilizou-se testes paramétricos. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana ou em que as variâncias foram estatisticamente significativas entre os grupos utilizou-se testes não paramétricos. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Para análises de mortalidade foram utilizados teste de LogRank e Gehan-Breslow-Wilcoxon. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da dose de cisplatina e indução da Lesão Renal Aguda

Nosso primeiro experimento mirava identificar uma concentração de cisplatina que induzisse lesão renal aguda, tendo como leitura de falha renal, a retenção de líquidos pelo animal (inchaço abdominal) e morte. Para isso diferentes doses e concentrações foram testadas, buscando aquela que levasse a um processo em que a morte dos animais ocorresse de modo gradual. Dentro das doses testadas, a dose de 0,1275mg/g foi a que apresentou resultados mais adequados. Na curva de sobrevida podemos observar que a morte dos animais tratados com cisplatina é contínua durantes os primeiros dias, causando mortalidade mais acentuada nas primeiras 24 horas e progredindo até 80% de morte no quinto dia, no qual os animais parecem se estabilizar e seguem vivos até o fim da análise (Figura 4A). Os animais controles foram tratados com NaCl (0,9%) e receberam o mesmo volume/peso que os animais do grupo cisplatina, mostrando que a morte dos peixes não está relacionado com o volume injetado mas com o efeito tóxico da cisplatina. Ainda a fim de padronizar nosso tratamento nós testamos se o gênero dos peixes poderia influir na sobrevida, por isso comparamos o mortalidade em fêmeas com a mortalidade em machos. Nossa escolha inicial de utilizar fêmeas se deu devido a estas possuírem um maior espaço peritoneal, para carregar os ovos e, portanto, maior facilidade na manipulação e injeção de maiores volumes. Ao compararmos a sobrevida de fêmeas com os peixes machos, não observamos diferenças, ambas as curvas progridem de modo similar ao longo do tempo (Figura 4A).

Em seguida, nós questionamos se a morte observada na curva de sobrevida estaria, de fato, relacionada com lesão no rim. Para verificar a lesão e acompanhar sua progressão nós injetamos cisplatina nos animais e realizamos uma cinética da progressão da doença coletando tecido renal em diferentes dias. Foi possível observar que enquanto os animais controles apresentaram túbulos bem delimitados (Figura 4B - seta em preto), e estrutura do tecido preservada, após 24 horas da injeção de cisplatina a arquitetura dos túbulos renais se vê afetada e suas células possuem características de células em apoptose como encolhimento da célula, hipercromasia e picnose nuclear (Figura 4B – seta em amarelo). Quatro dias após a injeção observamos que a estrutura do tecido renal parece estar se remodelando e já é possível observar túbulos íntegros. Aos oito dias, o rim parece estar retomando sua arquitetura, e pode-se encontrar evidências de neo-formação de túbulos (Figura 4B - seta verde) e mais uma vez, túbulos íntegros similares aos dos animais controles.

Uma vez que a histologia evidenciou a lesão tubular, decidimos avaliar a função renal. Em modelos animais mamíferos e em humanos é comum a mensuração de produtos residuais do metabolismo como indicativo da filtração glomerular, equivalente à função renal. Para isso, são

dosados os níveis de creatinina e ureia no sangue. No entanto, no zebrafish a extração de sangue envolve uma dificuldade técnica muito grande e estes métodos em particular estão ainda sendo adaptados em nosso laboratório. Por esse motivo, aplicamos outra técnica que evidencia a capacidade de filtração de sangue pelo rim. Para isso injetamos FITC-dextran, uma macromolécula acoplada a um marcador fluorescente, nos animais tratados com cisplatina ou com NaCl , para avaliar sua filtração pelo rim. A marcação com FITC-dextran nos mostrou que, de fato, após 24 horas, os animais injetados com cisplatina apresentam rins nos quais os túbulos perdem sua forma e deixam extravasar o conteúdo filtrado (Figura 4C). Esse fenômeno já havia sido descrito na literatura, porém em um tratamento com gentamicina (Diep, Cuong Q., et al. 2011). Com a comprovação de que a concentração e regime de cisplatina escolhido eram adequados como modelo de LRA nosso próximo objetivo foi caracterizar esse modelo e entender os eventos celulares por trás da lesão renal.

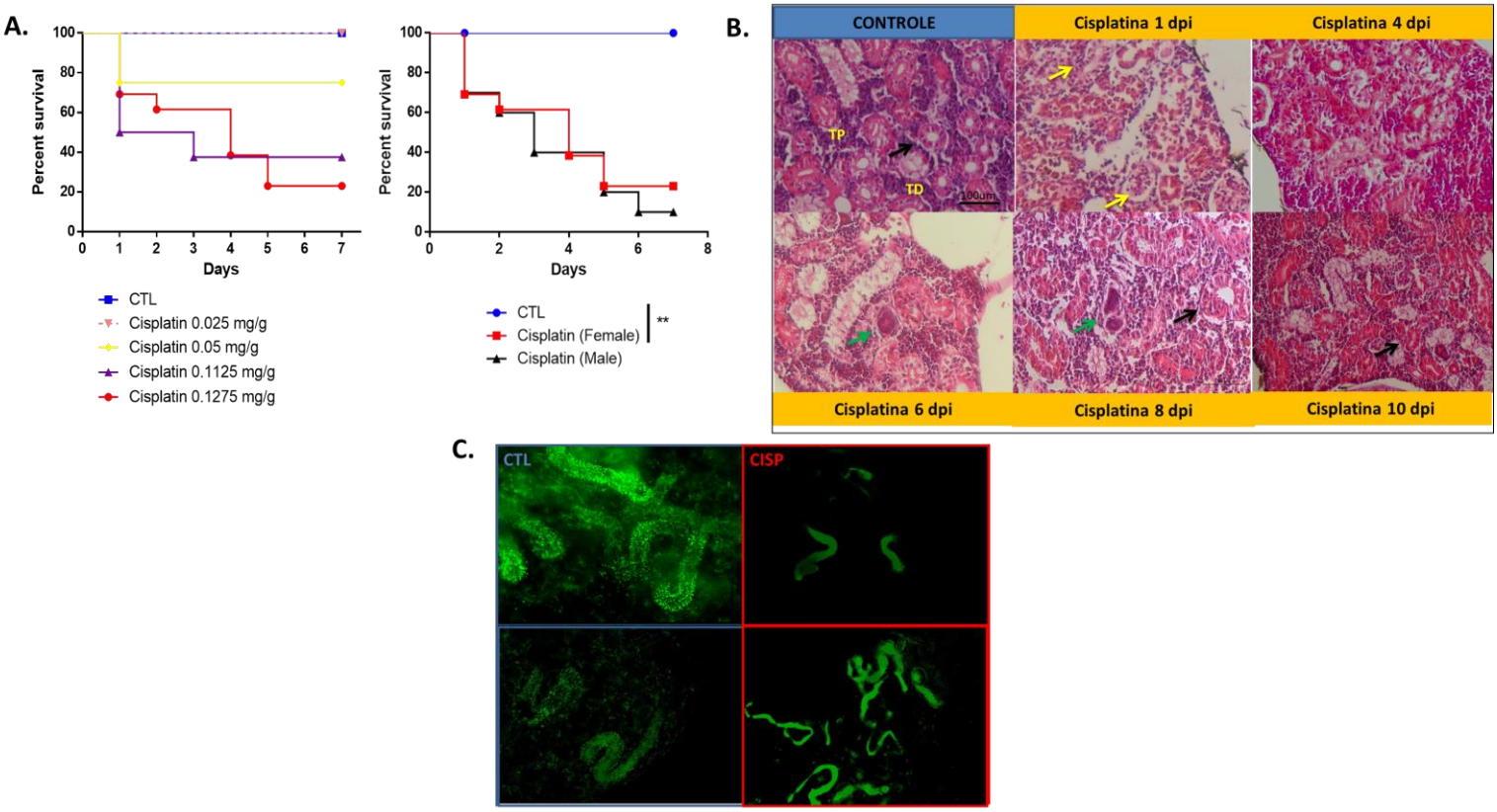
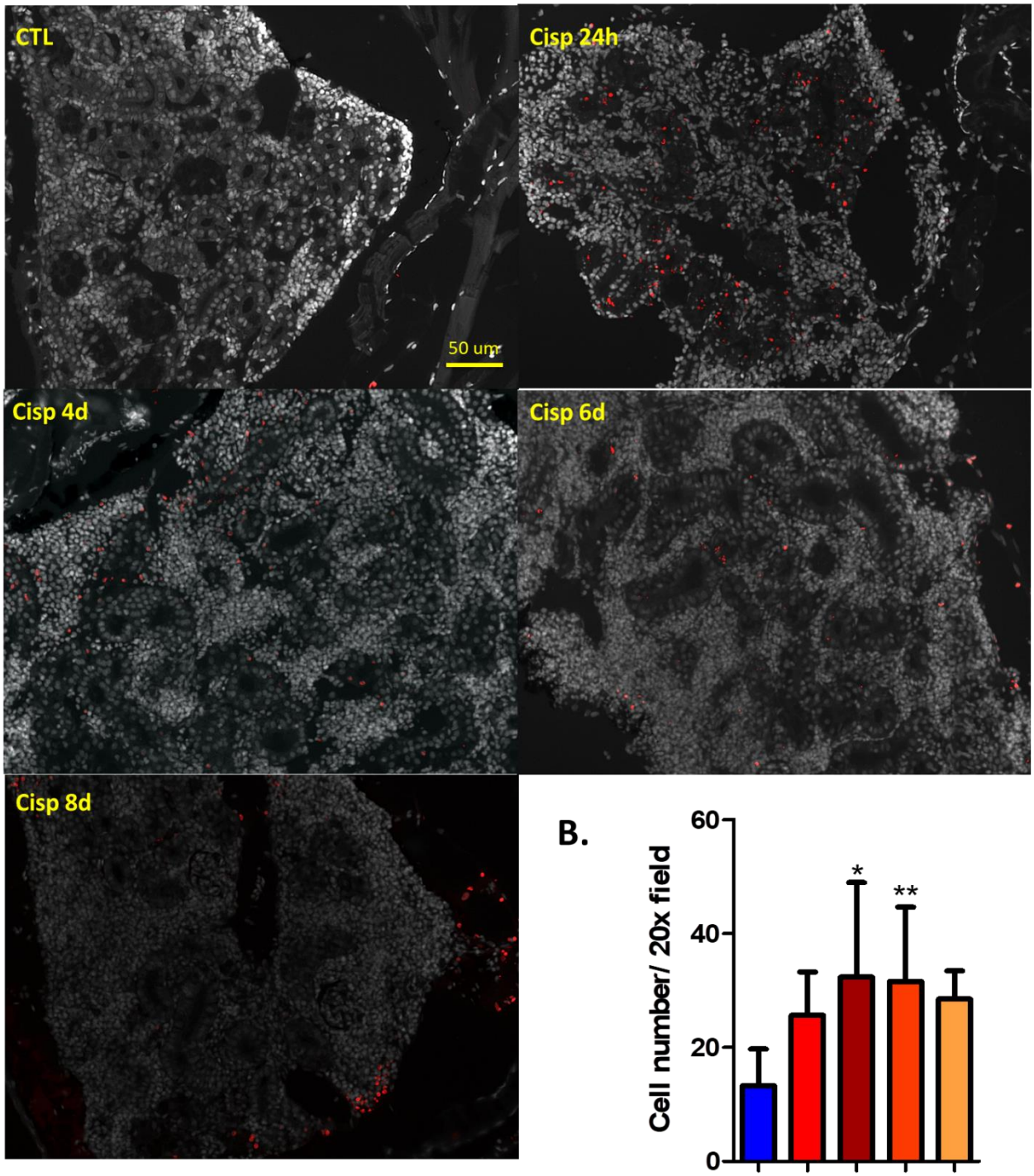


