

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

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.

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].

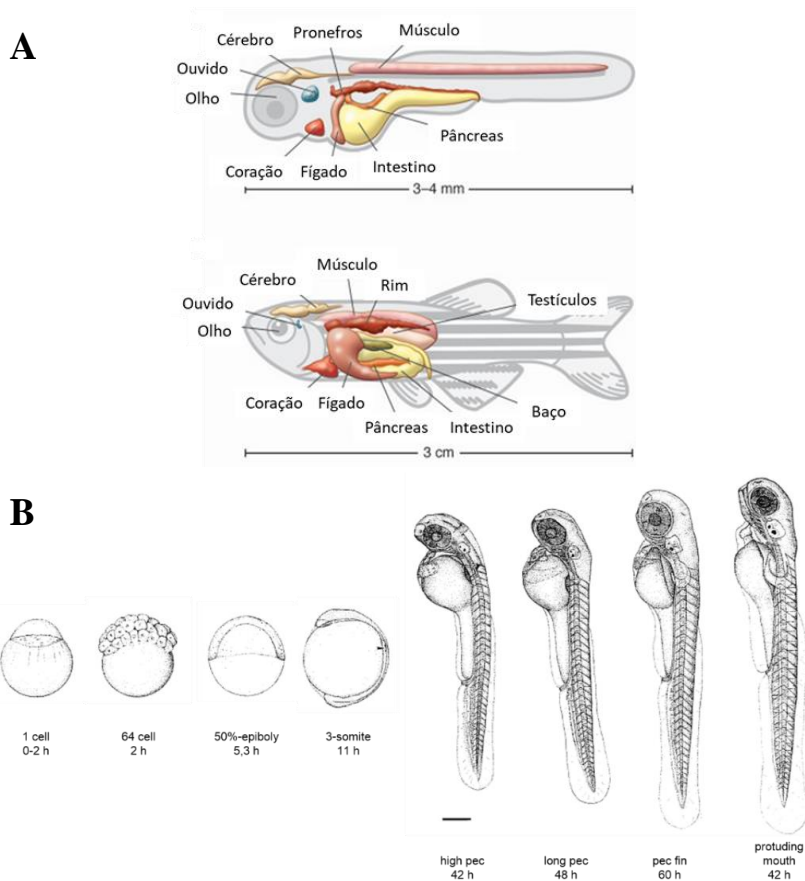


Figura 1: O *zebrafish* como modelo experimental.

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].

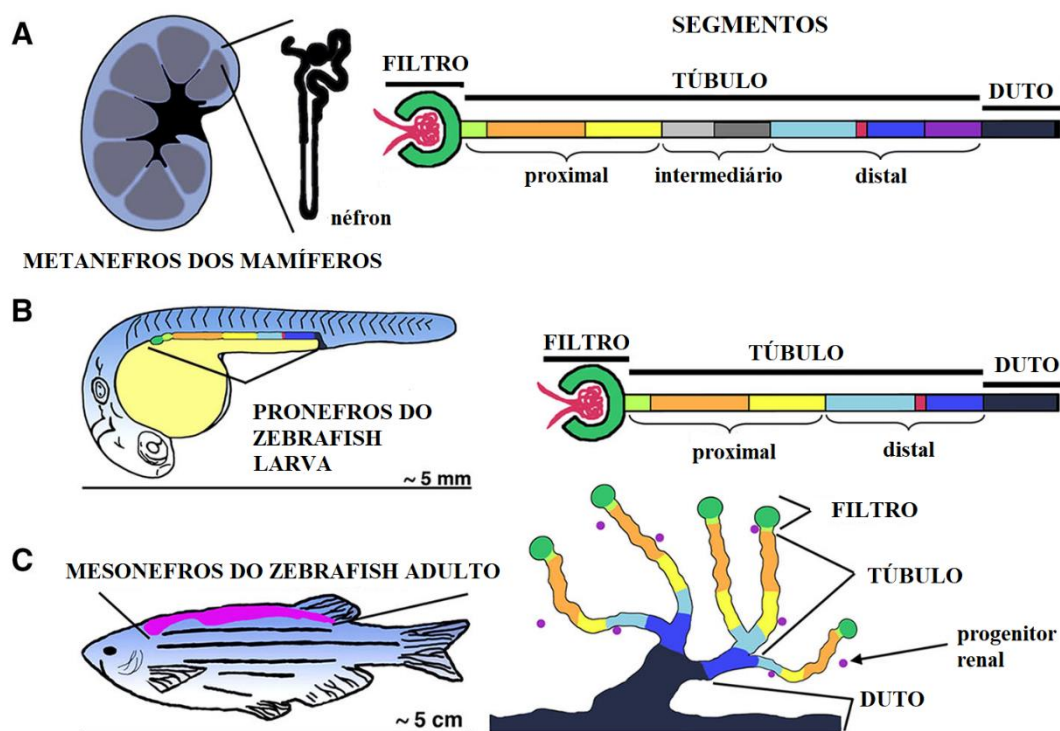


Figura 2: Estruturas renais em mamíferos e *zebrafish*.

