

**BARBARA NUNES PADOVANI**

**Caracterização da lesão renal aguda induzida por cisplatina em *zebrafish* e o efeito do  
probiótico *Bacillus subtilis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2021**

**BARBARA NUNES PADOVANI**

**Caracterização da lesão renal aguda induzida por cisplatina em *zebrafish* e o efeito do  
probiótico *Bacillus subtilis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão Original

**SÃO PAULO**

**2021**

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)

Nunes Padovani, Barbara

Caracterização da lesão renal aguda induzida por cisplatina em zebrafish e o efeito do probiótico *Bacillus subtilis* / Barbara Nunes Padovani; orientador Niels Olsen Saraiva Câmara. -- São Paulo, 2021.

69 p.

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

1. lesão renal aguda. 2. cisplatina. 3. probiótico. 4. *Bacillus subtilis*. 5. zebrafish. I. Olsen Saraiva Câmara, Niels, orientador. II. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* na lesão renal aguda induzida por cisplatina em zebrafish", protocolada sob o CEUA nº 8619291019, sob a responsabilidade de **Niels Olsen Saraiva Câmara e equipe; Barbara Nunes Paovani; Barbara Nunes Paovani; Camila Ideli Morales Fenero; Camila Ideli Morales Fenero; Mariana Abrantes do Amaral; Mariana Abrantes do Amaral; Tatiana Takiishi; Tatiana Takiishi; Niels Olsen Saraiva Câmara; Niels Olsen Saraiva Câmara** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 20/02/2020.

We certify that the proposal "Effect of probiotic *Bacillus subtilis* on cisplatin-induced acute kidney injury in zebrafish ", utilizing 2700 Fishes (2700 females), protocol number CEUA 8619291019, under the responsibility of **Niels Olsen Saraiva Câmara and team; Barbara Nunes Paovani; Barbara Nunes Paovani; Camila Ideli Morales Fenero; Camila Ideli Morales Fenero; Mariana Abrantes do Amaral; Mariana Abrantes do Amaral; Tatiana Takiishi; Tatiana Takiishi; Niels Olsen Saraiva Câmara; Niels Olsen Saraiva Câmara** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/20/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: **Biotério de Zebrafish do Instituto de Biociências**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **0 a 8 dias**

Linhagem: **AB**

**N amostral:** **2700**

São Paulo, 22 de fevereiro de 2021



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial, as minhas irmãs, Jéssica e Karina, por todo amor e paciência. A minha mãe que sempre foi a minha base e meu maior exemplo de mulher forte e independente. Minhas palavras aqui não seriam suficientes para mostrar quão grata sou a você.

Agradeço ao meu orientador, Niels, por todo suporte e incentivo nesses últimos anos. Obrigada por me guiar e colaborar com o meu amadurecimento. Estar em seu laboratório foi uma das escolhas mais certas que já fiz. Obrigada também por aceitar a minha teimosia.

Agradeço imensamente a Camila, Lais e Mari por toda ajuda e suporte que me deram. Vocês estavam lá em cada etapa: nos experimentos longos, na discussão dos resultados, no café após o almoço, nos desabafos e nos abraços. Vocês, sem dúvida alguma, foram a minha base. Meu agradecimento a Juliana e o Luan que posteriormente entraram no *team* zebra e que vieram para acrescentar mais ainda ao grupo. Vocês são maravilhosos.

Agradeço a minha amiga, a Rafaela. Obrigada por cada conversa, conselho, risada e abraço. Você muitas vezes transformou pequenos momentos em algo inesquecível. Você é luz e obrigada por deixar essa caminhada mais leve.

Agradeço aos meus amigos mais queridos, Alex, Laísa e Mariana, por toda ajuda e ombro amigo que me deram neste período e nos últimos 10 anos. Sempre serei grata por cada conversa, carona, ligações e risadas.

Aos meus amigos de laboratório que sempre estiveram disponíveis para discutir ciência e me ajudar com experimentos fica aqui o meu agradecimento. Em especial, ao Omar e a Marcella que sempre estiveram disponíveis para me ajudar. Não poderia esquecer de agradecer a Elo, Izabella, Cris, Tâmis, Paulo, Luiza e a Tati que de uma forma ou de outra fizeram parte dessa jornada.

Agradeço a Meire, técnica do nosso laboratório, e ao Mario do CEFAP-USP por toda paciência, ajuda e o suporte que me deram. À Maria Rita pela colaboração no Biotério de Zebrafish.

Agradeço às agências de fomento pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização do projeto: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - nº 2017/05264-7, 2015/21644-9). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES) – Código 001.

## RESUMO

Nunes Padovani, B. Caracterização da lesão renal aguda induzida por cisplatina em *zebrafish* e o efeito do probiótico *Bacillus subtilis* [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

A lesão renal aguda (LRA) é uma síndrome de fisiopatologia multifatorial e complexa, que pode ser causada por isquemia, sepse e o uso de medicamentos nefrotóxicos. Um dos agentes nefrotóxicos mais comuns é a cisplatina, fármaco antineoplásico que tem a capacidade de interferir nos mecanismos de reparo do DNA, levando à apoptose nas células cancerígenas. O acúmulo da cisplatina nos túbulos renais pode gerar a LRA e resultar na intensa diminuição da taxa de filtração glomerular, representada pela elevação da creatinina sérica, geração de estresse oxidativo nos rins e o desenvolvimento de um processo inflamatório no tecido renal. Desta forma, a cisplatina tem sido adotada como indutor de LRA em modelos experimentais. Neste sentido, o *zebrafish* (*Danio rerio*) tem despontado como ferramenta para estudar diversas doenças humanas visto que esse pequeno peixe tropical possui atributos fisiológicos e anatômicos semelhantes aos de mamíferos e alta similaridade genética com humanos, além de possuir vantagens como tamanho pequeno, alta taxa de reprodução externa e transparência óptica da larva. Atualmente, não existe um tratamento preventivo para a LRA causada pela cisplatina, deste modo, se torna imprescindível avaliar métodos que possam atuar na renoproteção e evitar o desenvolvimento desta condição durante o tratamento dos pacientes com câncer. O uso de probióticos tem surgido como uma possibilidade de tratamento para doenças inflamatórias incluindo a LRA. Assim, nossa hipótese aponta que o probiótico *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) será capaz de modular o processo inflamatório da LRA induzida pela cisplatina em larvas de *zebrafish*. O modelo atual de indução de LRA por cisplatina na larva de *zebrafish* requer um grande desafio técnico e especialização para sua aplicação, é com base nisso que este projeto teve como objetivo desenvolver um modelo de LRA utilizando à cisplatina como agente inflamatório e conjuntamente estudar o papel do probiótico *B. subtilis*, na modulação da inflamação. Para isso, induzimos e caracterizamos a inflamação ao adicionar cisplatina na água de larvas de 7 dias pós-fertilização (dpf) e investigamos os efeitos do *B. subtilis* nestes animais. Nossos dados sugerem que a cisplatina afeta a sobrevivência das larvas de forma dose-dependente e induz a expressão aumentada de IL-12, IL-6 e IL-8 após 48 horas. Larvas expostas a 0,10 mg/mL de cisplatina pelo mesmo período de tempo apresentaram diminuição de células mieloides na região glomerular dos pronefros. Por outro lado, foi observado o aumento de neutrófilos em toda larva após 48 horas. A análise *in silico* realizada indica uma possível via a ser estudada (Nrf2) no futuro. Por último, resultados preliminares utilizando o tratamento com o probiótico não demonstraram afetar a sobrevivência das larvas expostas à cisplatina.

**PALAVRAS CHAVE:** lesão renal aguda; cisplatina; probiótico; *Bacillus subtilis*; zebrafish.



## ABSTRACT

Nunes Padovani, B. Characterization of acute kidney injury induced by cisplatin in zebrafish and the effect of probiotic *Bacillus subtilis* [Master thesis (Master of Science in Immunology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2021.

The acute kidney injury (AKI) is a multifactorial and complex pathophysiology syndrome, which can be caused by ischemia, sepsis and the use of nephrotoxic drugs. One of the most common nephrotoxic agents is cisplatin, an antineoplastic drug that has the ability to interfere with DNA repair mechanisms, leading to apoptosis in cancer cells. The accumulation of cisplatin in the renal tubules can generate AKI resulting in an intense decrease in the glomerular filtration rate, represented by the increase in serum creatinine, generation of oxidative stress in the kidneys and the development of an inflammatory process in the renal tissue. Thus, cisplatin has been adopted as an AKI inducer in experimental models. In this sense, the zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a tool to study several human diseases since this small tropical fish has physiological and anatomical attributes similar to those of mammals and high genetic similarity with humans, in addition to having advantages such as small size, high rate of external reproduction and optical transparency of the larva. Currently, there is no preventive treatment for AKI caused by cisplatin, therefore, it is essential to evaluate methods that can act in renoprotection and to avoid the development of this condition during the treatment of cancer patients. The use of probiotics has emerged as a possibility of treatment for inflammatory diseases including AKI. Thus, our hypothesis points out that the probiotic *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) will be able to modulate the inflammatory process of AKI induced by cisplatin in zebrafish larvae. The current model of AKI induction by cisplatin in zebrafish larvae requires a great technical challenge and specialization for its application, it is based on this that this project aims to develop an AKI model using cisplatin as an inflammatory agent and jointly study the role of the probiotic *B. subtilis* in the modulation of inflammation. For this, we induced and characterized inflammation by adding cisplatin in the water of larvae 7 days post fertilization (dpf) and investigate the effects of *B. subtilis* on these animals. Our data suggest that cisplatin affects larval survival in a dose-dependent manner and induces increased expression of IL-12, IL-6 and IL-8 after 48 hours. Larvae exposed to 0.10 mg/mL of cisplatin for the same period of time showed a decrease in myeloid cells in the glomerular region of the pronephros. On the other hand, an increase in neutrophils was observed in all larvae after 48 hours. The *in silico* analysis performed indicates a possible path to be studied (Nrf2) in the future. Finally, preliminary results using the treatment with the probiotic did not affect the survival of larvae exposed to cisplatin.

**KEYWORDS:** acute kidney injury; cisplatin; probiotic; *Bacillus subtilis*; zebrafish.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> O <i>zebrafish</i> como modelo experimental. ....	20
<b>Figura 2:</b> Estruturas renais em mamíferos e <i>zebrafish</i> .....	22
<b>Figura 3:</b> Modelo de ontogenia hematopoiética no <i>zebrafish</i> .....	24
<b>Figura 4:</b> O intestino do <i>zebrafish</i> em estágio larval. ....	25
<b>Figura 5:</b> Primeira curva de sobrevivência de larvas de <i>zebrafish</i> em resposta a concentrações crescentes de cisplatina.....	38
<b>Figura 6:</b> Expressão gênica relativa da citocina IL-1 $\beta$ e KIM-1. ....	40
<b>Figura 7:</b> Segunda curva de sobrevivência de larvas de <i>zebrafish</i> em resposta a concentrações crescentes de cisplatina.....	41
<b>Figura 8:</b> Cisplatina induz alteração da curvatura do eixo rostro-caudal e diminuição dos movimentos após 48 horas.....	43
<b>Figura 9:</b> Média da intensidade de fluorescência oriundas de células mieloides na região glomerular do pronefros. ....	44
<b>Figura 10:</b> Número de células positivas na região glomerular do pronefros para morte celular (TUNEL).....	46
<b>Figura 11:</b> Número de células positivas na região glomerular do pronefros para Histona H3 fosforilada .....	49
<b>Figura 12:</b> Expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias e KIM-1 em 24 e 48 horas de exposição a cisplatina.....	51
<b>Figura 13:</b> Porcentagem de células lisozima+, macrófagos e neutrófilos em larvas após 24 horas de exposição a cisplatina.....	53
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de células lisozima+, macrófagos e neutrófilos em larvas após 48 horas de exposição a cisplatina.....	54
<b>Figura 15:</b> Análise <i>in silico</i> do efeito do Nrf2 <i>knockout</i> (Nrf2 KO) na lesão renal induzida pela cisplatina. ....	55
<b>Figura 16:</b> Curva de sobrevivência utilizando concentrações crescentes de probiótico <i>Bacillus subtilis</i> . ....	57
<b>Figura 17:</b> Média da intensidade de fluorescência oriundas de células mieloides na região glomerular do pronefros e número de células lisozima positivas no intestino. ....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Comparação das microbiotas de <i>zebrafish</i> , camundongo e humano. ....	27
<b>Tabela 2:</b> Lista dos primers usado para qPCR. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AGM** - Aorta-Gônada-Mesonefros

***Apaf-1*** - *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*

**APC** - Células Apresentação de Antígenos

**ARE** - *Antioxidant Response Element*

**BHI** - *Brain Heart Infusion*

**Bs** - *Bacillus subtilis*

**CD** - *Cluster of differentiation*

**cDNA** - *complementary DNA*

**CEUA** - Comitê de Ética para Uso de Animais de Experimentação

**CHT** - *Caudal Hematopoietic Tissue*

**Ctr** - Controle

**DAMPs** - *Damage-Associated Molecular Pattern*

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DNA** - *Deoxyribonucleic acid*

**dpf** - Dias Pós-Fertilização

**dUTP** - *Deoxyuridine Triphosphate*

**elf1- $\alpha$**  - *elongation fator 1 - alpha*

**EMPs** - *Erythromyeloid Progenitor*

***foxp3*** - *forkhead box P3*

**FSC** - *Foward scatter*

**GF** - *Germ Free*

**GFP** - *Green Fluorescent Protein*

***havcr1*** - *Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1*

**hpf** - Horas Pós- Fertilização

**HSC** - *Hematopoietic Stem cells*

**IB** - Instituto de Biociências

**ICB** - Instituto de Ciências Biomédicas

**ICM** - *Intermediate Cell Mass*

**Ig** - *Imunoglobulina*

**IL** - *Interleucina*

**keap1** - *Kelch Like ECH Associated Protein- 1*

**kim-1** - *Kidney Injury Molecule-1*

**KO** - *knockout*

**LRA** - *Lesão Renal Aguda*

**M1** - *Macrófago de tipo 1*

**M2** - *Macrófago de tipo 2*

**MFI** - *Mean Fluorescence Intensity*

**MHC** - *Major Histocompatibility Complex*

**mRNA** - *Messenger RNA*

**MS222** - *Tricaína metanosulfonato*

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

**NF- $\kappa$ B** - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**NK** - *Natural killer*

**Nrf2** - *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

**PAMPs** - *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

**PBI** - *Posterior Blood Island*

**PBS** - *Phosphate Buffered Saline*

**PLM** - *Posterior Lateral Mesoderm*

**Rag** - *Recombination-Activating Gene*

**RNA** - *Ribonucleic Acid*

**ROS** - *Reactive Oxygen Species*

**SFB** - *Soro Fetal Bovino*

**spf** - *Semanas Pós-Fertilização*

**SSC** - *Side Scatter*

**TGF- $\beta$**  - *Transforming Growth Fator -  $\beta$*

**Th** - *T helper cell*

**T-regs** - *Regulatory T cells*

**TUNEL** - *Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) dUTP nick end labeling*

**USP** - *Universidade de São Paulo*

**VDA** - *Ventral Wall of Dorsal Aorta*

**VEGF** - *Vascular Endothelial Growth Factor*

**WT** - *Wild Type*

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1. <i>LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR CISPLATINA</i> .....	17
1.2. <i>ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL</i> .....	18
1.2.1. <i>Zebrafish como modelo de doenças humanas</i> .....	18
1.2.2. <i>O Rim do zebrafish</i> .....	20
1.2.3. <i>O sistema imune do zebrafish</i> .....	22
1.2.4. <i>A microbiota do zebrafish</i> .....	25
1.3. <i>PROBIÓTICOS</i> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1. <i>OBJETIVO GERAL</i> .....	30
2.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1. <i>ANIMAIS</i> .....	31
3.2. <i>LESÃO RENAL AGUDA</i> .....	31
3.2.1. <i>Modelo de cisplatina em larvas</i> .....	31
3.2.2. <i>Análise da atividade locomotora</i> .....	31
3.2.3. <i>qPCR</i> .....	32
3.2.4. <i>Quantificação de células mieloides por microscopia</i> .....	33
3.2.5. <i>Ensaio de morte celular (TUNEL)</i> .....	33
3.2.6 <i>Imunofluorescência</i> .....	34
3.2.7. <i>Citometria de fluxo</i> .....	35
3.3. <i>PROBIÓTICO B. SUBTILIS</i> .....	35
3.3.1. <i>Padronização das condições de cultivo de Bacillus Subtilis</i> .....	35
3.3.2. <i>Avaliação de viabilidade das larvas de zebrafish</i> .....	36
3.3.3. <i>Quantificação de células mieloides por microscopia</i> .....	36
3.4. <i>ANÁLISES IN SILICO</i> .....	36
3.5. <i>ESTATÍSTICA</i> .....	37

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1. A CISPLATINA (BLAU FARMACÊUTICA) INDUZ MORTALIDADE DE FORMA DOSE-DEPENDENTE .....	38
4.2. A CISPLATINA (BLAU FARMACÊUTICA) NÃO INDUZ DIFERENÇA NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E LESÃO RENAL .....	39
4.3. A CISPLATINA (SIGMA) INDUZ MORTALIDADE DE FORMA DOSE-DEPENDENTE .....	40
4.4. A CISPLATINA INDUZ DIMINUIÇÃO DOS MOVIMENTOS E ALTERAÇÃO DA CURVATURA DO EIXO ROSTRO-CAUDAL DE LARVAS DE ZEBRAFISH .....	41
4.5. CISPLATINA GERA DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS MIELOIDES NO PRONEFROS .....	43
4.6. EXPOSIÇÃO DE CISPLATINA INDUZ MORTE CELULAR NO PRONEFROS APÓS 48 HORAS .....	45
4.7. EXPOSIÇÃO DE CISPLATINA INDUZ AUMENTO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS 24 HORAS E 48 HORAS.....	47
4.8. CISPLATINA INDUZ AUMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS APÓS 48 HORAS.....	50
4.9. CISPLATINA ALTERA A FREQUÊNCIA DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS.....	52
4.10. A VIA NRF2 DESEMPENHA UM IMPORTANTE PAPEL NO CONTROLE DA MORTE CELULAR PROGRAMADA APÓS O TRATAMENTO COM CISPLATINA .....	54
4.11. AS CONCENTRAÇÕES DE <i>B. SUBTILIS</i> TESTADAS NÃO RESULTARAM NA MAIOR SOBREVIVÊNCIA DAS LARVAS.....	56
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>67</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### *1.1. Lesão renal aguda induzida por cisplatina*

Os rins são responsáveis por diversas funções fisiológicas importantes para a manutenção da homeostasia do nosso organismo, tais como, a filtração do sangue, remoção do excesso de resíduos ou toxinas advindos do metabolismo de proteínas, regulação das concentrações de íons e produção de hormônios [1]. Danos no tecido renal podem acarretar uma condição heterogênea denominada lesão renal aguda (LRA), um importante problema de saúde pública que afeta mais de 13 milhões de pessoas por ano no mundo e resulta em 1,7 milhão de mortes. Além disso, essa doença está associada a maior permanência hospitalar e utilização substancial de recursos financeiros [2, 3]. Em humanos a LRA é diagnosticada pela alta concentração sérica de creatinina e é caracterizada por uma diminuição abrupta da função renal decorrente da lesão e morte de células epiteliais tubulares, lesão e ativação de células endoteliais e infiltração de leucócitos [4, 5]. Este quadro clínico está comumente associado a infecções bacterianas, sepse, dano gerado por isquemia/reperfusão e o uso de medicamentos nefrotóxicos [6]. Neste último caso, a perda da função renal pode ocorrer a partir do uso de fármacos utilizados no tratamento de câncer, como por exemplo a cisplatina. O mecanismo de ação da cisplatina se baseia na ligação ao DNA e, conseqüentemente, a indução de vias de morte celular [7]. Entretanto, por conta da sua falta de especificidade, diversos efeitos colaterais estão associados com o uso deste medicamento, como danos renais graves, reações alérgicas, diminuição da resposta imune a infecções, distúrbios gastrointestinais, entre outros [8]. Devido ao seu baixo peso molecular, o acúmulo deste fármaco nos rins contribui para a nefrotoxicidade visto que a morte celular e a inflamação são encontradas predominantemente no segmento tubular proximal do néfron, local onde ocorre o máximo acúmulo de cisplatina [9]. A fisiopatologia da LRA induzida por cisplatina consiste principalmente no dano ao túbulo proximal, estresse oxidativo, processo inflamatório e dano vascular no rim [10].