Figura 4. Cisplatina induz morte e lesão renal. A. Curva de sobrevida: animais controles (CTL) injetados com Nacl 0,9% e animais injetados com cisplatina (Cisplatin); à esquerda comparação de doses; à direita comparação dos sexos; n=20 por experimento; **B.** Corte histológico corado em HE de rim de zebrafish (40x): setas pretas indicam túbulos íntegros, setas amarelas lesão tubular e seta verde indica neoformação tubular; **C.** Microscopia fluorescente: filtração tubular de Dextran-FITC (500kD) – 520 nm; 24 horas após injeção de NaCl (CTL) ou cisplatina (Cisplatin 1dpi). (*p<0.05 vs Controle - Log-rank (Mantel-Cox) test (conservative)).

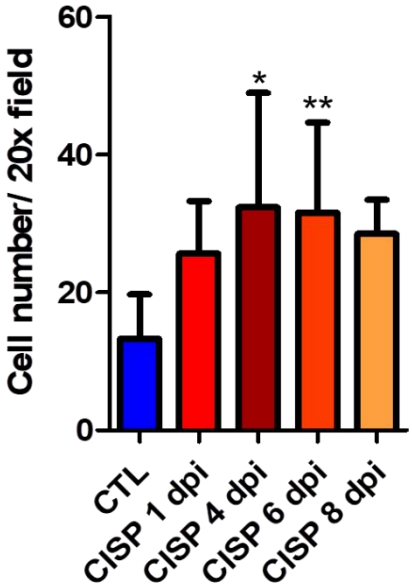
4.2. Determinação da taxa de morte e de proliferação celular após indução de lesão

Nossos resultados iniciais indicam que a lesão renal por cisplatina parece causar pico de dano em 24 horas e que a partir de 4 dias já é possível observar estruturas regeneradas, em seguida, realizamos um ensaio para verificar os níveis de morte celular e uma imunofluorescência para identificar a taxa de proliferação, uma vez que esse processo poderia estar relacionado com o de regeneração. O ensaio de TUNEL revelou que a taxa de morte das células dos animais que foram injetados com cisplatina progride até o quarto dia e então começa a decrescer, foi ainda possível identificar que muitas células mortas se apresentam próximas a regiões tubulares, principalmente nas primeiras 24h e no grupo de quatro dias (Figura 5A e 5B). Para verificar a taxa de proliferação celular nós realizamos uma imunofluorescência para o marcador de mitose Histona H3 fosforilada. Os resultados revelaram um pico na taxa de proliferação 24 horas após a injeção de cisplatina, que regride após quatro dias e com seis dias tem um novo aumento, reduzindo oito dias após a indução da lesão renal (Figura 5C e 5D). Assim como as células mortas, muitas das células em proliferação se apresentavam na região tubular. Tal fato nos indicou que possivelmente a marcação de proliferação indicava o processo de regeneração tubular. Porém faltava-nos identificar a atuação do sistema imune no processo e por tanto, esse foi o nosso próximo passo.

A.


CTL
Cisp 24h
50 um
Cisp 4d
Cisp 6d
Cisp 8d

B.


Cell number/ 20x field
60
40
20
0
*
**
CTL
CISP 1 dpi
CISP 4 dpi
CISP 6 dpi
CISP 8 dpi

C.

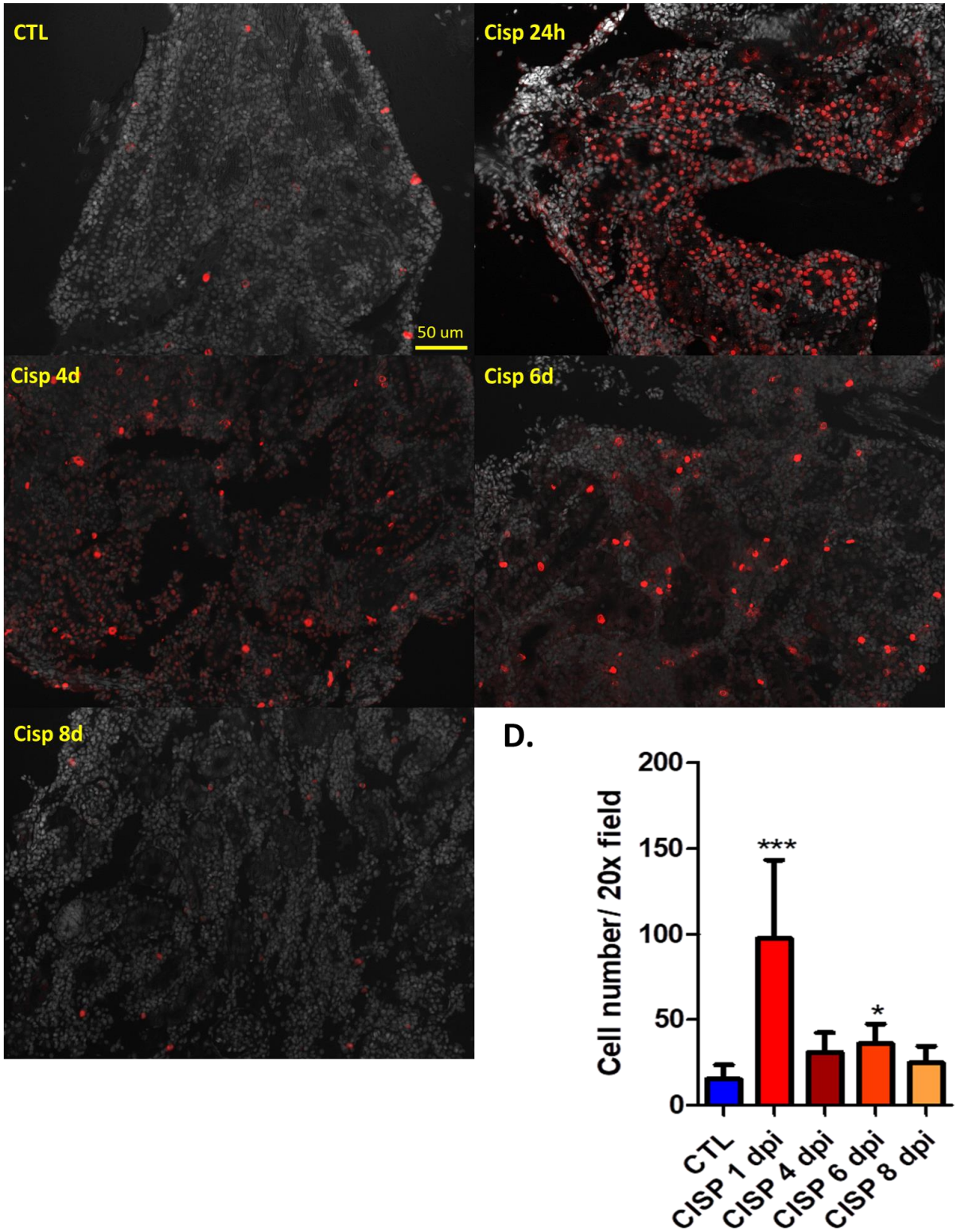


Figura 5. **Cisplatina induz morte e proliferação celular no rim de zebrafish. A.** Ensaio de TUNEL para marcação de morte celular; **B.** Média do número de células positivas no ensaio de TUNEL por campo de 20x; **C.** Imunofluorescência para histona H3 fosforilada como marcador de proliferação celular; **D.** Média do número de células positivas para histona H3 fosforilada por campo de 20x. (*p<0.05 vs Control – 1way Anova)

4.3. Avaliação do infiltrado inflamatório após 24 horas de lesão

Após observar um grande aumento da proliferação 24 horas após injeção de cisplatina hipotetizamos que com o dano tecidual causado pela cisplatina, as células do rim poderiam iniciar uma resposta proliferativa frente à lesão. Porém, uma vez que a morte celular libera DAMPs, que poderiam recrutar células do sistema imune para o órgão, precisávamos descartar a possibilidade de a proliferação ser uma resposta das células do sistema imunológico. Sendo assim, para comprovar ou descartar esta idéia, primeiro caracterizamos o infiltrado mielóide no rim, utilizando peixes duplo transgênico que possuem marcadores fluorescentes para células mielóides em vermelho e neutrófilos positivos para mieloperoxidase em verde. Os peixes Tg(BAC-MPO:GFP;Lyz:dsRed) foram injetados com cisplatina ou NaCl e após 24 horas foram eutanasiados e seus rins foram observados diretamente ao microscópio de fluorescência. Pela microscopia foi possível distinguir três populações diferentes de células, as que expressam ambos os marcadores e as que expressam individualmente cada um dos marcadores (Figura 6A). Porém, pela contagem de células, a população que expressa ambos os marcadores se mostrou aumentada no grupo que recebeu a cisplatina quando comparado ao grupo controle (Figura 6B). Apesar de não conseguirmos definir com precisão a população, podemos dizer que essas células provavelmente são neutrófilos e macrófagos que migraram para o rim.

