ESTUDO DA APOPTOSE NA LESÃO RENAL AGUDA NO MODELO DE MALÁRIA CEREBRAL EM CAMUNDONGOS COM DEFICIÊNCIA DE INTERFERON-GAMA

CAMILA PUGLIESI DE FIGUEIREDO; GABRIELLA DE PAULA; VICTOR PEDROSA FERREIRA DE SOUZA; KLEBER SIMÔNIO PARREIRA; WÂNIA REZENDE LIMA

RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) é uma das principais complicações da malária severa, doença infecciosa endêmica causada pelo protozoário *Plasmodium*. A LRA causado por *P.falciparum* acomete de forma predominante os idosos e as crianças. O modelo de malária severa em murino, modelo experimental de malária cerebral (ECM) em camundongos infectados por *Plasmodium berguei* Anka (PbA), tem auxiliado na compreensão da imunofisiopatologia da doença causada pelo *P. falciparum* e mostrado as principais complicações reproduzidas em camundongos C57BL/6J, bem como a LRA. Nesse sentido, nós investigamos se os camundongos C57BL/6J deficientes de interferon-gama (IFN-γ) desenvolvem LRA e se a via de apoptose é ativada mesmo na ausência de IFN-γ. Após a infecção, os animais foram avaliados e a coleta dos rins foi efetuada para análise histológica e quantificação dos mRNAs mensageiro dos marcadores CASP3, TRAIL e KIM. A infecção promoveu a regulação positiva significativa de genes que codificam todos os mRNAs marcadores quantificados, quando comparados ao grupo controle não-infectado, principalmente no que se refere à CASP3 e TRAIL. Ademais, os resultados de PCR quantitativa dos animais IFN-γ e infectados observaram uma redução na expressão de todos os marcadores quando comparados ao seu controle. Os resultados sugerem que no modelo ECM, a ausência de IFN-γ pode proteger contra a LRA e inibir a ativação da via de apoptose.

Palavras-chave: *Plasmodium berghei* Anka; Deficiência de IFN-y; LRA.

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa endêmica a diversos países tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. Transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*, a infecção por *Plasmodium falciparum* é uma doença de caráter agudo que pode causar febre alta, calafrios, sudorese, náuseas e dores no corpo. A forma grave da doença pode acarretar em coma cerebral, insuficiência respiratória aguda e lesão renal aguda. Sendo que esta última é uma das principais complicações da malária severa, representando a *causa mortis* principalmente de idosos e crianças infectados (Abreu et al.,2014; Souza et al.,2015; Silva et al.,2018). Análise histopatológica em pacientes com LRA após malária severa mostrou presença de necrose tubular, nefrite intersticial e glomerulonefrite, atribuídas a eventos de necrose, autofagia tubular e apoptose (Koopmans et al.,2015; Barsoum et al.,2000; Wichapoon et at.,2017). Em modelo de ECM foi relatado recentemente, que a infecção com PbA apresenta manifestações clínicas semelhantes à malária por *P.falciparum,* onde reproduz o quadro de lesão renal aguda (Possemiers et al.,2022). Recentemente nosso grupo, demonstrou que a LRA presente no modelo de ECM está associada a um desequilíbrio eletrolítico e produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ, IL-1β, IL-6, and TNF-α. Simião e colegas (2024) mostrou, pela primeira vez, o aumento da expressão de genes envolvidos no processo de apoptose extrínseca

DOI: 10.51161/v-conbrapah/51380

nas células glomerulares e tubulares do rim em camundongos C57BL/6J infectados com PbA (Simião, G. M. et al., 2024). Apesar das descobertas para a compreensão da patogênese da LRA em pacientes com malária cerebral e no modelo de ECM, ainda é pouco as pesquisas para desvendar a patogenia e patofisiologia da LRA na malária severa.

A via extrínseca da apoptose mediada pelo TRAIL, um membro da família dos factor de necrose tumoral (TNF), tem sido associado com lesão glomerular e tubular, bem como a caspase-3 ativa (CASP3) foi imunolocalizada em células mesangiais e tubulares no rim de camundongos com ECM. A CASP3 pode gerar efeitos pró-inflamatórios e apoptóticos no parênquima renal ligando-se a receptores de morte durante lesão isquêmica, sendo potencializado pela ação de IFN-γ (Simião, G. M. et al., 2024; Park, S. Y. et al., 2004). Por sua vez, o biomarcador de lesão precoce renal, chamado de KIM, em camundongos com ECM mostraram expressão gênica elevada. O KIM está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos, mas, principalmente, na regulação da resposta imune do epitélio renal a lesões isquêmicas ou tóxicas, justificando seu uso como marcador de LRA (Karmakova, T. A et al., 2021).