Devido ao efeito nefrotóxico da cisplatina, atualmente, este fármaco é utilizado como modelo de LRA em animais de experimentação [11]. Em roedores tem se observado que o tratamento com cisplatina resulta em dano renal funcional a partir do quinto dia com aumento característico de creatinina sérica [12]. Contudo, apesar de camundongos serem modelos de experimentação viáveis, o seu uso pode acarretar maiores gastos quanto

a sua manutenção quando comparado a outros modelos experimentais. Neste sentido, o *zebrafish* se torna um modelo interessante no estudo de doenças renais, em razão do menor custo de manutenção, facilidade de manipulação, desenvolvimento rápido e alto número de descendentes. Além disso, a larva de *zebrafish* possui transparência ótica, conservação de processos fisiológicos e inflamatórios, capacidade regenerativa entre outras vantagens que serão aprofundadas nos próximos tópicos.

Na literatura já tem sido descrito o uso desse peixe para estudar a lesão renal [13, 14]. Na fase larval, existem protocolos de microinjeção intravenosa de gentamicina que ocasiona características consistentes de LRA, como ruptura morfológica do túbulo e formação de edema [15]. De forma similar, a microinjeção de cisplatina em larvas de 48 horas pós-fertilização (hpf), resultou na vacuolização celular, distensão do lúmen tubular e achatamento e perda das bordas em escova das células tubulares, ocasionando a diminuição da função renal e desequilíbrio hídrico [16, 17]. Lamentavelmente, esses protocolos implicam em um grande desafio técnico devido à necessidade de retirar as larvas do córion antes da sua eclosão natural e realizar a microinjeção na corrente sanguínea em cada um dos animais, o que ocasiona o aumento da mortalidade induzida pela técnica além de impossibilitar algumas metodologias como a derivação de animais *germ-free* (GF) e dificultar a obtenção do número necessário de animais para algumas análises. Neste sentido, nosso laboratório tem procurado desenvolver novos modelos de LRA no *zebrafish*, com abordagens mais simples que permitem resultados em poucos dias. Recentemente, desenvolvemos um modelo de LRA induzida por cisplatina em peixes adultos com perda de estrutura tubular, aumento do infiltrado inflamatório e alta taxa de morte celular no rim [18]. Outros estudos têm observado que a lesão causada por cisplatina parece ser evolutivamente conservada entre os teleósteos e humanos, o que faz o *zebrafish* um organismo interessante para o estudo da inflamação induzida por este agente [16].

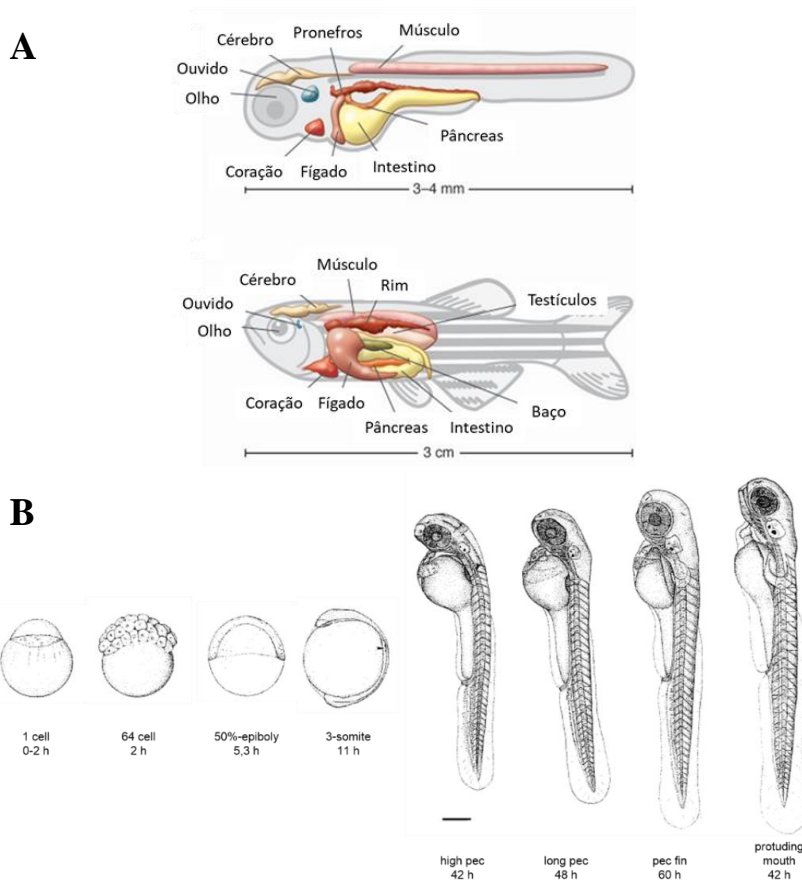
## *1.2. Zebrafish como modelo experimental*

### *1.2.1. Zebrafish como modelo de doenças humanas*

Tradicionalmente, estudos na área de imunologia tem utilizado modelos experimentais de mamíferos como camundongos e ratos, porém, em anos recentes o

*zebrafish*, tem despontado como ferramenta para estudar diversas doenças humanas. O *zebrafish* (*Danio rerio*) ou peixe-zebra, é um peixe tropical ósseo (teleósteo) de água doce e é originário dos córregos da região sudeste do Himalaia [19].

O *zebrafish* é um peixe de pequeno tamanho com uma vida média de 3,5 anos mas pode viver até 5,5 anos em cativeiro e, em geral, atinge a maturidade sexual entre 3 a 6 meses de vida, com grande dimorfismo sexual [20]. O *zebrafish* surgiu como modelo experimental na década de 70 introduzido por George Streisinger como um vertebrado para estudos de genética e biologia do desenvolvimento [21]. Os atributos pelos quais Streisinger escolheu o *zebrafish* como organismo experimental são considerados na atualidade para estudar doenças humanas [22]. Estes incluem, atributos fisiológicos e anatômicos semelhantes aos dos mamíferos (Figura 1A); pequeno tamanho do adulto (~4-5 cm), o que diminui os custos e o espaço para manutenção; alta taxa de reprodução externa (uma fêmea pode produzir até 300 ovos por semana) e rápido desenvolvimento (Figura 1B); larvas com corpo translúcido que em conjunto com o uso de animais transgênicos, facilita o exame não invasivo de órgãos e processos biológicos [23]; alta similaridade genética com humanos (70%) e facilidade de manipulação genética permitindo ensaios de genética direta para o estudo de diferentes genes envolvidos em doenças humanas [23-25].



**Figura 1: O *zebrafish* como modelo experimental.**

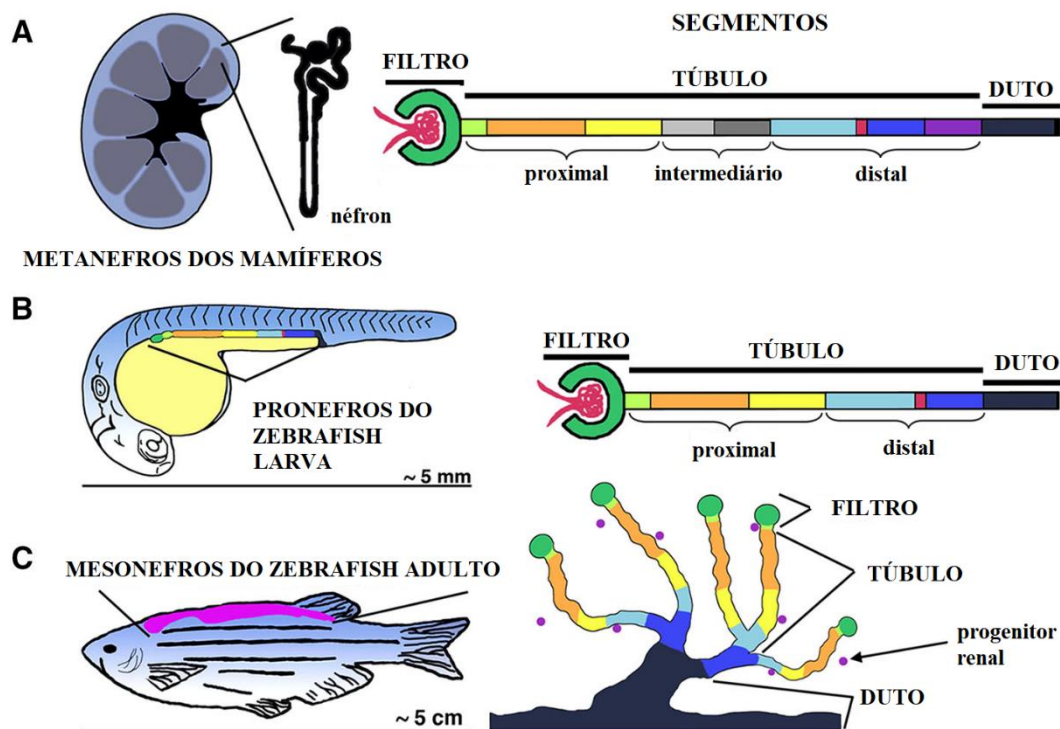
**A.** Desenho representando os órgãos do *zebrafish* em estado larval (acima) de 3 a 5 dias pós-fertilização e em um adulto (abaixo). (Adaptado de Santiorello & Zon, 2012, *J Clin Invest*) [23]. **B.** Desenho de embriões de *zebrafish* em diferentes estágios de desenvolvimento. A fase unicelular (período zigoto) dura cerca de 2 horas pós-fertilização (hpf) e é seguido pelo período de clivagem (divisão celular), blastulação (2-5 hpf), gastrulação (5-10hpf), segmentação (10-22 hpf) até o período de eclosão (48-72 hpf). (Adaptado de Kimmel *et al*, 1995, *Dev Dyn* [26])

### 1.2.2. O Rim do *zebrafish*

O rim do *zebrafish* possui aspectos estruturais e fisiológicos conservados comparáveis ao metanefros dos mamíferos (Figura 2A) [27], pelo que tem sido usado para o estudos de desenvolvimento, função e regeneração tecidual [28, 29]. O desenvolvimento renal no *zebrafish* inicia com a formação do pronefros após o fim da gastrulação (~10 hpf), e se encontra totalmente estruturado e funcional às 48 hpf. Nesta etapa é composto por dois pronefros localizados de forma horizontal laterais à bexiga natatória, estruturalmente divididos em glomérulo, pescoço, túbulo contorcido proximal, túbulo reto proximal, túbulo anterior distal, túbulo posterior distal, e ducto coletor, terminando na cloaca (Figura 2B) [28]. À medida que o peixe vai se desenvolvendo e

crescendo, esta estrutura básica começa a se ramificar formando o mesonefros, sendo composto na fase adulta, por três partes principais: a cabeça, o tronco e a cauda (Figura 2C), que têm função similar ao córtex e à medula renal em humanos. O órgão é localizado na parede dorsal do corpo, entre a bexiga natatória e a coluna vertebral [28]. Os nefros são bifurcados e drenam para um único ducto coletor [30] e semelhante aos humanos, o *Danio rerio* apresenta borda em escova desenvolvida [27]. Funcionalmente o rim do *zebrafish* compartilha algumas características com o rim de mamíferos como a regulação da osmolaridade e a excreção de água. Porém, como peixes de água doce permanecem em meios com osmolaridade muito baixa, tendem a ser hiper osmóticos e portanto dependem também de outros órgãos como as guelras, e a pele em estágios iniciais, para regular estes processos [31].

Os rins, tanto na fase larval quanto fase adulta, são ótimos sistemas para o estudo processos regenerativos após lesão, visto que o *zebrafish* é capaz de gerar néfrons durante toda sua vida e regenerar o órgão sem a formação de uma cicatriz fibrótica, isso devido à presença de progenitores renais até a vida adulta (Figura 2C). Além disso, um ponto interessante a ser ressaltado é que o rim do *zebrafish* além de apresentar a função de filtração de água e sangue também atua como órgão hematopoiético, equivalente à medula óssea em mamíferos [32].



**Figura 2: Estruturas renais em mamíferos e *zebrafish*.**

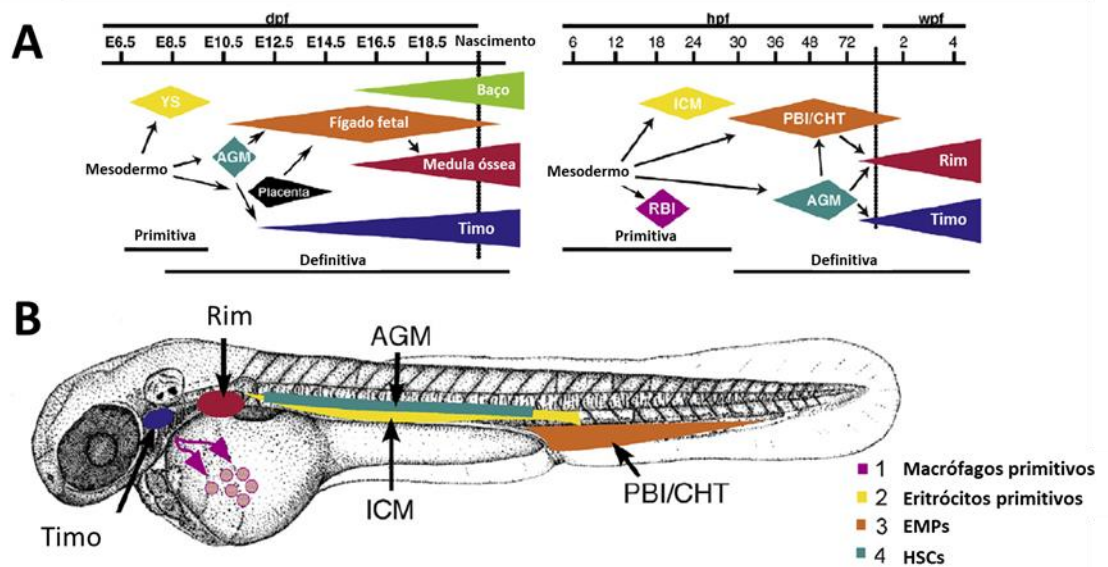
A. Metanefros de um mamífero e segmentos do néfron. B. Pronefros da larva de *zebrafish* é composto por dois néfrons, sendo organizado em um glomérulo, o túbulo proximal, o distal e um ducto coletor. C. O rim do *zebrafish* adulto, apesar de sua diferença anatômica, tem complexidade funcional similar ao dos mamíferos, o rim possui é composto por diversos glomérulos ligados aos túbulos que se ligam ao ducto. Ilustração adaptada de McKee, *et.al*, 2015, *Curr Pathobiol Rep* [33]

### 1.2.3. O sistema imune do *zebrafish*

O *zebrafish* possui maturação diferenciada do sistema imune: a imunidade inata está ativa a partir das 48 hpf enquanto o sistema imune adaptativo está completamente funcional ao redor das 4-6 spf (semanas pós-fertilização). Os sítios anatômicos da hematopoiese no *zebrafish* são diferentes dos mamíferos embora os mecanismos moleculares envolvidos sejam altamente conservados [34, 35]. A hematopoiese no *zebrafish* se desenvolve em duas ondas, primeiro, durante a embriogênese acontece a hematopoiese primitiva onde são produzidos eritrócitos e macrófagos [36, 37]. Este primeiro evento ocorre principalmente na Massa Celular Intermediária (*Intermedial Cell Mass* - ICM) que se forma bilateralmente ao mesoderma da Placa Lateral Posterior (PLM) [38]. Desta forma, se observam eritrócitos circulantes ao redor das 24 hpf e granulócitos às 36 hpf, já macrófagos podem ser observados desde as 22 hpf no saco vitelino [37, 39, 40]. A segunda onda ou hematopoiese definitiva começa ao redor das 26 hpf e é

responsável pela produção de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) autorrenováveis, que irão manter as linhagens mieloide, eritroide e linfoide pelo resto da vida do *zebrafish* [41]. Primeiramente, a Ilha de Sangue Posterior (PBI) gera transientemente progenitores eritro-mieloides (EMPs) que se diferenciarão em linhagens eritroides e mieloides, porém não linfoides, que vão povoar a larva do *zebrafish* [42, 43]. Logo, ao redor das 28-30 hpf as verdadeiras HSCs se especializam a partir de células endoteliais na parede Ventral da Aorta Dorsal (VDA), também conhecido como Aorta-Gônada-Mesonefros (AGM) [44, 45]. HSCs se separam do endotélio e entram em circulação semeando os três órgãos hematopoiéticos principais: o Tecido Hematopoiético Caudal (CHT) aos 2 dpf, o Timo aos 3 dpf e o Rim aos 4 dpf. As células do CHT serão fonte de macrófagos, neutrófilos e monócitos durante o período larval. Enquanto o pronefros/rim, será o órgão equivalente à medula óssea dos mamíferos e produzirá as linhagens mieloide, eritroide, tromboide e linfoide, deixando o timo para a produção de linfócitos T durante idade adulta [43, 45-49]. Um resumo e comparação com a hematopoiese de camundongos é mostrado da Figura 3.

O desenvolvimento de linfócitos T no timo do *zebrafish* se assemelha ao encontrado em mamíferos, com o timo completamente maduro na 3<sup>a</sup> spf [50]. A linfopoiese se inicia em torno das 92 hpf resultando em linfócitos T com receptores de superfície CD3, CD4 e CD8, além disso, a geração do TCR é conservada e ocorre a partir da recombinação V(D)J com ação de *rag1-2* [51-53]. Também foi encontrada evidência da presença de células T *foxp3* positivas com função reguladora [54]. Os linfócitos B estão presentes no *zebrafish* e se desenvolvem a partir dos 4 dpf no pâncreas e, posteriormente, são geradas no rim [55, 56]. Os linfócitos B também apresentam rearranjo V(D)J dependente de *rag1* e *rag2*, mas não apresentam a troca de classe de imunoglobulina, possuindo somente os subtipos IgM, IgD e IgZ, este último próprio dos teleostes [57, 58]. As células B são encontradas em vários órgãos e tecidos com preferência no baço, intestino e rim [59]. Já as células apresentadoras de antígenos (APCs), também tem como função processar e apresentar peptídeos, como em mamíferos, sendo identificados genes MHC classe I, II e III [60, 61]. Em contraposição aos vertebrados mais desenvolvidos, o *zebrafish* não possui órgãos linfoides secundários bem definidos como linfonodos, Placas de Peyer no intestino ou centros germinativos esplênicos [62].