Para confirmar os dados obtidos pela microscopia, decidimos utilizar animais transgênicos apenas para uma das populações e repetir o experimento, porém agora analisando por citometria. A citometria do rim dos animais Tg (BAC-MPO:GFP) mostrou que, de fato, há um aumento significativo no número total de células que expressam MPO no rim 24 horas após a indução da lesão renal. Com esse resultado faltava-nos identificar se essas células seriam as responsáveis pela alta taxa de proliferação identificada após 24 horas de indução da lesão.

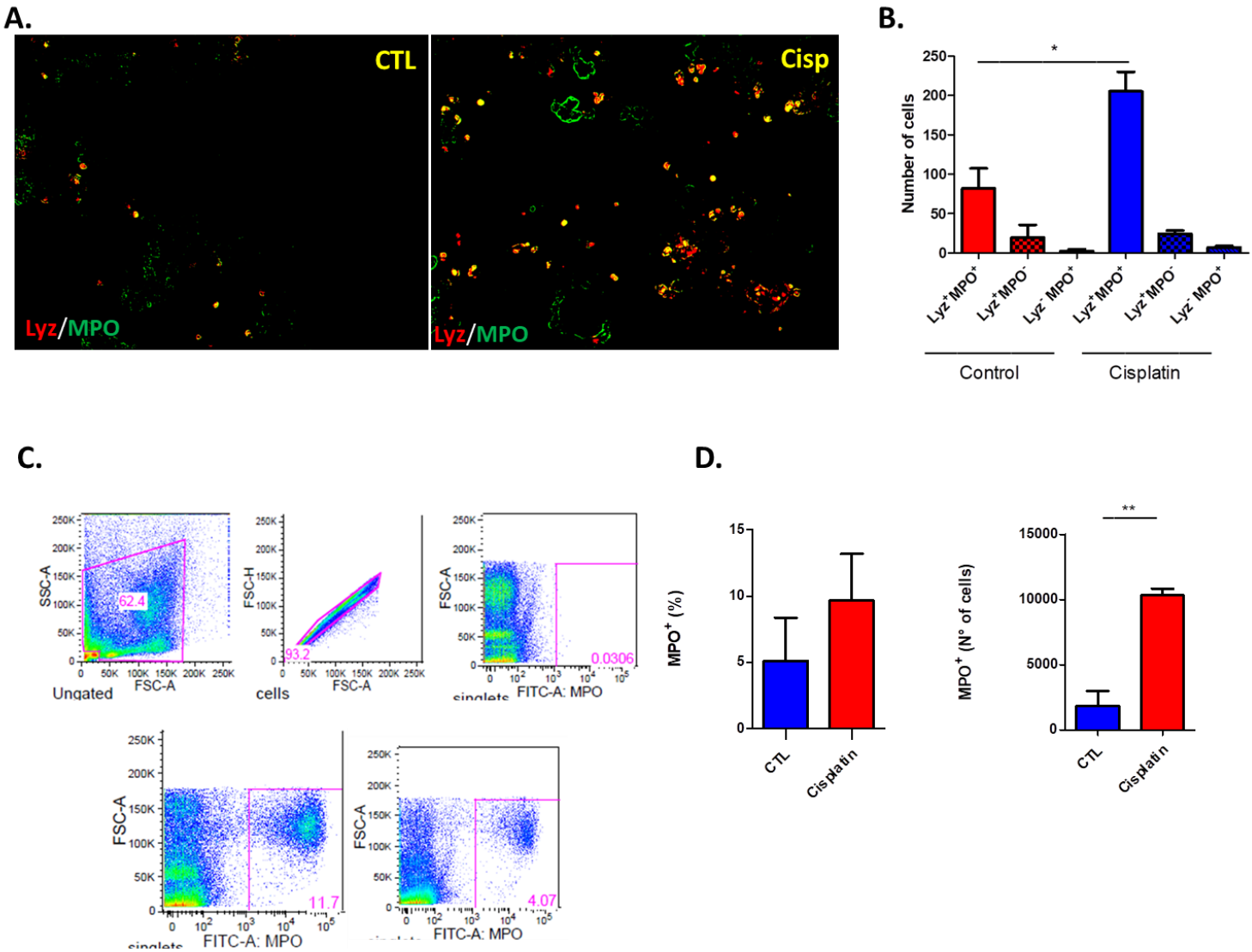


Figura 6. **Formação de infiltrado 24 horas após injeção. A.** Microscopia de fluorescência (aumento de 20x) do rim de animais tg(Lyz:dsRed;MPO:GFP) 24 horas após injeção de NaCl (CTL) ou Cisplatina (Cisp), n=3 animais por grupo; **B.** Número total de células transgênicas no rim dos animais tratados; **C.** Estratégia de *gate* utilizada para análise da citometria. Porcentagem de células MPO+ por citometria de fluxo do rim de animais tg(MPO:GFP) 24 horas após injeção de NaCl (CTL) ou Cisplatina; **D.** Quantificação da porcentagem e do número total de células MPO+ por citometria de fluxo do rim de animais tg(MPO:GFP) 24 horas após injeção de NaCl (CTL) ou Cisplatina. n=5 animais por grupo; (*p<0.05 vs Control).

4.4. Avaliação da proliferação de células MPO+

Uma vez que identificamos uma população MPO+ infiltrante no rim 24 horas após a injeção de cisplatina, avaliamos se se essas células poderiam estar proliferando no rim e consequentemente agravando o processo da lesão. Para isso realizamos uma imunofluorescência utilizando os animais Tg (MPO:GFP) e injetamos cisplatina em um grupo e NaCl no grupo controle. 24 horas após a injeção nós realizamos a eutanásia e coletamos os rins preparando-os para o ensaio de imunofluorescência. Nossos resultados confirmaram, mais uma vez, um aumento no infiltrado de células MPO positivas no grupo que recebeu cisplatina (Figura 7A e 7A') e também a alta taxa de proliferação celular indicado pela marcação da Histona H3 (Figura 7B e 7B'). Porém, a sobreposição das imagens revelou que não são as células MPO positivas que estão proliferando, mas sim outra população celular (Figura 7C e 7C').

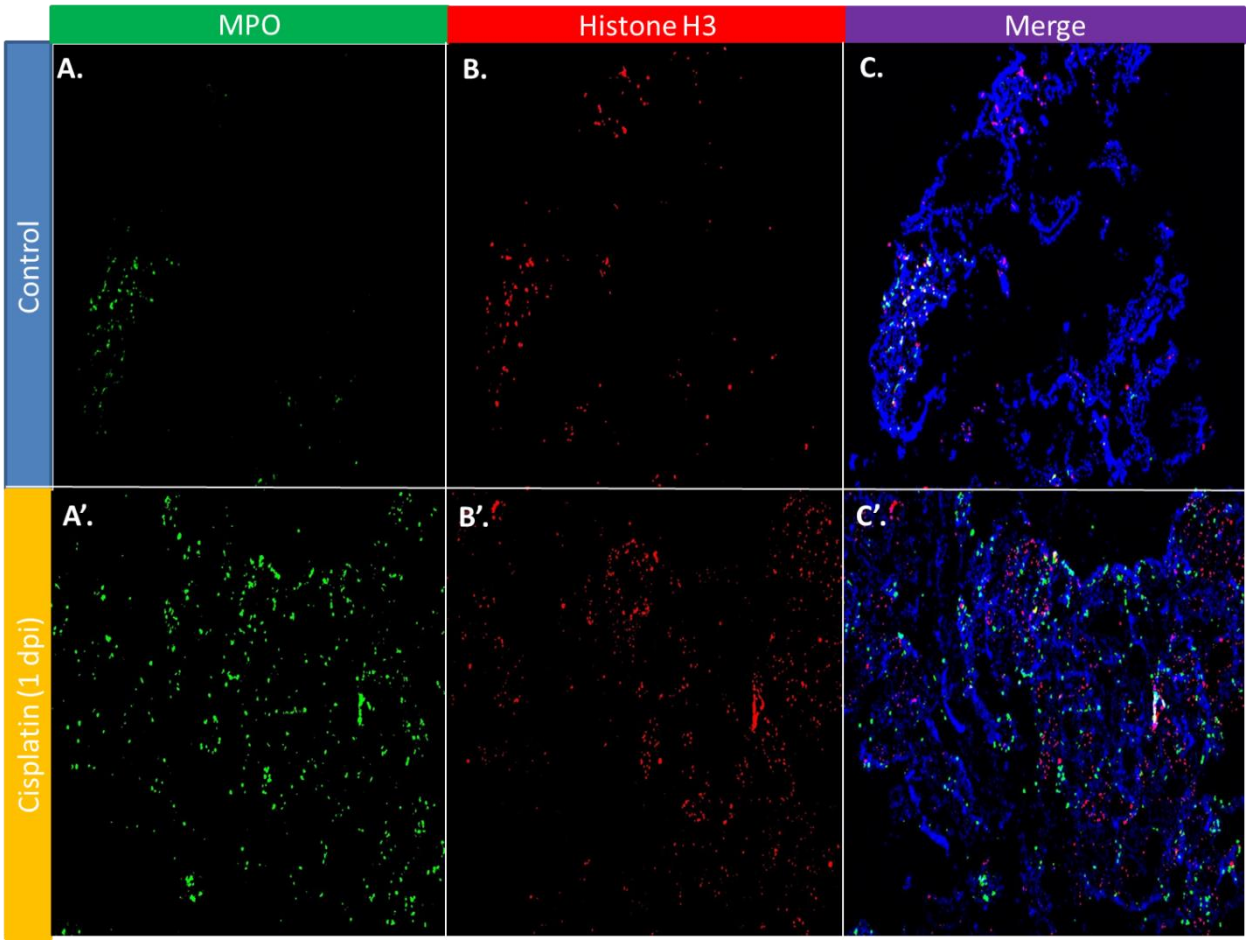


Figura 7. Proliferação induzida após lesão por Cisplatina ocorre em células não imunes. A e A'. Infiltrado de células MPO+ após injeção de cisplatina ou NaCl por imunofluorescência do rim de *zebrafish* tg(MPO:GFP); **B e B'.** Marcação histona H3 fosforilada como indicativo de proliferação celular; **C e C'.** Merge das imagens indicando a proliferação das células MPO+. N=4 animais por grupo. (aumento de 20x).