Levando em consideração que os camundongos C57BL/6J deficientes de IFN-γ não apresentam quadro de malária cerebral, e não existe estudo que demonstre seu papel na patogenia da LRA, nós propusemos investigar se os animais deficientes de IFN-γ (IFN-γ Ko) desenvolvem lesão renal aguda e se a via de apoptose é ativada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado utilizando camundongos machos C57BL/6J de 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 25g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sobre o protocolo de número 002/21. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2° C) e ciclo claro/escuro (12/12) controlados automaticamente, com livre acesso a água e alimentação.

Para o estudo, foram utilizados cinco animais dos seguintes grupos: Grupo 1: controle não-infectado; Grupo 2: infectado; Grupo 3: controle não-infectado deficiente IFN-γ; Grupo 4: infectado deficiente IFN-γ. Na infecção dos animais foi utilizada uma única dose de 50.000 eritrócitos parasitados com PbA diluído em soro fisiológico, enquanto os grupos controle 1 e 3 receberam veículo (soro fisiológico). Após a infecção, os animais foram anestesiados e eutanasiados no sétimo dia para coleta dos rins.

A extração do RNA total do tecido renal foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Gibco BRL USA). O RNA total isolado foi tratado com 20U de DNAse I por 30 minutos a temperatura ambiente e transcrito reversamente usando oligonucleotídeos oligo-dT e a transcriptase SuperScript II RNAse H, segundo a recomendação do fabricante, que determina incubação de 2 minutos a 42ºC, adição de d 1 μL de SuperScript II RNAse H, incubação por 50 minutos a 42ºC e inativação da reação pelo aquecimento a 70º por 15 minutos.

Com a meta de dosar a expressão dos marcadores de apoptose e lesão renal precoce, CASP3, TRAIL e KIM a PCR em tempo real foi realizada. As reações de PCR quantitativas foram amplificadas utilizando a enzima Taq DNA polimerase no termociclador BioRad (BioRad, California, USA) seguindo as recomendações do fabricante do kit Sybr Green master mix (Promega), tendo sido realizadas 30 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 54ºC e 2 minutos de 72ºC, acrescidos de um passo de 7 minutos a 72ºC de termociclagem. Todas as amostras foram submetidas a reações de quantificação do RNA mensageiro do GAPDH, utilizado como normatizadores da reação de quantificação (Lima et al.,2013; Lima et

DOI: 10.51161/v-conbrapah/51380

al.,2010).

A análise estatística foi determinada pela ANOVA seguida por análise de comparação múltipla pelo teste Tukey. Os valores foram expressos como a média ± SEM (Média do Erro Padrão). As diferenças na expressão foram baseadas no delta Ct de cada amostra [Razão = 2ΔCt(GAPDH—Target Gene)]. Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores de p menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

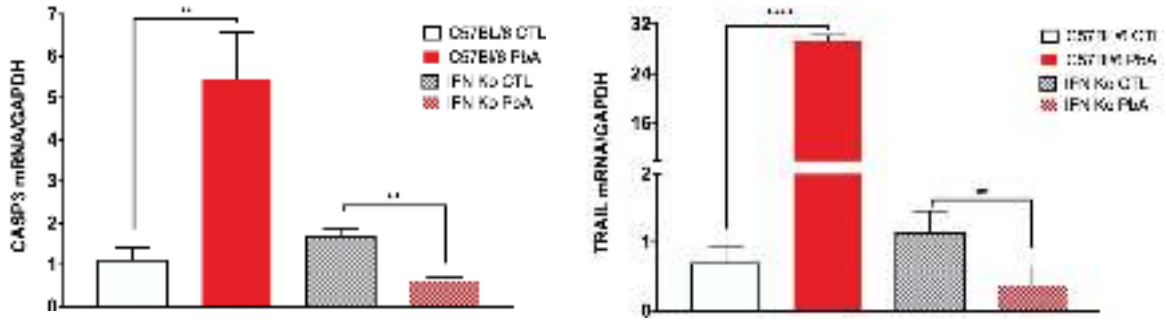
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta inflamatória na malária severa é marcada pela produção sistêmica elevada de citocinas pró-inflamatórias como a IFN-γ, que, por sua vez, não só contribui para a patogênese geral da doença, mas, especificamente, para a determinação das complicações renais (Simião, G. M. et al.,2024). Por essa lógica, é compreensível o porquê a ausência de IFN-γ protege esses animais no modelo ECM. No entanto, mesmo na ausência do quadro de malária cerebral, os animais ainda estariam sujeitos a hipovolemia. Nesse sentido, este estudo buscou compreender se as células do tecido renal estavam com a via da apoptose ativa e/ou com lesão. Para tal, foi determinada a expressão mRNA dos genes CASP3, TRAIL e KIM, respectivamente, marcadores de apoptose e marcador de LRA através da quantificação em PCR em tempo renal, normalizada por GAPDH, gene de expressão constitutiva.