**Figura 3: Modelo de ontogenia hematopoiética no *zebrafish*.**

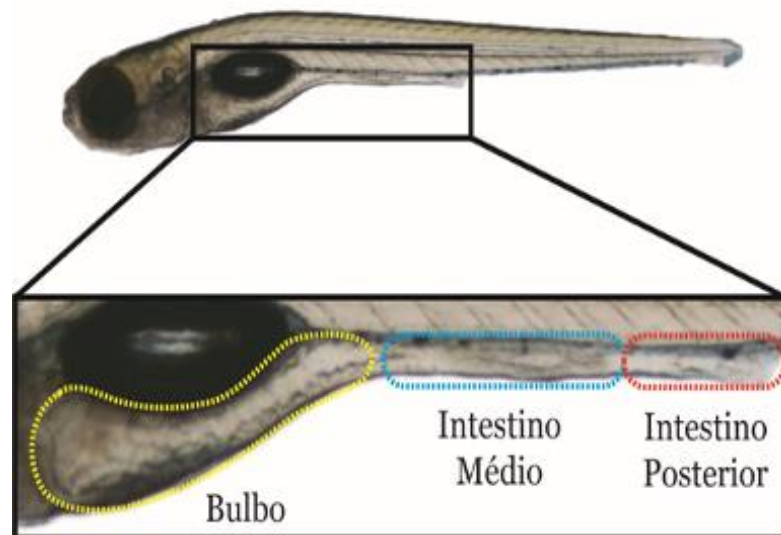
**A.** Hematopoiese de acordo com o estágio do desenvolvimento de camundongos e *zebrafish*. No camundongo (esquerda), a hematopoiese primitiva inicia no saco vitelino (YS; amarelo), produzindo células eritroides primitivas e macrófagos. Posteriormente, os progenitores eritromielóides definitivos (EMPs) emergem no YS. As HSCs são especificadas na região da aorta-gônada-mesonefros (AGM, azul-petróleo). Essas HSCs eventualmente semeiam o fígado fetal (laranja), o principal local de hematopoiese embrionária. A hematopoiese adulta ocorre no timo (azul), no baço (verde) e na medula óssea (vermelho). A hematopoiese do *zebrafish* é semelhante: analogia temporal com a hematopoiese de camundongo mostrada em (A, direita), localizações espaciais mostradas em B. **B.** No *zebrafish*, a hematopoiese embrionária ocorre por meio de ondas independentes de produção de precursores. (1) Primeiro, os macrófagos primitivos surgem no mesoderma céfálico, migram para o saco vitelino e se espalham por todo o embrião (roxo). (2) Logo, os eritrócitos primitivos se desenvolvem na massa celular intermediária (ICM; amarelo). (3) Os primeiros progenitores definitivos são EMPs, que se desenvolvem na Ilha de Sangue Posterior (PBI; laranja). (4) Mais tarde, HSCs surgem na região AGM (azul-petróleo) e migram para o CHT (nome posterior para o PBI, laranja), o timo (azul) e o rim (vermelho). Eventos hematopoiéticos semelhantes em camundongos e peixes têm correspondência de cores. dpf: dias pós-fertilização; E: dia embrionário; hpf: horas pós fertilização; wpf: semanas pós-fertilização. (Adaptado de Stachura & Traver, 2016, *Methods Cell Biol* [49])

Hoje em dia, a maioria das células do sistema imune dos mamíferos tem sido identificadas no *zebrafish*, incluindo neutrófilos, macrófagos M1 e M2, células dendríticas, células NK-like, células T-CD4+, com seus subtipos Th1, Th2, Th17 e T-regs, células T-CD8+ e células B. Embora a disponibilidade de ferramentas de identificação destas células, principalmente anticorpos, seja ainda limitada na atualidade, existem várias linhagens transgênicas com marcadores fluorescentes que permitem a visualização e isolamento destas células no *zebrafish*.



#### 1.2.4. A microbiota do zebrafish

A interação entre a microbiota e o intestino vem sendo bastante estudada nos últimos anos, resultando em uma melhor compreensão das relações entre a microbiota intestinal e outros órgãos, como por exemplo, os rins. No *zebrafish*, o intestino tem sido descrito como anatomicamente similar em arquitetura ao intestino delgado dos mamíferos. O intestino do *zebrafish* em estágio larval forma um tubo linear simples, enquanto no adulto o intestino já apresenta dobramentos de modo similar ao de mamíferos (Figura 4) [60]. O intestino se encontra compartimentado em três segmentos principais: o bulbo, o intestino-médio e o intestino posterior (Figura 4). Na larva de *zebrafish* o intestino já está completamente maduro e funcional aos 5 dpf e é facilmente observado devido à transparência da larva, tornando-o excelente modelo para estudos funcionais e moleculares. Pelo fato de não possuírem estômago, o bulbo absorve nutrientes [60, 63].



**Figura 4: O intestino do *zebrafish* em estágio larval.**

Imagem de uma larva de 10 dpf com ampliação do intestino, apontando em linhas pontilhadas coloridas o bulbo (amarelo), o intestino médio (azul) e o intestino posterior (vermelho). Imagem por C. Morales Fénero (Dissertação de Mestrado).

De modo geral, esse peixe tem demonstrado ser um excelente modelo experimental para o estudo de populações bacterianas *in vivo*, visto que sua transparência durante a fase larval permite que as interações microbianas possam ser observadas em animais vivos, através do uso de linhagens transgênicas ou a utilização bactérias que expressam proteínas fluorescentes [63]. Por outro lado, a possibilidade de geração de animais gnotobióticos ou *germ-free*, permite o estudo do efeito isolado de uma linhagem

bacteriana (monoassociação) ou de um grupo determinado (poliassociação), requerendo uma infraestrutura simples e com resultados dentro de uma semana. [64].

O processo de colonização bacteriana no intestino do *zebrafish* começa após o embrião sair do córion, entre as 48 e 72 hpf,[65]. Estudos têm demonstrado que a diferença dos humanos, a diversidade da microbiota diminui de larva ao adulto [66]. As Proteobacterias são o filo predominante desde o estágio larval ao adulto, sendo também abundantes os Firmicutes e Fusobactérias [66]. Comparando a microbiota do *zebrafish* aos humanos e camundongos (Tabela 1), podemos observar que são compartilhados os filós mais abundantes como Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Verrumicrobia, Actinobacteria e Fusobacteria [67].

A microbiota tem demonstrado participar ativamente na homeostasia do hospedeiro uma vez que atua na manutenção da integridade da barreira intestinal, aptidão imunológica e metabólica [68]. Isso porque a comunidade microbiana é responsável pela biossíntese de vitaminas e aminoácidos, do metabolismo de fármacos, quebra de nutrientes, controle de patógenos e maturação do sistema imunológico [68, 69]. Entretanto, múltiplos fatores podem afetar as interações microbiota-hospedeiro, tais como, alterações alimentares, exposição a certos medicamentos, doenças ou cirurgias gastrointestinais [68]. É por isso que o estudo de populações bacterianas que diminuam estados inflamatórios e promovam o equilíbrio fisiológico no intestino é uma área de grande interesse e será aprofundada no item seguinte.

<b>Filo</b>	<b>Zebrafish</b>	<b>Camundongo</b>	<b>Humano</b>
Proteobacteria	+	+	+
Fimicutes	+	+	+
Bacteroidetes	+	+	+
Verrucomicrobia	+	+	+
Actinobacteria	+	+	+
TM7	+	+	
Fusobacteria	+		+
Planctomycetes	+		
TM6	+		
Nitrospira	+		
OP10	+		
Cyanobacteria		+	+
Deferribacteria		+	
Gemmimonas		+	
Spirochaetes			+
VadinBE97			+

**Tabela 1: Comparação das microbiotas de zebrafish, camundongo e humano.**

Tabela comparativa dos filos bacterianos mais representativos de cada espécie zebrafish, camundongo e humano. Modificado de Rawls *et al*, 2006, *Cell*. [67].

### 1.3. Probióticos

Na literatura muito se discute sobre o eixo rim - microbiota, isso porque se sabe que alterações na composição da microbiota pode afetar o desenvolvimento de doenças renais. Altas concentrações de ureia podem levar a modificações na microbiota intestinal que podem elevar a produção de toxinas e alterar a barreira epitelial intestinal [70]. Essa barreira é essencial para a manutenção da homeostasia e também pode ser afetada por processos inflamatórios que estejam ocorrendo no rim [71]. Entretanto, determinados grupos bacterianos que constituem a microbiota também podem ter efeitos protetores no rim [72].

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem vantagem à saúde do hospedeiro, quando administrados corretamente [73]. Neste sentido, os probióticos podem atuar de forma benéfica para o hospedeiro através da competição com patógenos, produzindo substâncias bactericidas, ou podendo também regular a homeostase epitelial no intestino ao promover a sobrevivência das células epiteliais, desta maneira, melhorando a função de barreira [74]. Outra característica relevante é a possibilidade de regular a resposta imune, isso porque, probióticos ou substâncias derivadas do seu metabolismo e atividade funcional tem sido associados com efeitos anti-inflamatórios e

imunomoduladores [75]. Nesse sentido ocorre a estimulação para a produção de IgA, inibição da sinalização de vias apoptóticas, modulação dos processos oxidativos celulares e diminuição dos danos ao DNA [76-78]. Além disso, tem sido descrita uma relação entre os efeitos dos microrganismos probióticos e a remodelação da arquitetura e o aumento da expressão de proteínas de adesão das junções oclusivas do epitélio intestinal, mecanismo que atua na manutenção da integridade da barreira intestinal, impossibilitando a translocação bacteriana [79]. Na aquicultura, os probióticos tem sido usados com o objetivo de modular a microbiota dos peixes, com o intuito de melhorar a qualidade da água, a disponibilidade e digestibilidade dos nutrientes, controle da infecção, e assim, diminuir o uso de medicamentos e, conseqüentemente, diminuir a propagação da resistência antimicrobiana [69].

Na última década, o campo de estudo e aplicabilidade dos probióticos tem sido suportado em três princípios: (i) a necessidade de alternativas aos medicamentos que tenham eficácia abaixo do ideal ou efeitos adversos graves; (ii) um interesse crescente por produtos naturais e microrganismos; e (iii) evidências sobre as propriedades genéticas e metabólicas de cepas probióticas e estudos clínicos mostrando sua eficácia [80]. Atualmente, entre os probióticos estudados temos o *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete que forma esporos, de fácil crescimento e manipulação [81]. Já foi observado que a administração do *B. subtilis* pode limitar a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B, o que impede a degradação de I $\kappa$ B, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias [82, 83]. Ademais, reforça a integridade da barreira intestinal através da regulação positiva da expressão da proteína das junções oclusivas [82]. A diminuição da proteína iNOS após o tratamento do *Bacillus subtilis* também já foi reportada [82]. Alguns estudos têm analisado o papel da suplementação probiótica com *B. subtilis* e a saúde renal, sendo usado como modulador de processos de urolitíase em modelos animais, e na redução da toxicidade renal associada com certos fármacos [84, 85]. Esses dados demonstram o potencial papel de *B. subtilis* na modulação dos processos inflamatórios e a manutenção da barreira intestinal, porém acreditamos que estes processos imunomoduladores possam afetar órgãos extra intestinais como o rim.

Considerando os dados da literatura apresentados aqui, nós acreditamos que o uso de probióticos se torna uma estratégia potencial para corrigir ou manipular alterações da microbiota intestinal relacionadas à LRA. Deste modo, formulamos a hipótese de que o

probiótico *Bacillus subtilis* seria capaz de modular o processo inflamatório da LRA induzida pela cisplatina em larvas de *zebrafish*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar um modelo de LRA induzida por cisplatina em larvas de *zebrafish* e estudar o papel do probiótico *Bacillus subtilis* na modulação da resposta inflamatória.

### 2.2. Objetivos Específicos

- I. Desenvolver e caracterizar um modelo de LRA induzida por cisplatina em larvas de *zebrafish*;
- II. Avaliar morfológicamente e funcionalmente a lesão renal aguda induzida por cisplatina em larvas de *zebrafish*;
- III. Estudar o tratamento com *B. subtilis* em animais com LRA induzida por cisplatina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizadas larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*) da linhagem selvagem AB e linhagem transgênica com marcação para lisozima Tg(lysC:DsRED2) do Biotério de *Zebrafish* do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP. Os ovos foram obtidos por desova natural, coletados em placas de Petri com meio de embrião E3 1x (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.2) com azul de metileno e mantidos na incubadora a 28,5°C, com ciclo de luz/escuridão de 10/14 horas. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Experimentação (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP (Protocolo número 8619291019).

#### 3.2. Lesão renal aguda

##### 3.2.1. Modelo de cisplatina em larvas

Para a padronização da lesão renal aguda foram testadas duas cisplatinas de diferentes marcas: “C-PLATIN” (Blau Farmacêutica – Cotia, SP) e “Cis-Diammineplatinum(II) dichloride” (Sigma - Saint Louis, USA). Concentrações crescentes de cisplatina (0,025; 0,050; 0,10 e 0,25 mg/ml) foram adicionadas no meio embrionário 1X das larvas aos 6 dpf e 7 dpf. O pH do meio foi medido para verificar se não houve variação após a adição do fármaco, mantendo-se entre 7,2 a 7,3. A sobrevivência das larvas foi acompanhada diariamente até o 10º dia pós- fertilização. Após as análises das curvas de sobrevivência, a concentração de 0,10 mg/mL foi escolhida para os seguintes experimentos.

##### 3.2.2. Análise da atividade locomotora

Para a análise da atividade locomotora, a cisplatina foi adicionada no meio embrionário E3 1x contendo larvas AB aos 7 dpf. Animais controles foram mantidos no meio embrionário E3 1x. As larvas foram gravadas aos 8 dpf e 9 dpf após exposição ao fármaco por 24 horas e 48 horas, respectivamente. Para a gravação, as larvas foram

mantidas em 100 µl de meio embrionário E3 1x. Em uma placa de 96 poços, as larvas foram separadas de modo a haver apenas uma larva por poço. A gravação foi realizada na lupa ZEISS Axio Zoom.V16, tendo como configurações: 2 frames por segundo, magnitude 7x, intervalo de tempo 10 minutos. A análise dos vídeos foi realizada no software ImageJ utilizando o *plugin TrackMate* tendo como resultado a velocidade média (microns/segundos) de cada larva.

### 3.2.3. qPCR

*Pools* de 20 larvas foram coletadas e eutanasiadas com 0.3 mg/mL de Tricaína metanesulfonato (MS222) (Sigma). As amostras foram coletadas aos 8 dpf e 9 dpf após 24 horas e 48 horas, respectivamente, de exposição a cisplatina. A extração de RNA foi realizada utilizando o método por Trizol (Invitrogen, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA obtida, foi medida no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop, EUA) [86]. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA e, posteriormente, diluído (1:10). Para a reação de PCR foi utilizado 4µL de cDNA, 0,5µL de cada primers (125- 500nM), 5µL de master mix Syber (Thermo fisher, EUA). A amplificação de PCR foi realizada no aparelho QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher). Para a análise dos resultados foi utilizado o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , conforme descrito anteriormente [87]. A expressão gênica relativa foi calculada usando  $2^{-\Delta\Delta CT}$  usando o *elongation fator 1 - alpha* (*elf1-α*) como controle interno. Os seguintes primers Sybr foram utilizados:

Gene	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>efl1a1</i>	AGTGTTGCCTTCGTCCCAAT	TTCCATCCCTTGAACCAGCC
<i>il-1β</i>	TGGACTTCGCAGCACAAAATG	GTTCACTTCACGCTCTTGGATG
<i>il-6</i>	GGCATTTGAAGGGGTCAGGA	TCAGGACGCTGTAGATTCGC
<i>il-8</i>	GTTTTCCTGGCATTCTGACCA	GCGTCGGCTTTCTGTTTCAA
<i>il-12</i>	ACGCAAACGGTGTCTGTCT	CTCTGTAGGCATTCGCTCTCAT
<i>havcr1/ kim-1</i>	CGCTAGAAGTAAGGCAGAA	CACTGTTTCGTATTCGCTTTC

**Tabela 2: Lista dos primers usado para qPCR.**

Na primeira coluna estão os nomes dos genes analisados. Na segunda e terceira colunas estão, respectivamente, os *primers Forward* (iniciador 5') e *Reverse* (iniciador 3').



#### 3.2.4. Quantificação de células mieloides por microscopia

Aos 7 dpf, larvas da linhagem transgênica Tg(lysC:DsRED2) com marcação fluorescente vermelha para lisozima, presente em células mieloides, foram submetidas ao tratamento de 0,10 mg/mL de cisplatina e mantidas por 48 horas. As larvas controles foram mantidas apenas em meio E3 1X. As larvas com 9 dpf foram anestesiadas com 0,168 mg/mL de Tricaína Metanesulfonato (MS222) (Sigma) e colocadas em uma lâmina recoberta com metilcelulose 3% [86]. Nesta etapa, as larvas foram cuidadosamente manipuladas para uma visão lateral e imagens foram capturadas na lupa ZEISS Axio Zoom.V16. A quantificação da média da intensidade de fluorescência (MFI) na região glomerular do pronefros foi realizada no software ImageJ.

#### 3.2.5. Ensaio de morte celular (TUNEL)

Para o ensaio, a cisplatina foi adicionada no meio embrionário E3 1x contendo larvas AB aos 7 dpf. Animais controles foram mantidos apenas no meio embrionário E3 1x. As amostras foram fixadas com PFA 4% *overnight* a 4°C aos 8 dpf e 9 dpf após exposição ao fármaco por 24 horas e 48 horas, respectivamente. No dia seguinte, as amostras foram lavadas três vezes com PBS 1x por 10 minutos. Em seguida ocorreu a desidratação do material com metanol/PBS 1X (25%, 50%, 75% e 100%, respectivamente). As amostras foram mantidas em metanol 100% *overnight* a -20°C. Para o ensaio do *Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) dUTP nick end labeling* (TUNEL), as amostras foram novamente hidratadas com metanol/PBS 1X (75%, 50% e 25%, respectivamente), seguida de três lavagens com PBT (PBS 1x +Triton 0,5%) por 5 minutos. Para despigmentação das larvas, foi realizado o *bleaching* (2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,5% KOH) por 30 minutos, seguido de três lavagens com PBT por 5 minutos. As amostras foram incubadas com acetona por 9 minutos a -20°C. Após o tempo determinado, foram realizadas três lavagens com PBT por 5 minutos. Para a permeabilização das larvas foi usado 1mg/mL de colagenase do tipo IV por 60 minutos. Três lavagens com PBT por 5 minutos foram realizadas. Posteriormente, as amostras foram incubadas com o mix de *Enzyme Solution* e *Label Solution* na proporção de 1:10 por uma hora a temperatura ambiente, protegidas da luz. Foi utilizado o kit enzimático *In Situ Cell Death Detection TMR RED* (Roche - 12156792910). Para o controle negativo foi utilizado apenas o *label solution*. Três lavagens com PBT por 5 minutos foram realizadas. A marcação do núcleo

celular foi realizada com 50 µl de Hoescht (1:1000), incubando as amostras por 5 minutos a temperatura ambiente, protegendo-as da luz. Em seguida, novamente foram realizadas três lavagens com PBT e uma vez com PBS 1X por 5 minutos. As larvas foram montadas em uma placa contendo 1% de agarose *low melting point*, sendo manipuladas para ficarem na posição lateral. Por fim, as imagens foram capturadas no confocal LSM 780 NLO e analisadas manualmente selecionando a área de interesse e contando todos os *stacks* no ImageJ com o *Plug-in* “Cell Counter”.

### 3.2.6 Imunofluorescência

As etapas de processamento da amostra que antecedem a imunofluorescência: fixação, desidratação, reidratação, *bleaching*, permeabilização e lavagens foram idênticas as efetuadas no tópico anterior. Deste modo, após a permeabilização e sucessivas lavagens, para o bloqueio de proteínas inespecíficas as larvas permaneceram no IB (buffer de incubação) (10% Soro Fetal Bovino, 1% DMSO, 0,5% Triton diluídos em PBS 1x) *overnight* a 4°C. No dia seguinte, o IB foi retirado e as amostras foram incubadas com o anticorpo primário (Abcam - ab14955) para histona H3 fosforilada 1:750 diluído no IB *overnight* a 4°C. Para o controle negativo, as amostras foram incubadas sem o anticorpo primário. Após isso, o anticorpo primário foi descartado, seguido de duas lavagens com PBT por 15 minutos, duas lavagens com PBT por 30 minutos e uma lavagem de uma hora a temperatura ambiente. Novamente as amostras foram mantidas no IB por duas horas. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-GFP 1:200 (Invitrogen - A11029) diluídos no IB *overnight* a 4°. Duas lavagens com PBT por 15 minutos, duas lavagens com PBT por 30 minutos e uma lavagem de uma hora foram realizadas. Como citado anteriormente, marcação do núcleo celular foi realizada com 50 µl de Hoescht (1:1000), incubando as amostras por 5 minutos a temperatura ambiente, protegendo-as da luz. Em seguida, novamente foram realizadas três lavagens com PBT e uma vez com PBS 1X por 5 minutos. As larvas foram montadas em uma placa contendo 1% de agarose *low melting point*, sendo manipuladas para ficarem na posição lateral. As imagens foram capturadas no confocal LSM 780 NLO e analisadas manualmente selecionando a área de interesse e contando todos os *stacks* no ImageJ com o *Plug-in* “Cell Counter”.