4.5. Sobrevida dos animais tratados com acetato

Uma vez que nosso modelo de indução de LRA estava bem estabelecido e a participação do sistema imune foi confirmada, decidimos tratar os animais com um ácido graxo de cadeia curta para tentar reduzir os efeitos da inflamação no processo de lesão renal. Para isso primeiramente realizamos testes com dois regimes de tratamento com acetato, tratando os animais no mesmo dia da injeção com cisplatina ou pré-tratando dois dias antes. O tratamento dos animais com acetato 1M, por gavagem, no mesmo dia da injeção com cisplatina não foi capaz de melhorar significativamente a sobrevida dos animais (Figura 8A), entretanto,observamos que os animais tratados com acetato morreram apenas nos dois primeiros dias ao contrário do grupo não-tratado que continuou apresentando mortes. Devido a esse resultado, decidimos tratar os animais de forma profilática e para isso aplicamos o acetato 1M dois dias antes da indução da lesão. A curva de sobrevida mostra que o tratamento apenas com acetato parece não ter efeitos adversos, visto que não houve alterações na sobrevida. Os animais não-tratados com acetato que receberam a cisplatina tiveram comportamento similar com o que já havíamos descrito, tendo uma queda na sobrevida nas primeiras 24 horas e uma morte contínua nos dias subsequentes. Porém aqueles animais que foram pré-tratados com acetato apresentaram melhora significativa, se mostrando resistentes nos dois primeiros dias e apesar de apresentarem morte nos dias seguintes, tiveram aproximadamente 30% a mais de sobrevida quando comparados com o grupo que não recebeu o acetato (Figura 8B).

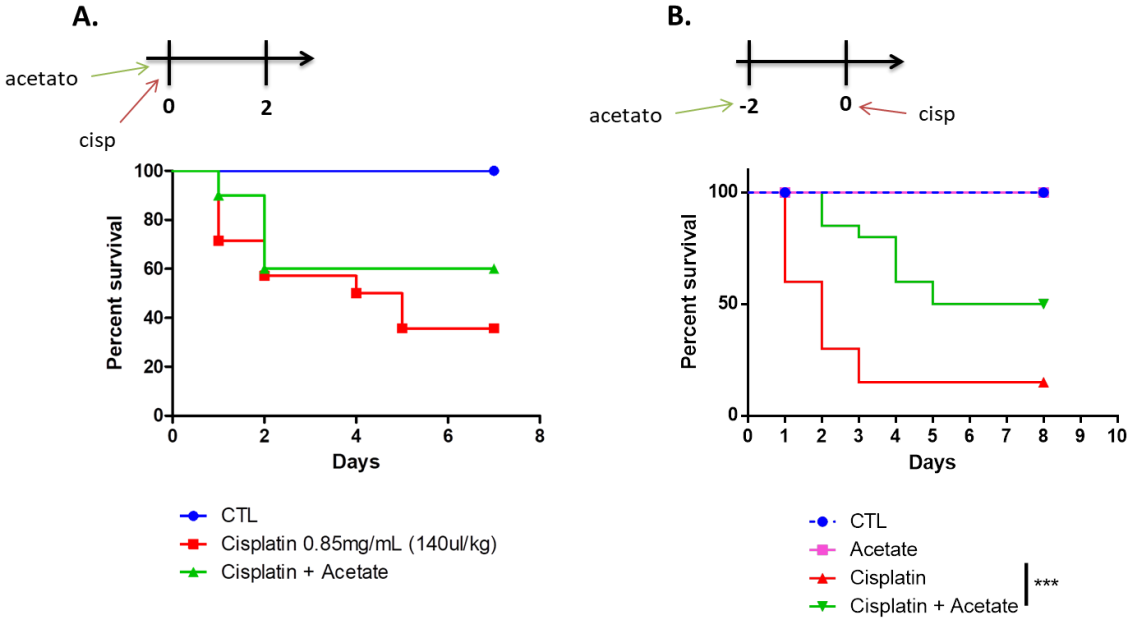


Figura 8. Tratamento com acetato aumenta a sobrevida dos animais injetados com cisplatina. A. Sobrevida dos animais tratados com acetato no mesmo dia da injeção de cisplatina. N=10 animais por grupo. **B**. Sobrevida de animais submetidos à gavagem com acetato 1M dois dias antes das injeções de NaCl (CTL) ou Cisplatina; n=20 animais por grupo. (***p<0.05 vs Controle - Log-rank (Mantel-Cox) test (conservative)).

4.6. Avaliação da lesão renal após o tratamento com acetato

Tendo em vista que o tratamento profilático com o acetato reduziu a mortalidade dos animais, restava-nos avaliar se a menor mortalidade era acompanhada de uma melhora na lesão renal. Portanto, nós realizamos o tratamento com acetato e mais uma vez eutanasiamos os animais em diferentes dias para analisar a progressão da lesão renal.

Foi possível observar que o acetato se mostrou capaz de preservar as estruturas, mantendo os túbulos íntegros comparado ao grupo não-tratado em 24 horas (Figura 9). Acompanhando os dados da curva de sobrevida, é possível verificar a melhora na arquitetura renal após quatro dias, para os animais tratados apenas com cisplatina, e por outro lado, uma piora nos animais que foram tratados com acetato. Porém, após seis dias, ambos os grupos parecem ter recuperado o tecido e se assemelham com os animais controle.

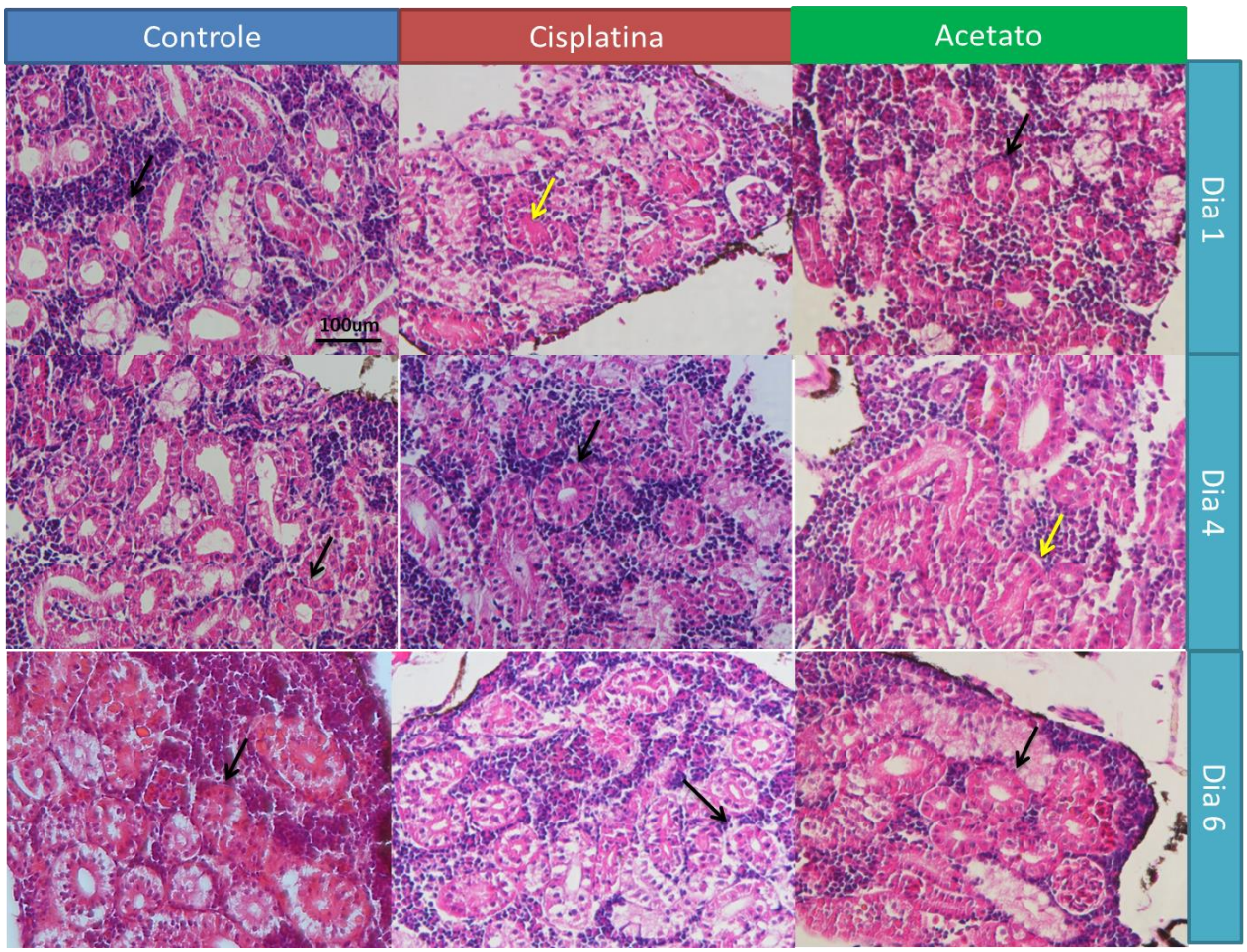


Figura 9: Acetato reduz lesão renal nas primeiras 24 horas. Corte histológico corado em HE de rim de zebrafish (40x). Animais tratados com NaCl (Controle) ou com Cisplatina (Cisplatina e Acetato). Grupo Acetato foi tratado por gavagem com acetato 1M. Setas pretas indicam estruturas íntegras; setas amarelas indicam estruturas lesionadas. N = 4 animais por grupo

4.7. Infiltrado de células MPO+ após o tratamento com acetato

Uma vez que havíamos identificado um aumento no infiltrado de células pró-inflamatórias após o tratamento com cisplatina e havíamos hipotetizado que essas células poderiam, de alguma forma, agravar a lesão, imaginamos que a melhora na lesão renal poderia estar relacionada com uma diminuição no infiltrado dessas células. Por essa razão nós tratamos os animais com cisplatina, dividindo-os em dois grupo, tratados ou não com acetato, em eutanasiamos no pico de inflamação, após 24 horas da injeção. O rim foi coletado e levado íntegro ao microscópio de fluorescência.