Ensaios de PCR quantitativos confirmaram que a infecção com PbA aumenta a expressão de CASP3 no tecido renal (Simião et al., 2024). O resultado da PCR quantitativa mostrou um aumento de 4,9 vezes mais nos animais infectados do que no controle. Em contraste, foi revelado que os animais IFN-γ Ko e infectados com PbA apresentaram diminuição de 3,2 vezes de mRNA de CASP3 quando comparado aos animais IFN-γ Ko sem infecção (Figura 1A).

Com o objetivo de observar se a via extrínseca da apoptose é induzida na infecção mesmo na ausência de IFN-y, a dosagem dos transcritos do TRAIL também foi quantificada. Os resultados da PCR confirmaram que a infecção com PbA aumenta a expressão de TRAIL no tecido renal (Simião et al., 2024). A quantificação relativa do mRNA mostrou um aumento de aproximadamente 42 vezes mais TRAIL nos animais infectados do que no grupo controle (Figura 1B). Em contraste, foi revelado que os animais IFN-γ Ko infectados apresentaram 3,2 vezes menos mRNA de CASP3 quando comparado aos IFN-γ Ko sem infecção, ambos valores estatisticamente significativos.

Figura 1- Expressão de genes da via extrínseca da apoptose no tecido renal. (A) expressão do mRNA da CASP3 ativa; (B) expressão do mRNA do TRAIL.

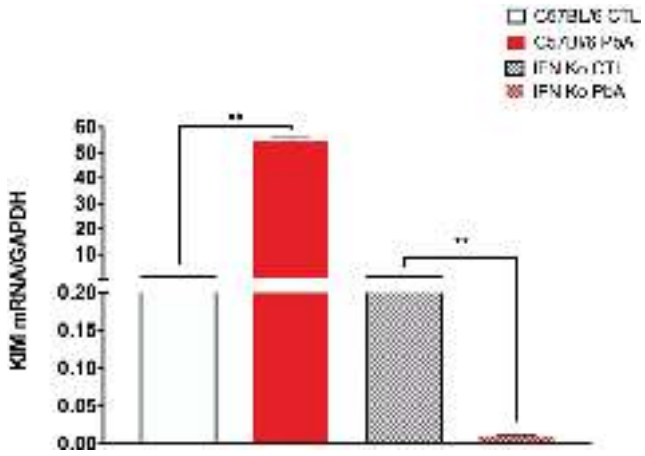


A expressão do mRNA do marcador KIM demonstrou um aumento de aproximadamente 49 vezes nos animais infectados, quando comparado ao controle (Figura 2). Contrariamente, os resultados da PCR quantitativa revelaram que os animais IFN-γ Ko infectados apresentaram queda de 8,35 vezes de mRNA quando comparado aos animais IFN-γ

DOI: 10.51161/v-conbrapah/51380

Ko sem infecção PbA.

Figura 2- Expressão do gene KIM no tecido renal



A ausência de IFN-γ nos camundongos, causou uma redução importante na expressão dos marcadores CASP3, TRAIL e KIM quando comparados o grupo não-infectado e infectado, tendo os animais infectados demonstrado uma menor expressão gênica. Estes resultados permitiram determinar que no modelo ECM, os animais IFN-γ Ko apresentaram uma inibição da ativação da via de apoptose, bem como, um certo grau de proteção contra a LRA. Ademais, os resultados mostram que a hipovolemia no último dia após infecção no modelo de ECM não é suficiente para aumentar os níveis de expressão dos transcritos. Estes dados podem sugerir que a reação inflamatória deve ser um dos principais fatores que inicia o surgimento da LRA no modelo de ECM.