### 3.2.7. Citometria de fluxo

Para análise do *zebrafish* em fase larval, um *pool* contendo 50 larvas transgênicas Tg(lysC:DsRED2) foram eutanasiadas e mantidas em solução PBS 1x contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) à 4°C até o seu processamento. As amostras foram coletadas aos 8 dpf e 9 dpf após 24 horas e 48 horas, respectivamente, de exposição a cisplatina. Para obter uma suspensão de células isoladas, as amostras foram maceradas em *cell strainer* de 40 µm (Corning, EUA) e ressuspendidas em PBS 1X 2% SFB. Após isso, as células foram incubadas com diferentes anticorpos 1:200 F4/80-APC-Cyanine7 (BioLegend); CD11b-PE/Cyanine7 (BioLegend) e Ly6G- APC (BD Biosciences). Para configuração e identificação das populações de granulócitos com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade foram usados rins de *zebrafish* AB adultos, por serem o órgão hematopoiético deste animal. As amostras foram lidas no aparelho BD FACSCanto II e analisadas usando o software FlowJo (Tree Star).

### 3.3. Probiótico *B. Subtilis*

#### 3.3.1. Padronização das condições de cultivo de *Bacillus Subtilis*

O *Bacillus subtilis* (VT000032-1VL- Sigma - Saint Louis, USA) foi reconstituído seguindo as instruções do fabricante e posteriormente, mantido em meio de congelamento (250 µl de 60% glicerol e 250 µl de meio BHI *Broth* (*Brain Heart Infusion*)) a -80°C. Para a expansão bacteriana 10µl das bactérias foram diluídos em 5 mL de meio BHI *Broth* sendo mantidas a 37° a 200 rpm *overnight*. No dia seguinte após a expansão bacteriana, 10µl das bactérias foram diluídos em 5 mL de meio BHI *Broth* sendo mantidas nas temperaturas de 28° e 37° a 200 rpm. A cada duas horas foi realizada a medição da densidade óptica e o diluição para o crescimento em meio sólido em placas ágar para a contabilização das CFU (Unidades Formadoras de Colônias). A partir desses dados foram obtidos os valores de CFU/mL nos diferentes tempos, permitindo a obtenção das diferentes concentrações bacterianas de interesse.

### 3.3.2. Avaliação de viabilidade das larvas de zebrafish

Para analisar o efeito do probiótico na mortalidade das larvas, três concentrações de *Bacillus subtilis* ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ) diluídos em meio BHI foram adicionados ao meio embrionário aos 6 dpf. No dia seguinte, foi feita a lavagem do poço contendo as larvas e a troca por meio embrionário E3 1X. As larvas foram separadas em quatro grupos: Ctr; Bs; Bs+Cisp e Cisp. Animais controles foram mantidos apenas em meio embrionário E3 1x (Ctr). Aos 7dpf, a cisplatina foi adicionada ao meio embrionário aos grupos Bs+Cisp (grupo tratado com o probiótico e também exposto a cisplatina) e Cisp (grupo tratado apenas com cisplatina). O grupo Bs foi tratado com o probiótico. A sobrevivência das larvas foi acompanhada diariamente até o 10º dia pós- fertilização.

### 3.3.3. Quantificação de células mieloides por microscopia

Aos 5 dpf, larvas da linhagem transgênica Tg(lysC:DsRED2) imersas em meio embrionário E3 1X estéril foram expostas a concentrações crescentes do *Bacillus subtilis* ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ) e mantidas por 24 horas. As larvas controles foram mantidas apenas em meio E3 1X. No dia seguinte, ocorreu a lavagem do poço contendo as larvas e a troca por meio embrionário E3 1X. Em seguida, as larvas foram anestesiadas com 0,168 mg/mL de Tricaína Metanesulfonato (MS222) (Sigma) e colocadas em uma lâmina recoberta com metilcelulose 3% [86]. Como já citado anteriormente, as larvas foram cuidadosamente manipuladas para uma visão lateral e imagens foram capturadas na lupa ZEISS Axio Zoom.V16. A quantificação da média da intensidade de fluorescência (MFI) na região glomerular do pronefros e o número de células no intestino foi realizada no software ImageJ.

### 3.4. Análises In Silico

Para a análise *in silico* foi utilizado o banco de dados GEO DataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>). Os dados de *microarray* apresentados são referentes ao artigo “*Transcriptomic approach to renal toxicity for cisplatin treatment in Nrf2 WT/KO*” sob o código GSE48879. Os dados foram analisados na plataforma online GEO2R, na qual os dados de genes de interesse foram analisados no programa GraphPad PRISM® 6.

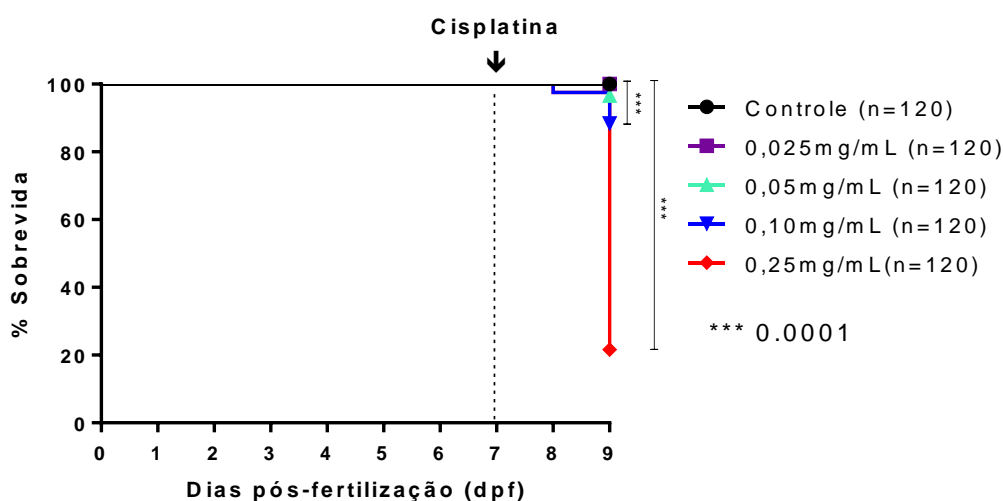
### *3.5. Estatística*

Os dados foram apresentados no formato de média e desvio padrão. A diferença entre os grupos experimentais entre dois grupos foi determinada com teste de t-student e para três ou mais grupos com o teste de ANOVA de uma via com comparações múltiplas. A curva de sobrevida foi avaliada utilizando o teste de log-rank (Mantel-Cox) test e o Gehan-Breslow-Wilcoxon. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo para todos os gráficos. Todos as análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism® 6.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. A Cisplatina (Blau Farmacêutica) induz mortalidade de forma dose-dependente

A primeira etapa do projeto foi estabelecer um protocolo de indução de LRA por cisplatina em larvas diluindo o medicamento diretamente no meio embrionário E3, visto que os protocolos existentes implicam um grande desafio técnico que envolve a microinjeção da cisplatina na corrente sanguínea das larvas. Sendo assim, inicialmente, utilizamos uma cisplatina disponível em farmácias para o tratamento de pacientes com câncer (Blau Farmacêutica – Cotia, SP), sendo administrada em diferentes concentrações no meio das larvas aos 7 dias pós-fertilização e a sobrevida acompanhada até os 9 dpf (Figura 5).



**Figura 5: Primeira curva de sobrevida de larvas de zebrafish em resposta a concentrações crescentes de cisplatina.**

A cisplatina foi adicionada ao meio das larvas no sétimo dia pós-fertilização (dpf) em concentrações de 0,025; 0,05; 0,10 e 0,25mg/mL. Cada situação foi testada em 120 larvas. O grupo controle foi mantido apenas em meio E3 1x. Teste de log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado, \*\*\* $p \leq 0.0001$ .

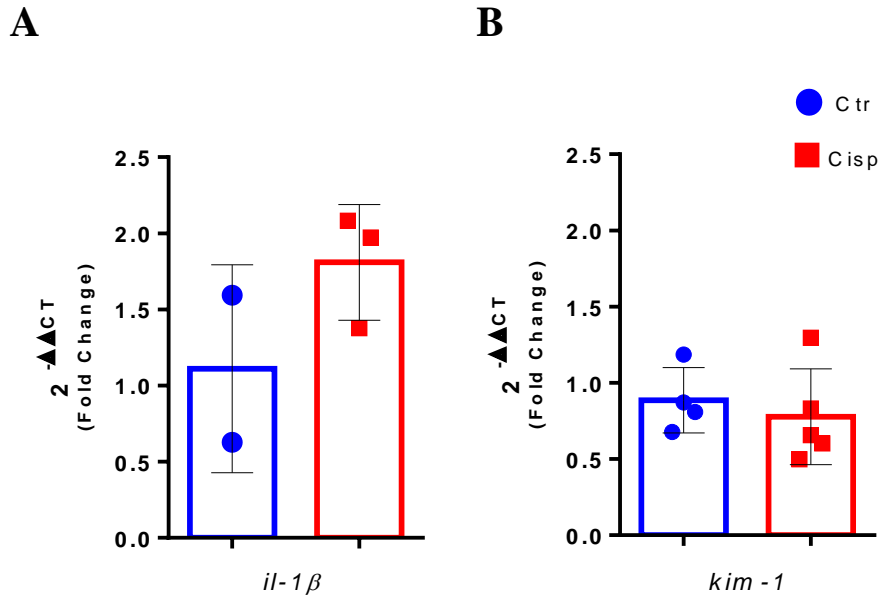
Na Figura 5 é possível observar que concentrações inferiores a 0,10 mg/mL de cisplatina não afetaram a sobrevida das larvas de forma significativa. Contudo, aos 9 dpf as concentrações de 0,10 mg/mL e 0,25 mg/mL induziram mortalidade significativa de 11,7% e 78,4%, respectivamente. A partir dos dados obtidos na curva de sobrevida, foi escolhida a concentração de 0,10 mg/mL para as seguintes análises visto que 0,25 mg/mL de cisplatina teve um efeito extremamente tóxico nas larvas resultando em mortalidade

alta. Tendo isto em consideração, o próximo passo foi averiguar se a mortalidade observada estaria associada à lesão renal.

#### 4.2. A Cisplatina (Blau farmacêutica) não induz diferença na expressão gênica de marcadores de inflamação e lesão renal

Após observar o efeito de diferentes concentrações de cisplatina na sobrevivência das larvas, decidimos analisar a expressão gênica de marcadores de inflamação e lesão renal após 24 horas de exposição ao fármaco. Foi realizada a análise da expressão gênica de dois marcadores para averiguar se o tempo de exposição seria suficiente para observar dano ou processo inflamatório nas larvas. A fisiopatologia da LRA induzida por cisplatina consiste principalmente de dano no túbulo proximal, com estresse oxidativo e ativação do processo inflamatório [10], assim, analisamos a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ . Entretanto, os dados também não evidenciaram diferenças estatísticas (Figura 6 A). O gene *havcr1*, também conhecido como *kim-1* (*Kidney Injury Molecule – 1*), é altamente expresso na presença de dano tubular renal, sendo um dos principais marcadores para a LRA. Desta forma, analisamos sua expressão em larvas expostas a 0,10 mg/mL de cisplatina (Figura 6B). No entanto, o grupo exposto não apresentou aumento de expressão quando comparado ao seu controle.

As hipóteses levantadas para explicar esses dados foram que a cisplatina utilizada, na concentração escolhida ou/e o tempo de exposição ao fármaco não foram ideais para gerar lesão renal nas larvas. O tempo de exposição ao fármaco é um fator importante a ser levado em consideração já que o acúmulo da cisplatina no rim contribui de forma fundamental para a nefrotoxicidade [88]. Deste modo, optamos por aumentar o tempo de exposição ao fármaco e examinar se após 48 horas de estímulo com cisplatina ocorreria o aumento de marcadores de inflamação no pronefros, uma vez que a mortalidade das larvas aumenta nesse intervalo de tempo (Figura 5). Além disso, decidimos testar uma cisplatina mais pura (Sigma - Saint Louis, USA), para averiguar se haveria diferença na resposta das larvas.



**Figura 6: Expressão gênica relativa da citocina IL-1 $\beta$  e KIM-1.**

Larvas foram submetidas a 0,10 mg/mL de cisplatina (Cisp) aos 7 dpf e foram analisadas após 24 horas. Larvas controles (Ctr) foram mantidas apenas em meio embrionário E3 1x. **A.** Expressão relativa da citocina IL-1 $\beta$ . **B.** Expressão relativa da citocina de KIM-1. Médias foram obtidas a partir de 2-5 amostras, referentes a um pool de 20 larvas. Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre os grupos.

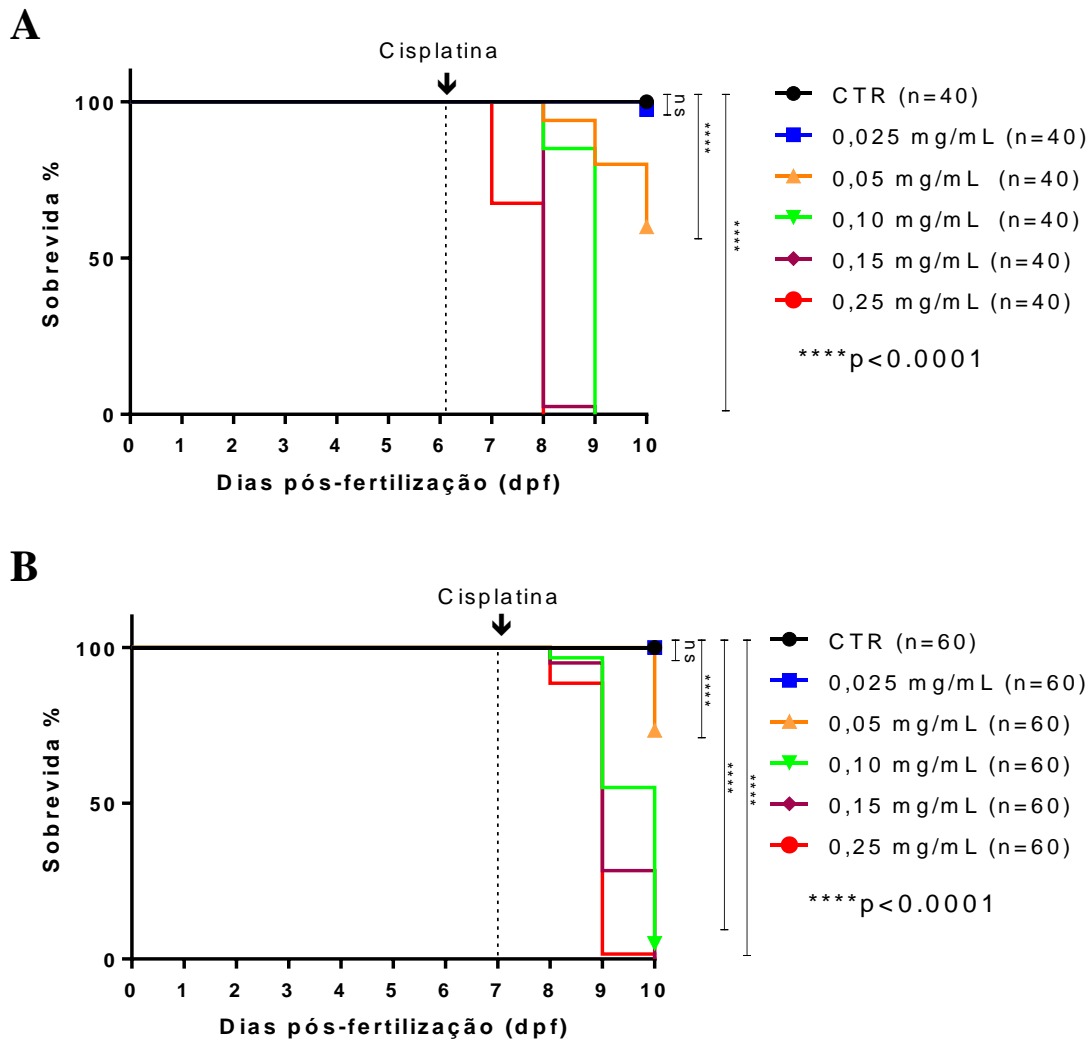
#### 4.3. A cisplatina (Sigma) induz mortalidade de forma dose-dependente

Utilizando uma nova marca de Cisplatina (Sigma - Saint Louis, USA), foram realizadas duas curvas de sobrevivência utilizando as mesmas concentrações anteriores (0,025mg/mL, 0,05mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,15 mg/mL e 0,25 mg/mL) iniciando a exposição em dias diferentes. Inicialmente, a droga foi adicionada no meio de larvas de 6 dpf (Figura 7A), e separadamente, em larvas de 7 dpf (Figura 7B). A mortalidade foi acompanhada diariamente até os 10 dpf.

Nossos resultados demonstraram que as larvas de *zebrafish* são mais sensíveis à cisplatina quando adicionada aos 6 dpf do que aos 7 dpf, quando comparado as mesmas concentrações (Figura 7). Quando o fármaco foi adicionado aos 6 dpf, concentrações maiores de cisplatina (0,15 e 0,25 mg/mL) levaram a uma mortalidade de quase 100% após 48 horas (Figura 7A). No entanto, a concentração de 0,10 mg/mL resulta em mortalidade de apenas 15% após 48 horas (Figura 7A). No caso da administração aos 7 dpf, a mortalidade das concentrações 0,25, 0,15 e 0,10 mg/mL após 48 horas foi de 99,4%, 71,7% e 45%, respectivamente. Após 72h, essas concentrações induziram 100% de



mortalidade (Figura 7B). A concentração de 0,10 mg/mL de cisplatina foi menos agressiva quando adicionada aos 7 dpf que aos 6 dpf, gerando uma mortalidade gradual, e por esse motivo foi escolhida para os experimentos seguintes.



**Figura 7: Segunda curva de sobrevivência de larvas de *zebrafish* em resposta a concentrações crescentes de cisplatina.**

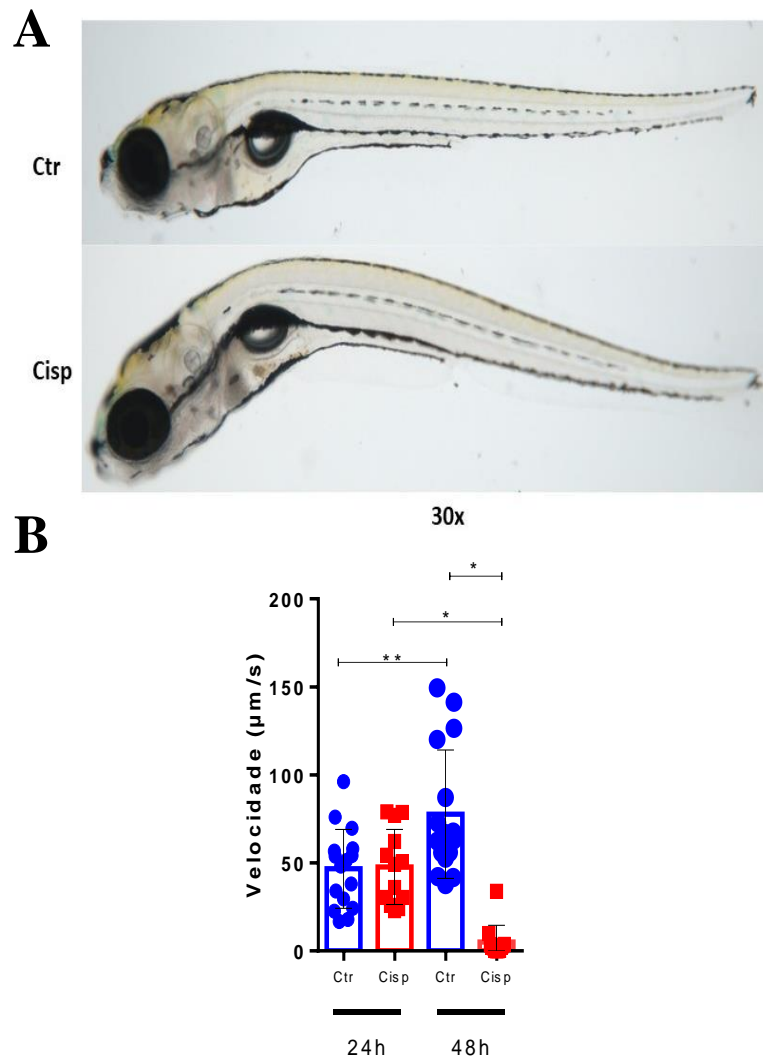
Concentrações crescentes de cisplatina (0,025mg/mL, 0,05mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,15 mg/mL e 0,25 mg/mL) foram adicionadas no meio embrionário contendo as larvas aos 6 dpf (A) e aos 7 dpf (B). \*\*\*p<0,0001, log-rank (Mantel-Cox) test. Dados referentes a dois experimentos, contendo 40 larvas para cada concentração no gráfico A e 60 larvas no gráfico B nas mesmas condições.