Ao analisarmos os resultados, foi possível observar que ambos os grupo tiveram um aumento no infiltrado de células quando comparados ao controle, principalmente próximo à região dos túbulos (Figura 10 setas amarelas). Ao compararmos os grupos que foram tratados com cisplatina, não foi possível identificar clara diferença na quantidade de células infiltrantes nos animais que foram ou não tratados com o acetato. Sendo assim, concluímos que nas

primeiras 24 horas o ácido graxo não foi capaz de inibir o aumento de células MPO+ na LRAs. Tal fato abriu caminho para investigarmos se de alguma forma aquele microambiente poderia estar sofrendo algum tipo de regulação. E por isso decidimos checar o perfil de ativação das células responsáveis pela lesão e reparo do tecido, os macrófagos.

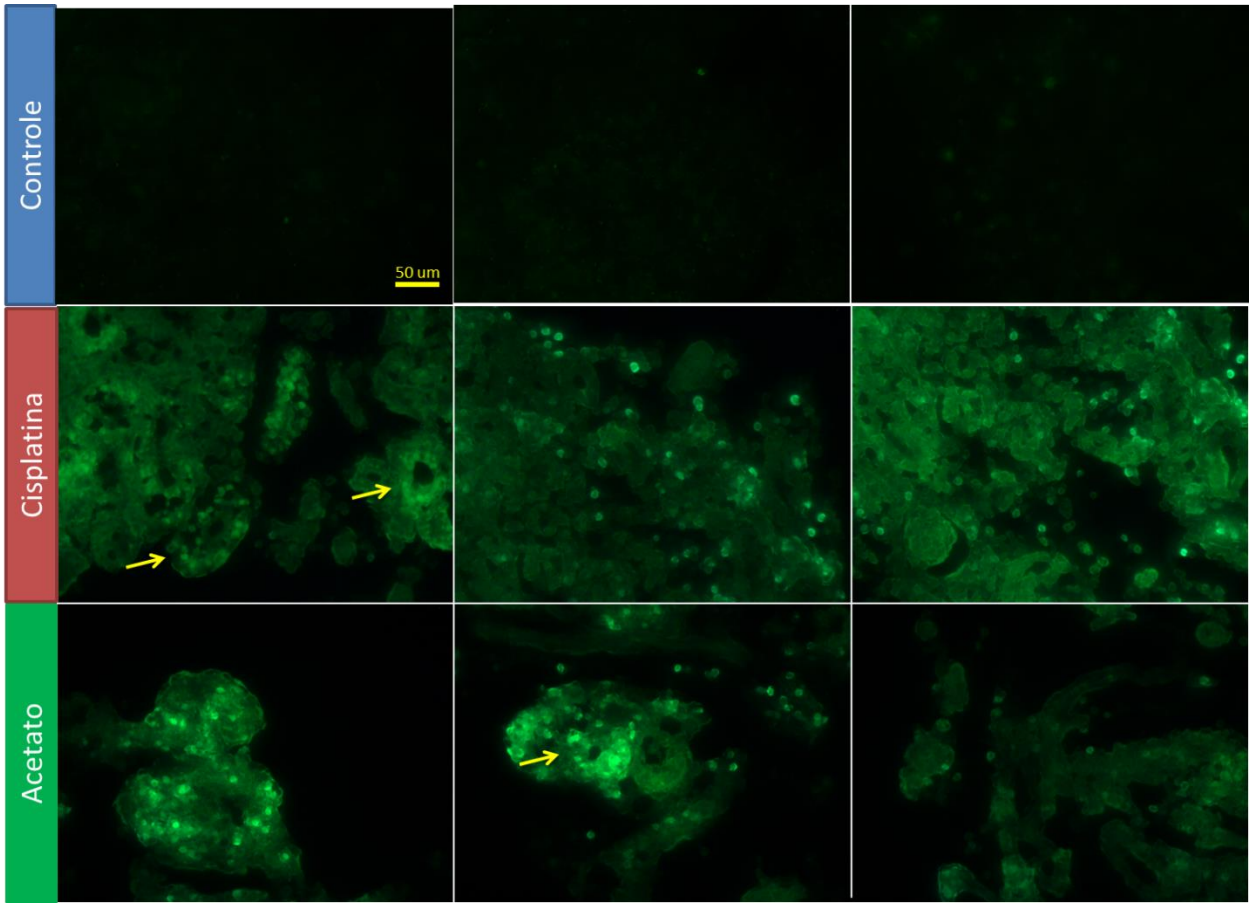


Figura 10: Acetato não reduz infiltrado de células MPO+ após 24 horas da indução da lesão. Microscopia de fluorescência de rim íntegro de zebrafish. Animais transgênicos expressando o marcador GFP na proteína MPO. Rim foi dissecado cuidadosamente e observado diretamente no microscópio de fluorescência. Setas amarelas indicam concentração de células na região tubular. N = 3 animais por grupo

4.8. Avaliação do perfil das células infiltrantes

Para avaliarmos os macrófagos utilizamos um peixe duplo transgênico, expressando o marcador mCherry na molécula MPEG, uma proteína de membrana específica de macrófagos, e também expressando o marcador GFP acoplado ao promotor do gene para a citocina pró inflamatória TNF-α. Dessa forma, nós poderíamos avaliar três diferentes populações: Os

macrófagos ativados e direcionados para um perfil pró inflamatório (expressando ambos os marcadores), os macrófagos que não são pró inflamatórios e as células que não são macrófagos mas que estão atuando de forma inflamatória no tecido (expressando apenas o TNF-α). Sendo assim, animais injetados com cisplatina tratados ou não com acetato foram eutanasiados após 24 horas, para acompanharmos a atuação do sistema imunológico durante o pico da lesão nos animais. O rim dos animais foi removido cuidadosamente e levado para o microscópio confocal.

Ao analisarmos as imagens podemos identificar que os animais sadios, sem LRA, possuem poucas células expressando TNF-α e que seus túbulos estão marcados em vermelho, indicando a presença de macrófagos circulantes (Figura 11 - seta azul). Há também alguns macrófagos fora da área do túbulo, podendo ser caracterizados como macrófagos residentes do tecido renal. Por outro lado, nos animais tratados com cisplatina há um grande aumento na quantidade de células expressando TNF-α, que é acompanhado pelo aumento na quantidade de macrófagos, além disso, surgem células duplo positivo (Figura 11 - setas amarelas), indicando macrófagos M1, pró-inflamatórios. Nesses animais não foi possível identificar a estrutura tubular, o que nos indica que a lesão induzida pela cisplatina permitiu uma quantidade maior de macrófagos extravasar para o tecido renal. Já nos animais tratados com acetato antes de receberem a cisplatina é possível identificar novamente os túbulos (Figura 11 – setas azuis), indicando a preservação da estrutura, porém, vemos um maior número de macrófagos nesses túbulos. Nesses animais há também o aumento de células expressando TNF-α e o surgimento de macrófagos pró inflamatórios.