4 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo buscou avaliar os impactos renais do modelo experimental de malária cerebral em camundongos C57BL/6J IFN-γ Ko, determinando se os animais infectados com *Plasmodium* desenvolvem LRA e se a via de apoptose é ativada na ausência de IFN-γ. Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer o mecanismo de ação que determina o fator de proteção renal, foi possível constatar que estes animais apresentaram uma redução na expressão dos marcadores de lesão renal (KIM) e de apoptose (CASP3 e TRAIL). Estes resultados reforçam que as vias de inflamação e de apoptose, na LRA em pacientes com malária cerebral, devem em parte ao *cross-talk* da resposta inflamatória mediada por IFN-y e da via extrínseca da apoptose mediada por fator de morte tumoral (TNF). Assim, podemos sugerir que o mecanismo molecular e as intervenções terapêuticas em malária associada a LRA podem levar em consideração alvos que bloqueiam a via do IFN-y com o objetivo de amenizar o dano do tecido renal e a inflamação.

REFERÊNCIAS

Abreu TP, Silva LS, Takiya CM, et al. Mice Rescued from Severe Malaria Are Protected against Renal Injury during a Second Kidney Insult. **PLoS ONE** 9(4): e93634, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093634

Barsoum RS. Malarial acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol**. 2000; 11: 2147-54.

Karmakova, TA, Sergeeva, NS, Kanukoev, KY, et al. Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1): a Multifunctional Glycoprotein and Biological Marker (Review). ***Sovremennye tekhnologii v***

meditsine, *13*(3), p 64–78, 2021. https://doi.org/10.17691/stm2021.13.3.08

Koopmans LC, van Wolfswinkel ME, Hesselink DA, Hoorn EJ, Koelewijn R, van Hellemond JJ, van Genderen PJ. Acute kidney injury in imported Plasmodium falciparum malaria. **Malar J**. 2015 Dec 24;14:523. doi: 10.1186/s12936-015-1057-9.

Lima, WR; Moraes, M, Alves E, Azevedo MF, et al. The PfNF-YB transcription factor is a downstream target of melatonin and cAMP signalling in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **J Pineal Res**; (54): p 145-153, 2013.

Lima, WR; Parreira KS, Devuyst O, et al,. ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**;(21): p 478-488, 2010.

Park, SY, Seol JW, Lee YJ, et al. IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. ***European journal of biochemistry***, *271*(21), p 4222–4228, 2004. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04362.x

Silva LS, Peruchetti DB, Silva-Aguiar RP, et al. The Angiotensin II/AT1 Receptor Pathway Mediates Malaria-Induced Acute Kidney Injury. **PloS One,** 13(9):e0203836, 2018.

Simião, GM, Parreira, K S, Klein, SG, et al. Involvement of Inflammatory Cytokines, Renal NaPi-IIa Cotransporter, and TRAIL Induced-Apoptosis in Experimental Malaria-Associated Acute Kidney Injury. ***Pathogens*** *(Basel, Switzerland)*, *13*(5), 376, 2024. https://doi.org/10.3390/pathogens13050376

Souza, MC, Silva, JD, Pádua, TA. et al., Mesenchymal stromal cell therapy attenuated lung and kidney injury but not brain damage in experimental cerebral malaria. **Stem Cell Res Ther** 6, 102 (2015). https://doi.org/10.1186/s13287-015-0093-2

Villegas-Mendez, Ana et al. Gamma Interferon Mediates Experimental Cerebral Malaria by Signaling within Both the Hematopoietic and Nonhematopoietic Compartments. ***Infection and immunity.*** vol. 85,11 e01035-16. 18 Oct. 2017, doi:10.1128/IAI.01035-16

Wichapoon B, Punsawad C, Viriyavejakul P. Expression of cleaved caspase-3 in renal tubular cells in Plasmodium falciparum malaria patients. **Nephrology** (Carlton). 2017 Jan;22(1):79-84. doi: 10.1111/nep.12715. PMID: 26729581.