#### 4.4. A cisplatina induz diminuição dos movimentos e alteração da curvatura do eixo rostror-caudal de larvas de *zebrafish*

Com base nos dados anteriores, foi realizada uma análise visual das larvas, na qual foi possível observar que a cisplatina (0,10 mg/mL) resultou em alterações morfológicas

após 48 horas de exposição (Figura 8A). Entre as larvas do grupo exposto a cisplatina, foi encontrado deformidade quanto à curvatura do corpo, o que não foi observado nos animais controles.

Ademais, observamos que larvas tratadas com cisplatina apresentaram diminuição dos movimentos (Figura 8B). Neste sentido, já foi reportado na literatura que a cisplatina induz alterações na linha lateral das larvas e nas células ciliadas do ouvido que são responsáveis por identificar o movimento na água [89]. Além disso, o quimioterápico está sendo diluído no meio embrionário, sendo assim, toda a superfície corpórea da larva em desenvolvimento está exposta a cisplatina. Outros estudos demonstram que algumas drogas podem induzir degeneração da notocorda no *zebrafish*, resultando em encurtamento longitudinal do corpo e diminuição da resposta locomotora após o toque no animal [27, 90]. Desta forma, acreditamos que a cisplatina, por ser um medicamento que interfere na divisão celular, e ser usado no nosso caso na água das larvas, pode estar induzindo apoptose em células externas ao rim, incluindo a notocorda.



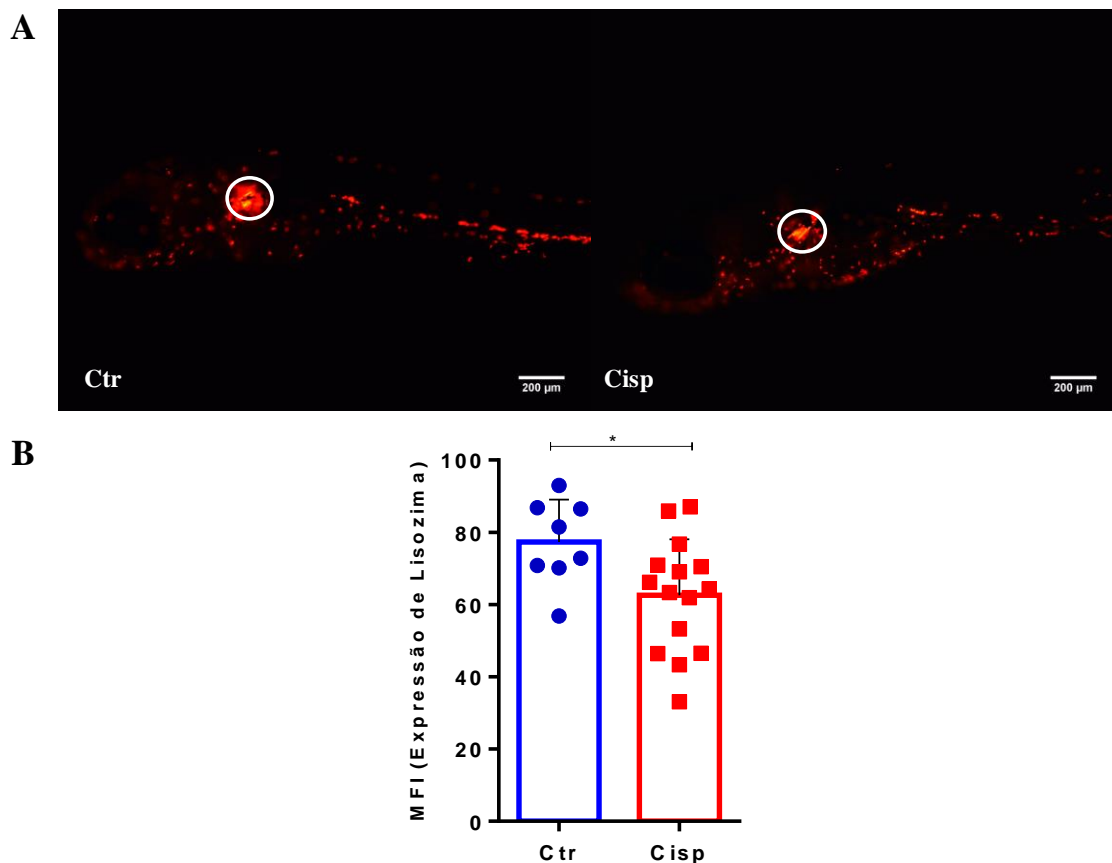
**Figura 8: Cisplatina induz alteração da curvatura do eixo rostral-caudal e diminuição dos movimentos após 48 horas.**

**A.** A cisplatina (Cisp) foi adicionada no meio embrionário contendo as larvas com 7 dpf e mantida por 24 horas e 48 horas. Larvas controles (Ctr) foram mantidas apenas em meio embrionário E3 1x. **A.** Imagens referentes a morfologia das larvas controles (Ctr) e tratadas com cisplatina após 48 horas. Rostral à esquerda, dorsal acima. Magnitude de 30x. **B.** Para analisar a atividade locomotora foi efetuada a gravação das larvas por um período de 10 minutos e a velocidade ( $\mu\text{m/s}$ ) foi quantificada. Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre os grupos.

#### 4.5. Cisplatina gera diminuição de células mieloides no pronefros

A linhagem transgênica Tg(lysC:DsRED2) possui um marcador fluorescente vermelho expresso em células mieloides. Desta forma é possível analisar visualmente a infiltração e migração destas células in vivo. Sendo assim, quantificamos a acumulação destas células como um indicativo de inflamação no pronefros de larvas aos 9 dpf, após 48 horas de exposição a cisplatina. Na Figura 9A, observam-se imagens representativas

do animal transgênico exposto à cisplatina (Cisp) e do controle (Ctr). A área em branco circulada mostra a região glomerular do pronefros, a qual foi realizada a quantificação da média da intensidade da fluorescência (MFI) (Figura 9A). A quantificação demonstrou que os animais expostos a cisplatina apresentam diminuição da média da intensidade de fluorescência na região glomerular do pronefros (Figura 9B).



**Figura 9: Média da intensidade de fluorescência oriundas de células mieloides na região glomerular do pronefros.**

**A.** Imagens representativas de larvas Tg(LysC:DsRED2) aos 9 dpf, controles (Ctr) e expostas a 0,10 mg/mL de cisplatina (Cisp) por 48 horas. **B.** Quantificação da média da intensidade de fluorescência (MFI) da região glomerular do pronefros (circulada em branco em A). Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre o grupo controle e cisplatina, \* $p=0.0292$ . Rostral à direita dorsal acima.

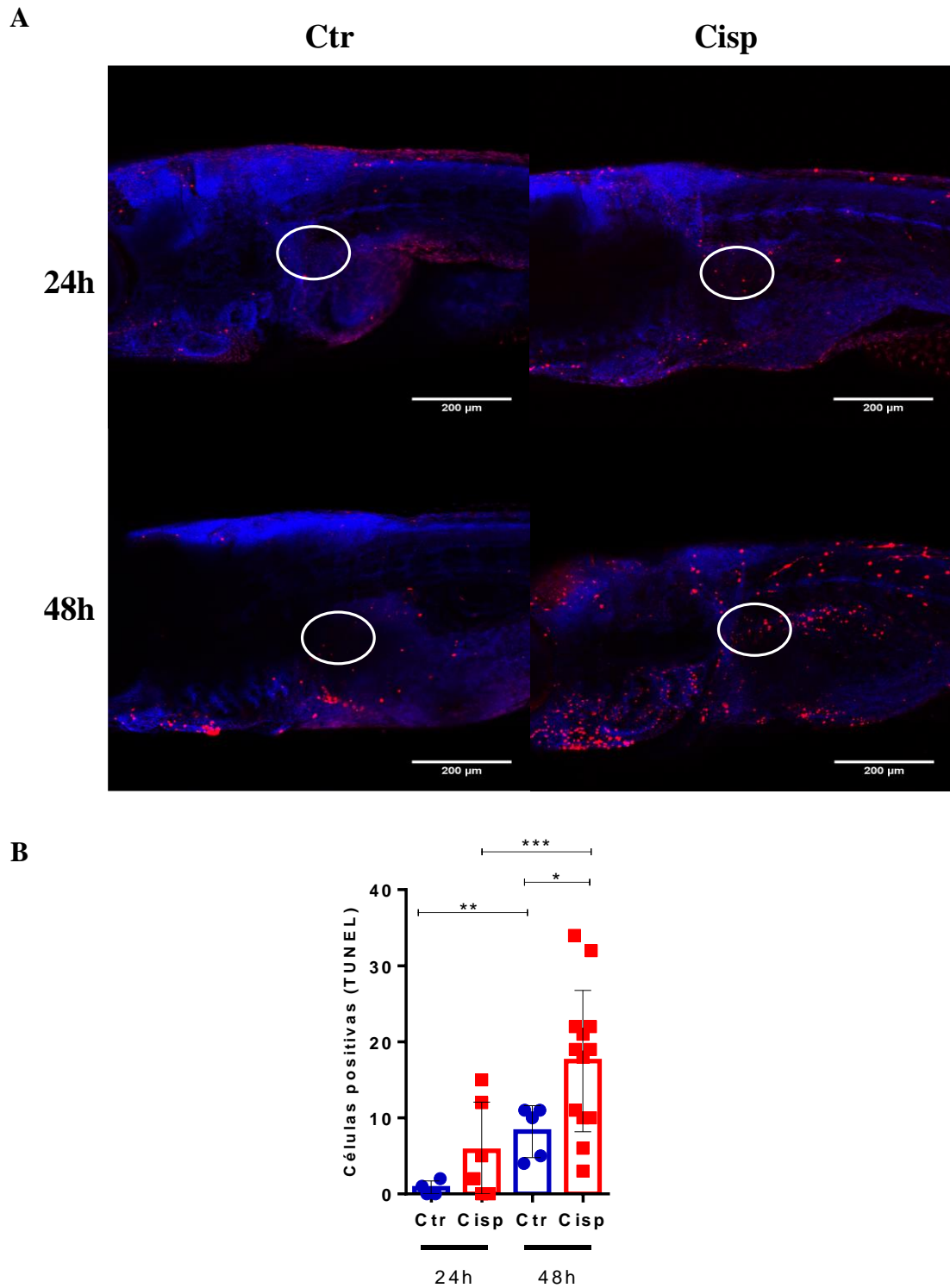
Contudo, neste ponto é importante salientar que os rins são responsáveis pela hematopoiese no *zebrafish* [41]. Deste modo, é possível que a diminuição observada seja resultado do dano gerado pela cisplatina no pronefros levando a morte das células imunes. Outra hipótese levantada é que essas células possam estar migrando para outras áreas visto que a cisplatina foi diluída no meio e toda larva é exposta ao fármaco. Levando isso em consideração, em futuros experimentos, seria interessante averiguar a expressão do

marcador em órgãos externos ao rim visto que a inflamação encontrada pode ser sistêmica e não restrita apenas ao pronefros.

#### *4.6. Exposição de cisplatina induz morte celular no pronefros após 48 horas*

Levando em consideração que o acúmulo de cisplatina nos rins gera altos níveis de apoptose, sendo essa uma característica importante para o desenvolvimento LRA, nosso próximo passo foi averiguar se o modelo proposto estaria resultando na morte de células na região glomerular do pronefros. O ensaio de TUNEL é considerado um método sensível para análise de morte celular, pois identifica fragmentos de DNA em células apoptóticas [91]. A enzima TdT catalisa a adição de dUTPs marcados a extremidades do DNA, que podem ser visualizados ao microscópio [91].

Visualmente, larvas expostas à cisplatina aparecem com maior marcação para células apoptóticas que os controles (Figura 10A). No entanto, ao quantificar o número de células apoptóticas observamos que após 24 horas (24h) de exposição a 0,10 mg/mL de cisplatina, os animais não apresentaram aumento significativo de células mortas comparado ao controle (Figura 10B). Entretanto, após 48 horas já é possível observar uma diferença significativa na quantificação de células apoptóticas entre os grupos controle e cisplatina. Isso ocorre porque o DNA é um dos alvos primários da cisplatina, sendo um importante mecanismo para morte de células tumorais [92]. Além disso, ao comparar os dois grupos tratados com cisplatina, Cisp 24h e Cisp 48h, na Figura 10B, também é observado um aumento significativo de células apoptóticas, evidenciando que o tempo de exposição ao fármaco é um fator importante para indução de morte celular. O aumento de células apoptóticas observado entre os controles (Ctr 24h e Ctr 48h), pode ser por causa da diferença de idade das larvas (8 dpf e 9 dpf), sendo assim, níveis de desenvolvimento diferentes.



**Figura 10: Número de células positivas na região glomerular do pronefros para morte celular (TUNEL).**

**A.** Imagens representativas da marcação de núcleo celular com hoechst (em azul) e marcação de morte celular (em vermelho) a partir da técnica de TUNEL em larvas AB aos 8 dpf e 9 dpf ao serem expostas, respectivamente, a 24 horas (24h) e 48 horas (48h) de 0,10 mg/mL de cisplatina (Cisp). Larvas controles (Ctr) foram mantidas apenas no meio embrionário E3 1X. Rostral à esquerda dorsal acima. **B.** Número de células positivas para TUNEL na região glomerular do pronefros (circulada em branco em A). Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre o grupo os grupos (Ctr 48h vs Cisp 48h, \*\*\* $p=0,0483$ ; Ctr 24h vs Ctr 48h,  $p=0,0042$ ; Cisp 24h vs Cisp 48h,  $p=0,0124$ ).

A morte celular programada é um processo celular normal responsável pela manutenção da homeostasia ao remover células potencialmente danificadas e células que são desnecessárias após a diferenciação celular. No *zebrafish* a apoptose é induzida durante desenvolvimento normal após gastrulação [93]. Altas taxas de morte celular estão correlacionadas com alterações morfológicas de diversos órgãos durante o desenvolvimento da larva [94]. De modo geral, o resultado deste ensaio permite concluir que a cisplatina induz a morte de células de forma significativa após 48 horas, corroborando com o dado anterior que mostrava diminuição da média da intensidade de fluorescência de células mieloides na região glomerular do pronefros após o tratamento com o fármaco. Sendo assim, uma hipótese levantada é que essa diminuição possa ser resultado da morte dessas células nesta região. Futuramente consideramos realizar o ensaio de TUNEL em animais transgênicos com marcação fluorescente em células imunes, para confirmar se a morte celular observada no pronefros corresponde efetivamente a células imunes. Por outro lado, pretendemos realizar a quantificação do número de células apoptóticas em todo o corpo da larva para avaliar o efeito total da indução de morte celular causada por cisplatina.

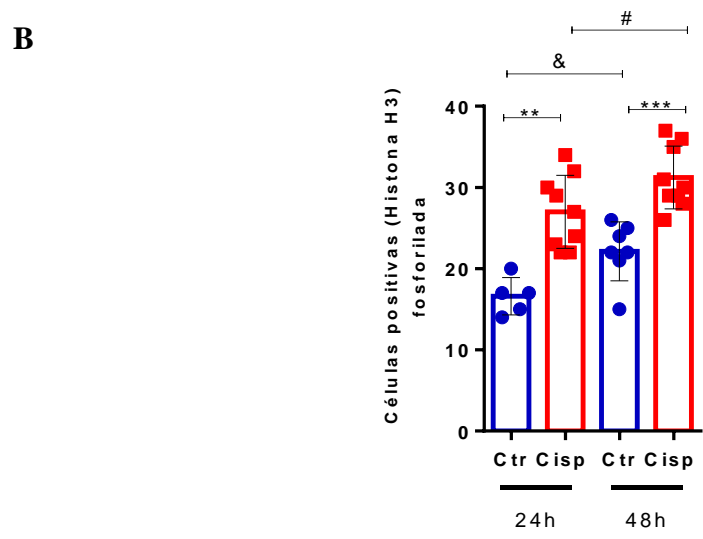
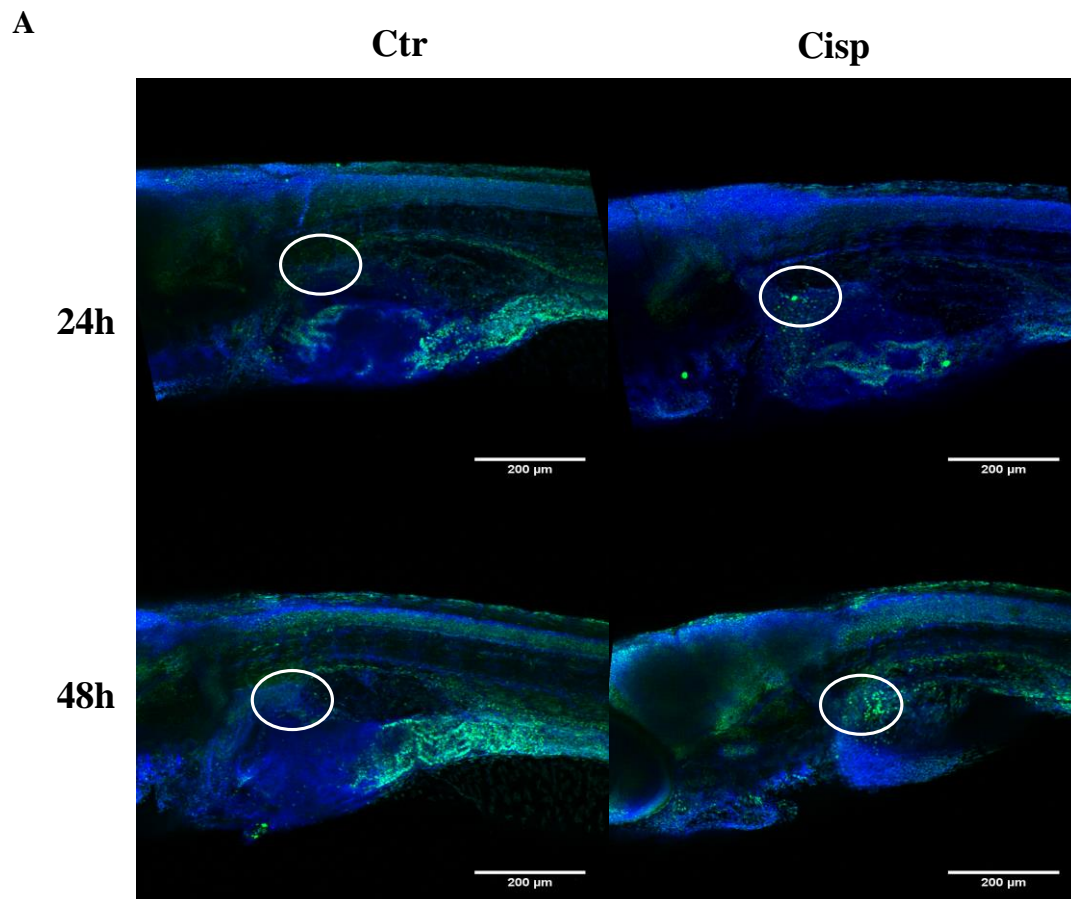
#### *4.7. Exposição de cisplatina induz aumento da proliferação celular após 24 horas e 48 horas*

Após quantificar o número de células em apoptose em larvas tratadas com cisplatina e observar o seu aumento na região glomerular do pronefros. A próxima etapa foi realizar a imunofluorescência para o marcador de mitose Histona H3 fosforilada para determinar a proliferação celular na mesma área visto que vias de reparação tecidual poderiam estar ativadas de modo compensatório. Como pode ser observado na Figura 11, quando comparado aos controles que foram mantidos no meio embrionário, os níveis de proliferação celular são maiores após a exposição a cisplatina, tanto em 24 horas quanto em 48 horas. Além disso, esse aumento no número de células em proliferação é ainda maior conforme aumenta-se o tempo de exposição ao fármaco, como também foi observado no ensaio do TUNEL. Nos controles, também foi encontrado diferença significativa (Ctr 24h vs Ctr 48h), mostrando que quanto mais desenvolvidos os animais são, mais células positivas para histona H3 fosforilada são encontradas. Isso é esperado, pois a proliferação celular é um elemento chave para o desenvolvimento do animal, visto que diversos órgãos e tecidos são desenvolvidos e diferenciados neste estágio larval [26].