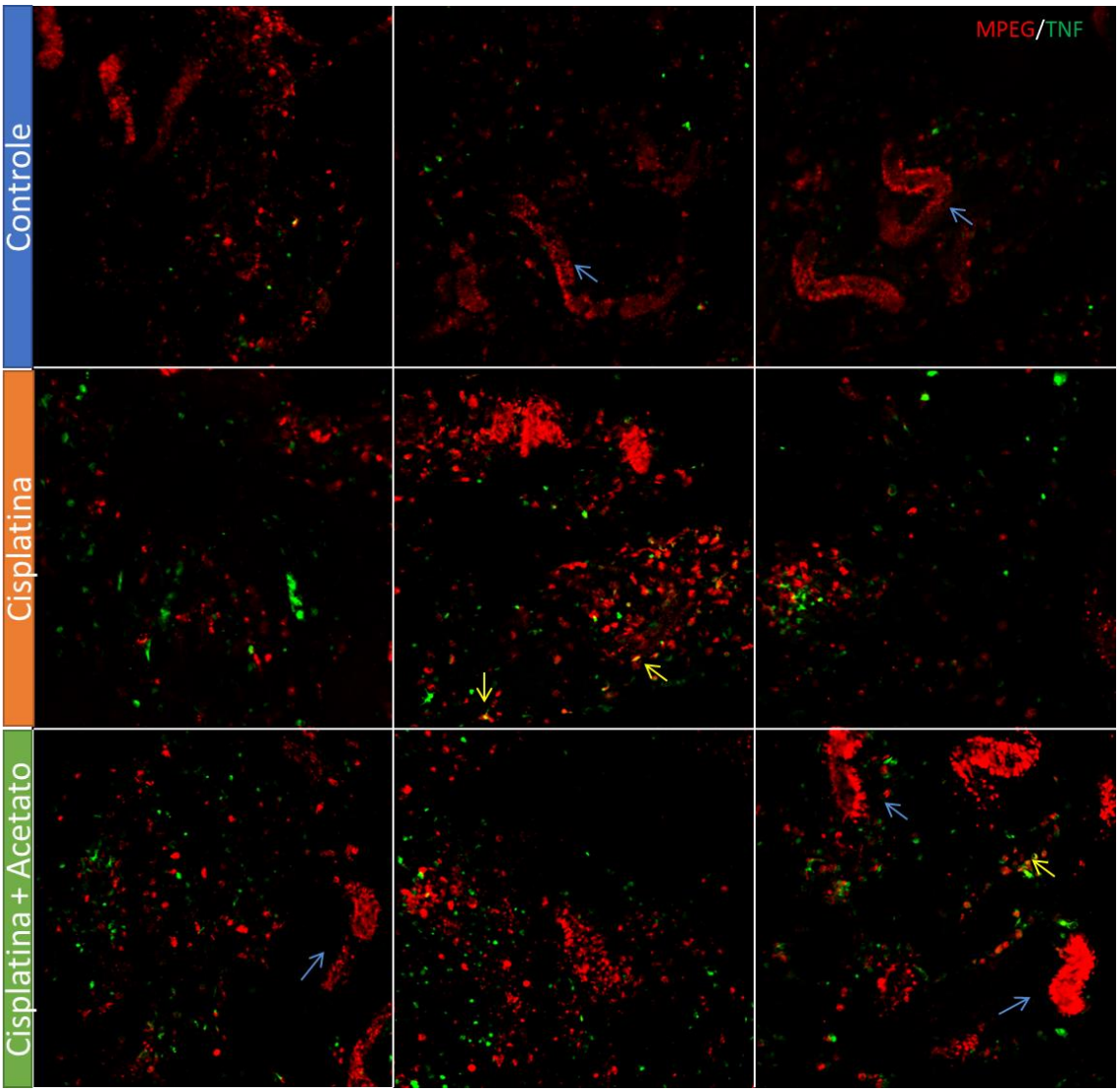


Figura 11: Acetato preserva estrutura tubular, mas não modula atuação do sistema imune. Microscopia confocal de rim integro de zebrafish transgênico. Os animais expressam a proteína MPEG em vermelho e a citocina pró-inflamatória TNF-α em verde. Os animais foram tratados com cisplatina após terem ou não recebido o acetato por gavagem. Grupo controle recebeu apenas NaCl. Na figura: setas azuis indicam túbulo íntegro; setas amarelas indicam células duplo positivo. N = 3 animais por grupo

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A Lesão Renal Aguda (LRA) é caracterizada por levar a perda da função do rim em horas ou dias, devido à perda da borda em escova do túbulo proximal e perda irregular de células tubulares. Diversos modelos indutores de lesão renal já foram criados e utilizados, sendo que, os modelos que utilizam camundongos são extremamente consolidados. Optamos nesse projeto pelo desafio de utilizar um novo modelo animal, pouco estabelecido no Brasil, mas com diversas vantagens. O *zebrafish* tem surgido como um exelente modelo para manipulação genética e isso abre caminho para explorar novas técnicas pouco utilizados em nosso laboratório. Em modelos de lesão renal é bem estabelecido, para *zebrafish*, tanto em adultos quanto em larvas, o uso de gentamicina como indutor, porém, um dos objetivos do nosso projeto foi estudar a participação do acetato, e, por este ser um produto da microbiota, não achamos válido o uso de um antibiótico como o indutor da lesão.

Nosso modelo de injeção intraperitoneal de cisplatina em peixes *Danio rerio* adultos foi capaz de induzir lesão renal uma vez que foi observada a perda da arquitetura do órgão, com característica perda da estrutura do túbulo proximal, e também a perda de função, demonstrada pelo ensaio de filtração do FITC-dextran evidenciando uma menor capacidade de filtração que os controles.

A progressão da lesão renal ao longo dos dias é comparável com o modelo já descrito por Robert A. McKee e colaboradores (60) utilizando gentamicina como droga indutora da lesão. Em ambos os modelos analisando a histologia dos rins vemos uma lesão intensa nas primeiras 24 horas e com o início do processo de regeneração iniciando após o terceiro dia. Como consequência do intenso dano gerado pela indução da lesão renal, os peixes progridem rapidamente para morte, esse processo persiste por cinco dias e, a partir desse ponto, os animais que sobreviveram ao serem eutanasiados apresentam pontos de regeneração tecidual, com a formação de novos túbulos íntegros. A perda da arquitetura e de células tubulares parece ser evidente quando utilizamos marcadores de morte celular e identificamos altas taxas de morte nos primeiros dias após a injeção de cisplatina, o que pode explicar o desarranjo do órgão e a perda de função deste.

Tal experimento foi escolhido devido ao fato do processo de apoptose ser um bom indicador de lesão renal, Huang e colaboradores (61) a partir de técnicas de citometria caracterizaram a lesão renal em camundongos utilizando marcadores de apoptose. Uma vez que os sinais de dano e morte celular podem ser o gatilho para ativar mecanismos compensatórios as células podem começar a proliferar para repor aquelas que estão se perdendo. Esse mecanismo poderia explicar o comportamento das células que apresentam logo nas primeiras 24 horas o maior pico de proliferação, apesar de não ser o maior pico de morte celular. A elevada morte nas primeiras 24 horas pode estar relacionada com a súbita lesão gerada pelo modelo, desorganizando a

estrutura do tecido e gerando um processo inflamatório no qual células começam a migrar enquanto outras recebem sinais de proliferação. Por esse motivo vemos na histologia das lâminas de 24 horas após a indução da lesão um sistema desorganizado, com espaços intersticiais e células obliteradas. Nos dias seguintes o órgão parece iniciar um processo de recuperação, porém os efeitos da cisplatina continuam atuando e as células continuam morrendo até o quarto dia. Quando os níveis de morte celular começam a diminuir também se inicia o processo de reorganização e recuperação do tecido, e podemos identificar a formação de novas estruturas tubulares. A regeneração do rim em *zebrafish* é algo amplamente estudado e já foram criados peixes transgênicos com células reporters para a caracterização do processo de regeneração (62,63). A regeneração após os três primeiros dias da indução da lesão também foi observada em modelo de gentamicina (64), na qual o grupo induzia diferentes intensidades de lesão, e assim, puderam identificar que a regeneração ocorre apenas a partir de determinado nível de destruição tecidual.

Nossos dados nos levam a concluir que a cisplatina na concentração de 0,025mg/g de peso do animal é capaz de levar a morte de aproximadamente 80% dos animais em oito dias, além disso a morte parece estar relacionada com a destruição de estruturas fundamentais no rim, como a perda da borda dos túbulos que, por sua vez, perdem sua capacidade de filtração. O processo de morte celular reforça os dados da lesão tubular identificada por histologia e pela análise de filtração de FITC-Dextran e, por outro lado, o processo de proliferação celular parece estar atrelado ao processo de regeneração do rim.

Durante o processo de DR diversos trabalhos já descreveram que o sistema imune atua inicialmente contribuindo para o agravamento da lesão, uma vez que a morte celular libera no meio externo DAMPs e ativa células residentes como macrófagos e mastócitos que são capazes de rapidamente recrutar outras células para o local. Recentemente Singbartl e colaboradores publicaram uma revisão que relaciona diversos componentes do sistema imunológico com o processo de lesão renal aguda (65), reforçando nossa ideia de que o sistema imune tem participação crucial no progresso da lesão. O infiltrado de células do sistema imune em um ambiente pró-inflamatório induz a liberação de mediadores como espécies reativas que acabam por interagir com as próprias células do organismo e levar a destruição destas. Em nosso modelo o sistema imunológico parece atuar também, verificamos o surgimento do infiltrado de células positivas para marcadores de neutrófilos e macrófagos. Tais células nesse meio poderiam receber sinais para proliferarem por isso nosso objetivo foi entender se a alta taxa de proliferação vista 24 horas após a indução da lesão estava relacionada com uma resposta compensatória do organismo, proliferando as células renais, ou se seria parte do processo de agravamento da lesão por ação do sistema imune. A resposta proliferativa frente a lesões renais já havia sido descrita por Benjamin D. Humphreys e seu grupo em 2008 (66), quando utilizando

o marcador de proliferação Ki67 ele identificou em modelo murinho a proliferação das células epiteliais dos túbulos após uma injuria. Com nossos dados de imunofluorescência nós reforçamos o resultado de que a proliferação é uma resposta do organismo frente à lesão, buscando se reorganizar para regenerar o órgão. O compilado desses resultados comprova a importância da atuação do sistema imunológico no processo de lesão renal, dessa forma, concluímos que as células mielóides e os neutrófilos presentes no infiltrado são pilares no processo da doença.

Uma vez que identificamos o sistema imune como atuante no processo da lesão, nossa estratégia foi pensar em uma forma de manipular o microambiente pró-inflamatório para diminuir o sinal de ativação para essas células de forma que elas não exacerbassem a lesão. Em nosso laboratório já havíamos utilizado produtos oriundos da microbiota, como os AGCC, para melhorar o prognóstico de lesões renais associadas à isquemia e reperfusão em camundongos (57), por isso utilizamos o acetato que é descrito como um potente mediador anti-inflamatório, podendo atuar diretamente nas células do sistema imunológico.

Nossa primeira abordagem foi de tratar os animais com acetato e logo em seguida injetar a cisplatina, porém o que observamos foi que não houve diferença na mortalidade dos dois primeiros dias para os dois grupos que receberam a cisplatina, porém que após esse período o acetato diminuiria a taxa de morte dos animais. Por esse motivo decidimos tratar os animais dois dias antes da injeção de cisplatina, supondo que o acetato precisaria de um tempo de aproximadamente dois dias para agir e modificar o ambiente de forma a influenciar no processo da lesão. De fato, com esse protocolo conseguimos diferença nas curvas de sobrevida, mostrando que dois dias após a injeção de cisplatina não tínhamos animais mortos no grupo tratado com acetato, enquanto no grupo que não recebeu o tratamento a sobrevida já era menor que 50%.