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 aos 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 mielóide, eritroide e linfóide pelo resto da vida do *zebrafish* [41]. Primeiramente, a Ilha de Sangue Posterior (PBI) gera transientemente progenitores eritro-mielóides (EMPs) que se diferenciarão em linhagens eritroides e mielóides, porém não linfóides, 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 mielóide, eritroide, tromboide e linfóide, 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^a 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 linfóides secundários bem definidos como linfonodos, Placas de Peyer no intestino ou centros germinativos esplênicos [62].

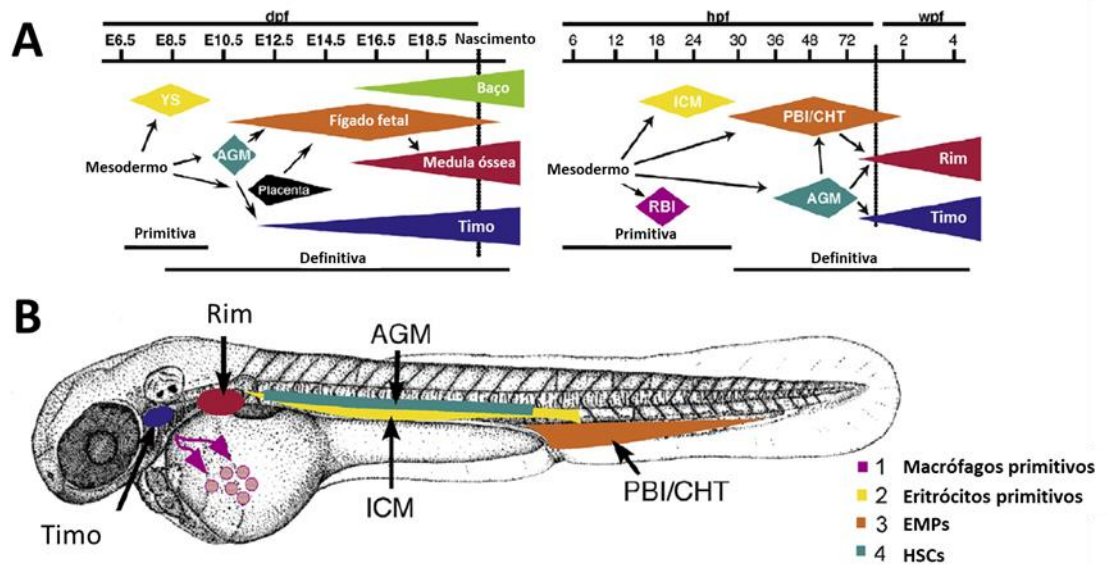


Figura 3: Modelo de ontogenia hematopoiética no *zebrafish*.

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 precusores. (1) Primeiro, os macrófagos primitivos surgem no mesoderma cefálico, 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].

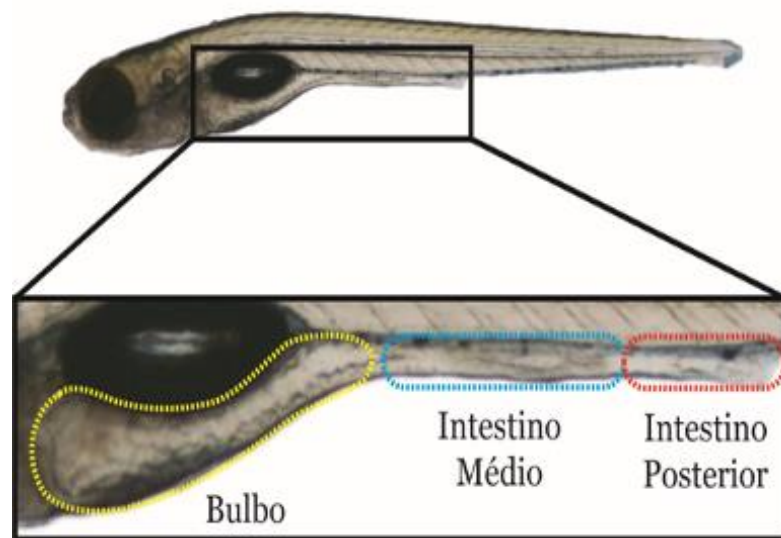


Figura 4: O intestino do *zebrafish* em estágio larval.

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 de 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 filos 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.

Filo	Zebrafish	Camundongo	Humano
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 filios 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- κ B, o que impede a degradação de I κ 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*.

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 mieloides 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.

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 β 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. Zokaefar, 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.