O comprimento do corpo da larva pode duplicar de 4 mm a 8 mm entre o 5 dpf ao 10 dpf, mostrando que pouco tempo é suficiente para gerar grandes alterações morfológicas [95].

Duas hipóteses foram levantadas para tentar explicar o aumento de células em proliferação encontradas no pronefros dos grupos tratados com a cisplatina. Uma delas é que a elevada taxa de proliferação celular seja um mecanismo compensatório ao dano gerado pela cisplatina. Como descrito na literatura, os rins do *zebrafish*, diferente dos humanos, possuem elevada regeneração tecidual, sendo capaz de produzir nefros durante toda vida [18, 96]. Outra hipótese é que o aumento dessas células seja resultado da hematopoiese elevada visto que a cisplatina induz um processo inflamatório e o aumento de células imunes no local afetado [97]. Com base nisso, o próximo passo foi analisar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e de um marcador de dano renal.





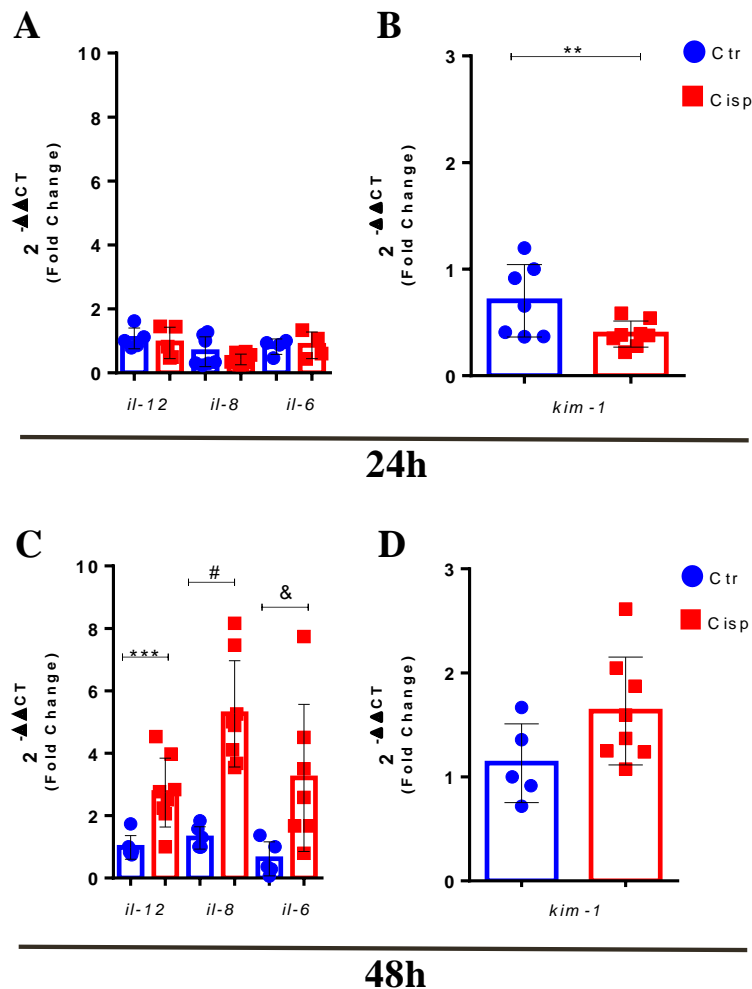
**Figura 11: Número de células positivas na região glomerular do pronefros para Histona H3 fosforilada**

**A.** Imagens representativas da marcação de núcleo celular com hoechst (em azul) e marcação histona H3 fosforilada (em verde) como indicativo de proliferação celular em larvas AB aos 8 dpf e 9 dpf ao serem expostas, respectivamente, a 24 horas (24h) e 48 horas (48h) de 0,10 mg/mL de cisplatina (Cisp). Larvas controles (Ctr) foram mantidas apenas no meio embrionário E3 1X. Rostral à esquerda dorsal acima. **B.** Número de células positivas para histona H3 fosforilada na região glomerular do pronefros (circulada em branco em A). Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre o grupo os grupos (Ctr 24h vs Cisp 24h, \*\* $p=0,0005$ ; Ctr 48h vs Cisp 48h, \*\*\* $p=0,0003$ ; Ctr 24h vs Ctr 48h, & $p=0,0135$ ; Cisp 24h vs Cisp 48h, # $p=0,0486$ ).

#### *4.8. Cisplatina induz aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias após 48 horas*

A LRA é marcada pelo aumento da inflamação do tecido renal em humanos. Em pacientes com LRA os níveis séricos de IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e IL-18 estão aumentados [90, 98, 99]. Desta maneira, analisamos a expressão de marcadores inflamatórios e de dano renal frente à exposição de 0,10 mg/mL de cisplatina (Sigma - Saint Louis, USA). Sendo assim, após 24 horas de exposição a droga, a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-8 e IL-12 foi analisada e nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos controle (Ctr) e cisplatina (Cisp) (Figura 12A). Entretanto, ao aumentar o tempo de exposição das larvas a cisplatina para um período de 48 horas, as mesmas citocinas apresentaram um aumento significativo no grupo tratado com cisplatina (Figura 12C). Quanto a expressão do marcador de dano renal KIM-1, após 24 horas os animais do grupo com cisplatina apresentaram menor expressão do marcador do que o grupo controle (Figura 12B). O mesmo não foi observado após 48 horas (Figura 12D). Era esperado que este marcador de dano estivesse aumentado após o estímulo, entretanto, já foi observado que as mudanças significativas nas concentrações urinárias de KIM-1 em resposta ao tratamento com cisplatina são dependentes do tempo de exposição [100]. Sendo assim, é possível que o período de 24 horas não seja suficiente para observar este aumento.

A LRA gerada pela nefrotoxicidade resulta em alterações estruturais e funcionais do sistema vascular que atraem para o tecido renal células imunes através da liberação de diversas citocinas e quimiocinas. A interleucina - 12 é uma citocina que auxilia na ativação e regulação de várias células imunes, entre elas, os macrófagos, células natural killer e células T [101]. Além disso, foi mostrado que a produção de IL-12 por células não imunes pode contribuir para lesão renal inflamatória [102]. Em humanos, a citocina IL-6 pode ser sintetizada no local da lesão nos estágios iniciais da inflamação, emitindo um sinal de alerta ao reconhecer DAMPs que são padrões moleculares associados ao dano liberados por células danificadas ou que estejam processo de apoptose [103]. Além disso, IL-6 tem sido utilizada como biomarcador precoce em soro e urina de pacientes após o tratamento com cisplatina. Em modelos de câncer foi demonstrado que o aumento da expressão de IL-6 aumenta a resistência adquirida à cisplatina e diminuindo a citotoxicidade e, deste modo, diminuindo a eficácia da cisplatina [104].



**Figura 12: Expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias e KIM-1 em 24 e 48 horas de exposição a cisplatina.**

As larvas foram submetidas a 0,10 mg/mL de cisplatina (Cisp) por 24 horas e 48 horas. Em oposição, as larvas controles (Ctr) foram mantidas apenas em meio embrionário. A expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-8 e IL-6 foi medida em 24 horas (A) e em 48 horas (C). Também foi realizada a análise da expressão gênica de KIM-1 em 24 horas (B) e 48 horas (D). Médias foram obtidas a partir de 6-9 amostras, referentes a um *pool* de 20 larvas por amostra. Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre o grupo controle e cisplatina (24 horas: \*\* $p=0,0307$ ; 48 horas: \*\*\* $p=0,0030$ ; # $p=0,0001$ ; & $p=0,0382$ ).

Na Figura 12C o aumento expressivo de IL-8 é algo a ser evidenciado visto que esta quimiocina está diretamente relacionada com a quimiotaxia de neutrófilos para o local lesionado [104]. Essas células da imunidade inata são responsáveis por diversas funções como reconhecimento de patógenos e reparo tecidual, entre elas, a fagocitose e degranulação de grânulos que contêm enzimas e espécies reativas de oxigênio (ROS) [105]. Corroborando essa ideia já foi descrito que o acúmulo de neutrófilos no tecido

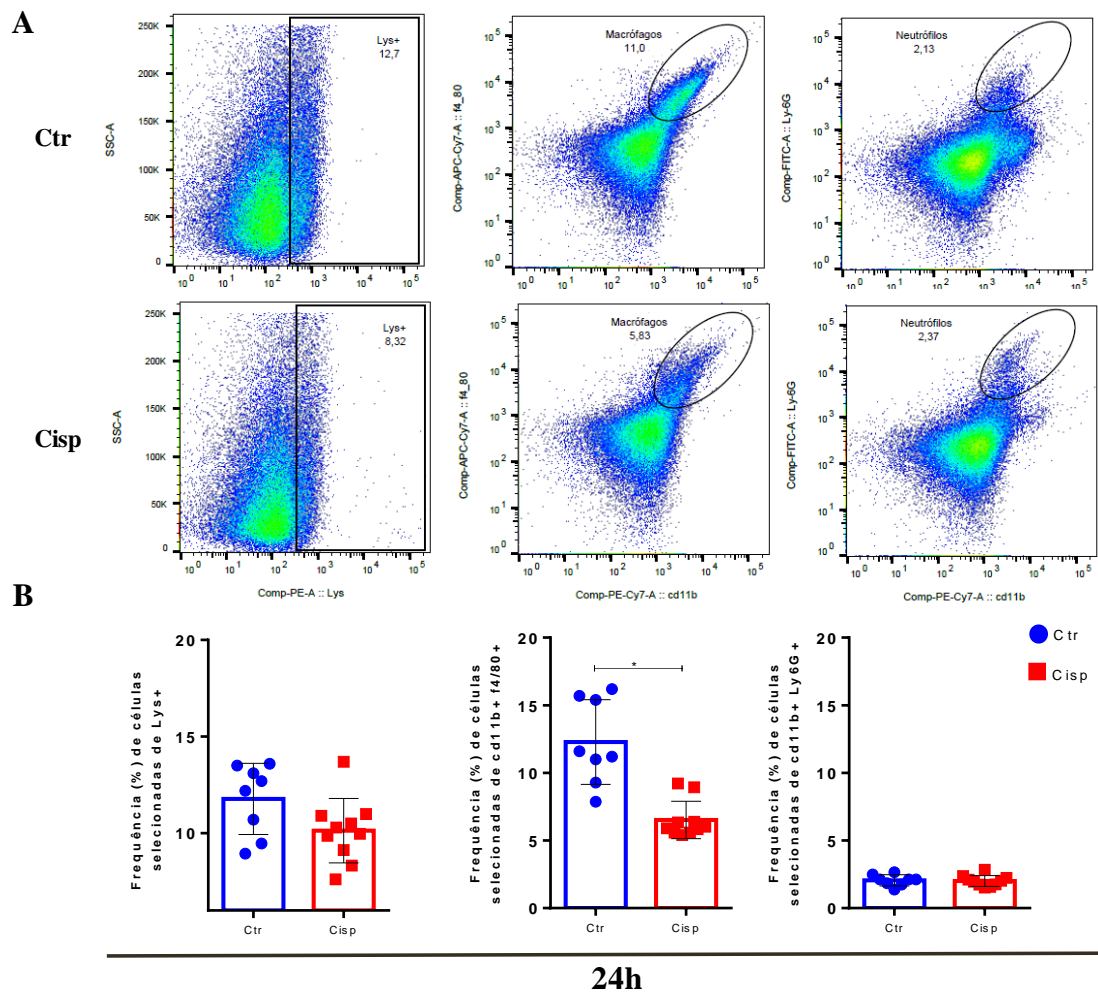
lesado é um achado precoce em humanos com LRA [106]. Para investigar essa hipótese, a linhagem transgênica marcadora de células mieloides Tg(lysC:DsRED2) foi usada para uma análise *in vivo*.

#### 4.9. Cisplatina altera a frequência de macrófagos e neutrófilos

Para confirmar os dados anteriores foi realizada citometria de fluxo utilizando larvas da linhagem transgênica Tg(lysC:DsRED2). Atualmente, existem protocolos de citometria de fluxo para o *zebrafish* adulto, nos quais é possível separar células por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e observar populações de leucócitos nitidamente definidas no rim [107]. Entretanto, pelo pequeno tamanho do pronefros e a impossibilidade de isolamento, foi realizada a análise na larva inteira. Além disso, nesse experimento foram usados anticorpos para tentar aprimorar a análise e identificar diferentes populações de células, como pode ser observado na estratégia de *gating* nas Figura 13 e Figura 14. Os dados obtidos evidenciam que a cisplatina ao ser diluída no meio embrionário gera um estado inflamatório nas larvas de *zebrafish*, corroborando com os dados da expressão gênica. Após 24 horas de exposição a cisplatina, as larvas apresentaram diminuição significativa de macrófagos CD11b+/F480+ (Figura 13).

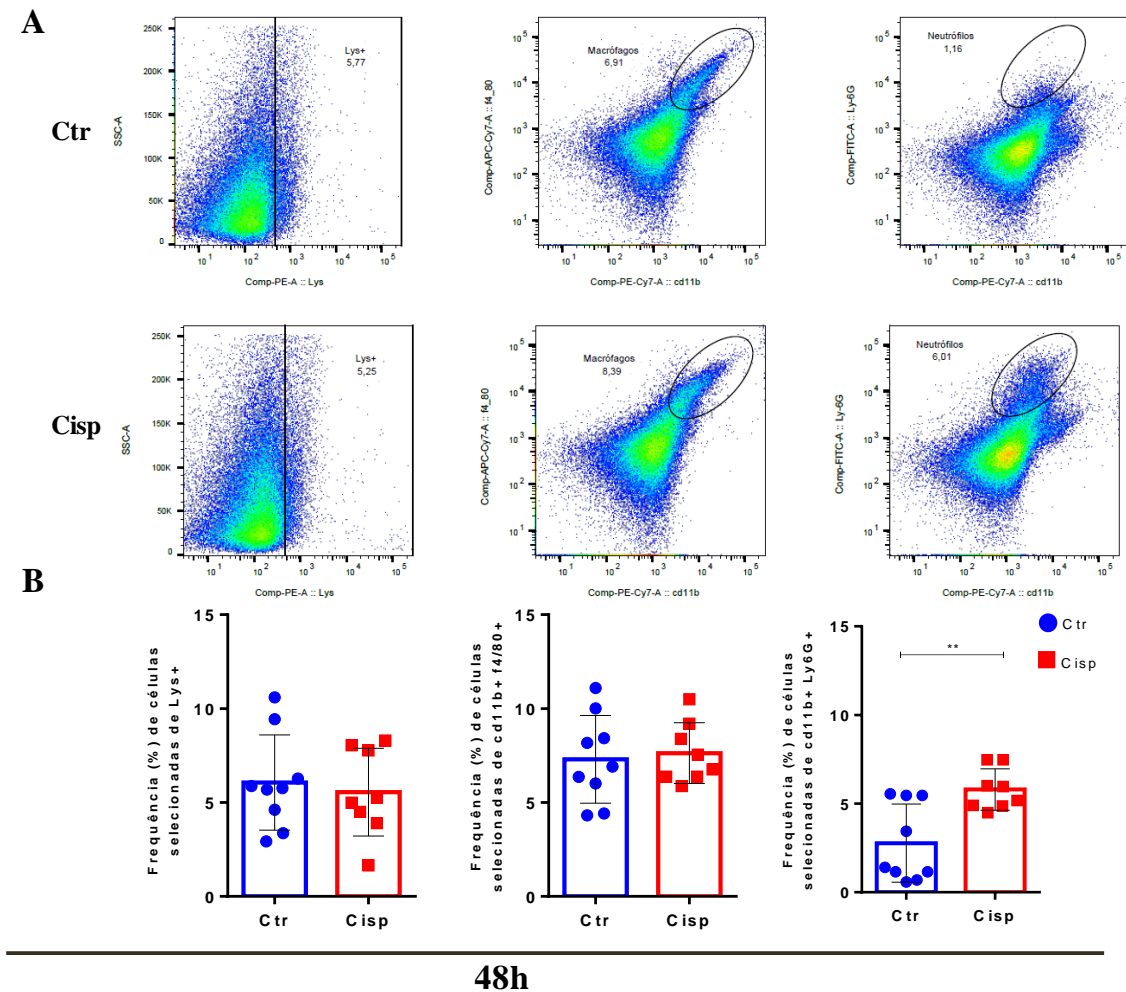
Após o dano tecidual ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias e atração leucócitos para o local danificado [108]. Os macrófagos são células de origem mieloide que participam tanto na fase inicial do dano renal quanto na fase de reparo tecidual, sendo tradicionalmente chamados de macrófagos M1 e M2, respectivamente [109]. Vale pontuar que esse paradigma que envolve a polarização dos macrófagos está em discussão na literatura atualmente, questionando esse agrupamento visto que essa polarização é mais complexa do que pensada inicialmente [110]. Entretanto, pensando nessas características dos macrófagos, o aumento dessas células nos estágios iniciais da inflamação é importante, pois são responsáveis por liberar citocinas pró-inflamatórias responsáveis por recrutar outras células, além de atuar na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) [111]. O fato de os macrófagos não apresentarem o padrão esperado de aumento pode ser resultado da seleção de anticorpos utilizados. Os macrófagos são células com uma variedade de receptores e seria necessário utilizar outros marcadores, como por exemplo, marcadores de ativação para a obtenção de uma análise mais precisa.

Em contrapartida, após 48 horas, houve aumento significativo de neutrófilos CD11b+/Ly6G+ (Figura 14). Esse dado corrobora com o aumento de IL-8 encontrado anteriormente, mostrando que a cisplatina resulta na proliferação e ativação deste tipo celular. Em modelos murinos de LRA, os neutrófilos chegam rapidamente ao sítio inflamatório [99]. Entretanto, no *zebrafish*, Skavarca *et al* mostrou que após a indução da LRA gentamicina em larvas com 3 dpf, o aumento de neutrófilos ocorreu apenas após 2 dias pós-injeção (dpi) do fármaco, não havendo diferença após 1 dpi [111]. Um resultado semelhante ao observado em nossas análises, mostrando a importância dos neutrófilos em uma fase mais tardia do processo inflamatório no modelo de *zebrafish*.



**Figura 13: Porcentagem de células lisozima+, macrófagos e neutrófilos em larvas após 24 horas de exposição a cisplatina.**

**A.** Figuras representativas da estratégia de *gating* usada para análise da citometria de fluxo oriundas da seleção prévia de complexidade (SSC-A) x tamanho (FSC-A), seguida da seleção de singlets (FSC-H x FSC-A). A figura representa um *pool* de 50 de larvas Tg (Lys:DsRED2), mostrando a estratégia de seleção das diferentes populações celulares (macrófagos e neutrófilos) a partir do uso de anticorpos CD11b, F4/80 e Ly6G. **B.** Médias foram obtidas a partir de 8-9 amostras. Os dados estão apresentados com média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre o grupo controle e cisplatina (\* $p < 0,0001$ ). Dados representativos de um experimento.