Em seguida, como havíamos confirmado que a morte induzida pela cisplatina se dava devido a uma grave lesão no rim dos animais, que deixava de cumprir suas funções, nós precisávamos confirmar que o caráter protetor do acetato era proveniente de uma menor lesão renal. Nossos dados mostraram que, de fato, o acetato é capaz de induzir uma maior preservação do tecido renal e com isso, um maior número de animais pode sobreviver. Restava-nos então caracterizar a atuação do sistema imunológico frente ao acetato.

Os ácidos graxos te cadeia curta tem ganhado força nos últimos anos por serem parte dos produtos da microbiota intestinal. Porém, em 2008 Sofia Tedelind e colaboradores (67) já descreviam o importante papel anti-inflamatório desses componentes, que se mostravam capazes de inibir importantes vias da inflamação como a via do NF-κB. Mais recentemente, em 2016, Michelle G. Rooks e seu grupo de Harvard (68) publicaram uma revisão elucidando a relação entre a microbiota, seus produtos e o sistema imune, mais uma vez descrevendo o potente papel anti-inflamatório dos ácidos graxos de cadeia curta. Portanto, tudo indicava que o

acetato seria um importante modulador da resposta inflamatória em nosso modelo de lesão renal.

Nossos resultados, porém, não identificaram um menor infiltrado de células inflamatórias nos animais que foram tratados, a quantidade de células infiltrantes ainda é alta quando comparado ao controle e para conseguirmos diferenciar do grupo tratado apenas com cisplatina precisaríamos de um método mais específico como a citometria de fluxo para identificarmos a quantidade de células infiltrantes. Além disso, nós hipotetizamos que as células poderiam estar atingindo diferentes estágios de ativação e que o acetato talvez fosse capaz de inibir vias inflamatórias como a do TNF-α. Por essa razão utilizamos os peixes transgênicos que nos dariam a informação de ativação das células e participação de macrófagos. Mais uma vez os resultados caminharam para o oposto do esperado e não encontramos grandes diferenças na ativação das células, uma vez que a expressão de TNF-α e o infiltrado de macrófagos se mostrou similar nos grupo tratados. Esses dados não vão de encontro com o observado por Andrade e colaboradores (57) que em modelo de I/R em camundongos observou redução de diversos marcadores e células pró-inflamatórios, tanto da imunidade inata quanto adaptativa. O mesmo foi observado por Kobayashi (69) e seu grupo, que observaram que AGCC poderiam, via receptores GPR41 e GPR43, inibir a empressão de TNF-α ao modular as vias p38 e JNK em células corticais do rim de humanos. Por outro lado, em macrófagos de tecido adiposo foi visto que o acetato, via o mesmo receptor GPR43, seria capaz de induzir um macrófago M2 a expressar TNF-α (70). Apesar de não terem sido desenvolvidos em *zebrafish,* esses trabalhos demonstram a variabilidade que pode-se ter em resposta aos ácidos graxos de cadeia curta, sendo provável que cada célula responda de uma forma diferente. Em nosso trabalho não conseguimos identificar a ação do acetato em células como os macrófagos e neutrófilos que parecem não deixar de expressar TNF-α. Porém, foi possível reforçar a hipótese de integridade do túbulo renal, já que os macrófagos dos animais tratados com acetato pareciam manter-se dentro dos túbulos.

Tais resultados abrem caminhos diversos para o surgimento de novas hipóteses, nosso grupo acredita que o acetato possa estar induzindo células regulatórias, que não foram analisadas no projeto ou que esse ácido graxo tenha ação direta nas células do rim, reduzindo sua mortalidade ou aumentando sua taxa de proliferação. Em modelos de tumor, associados com metformina, o acetato se mostrou uma molécula energética, sendo usada como um substrato lipogênico e fornecendo energia para as células tumorais proliferarem(71). Sendo assim, tais hipóteses ainda precisariam ser testadas em nosso modelo.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho e após análise e comparação com dados da literatura, concluímos que o protocolo desenvolvido ao longo do projeto para a indução de LRA em *zebrafish* foi eficaz, mostrando resultados consistentes e reprodutíveis, compatíveis com o encontrado na literatura e inovador. O tratamento com acetato (1M) se mostrou capaz de reduzir a mortalidade observada após a injeção de cisplatina, protegendo o rim dos animais que foram tratados. Por outro lado, o ácido graxo não foi capaz de reduzir a infiltração de células inflamatórias ou alterar seu perfil de ativação, não deixando clara a participação do sistema imune no processo.

6.1 Conclusões Específicas

- Nosso trabalho foi capaz de desenvolver um modelo de lesão renal aguda em adultos de zebrafish, uma vez que constatamos a lesão por diversas técnicas diferentes.
- O acetato se mostrou capaz de proteger os animais da LRA, preservando a integridade do órgão e aumentando a sobrevida.
- O trabalho identificou que há um aumento na infiltração de macrófagos após a indução da lesão, mostrando que essas células possuem participação no processo. Porém, o acetato não foi capaz de alterar a ativação dos macrófagos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Foundation NK. Acute Kidney Injury (AKI) 2016 [Available from: https://www.kidney.org/atoz/content/AcuteKidneyInjury.

2. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. Comprehensive Physiology. 2012;2(2):1303-53.

3. Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE. AJKD Atlas of Renal Pathology: Toxic Acute Tubular Injury. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2016;67(6):e31-2.

4. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2006;17(6):1503-20.

5. Agarwal A, Dong Z, Harris R, Murray P, Parikh SM, Rosner MH, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of AKI. J Am Soc Nephrol. 2016;27(5):1288-99.

6. Langenberg C, Gobe G, Hood S, May CN, Bellomo R. Renal histopathology during experimental septic acute kidney injury and recovery. Critical care medicine. 2014;42(1):e58-67.

7. Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. Compr Physiol. 2013;3(2):957-76.

8. Safari, Saeed, et al. "Epidemiology and Outcome of Patients with Acute Kidney Injury in Emergency Department; a Cross-Sectional Study." Emergency 6.1 (2018): 30.

9. Manohar, Sandhya, and Nelson Leung. "Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature." Journal of nephrology 31.1 (2018): 15-25.

10. N. Pabla, R. F. Murphy, K. Liu, and Z. Dong, "The copper transporterCtr1contributestocisplatinuptakebyrenaltubular cells during cisplatin nephrotoxicity," American Journal of Physiology: Renal Physiology, vol. 296, no. 3, pp. F505–F511, 2009.

11. N. Pabla and Z. Dong, "Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms andrenoprotectivestrategies,"KidneyInternational,vol.73,no. 9,pp.994–1007,2008.

12. Z.H.Siddik,"Cisplatin:modeofcytotoxicactionandmolecular basis of resistance," Oncogene, vol. 22, no. 47, pp. 7265–7279, 2003.

13. J. Wang, N. Pabla, C. Wang, W. Wang, P. V. Schoenlein, and Z.Dong,"Caspase-mediatedcleavageofATMduringcisplatininducedtubularcellapoptosis:inactivationofitskinaseactivity toward p53," American Journal of Physiology-Renal Physiology, vol.291,no.6,pp.F1300–F1307,2006.

14. Ozkok, Abdullah, and Charles L. Edelstein. "Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury." BioMed research international 2014 (2014).

15. Kruidering, Marieke, et al. "Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular

cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 280.2 (1997): 638-649.

16. S. Faubel, E. C. Lewis, L. Reznikov et al., "Cisplatin-induced acuterenalfailureisassociatedwithanincreaseinthecytokines interleukin (IL)-1β, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney," Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,vol.322,no.1,pp.8–15,2007.

17. J. A. Winston and R. Safirstein, "Reduced renal blood flow in earlycisplatin-inducedacuterenalfailureintherat,"American JournalofPhysiology:RenalFluidandElectrolytePhysiology,vol. 18,no.4,pp.F490–F496,1985.

18. Watanabe, Mari, et al. "Protease-activated receptor 2 exacerbates cisplatin-induced nephrotoxicity." American Journal of Physiology-Renal Physiology (2019).

19. Andrade-Silva, Magaiver, et al. "TLR2 and TLR4 Play Opposite Role in Autophagy associated with Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury." Clinical Science (2018): CS20170262.

20. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. J Clin Invest. 2012;122(7):2337-43.

21. Zebrafish Genome Project [Internet]. Available from: http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/.

22. Wingert RA, Selleck R, Yu J, Song HD, Chen Z, Song A, et al. The cdx genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. PLoS Genet. 2007;3(10):1922-38.

23. Diep CQ, Ma D, Deo RC, Holm TM, Naylor RW, Arora N, et al. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. Nature. 2011;470(7332):95-100.

24. McCampbell KK, Springer KN, Wingert RA. Analysis of nephron composition and function in the adult zebrafish kidney. J Vis Exp. 2014(90):e51644.

25. Nguyen-Chi, Mai, et al. "Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish." Elife 4 (2015): e07288.

26. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science 327: 656 – 661, 2010.

27. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol 5: 953–964, 2005.

28. Rae F, Woods K, Sasmono T, Campanale N, Taylor D, Ovchinnikov DA, Grimmond SM, Hume DA, Ricardo SD, Little MH. Characterisation and trophic functions of murine embryonic macrophages based upon the use of a Csf1r-EGFP transgene reporter. Dev Biol 308: 232–246, 2007.

29. . Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Nat Rev Immunol 9: 259 – 270, 2009.

30. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol 11: 723–737, 2011.
31. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 3: 23–35, 2003.
29. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest 122: 787–795, 2012.
32. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci 13: 453– 461, 2008.
33. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest 117: 175–184, 2007.
34. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. Diabetes 57: 3239 –3246, 2008.
35. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. The Journal of clinical investigation. 2008;118(11):3522-30.
36. Wang Y, Harris DC. Macrophages in renal disease. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2011;22(1):21-7.
37. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. 2003;19(1):71-82.
38. Tipping PG, Lowe MG, Holdsworth SR. Glomerular interleukin 1 production is dependent on macrophage infiltration in anti-GBM glomerulonephritis. Kidney Int. 1991;39(1):103-10.
39. Matsumoto K, Dowling J, Atkins RC. Production of interleukin 1 in glomerular cell cultures from patients with rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. Am J Nephrol. 1988;8(6):463-70.
40. Tipping PG, Leong TW, Holdsworth SR. Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. Lab Invest. 1991;65(3):272-9.
41. Noronha IL, Kruger C, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R. In situ production of TNFalpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. Kidney Int. 1993;43(3):682-92.
42. Cook HT, Smith J, Salmon JA, Cattell V. Functional characteristics of macrophages in glomerulonephritis in the rat. O2- generation, MHC class II expression, and eicosanoid synthesis. Am J Pathol. 1989;134(2):431-7.
43. Tomita N, Morishita R, Lan HY, Yamamoto K, Hashizume M, Notake M, et al. In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis. Journal of the American Society of Nephrology : JASN.