**Figura 14: Porcentagem de células lisozima+, macrófagos e neutrófilos em larvas após 48 horas de exposição a cisplatina.**

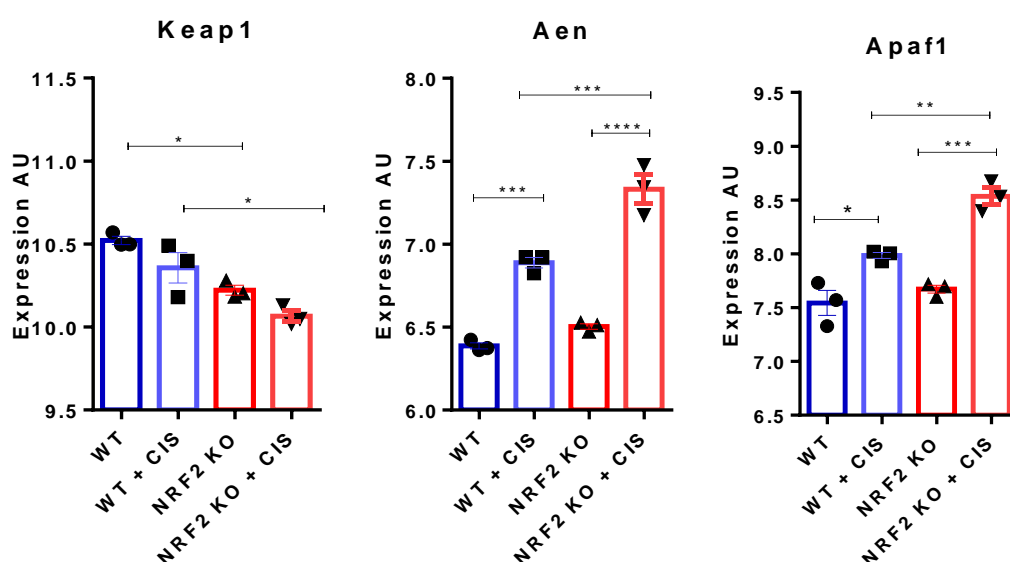
**A.** Figuras representativas da estratégia de *gating* usada para análise da citometria de fluxo. A figura representa um *pool* de 50 de larvas Tg (Lys:DsRED2), mostrando a estratégia de seleção das diferentes populações celulares (macrófagos e neutrófilos) a partir do uso de anticorpos CD11b, F4/80 e Ly6G. **B.** Médias foram obtidas a partir de 8-10 amostras. Os dados estão apresentados com média e desvio padrão. Foi realizado Teste T-student entre o grupo controle e cisplatina (\*\* $p=0,0034$ ). Dados representativos de dois experimentos.

#### 4.10. A via *Nrf2* desempenha um importante papel no controle da morte celular programada após o tratamento com cisplatina

Devido a pandemia pelo novo coronavírus, SARS-CoV2, e a impossibilidade de realizar atividades presenciais e atrasar todo o cronograma de experimentos do projeto. Foi realizada a análise *in silico* para investigar possíveis vias que poderiam ser investigadas no projeto a partir de dados disponíveis no *Geo Expression Omnibus*

(NCBI). Nesta abordagem foi possível analisar a expressão de diversos genes associados ao tratamento com cisplatina.

Os dados desta análise (Figura 15) são referentes ao trabalho “*Transcriptomic approach to renal toxicity for cisplatin treatment in Nrf2 WT/KO*” sob o código GSE48879. Neste artigo, foi examinado o efeito do knockout (KO) do *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) na lesão renal induzida pela cisplatina em camundongos, usando dados de *microarray*. A análise transcriptômica permitiu extrair *clusters* de genes que mostram padrões de expressão de mRNA significativamente diferentes entre camundongos tipo selvagem (WT) e Nrf2 KO.



**Figura 15:** Análise *in silico* do efeito do Nrf2 knockout (Nrf2 KO) na lesão renal induzida pela cisplatina.

Dados referentes ao artigo “*Transcriptomic approach to renal toxicity for cisplatin treatment in Nrf2 WT/KO*” sob o código GSE48879. Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizada *one-way ANOVA with Multiple Comparison*.

Na Figura 15 é possível observar que *Kelch Like ECH Associated Protein- 1* (*keap1*) tem sua expressão diminuída no grupo Nrf2 KO tratado com cisplatina quando comparada ao seu controle Nrf2 KO e os animais WT que também foram submetidos a cisplatina. Nesta mesma figura, foi analisado a expressão de genes ligados a apoptose, entre eles, *Apoptosis-enhancing nuclease* (*Aen*), uma exonuclease que medeia a apoptose induzida por p53, por possuir atividade contra DNA e RNA de fita simples e dupla [112]. Este gene possui aumento significativo nos grupos tratados com cisplatina, sendo sua expressão mais intensa no grupo Nrf2 KO. O *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*

(*Apaf-1*) medeia à ativação autocatalítica dependente do citocromo c da pro-caspase-9 (*Apaf-3*), levando à ativação da caspase-3 e apoptose [113]. Os dados mostram que o grupo Nrf2 KO tratado com cisplatina também possui aumento na expressão deste gene. Esses resultados demonstram a importância de Nrf2 no controle da morte celular programada que ocorre após o tratamento com cisplatina. Neste sentido, já foi demonstrado que o esporo do *Bacillus subtilis* pode ativar o sistema antioxidante em queratinócitos humanos [114]. Após sua ativação Nrf2 é translocado para o núcleo, onde se liga ao *antioxidant response element (ARE)* e ativa a transcrição de diversas enzimas antioxidantes [115]. Além disso, a sinalização de Keap 1/ Nrf2/ ARE regula a expressão de genes anti-inflamatórios, inibindo a progressão da inflamação característica da LRA. Esses dados corroboram a ideia do projeto de estudar o papel dos probióticos, mais especificamente, o *B. subtilis*, na proteção da lesão renal aguda induzida por cisplatina. Visto que a cisplatina induz um processo inflamatório resultando na lesão renal aguda e os probióticos podem atuar na regulação do sistema imune. Em humanos, a falta de especificidade da cisplatina pode acarretar diversos efeitos colaterais tais como, danos renais graves, reações alérgicas, diminuição da imunidade a infecções, distúrbios gastrointestinais, entre outros [8]. Sendo assim, o desenvolvimento de medidas preventivas específicas que melhorem o quadro clínico dos pacientes se torna imprescindível.

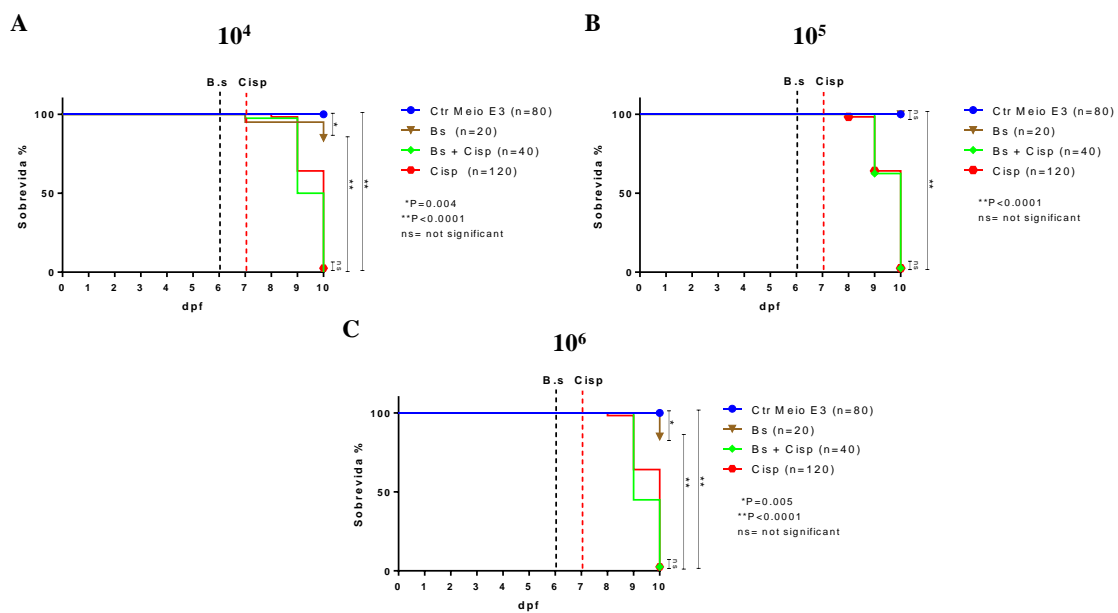
#### 4.11. As concentrações de *B. subtilis* testadas não resultaram na maior sobrevivência das larvas

Na Figura 16 o probiótico *B. subtilis* foi adicionado em três concentrações ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  CFU/mL) no meio embrionário contendo as larvas aos 6 dpf. Após 24 horas de tratamento com o probiótico foi realizada a troca do meio embrionário e a adição de 0,10 mg/mL de cisplatina. A sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente. A concentração de  $10^4$  CFU/mL da bactéria induziu mortalidade de 15% das larvas (Bs) aos 10 dpf quando comparado com o grupo controle (Ctr) mantido apenas em meio embrionário. Quando também expostas a cisplatina (Bs+Cisp), 100% das larvas morreram no mesmo período de tempo. Em contrapartida, esse mesmo grupo (Bs+Cisp) quando tratado com a concentração de  $10^5$  CFU/mL obteve mortalidade das larvas semelhante ao grupo exposto apenas a cisplatina. O probiótico nesta concentração gerou uma mortalidade inferior a mortalidade encontrada quando na concentração de  $10^4$ , tanto



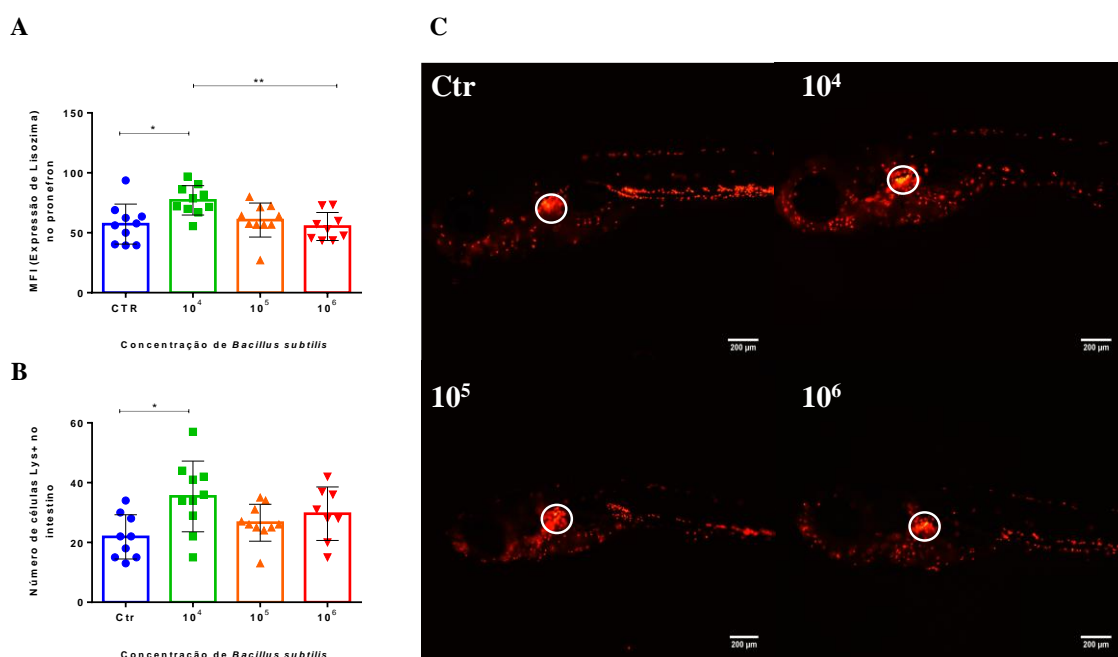
no grupo tratado apenas com o probiótico quanto o grupo tratado com o probiótico e exposto a cisplatina, resultando em uma mortalidade aos 9 dpf de, respectivamente, 37,5% e 35,9%. No décimo dia, a sobrevivida de ambos os grupos foi de 2,5%. Já na maior concentração do probiótico testada,  $10^6$  CFU/mL, o grupo tratado apenas com o *B. subtilis* resultou em mortalidade significativa de 15%. O grupo “Bs+Cisp” resultou em uma mortalidade de 55% aos 9 dpf, sendo superior ao grupo tratado apenas com cisplatina que resultou em mortalidade de 35,9% neste mesmo período. Aos 10 dpf a mortalidade foi de 97,5% em ambos os grupos.

Esses resultados mostram que dependendo da concentração utilizada o probiótico pode alterar a sobrevivida das larvas. A única concentração que não induziu mortalidade foi a de  $10^5$  CFU/mL. Entretanto, em larvas tratadas com essa concentração e expostas a cisplatina, a mortalidade foi semelhante ao grupo exposto apenas a cisplatina, evidenciando que nas condições tratadas o probiótico não foi efetivo em proteger as larvas dos efeitos do fármaco.



**Figura 16: Curva de sobrevivida utilizando concentrações crescentes de probiótico *Bacillus subtilis*.** Concentrações crescentes de probiótico *Bacillus subtilis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  CFU/mL) foram adicionadas ao meio embrionário aos 6 dpf e mantidas por 24 horas. Aos 7 dpf, 0,10 mg/mL de cisplatina foi adicionada no meio embrionário contendo as larvas. Ctr: larvas mantidas em meio embrionário; Bs: larvas tratadas apenas com *B. subtilis*; Bs+Cisp: larvas tratadas com o *B. subtilis* e expostas a cisplatina; Cisp: larvas expostas apenas a cisplatina. A. Concentração de  $10^4$ , \*p=0,004; \*\*p≤0,0001; ns=not significant. B. Concentração de  $10^5$ , \*\*p≤0,0001; ns=not significant. C. Concentração de  $10^6$ , \*p=0,005; \*\*p≤0,0001; ns=not significant. Teste de log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado. Dados referentes a dois experimentos, contendo de 20 a 120 larvas, como indicado na figura.

Para averiguar o efeito do probiótico no sistema imune das larvas, as mesmas três concentrações crescentes ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) de *B. subtilis* (Figura 17) foram testadas em larvas da linhagem transgênica (Lys:DsRED2), com marcação fluorescente para células mieloides, mas adicionadas um dia antes (5 dpf) para verificar se haveria algum efeito quando adicionada em larvas mais jovens.



**Figura 17: Média da intensidade de fluorescência oriundas de células mieloides na região glomerular do pronefros e número de células lisozima positivas no intestino.**

Larvas Tg(LysC:DsRED2) aos 6 dpf, controles (Ctr) e tratadas com concentrações crescentes do probiótico *Bacillus subtilis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  CFU/mL) que foram adicionadas ao meio embrionário aos 5 dpf e mantidas por 24 horas. A. Quantificação da média da intensidade de fluorescência (MFI) da região glomerular do pronefros (circulada em branco em C). B. Quantificação do número de células lisozima positivas no intestino. C. Imagens representativas do grupo Ctr e das três concentrações do probiótico testadas. Dados apresentados como média e desvio padrão. Foi realizada *one-way ANOVA with Multiple Comparison*. Rostral à direita dorsal acima.

A concentração de  $10^4$  CFU/mL de bactéria resultou em aumento na expressão de células lisozima positivas no intestino. O mesmo grupo também apresentou aumento na média da intensidade de fluorescência na região glomerular do pronefros. Além disso, vale salientar que as larvas tratadas com o *Bacillus* obtiveram uma resposta oposta ao que foi observado no grupo exposto a cisplatina, no qual vimos que resulta na diminuição da MFI na mesma região quantificada. Em contrapartida, as duas maiores concentrações do probiótico utilizadas,  $10^5$  e  $10^6$  CFU/mL, não apresentaram nenhuma diferença quando comparadas ao controle. É possível observar que dependendo da concentração utilizada,

o probiótico tem a capacidade de influenciar o sistema imunológico resultando no aumento de células mieloides tanto no pronefros quanto no intestino.

Tan *et al* mostrou que concentrações de  $10^2$  a  $10^4$  CFU/mL de *B. subtilis* geram a uma colonização de  $10^3$  a  $10^4$  CFU/peixe. Os autores testaram até a concentração de  $10^6$ , mas a partir de  $10^5$  começou a gerar mortalidade nas larvas [116]. Diferente do que ocorreu em nossos experimentos nos quais  $10^4$  CFU/mL já foi capaz de causar mortalidade. Neste mesmo trabalho também foi observado que 24 horas foi suficiente para que ocorresse a colonização, além disso, neste mesmo tempo de tratamento houve o aumento da expressão de genes ligados à imunidade [116].

A relação entre os probióticos e doenças renais tem sido foco de estudo nos últimos anos visto que esses microrganismos e as moléculas produzidas por eles podem afetar diretamente lesões renais [117]. Os probióticos podem ter efeitos moduladores no sistema imune, podendo ativar diversos leucócitos, entre eles, linfócitos, células NK, células dendríticas e macrófagos [118]. Além disso, essas bactérias podem induzir a expressão do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), auxiliando na cicatrização de feridas [118].

Nesse sentido, Zouari *et al* mostrou que o *B. subtilis* apresentou atividade antioxidante e foi capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas [119]. Levando em consideração isso, é possível que o aumento de células mieloides que foi observado em nossos experimentos após o tratamento com o probiótico possa ser benéfico as larvas visto a ação do *B. subtilis* no reparo tecidual. Além disso, nossos dados mostram que a cisplatina resulta na diminuição de células mieloides nos pronefros e o probiótico poderia ter um efeito compensatório, auxiliando na resolução da inflamação e reparo tecidual.

Os resultados obtidos em nossos experimentos com o probiótico mostram que nas condições testadas, não foi possível observar um efeito protetor nas larvas. Desta maneira, seria necessário realizar mais experimentos para estudar o papel modulador do probiótico, testando outras concentrações e diferentes períodos de tratamento. Além disso, em futuros estudos, gostaríamos de estudar mais a fundo os mecanismos imunomoduladores extra-intestinais do *B. subtilis* no tratamento isolado (mono-associação) e convencional da lesão renal aguda induzida por cisplatina na larva de *zebrafish*.

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho caracterizamos e avaliamos um novo modelo de LRA induzida por cisplatina em larvas de *zebrafish*. A partir de nossos dados podemos concluir que a cisplatina apresenta um efeito tóxico nas larvas de *zebrafish* quando expostas por pelo menos 48 horas. O fármaco apresenta um efeito dose-dependente na sobrevivência dos animais e induz o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6, IL-8) após 48 horas. Além disso, as larvas tratadas com 0,10 mg/mL de cisplatina apresentaram diminuição de células mielóides na região glomerular do pronefros. Em contrapartida, foi observado o aumento de neutrófilos em toda larva após 48 horas. A análise *in silico* indica uma possível via a ser estudada (Nrf2) que é regulada após o uso do *Bacillus subtilis*. Por fim, ao estudar o tratamento do *B. subtilis*, verificamos que a duração do tratamento com o probiótico e as três concentrações escolhidas não afetaram a sobrevivência das larvas expostas à cisplatina, demonstrando a necessidade de mais estudos para avaliação dos efeitos gerados pelo probiótico em contextos inflamatórios.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Sahay, M., S. Kalra, and T. Bandgar, *Renal endocrinology: The new frontier*. Indian J Endocrinol Metab, 2012. **16**(2): p. 154-5.
2. Saxena, A. and S.V. Meshram, *Predictors of Mortality in Acute Kidney Injury Patients Admitted to Medicine Intensive Care Unit in a Rural Tertiary Care Hospital*. Indian J Crit Care Med, 2018. **22**(4): p. 231-237.
3. Zuk, A. and J.V. Bonventre, *Acute Kidney Injury*. Annu Rev Med, 2016. **67**: p. 293-307.
4. Guo, C., et al., *Epigenetic regulation in AKI and kidney repair: mechanisms and therapeutic implications*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(4): p. 220-239.
5. Makris, K. and L. Spanou, *Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes*. Clin Biochem Rev, 2016. **37**(2): p. 85-98.
6. Lameire, N.H., et al., *Acute kidney injury: an increasing global concern*. Lancet, 2013. **382**(9887): p. 170-9.
7. Pabla, N. and Z. Dong, *Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies*. Kidney Int, 2008. **73**(9): p. 994-1007.
8. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 364-78.
9. Xu, Y., et al., *A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(11): p. 2647-58.
10. Ozkok, A. and C.L. Edelstein, *Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 967826.
11. Sharp, C.N. and L.J. Siskind, *Developing better mouse models to study cisplatin-induced kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2017. **313**(4): p. F835-F841.
12. Perse, M. and Z. Veceric-Haler, *Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 1462802.
13. Kim, M.J., et al., *Cisplatin nephrotoxicity is induced via poly(ADP-ribose) polymerase activation in adult zebrafish and mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2020. **318**(5): p. R843-R854.
14. Wen, X., et al., *A zebrafish model of infection-associated acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2018. **315**(2): p. F291-F299.
15. Cianciolo Cosentino, C., et al., *Intravenous microinjections of zebrafish larvae to study acute kidney injury*. J Vis Exp, 2010(42).
16. Hentschel, D.M., et al., *Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(5): p. F923-9.
17. Swanhart, L.M., et al., *Zebrafish kidney development: basic science to translational research*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2011. **93**(2): p. 141-56.
18. Morales Fénero, C., et al., *Acute Kidney Injury Model Induced by Cisplatin in Adult Zebrafish*. J Vis Exp, 2021(171).
19. Mayden, R.L., et al., *Phylogenetic relationships of Danio within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2007. **308**(5): p. 642-54.
20. Gerhard, G.S., et al., *Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (Danio rerio)*. Exp Gerontol, 2002. **37**(8-9): p. 1055-68.
21. Bradford, Y.M., et al., *Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN*. ILAR J, 2017. **58**(1): p. 4-16.

22. Dooley, K. and L.I. Zon, *Zebrafish: a model system for the study of human disease*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(3): p. 252-6.
23. Santoriello, C. and L.I. Zon, *Hooked! Modeling human disease in zebrafish*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(7): p. 2337-43.
24. Zorzetto, R. and M. Guimarães, *Um peixe modelo*, in *Pesquisa fapesp*. 2013. p. 16-21.
25. Delvecchio, C., J. Tiefenbach, and H.M. Krause, *The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery*. *Assay Drug Dev Technol*, 2011. **9**(4): p. 354-61.
26. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(3): p. 253-310.
27. Outtandy, P., et al., *Zebrafish as a model for kidney function and disease*. *Pediatr Nephrol*, 2019. **34**(5): p. 751-762.
28. Drummond, I.A. and A.J. Davidson, *Zebrafish kidney development*. *Methods Cell Biol*, 2010. **100**: p. 233-60.
29. Morales, E.E. and R.A. Wingert, *Zebrafish as a Model of Kidney Disease*. *Results Probl Cell Differ*, 2017. **60**: p. 55-75.
30. Diep, C.Q., et al., *Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish*. *Nature*, 2011. **470**(7332): p. 95-100.
31. Hill, A.J., et al., *Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages*. *Toxicol Sci*, 2004. **78**(1): p. 78-87.
32. Song, H.D., et al., *Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(46): p. 16240-5.
33. McKee, R.A. and R.A. Wingert, *Zebrafish Renal Pathology: Emerging Models of Acute Kidney Injury*. *Curr Pathobiol Rep*, 2015. **3**(2): p. 171-181.
34. Paik, E.J. and L.I. Zon, *Hematopoietic development in the zebrafish*. *Int J Dev Biol*, 2010. **54**(6-7): p. 1127-37.
35. Ciau-Uitz, A., et al., *Developmental hematopoiesis: ontogeny, genetic programming and conservation*. *Exp Hematol*, 2014. **42**(8): p. 669-83.
36. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 631-44.
37. Herbomel, P., B. Thisse, and C. Thisse, *Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo*. *Development*, 1999. **126**(17): p. 3735-45.
38. Ma, A.C., et al., *The role of jak2a in zebrafish hematopoiesis*. *Blood*, 2007. **110**(6): p. 1824-30.
39. Long, Q., et al., *GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene*. *Development*, 1997. **124**(20): p. 4105-11.
40. Jin, H., et al., *Runx1 regulates embryonic myeloid fate choice in zebrafish through a negative feedback loop inhibiting Pu.1 expression*. *Blood*, 2012. **119**(22): p. 5239-49.
41. Gore, A.V., et al., *The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2018. **7**(3): p. e312.
42. Bertrand, J.Y., et al., *Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo*. *Development*, 2007. **134**(23): p. 4147-56.
43. Bertrand, J.Y., et al., *Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development*. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 108-11.

44. Bresciani, E., et al., *CBF $\beta$  and RUNX1 are required at 2 different steps during the development of hematopoietic stem cells in zebrafish*. *Blood*, 2014. **124**(1): p. 70-8.
45. Kissa, K. and P. Herbomel, *Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition*. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 112-5.
46. Murayama, E., et al., *Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development*. *Immunity*, 2006. **25**(6): p. 963-75.
47. Gore, A.V., et al., *Epigenetic regulation of hematopoiesis by DNA methylation*. *Elife*, 2016. **5**: p. e11813.
48. Sood, R., et al., *Development of multilineage adult hematopoiesis in the zebrafish with a runx1 truncation mutation*. *Blood*, 2010. **115**(14): p. 2806-9.
49. Stachura, D.L. and D. Traver, *Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis*. *Methods Cell Biol*, 2016. **133**: p. 11-53.
50. Mitra, S.v.d.S., A.; Alnabulsi, A.; Secombes, A.; Bird, S., *Fishing for CD4 positive cells in the zebrafish*. 2010, *The Journal of Immunology*.
51. Painter, C.A.C., *C. Adaptive immunity in a zebrafish model of melanoma*. in *AACR 104th Annual Meeting 2013*. Washington, DC.
52. Quintana, F.J., et al., *Adaptive autoimmunity and Foxp3-based immunoregulation in zebrafish*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9478.
53. Danilova, N. and L.A. Steiner, *B cells develop in the zebrafish pancreas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13711-6.
54. Page, D.M., et al., *An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish*. *Blood*, 2013. **122**(8): p. e1-11.
55. Willett, C.E., J.J. Cherry, and L.A. Steiner, *Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish*. *Immunogenetics*, 1997. **45**(6): p. 394-404.
56. Bingulac-Popovic, J., et al., *Mapping of mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, Danio rerio*. *Immunogenetics*, 1997. **46**(2): p. 129-34.
57. Sultmann, H., et al., *Conservation of Mhc class III region synteny between zebrafish and human as determined by radiation hybrid mapping*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 6984-93.
58. Trede, N.S., et al., *The use of zebrafish to understand immunity*. *Immunity*, 2004. **20**(4): p. 367-79.
59. Traver, D., et al., *The zebrafish as a model organism to study development of the immune system*. *Adv Immunol*, 2003. **81**: p. 253-330.
60. Wallace, K.N., et al., *Intestinal growth and differentiation in zebrafish*. *Mech Dev*, 2005. **122**(2): p. 157-73.
61. Ng, A.N., et al., *Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis*. *Dev Biol*, 2005. **286**(1): p. 114-35.
62. Berman, J., K. Hsu, and A.T. Look, *Zebrafish as a model organism for blood diseases*. *Br J Haematol*, 2003. **123**(4): p. 568-76.
63. Rawls, J.F., B.S. Samuel, and J.I. Gordon, *Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(13): p. 4596-601.
64. Melancon, E., et al., *Best practices for germ-free derivation and gnotobiotic zebrafish husbandry*. *Methods Cell Biol*, 2017. **138**: p. 61-100.
65. Bates, J.M., et al., *Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation*. *Dev Biol*, 2006. **297**(2): p. 374-86.

66. Stephens, W.Z., et al., *The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development*. ISME J, 2016. **10**(3): p. 644-54.
67. Rawls, J.F., et al., *Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection*. Cell, 2006. **127**(2): p. 423-33.
68. Meijers, B., P. Evenepoel, and H.J. Anders, *Intestinal microbiome and fitness in kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(9): p. 531-545.
69. Martínez Cruz, P., et al., *Use of probiotics in aquaculture*. ISRN Microbiol, 2012. **2012**: p. 916845.
70. Hobby, G.P., et al., *Chronic kidney disease and the gut microbiome*. Am J Physiol Renal Physiol, 2019. **316**(6): p. F1211-F1217.
71. Ramezani, A. and D.S. Raj, *The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(4): p. 657-70.
72. Rukavina Mikusic, N.L., N.M. Kouyoumdzian, and M.R. Choi, *Gut microbiota and chronic kidney disease: evidences and mechanisms that mediate a new communication in the gastrointestinal-renal axis*. Pflugers Arch, 2020. **472**(3): p. 303-320.
73. Kechagia, M., et al., *Health benefits of probiotics: a review*. ISRN Nutr, 2013. **2013**: p. 481651.
74. Selvam, R., et al., *Effect of Bacillus subtilis PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease*. Indian J Biochem Biophys, 2009. **46**(1): p. 79-85.
75. Cristofori, F., et al., *Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 578386.
76. Gioacchini, G., et al., *The influence of probiotics on zebrafish Danio rerio innate immunity and hepatic stress*. Zebrafish, 2014. **11**(2): p. 98-106.
77. Zokaeifar, H., et al., *Effects of Bacillus subtilis on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol, 2012. **33**(4): p. 683-9.
78. Djaldetti, M. and H. Bessler, *Probiotic strains modulate cytokine production and the immune interplay between human peripheral blood mononuclear cells and colon cancer cells*. FEMS Microbiol Lett, 2017. **364**(3).
79. Maldonado Galdeano, C., et al., *Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System*. Ann Nutr Metab, 2019. **74**(2): p. 115-124.
80. Puebla-Barragan, S. and G. Reid, *Forty-five-year evolution of probiotic therapy*. Microb Cell, 2019. **6**(4): p. 184-196.
81. Sueoka, N., *Cell membrane and chromosome replication in Bacillus subtilis*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **59**: p. 35-53.
82. Rhayat, L., et al., *Effect of*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 564.
83. Pasparakis, M., *IKK/NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells controls immune homeostasis in the gut*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S54-7.
84. Al, K.F., et al., *Oxalate-Degrading Bacillus subtilis Mitigates Urolithiasis in a Drosophila melanogaster Model*. mSphere, 2020. **5**(5).
85. Lefevre, M., et al., *Safety assessment of Bacillus subtilis CUI for use as a probiotic in humans*. Regul Toxicol Pharmacol, 2017. **83**: p. 54-65.
86. Matthews, M. and Z.M. Varga, *Anesthesia and euthanasia in zebrafish*. ILAR J, 2012. **53**(2): p. 192-204.
87. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.



88. Arany, I. and R.L. Safirstein, *Cisplatin nephrotoxicity*. *Semin Nephrol*, 2003. **23**(5): p. 460-4.
89. Holmgren, M. and L. Sheets, *Using the Zebrafish Lateral Line to Understand the Roles of Mitochondria in Sensorineural Hearing Loss*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 628712.
90. Simmons, E.M., et al., *Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure*. *Kidney Int*, 2004. **65**(4): p. 1357-65.
91. Kyrylkova, K., et al., *Detection of apoptosis by TUNEL assay*. *Methods Mol Biol*, 2012. **887**: p. 41-7.
92. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7265-79.
93. Yamashita, M., *Apoptosis in zebrafish development*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003. **136**(4): p. 731-42.
94. Cole, L.K. and L.S. Ross, *Apoptosis in the developing zebrafish embryo*. *Dev Biol*, 2001. **240**(1): p. 123-42.
95. Wilson, C., *Aspects of larval rearing*. *ILAR J*, 2012. **53**(2): p. 169-78.
96. Pouretezadi, S.J. and R.A. Wingert, *Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease*. *Kidney Int*, 2016. **89**(6): p. 1204-10.
97. Humanes, B., et al., *Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection*. *Nephrol Dial Transplant*, 2017. **32**(10): p. 1645-1655.
98. Liu, K.D., et al., *Serum interleukin-6 and interleukin-8 are early biomarkers of acute kidney injury and predict prolonged mechanical ventilation in children undergoing cardiac surgery: a case-control study*. *Crit Care*, 2009. **13**(4): p. R104.
99. Faubel, S., et al., *Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **322**(1): p. 8-15.
100. George, B., et al., *Time-dependent changes in kidney injury biomarkers in patients receiving multiple cycles of cisplatin chemotherapy*. *Toxicol Rep*, 2020. **7**: p. 571-576.
101. Gee, K., et al., *The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009. **8**(1): p. 40-52.
102. Timoshanko, J.R., et al., *Interleukin-12 from intrinsic cells is an effector of renal injury in crescentic glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(3): p. 464-471.
103. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(10): p. a016295.
104. McSweeney, K.R., et al., *Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(7).
105. Liangos, O., et al., *Interleukin-8 and acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a prospective cohort study*. *Nephron Clin Pract*, 2009. **113**(3): p. c148-54.
106. Akcay, A., Q. Nguyen, and C.L. Edelstein, *Mediators of inflammation in acute kidney injury*. *Mediators Inflamm*, 2009. **2009**: p. 137072.
107. Bates, T.J., U. Naumann, and C. Englert, *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Protocol for Podocyte Isolation in Adult Zebrafish*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1467**: p. 133-6.

108. Paredes, L.C., N. Olsen Saraiva Camara, and T.T. Braga, *Understanding the Metabolic Profile of Macrophages During the Regenerative Process in Zebrafish*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 617.
109. Cao, Q., D.C. Harris, and Y. Wang, *Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis*. *Physiology (Bethesda)*, 2015. **30**(3): p. 183-94.
110. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. *F1000Prime Rep*, 2014. **6**: p. 13.
111. Brill Skvarca, L., et al., *Enhancing regeneration after acute kidney injury by promoting cellular dedifferentiation in zebrafish*. *Dis Model Mech*, 2019. **12**(4).
112. Kawase, T., et al., *p53 target gene AEN is a nuclear exonuclease required for p53-dependent apoptosis*. *Oncogene*, 2008. **27**(27): p. 3797-810.
113. Shakeri, R., A. Kheirollahi, and J. Davoodi, *Apaf-1: Regulation and function in cell death*. *Biochimie*, 2017. **135**: p. 111-125.
114. Petruk, G., et al., *Alternative use of Bacillus subtilis spores: protection against environmental oxidative stress in human normal keratinocytes*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1745.
115. Ahmed, S.M., et al., *Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(2): p. 585-597.
116. Tan, F., et al., *The Responses of Germ-Free Zebrafish* (*Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 2156).
117. Andrade-Oliveira, V., et al., *Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion*. *J Am Soc Nephrol*, 2015. **26**(8): p. 1877-88.
118. Lukic, J., et al., *Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair*. *Wound Repair Regen*, 2017. **25**(6): p. 912-922.
119. Zouari, R., et al., *Evaluation of dermal wound healing and in vitro antioxidant efficiency of Bacillus subtilis SPB1 biosurfactant*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **84**: p. 878-891.

## APÊNDICES

### A) PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### Artigos publicados no período:

- Paredes, LC; Luz, RBS; Tozzi, ON; de Carvalho, LASJ; Calado, SLM; **Padovani, BN**; Fénero, CIM; do Amaral, MA; de Assis, HCS; Câmara, NOSC; Braga, TT. Distinct macrophage phenotypes and redox environment during the fin fold regenerative process in *zebrafish*. SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, v. 00, p. 11 -12, 2021.
- Gomes, JMM; Valverde, TM; Martins, TMM; Charlie-Silva, I; **Padovani, BN**; Fénero, CM; da Silva, EM; Domingues, RZ; Hoyos, DCM; Junior, JDC; Câmara, NOS; de Góes, AM; Gomes, DA. Long-term dexamethasone treatment increases the engraftment efficiency of human breast cancer cells in adult *zebrafish*. Fish and Shellfish Immunology Reports, v. 1, p. 100007, 2021.
- Fénero CM, **Padovani BN**, Amaral MA, Barros MJB, Oliveira IKX, Hiyane MI, Câmara NOS. Acute Kidney Injury Model Induced by Cisplatin in Adult Zebrafish. J Vis Exp. (171). doi: 10.3791/61575. PMID: 34057433. 2021.
- Fénero, CM; Amaral, MA; Xavier, IK; **Padovani, BN**; Paredes, LC; Takiishi, T; Ferreira, ML, Lima, C; Colombo, A; Câmara, NOS. Short Chain Fatty Acids (SCFAs) Improves TNBS-induced Colitis in Zebrafish. Current Research in Immunology, 2, 142–154. doi:10.1016/j.crimmu.2021.08.003, 2021.

#### Artigo aceito para publicação:

- **Padovani, BN**; Amaral, MA; Fénero, CM; Paredes, LC; Barros, GJB; Xavier, IK; Hiyani, MI, Ghiretto, B; Feijóo, CG; Câmara, NOS; Takiishi, T. Different wild type strains of zebrafish show divergent susceptibility to TNBS-induced inflammatory bowel disease model displaying distinct immune cell profile. Current Research in Immunology. Accepted for publication on Set 06, 2021.

#### Capítulos de livros:

- Honda, TSB; **Padovani, BN**; Câmara, NOSC. Chapter 4: Antigen processing and presentation through MHC molecules - Proteolytic Signaling in Health and

Disease. Elsevier, Pages 63-80, ISBN 9780323856966. doi: 10.1016/B978-0-323-85696-6.00005-6, 2021

- Fénero CM, **Padovani BN**, Amaral MA, Câmara NOS. The Role of Zebrafish Microbiota in Experimental Studies. Zebrafish as Tool for Study Pharmacology. Drug Discovery. Submitted on May 12, 2020.

## **B) ATIVIDADES ACADÊMICAS EXTRA-CURRICULARES**

### **Participação em eventos e congressos:**

- IX Annual Meeting of the Postgraduate Program in Immunology. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* on cisplatin-induced acute kidney injury in *zebrafish*. 2020. (Encontro).
- 27º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo. Análise do perfil de respostas imunes inatas e imunoregulação entre linhagens selvagens de *zebrafish* no modelo de doença inflamatória intestinal. 2019
- VI Simpósio *Zebrafish* Como Modelo Animal de Pesquisa. Analysis of the innate immune response profile and immunoregulation between wild strains of *zebrafish* inflammatory bowel disease. 2019. (Simpósio).
- VII Simpósio *Zebrafish* Como Modelo Animal de Pesquisa. 2021. (Simpósio).

### **Prêmios e títulos**

- Honra ao mérito, VI Simpósio *Zebrafish* Como Modelo Animal de Pesquisa. 2019

### **Cursos**

- Integrated Analysis in Systems Biology. (Carga horária: 4h). Icahn School of Medicine at Mount Sinai - New York City, ICAHN, Estados Unidos. (Plataforma Coursera). 2020.
- Western Blotting. (Carga horária: 2h). Nova Analítica Importação e Exportação Ltda, Analítica, Brasil. 2020
- English for Science, Technology, Engineering, and Mathematics. (Carga horária: 34h). University of Pennsylvania, UPENN, Estados Unidos. (Plataforma Coursera). 2020.

## **Monitoria**

- Estágio voluntário do Programa PAE junto a disciplina, MI0214 - Imunologia ministrada no período de fevereiro/2020 a julho/2020 sob supervisão do Prof. Dr. Alexandre A. Steiner.
- Colaboração em aulas práticas e teóricas sobre “Usos do modelo experimental de Zebrafish para estudo de doenças inflamatórias intestinais” na disciplina “Métodos Laboratoriais em Imunologia”. 2019