2000;11(7):1244-52.

44. Ikezumi Y, Hurst LA, Masaki T, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Adoptive transfer studies demonstrate that macrophages can induce proteinuria and mesangial cell proliferation. Kidney Int. 2003;63(1):83-95.

45. 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 Int. 2007;72(3):290-9.

46. Braga TT, Agudelo JS, Camara NO. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. Front Immunol. 2015;6:602. Published 2015 Nov 25. doi:10.3389/fimmu.2015.00602.

47. Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang Y, Lee VW, et al. IL-10/TGF-beta - modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2010;21(6):933-42.

48. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. 2010;11(10):889-96.

49. Anders HJ, Andersen K, Stecher B: The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. Kidney Int 83: 1010–1016, 2013pmid:23325079

50. Vitetta, Luis, and Glenda Gobe. "Uremia and chronic kidney disease: The role of the gut microflora and therapies with pro-and prebiotics." Molecular nutrition & food research 57.5 (2013): 824-832.

51. Vitetta, Luis, Anthony W. Linnane, and Glenda C. Gobe. "From the gastrointestinal tract (GIT) to the kidneys: live bacterial cultures (probiotics) mediating reductions of uremic toxin levels via free radical signaling." Toxins 5.11 (2013): 2042-2057.

52. Ramezani A,Raj DS: The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. J Am Soc Nephrol 25: 657–670, 2014pmid:24231662

53. Wong, Julia MW, et al. "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids." Journal of clinical gastroenterology 40.3 (2006): 235-243.

54. Maslowski, Kendle M., et al. "Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43." Nature 461.7268 (2009): 1282-1286.

55. Trompette, Aurélien, et al. "Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis." Nature medicine 20.2 (2014): 159-166.

56. Vinolo MA, Rodrigues HG, Festuccia WT, Crisma AR, Alves VS, Martins AR, Amaral CL, Fiamoncini J, Hirabara SM, Sato FT, Fock RA, Malheiros G, dos Santos MF, Curi R: Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 303: E272–E282, 2012pmid:22621868.

57. Andrade-Oliveira, Vinicius, et al. "Gut bacteria products prevent AKI induced by ischemia-reperfusion." Journal of the American Society of Nephrology (2015): ASN-2014030288.

58. Wu, Huiling, et al. "High Fibre Diet Induces Donor Specific Tolerance of Kidney Allografts through SCFA Induction of Tregs." Transplantation 102 (2018): S332-S333.
59. Gong, Jing, et al. "Gut Microbiota-Kidney Cross-Talk in Acute Kidney Injury." Seminars in nephrology. Vol. 39. No. 1. WB Saunders, 2019.
60. McKee, Robert A., and Rebecca A. Wingert. "Zebrafish renal pathology: emerging models of acute kidney injury." Current pathobiology reports 3.2 (2015): 171-181.
61. Huang, N., Zhang, X., Jiang, Y. et al. Int Urol Nephrol (2018). https://doi.org/10.1007/s11255-018-2026-3
62. Zhou W, Boucher RC, Bollig F, Englert C, Hildebrandt F. Characterization of mesonephric development and regeneration using transgenic zebrafish. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;299:F1040–F1047.
63. Diep CQ, et al. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. Nature. 2011;470:95–100.
64. Kamei CN, Liu Y, Drummond IA. Kidney Regeneration in Adult Zebrafish by Gentamicin Induced Injury. J Vis Exp. 2015;(102):e51912. Published 2015 Aug 3. doi:10.3791/51912
65. Singbartl, Kai, Cassandra L. Formeck, and John A. Kellum. "Kidney-Immune System Crosstalk in AKI." Seminars in nephrology. Vol. 39. No. 1. WB Saunders, 2019.
66. Humphreys, Benjamin D., et al. "Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury." Cell stem cell 2.3 (2008): 284-291.
67. Tedelind, Sofia, et al. "Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease." World journal of gastroenterology: WJG 13.20 (2007): 2826.
68. Rooks, Michelle G., and Wendy S. Garrett. "Gut microbiota, metabolites and host immunity." Nature Reviews Immunology16.6 (2016): 341.
69. Kobayashi, Mamiko, et al. "Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF-α-induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells." Biochemical and biophysical research communications 486.2 (2017): 499-505.
70. Nakajima, Akira, et al. "The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages." PloS one 12.7 (2017): e0179696.
71.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Parecer da comissão de ética em experimentação animal

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Influência da microbiota no papel dos macrófagos durante a lesão renal aguda induzida por cisplatina em zebrafish***", registrado sob o protocolo nº ***42/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***11/04/2017*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Niels Olsen Saraiva Camara***
- Departamento: *Imunologia*
- Membros da Equipe: *Guilherme José Bottura de Barros, Camila Morales*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Influence of microbiota on the role of macrophages during acute renal injury induced by cisplatin in zebrafish***", protocol nº ***42/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***4/11/2017*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Niels Olsen Saraiva Camara***
- Team members: *Guilherme José Bottura de Barros, Camila Morales.*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Danio rerio	*Wild type AB*	*Macho/male*	*0,3 g*	*93*
	Tg(Lys:DSRED)	*Macho/male*	*0,3 g*	*48*
	Tg(mpeg-1:mCherry)	*Macho/male*		*59*

São Paulo, 18 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

8.2. Ficha do Aluno

29/01/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

42133 - 4403751/1 - Guilherme Jose Bottura de Barros

Email:	guilherme.jose.barros@usp.br
Data de Nascimento:	14/09/1993
Cédula de Identidade:	RG - 39.348.369-1 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Fundamentais para a Saúde - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2016

Curso:	Mestrado
Programa:	Imunologia
Data de Matrícula:	23/01/2017
Início da Contagem de Prazo:	23/01/2017
Data Limite para o Depósito:	23/07/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Anderson de Sá Nunes - 23/01/2017 até 07/05/2017. Email: sanunes@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Niels Olsen Saraiva Câmara - 08/05/2017 até o presente. Email: niels@icb.usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 13/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 30/04/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 23/01/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/07/2018
Impresso em: 29/01/2019 15:05:47

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

42133 - 4403751/1 - Guilherme Jose Bottura de Barros

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMI5881-5/1	Regulação da Resposta Imune	03/03/2017	03/05/2017	120	8	100	A	N	Concluída
ICB5711-3/1	Redação de Trabalhos Científicos	07/03/2017	10/04/2017	45	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMI5862-10/1	Seminário Didático-Científico em Imunologia I	09/03/2017	21/06/2017	60	4	100	A	N	Concluída
MIP5737-2/5	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/06/2017	11/06/2017	30	2	100	A	N	Concluída
BMF5888-1/2	Farmacologia da Resposta Inflamatória	13/06/2017	03/07/2017	30	2	100	A	N	Concluída
BMI5853-5/1	Imunobiologia dos Tumores	08/08/2017	30/08/2017	60	4	100	A	N	Concluída
BMI5863-9/1	Seminário Didático-Científico em Imunologia II	17/08/2017	29/11/2017	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5745-1/3	Grandes Endemias	03/10/2017	30/11/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5752-1/3	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público	16/10/2017	29/10/2017	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
ICB5710-4/1	Controle Molecular da Morte Celular	02/04/2018	15/04/2018	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5764-1/1	Hormônios e Processos Inflamatórios	02/04/2018	22/04/2018	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5750-3/1	Métodos Avançados em Biologia Celular	08/05/2018	26/06/2018	60	4	87	B	N	Concluída
ICB5752-1/4	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público	25/06/2018	08/07/2018	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	16	32	32
Estágios:			
Total:	16	32	32

Créditos Atribuídos à Dissertação: 64

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/07/2018

Impresso em: 29/01/2019 15:05:47

9.ATIVIDADES ACADÊMICAS E CIENTÍFICAS

9. Atividades Acadêmicas e Científicas

9.1 Formação complementar

- Organizador do "*VII Encontro de Pós-Graduação em Imunologia*". Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil. 19-21/02/2018.
- Avaliador de Pôster na Disciplina BMI 296 – Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil. 13/11/2017.
- Congresso XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology. The influence of acetate on the activation of macrophages in acute renal injury induced by cisplatin in zebrafish. 2017.
- Congresso "*VI Encontro de Pós-Graduação em Imunologia*". Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil. 13-14/02/2017.
- Mini-curso *"Biossegurança em Biotérios"*. Dr. Joel Majerowicz da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instituto de Ciências Biomédicas. Carga horária: 8 horas. 26/02/2016.
- Curso *"Uso de Animais em Experimentação"*. Instituto de Ciências Biomédicas. Carga horária: 10 horas. 24/02/2016.
- Curso *"Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos"*. Instituto de Ciências Biomédicas. 23/02/2016.
- Curso *"Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB"*. Instituto de Ciências Biomédicas. Carga horária: 6 horas. 22/02/2016.

9.2 Capítulo de livros

- Terra, FF; **Barros, GJB**; Câmara, NOS. Imunologia dos Transplantes. Livro: Imunoensaios: Fundamento e Aplicações. (aguardando publicação).

9.3 Prêmios

- Menção honrosa pelo desempenho de terceira melhor apresentação oral no nível Mestrado no "VII encontro de Pós-Graduação em Imunologia". Título do trabalho: The influence of acetate on the activation of macrophages in acute renal injury induced by cisplatin in zebrafish. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil. 02/2018