

Luiz Henrique Gomes Matheus

Expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) durante o processo de fibrogênese renal e efeitos de sua inibição na transição epitélio mesenquimal induzida por TGF- β 1

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título acadêmico de Mestre em Medicina.

SÃO PAULO

2016

Luiz Henrique Gomes Matheus

Expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) durante o processo de fibrogênese renal e efeitos de sua inibição na transição epitélio mesenquimal induzida por TGF- β 1

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título acadêmico de Mestre em Medicina.

Orientador:

Prof. Humberto Dellê.

SÃO PAULO

2016

Matheus, Luiz Henrique Gomes.

Expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) durante o processo de fibrogênese renal e efeitos de sua inibição na transição epitélio mesenquimal induzida por TGF-β1. / Luiz Henrique Gomes Matheus. 2016.

63 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof. Dr. Humberto Dellê.

1. Indoleamina, 2-3 dioxigenase. 2. Fibrose renal. 3. 1-metil-D-triptofano. 4. TGF-β 1. 5. Inflamação renal.

I. Dellê, Humberto.

II. Título.

CDU 616

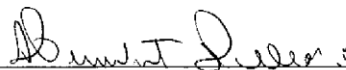
São Paulo, 14 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

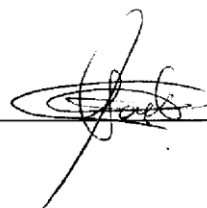
Aluno: Luiz Henrique Gomes Matheus

Título da Dissertação: “ **Expressão do Indoleamina 2,3- dioxigenase (IDO) durante o processo do fibrogênese renal e efeitos de sua inibição na transição epitélio mesenquimal induzido por TGF-B1.** ”

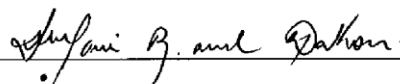
Presidente: Prof. Dr. Humberto Dellê



Membro: Profa. Dra. Samirah Abreu Gomes



Membro: Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni



Dedicatória

Dedico este trabalho em especial à minha família e minha noiva, Danielle, que juntos, com seu apoio para com as decisões e o caminho que trilhei, tornaram-se pilares em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Nove de Julho – UNINOVE pela estrutura física e intelectual fornecidas para o início e continuidade dos trabalhos desenvolvidos em conjunto assim como os recursos fornecidos para a conclusão deste degrau que inicia minha vida acadêmica.

Ao meu orientador, professor Humberto Dellê, por sua dedicação e compromisso em ensinar e instruir desde o período de iniciação científica e por ser meu primeiro contato e base em um caminho na pesquisa.

Agradeço à minha família, que me forneceu apoio e incentivo em todos os sentidos para seguir em frente e concluir cada etapa com o equilíbrio e força necessários desde o primeiro dia que senti o lampejo pela pesquisa e docência.

Agradeço à minha noiva, Danielle, por todo o amor, compreensão e apoio mútuo para superar cada dificuldade e aprender com elas.

Agradeço grandemente aos companheiros e colaboradores do grupo de pesquisa, por seu apoio e grande auxílio técnico, intelectual e pessoal, Gislene, Taíssa, Diego, Yves, Rodrigo, Camila, Chrisna, professora Erna e todos os demais que contribuíram para a execução deste trabalho.

Agradeço também aos alunos de iniciação científica, que contribuíram tanto fornecendo conhecimento quanto servindo de fonte para distribuir conhecimento e instruir o que me foi e será ensinado da melhor maneira que me foi possível.

“Durante a nossa breve estada no planeta Terra, devemos nós mesmos e nossos descendentes ter a oportunidade de explorar, em parte porque é divertido fazer isso. Mas há uma razão muito mais nobre. Se o

nosso conhecimento do cosmos deixar de se expandir, corremos o risco de regredir para o ponto de vista infantil em que o universo figurava e literalmente girava em torno de nós”.

- Neil deGrasse Tyson

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Doença renal crônica.....	16
1.2. Fibrose renal e mecanismos associados.....	17
1.3. Transição epitélio mesênquimal.....	18
1.4. TGF- β.....	19
1.5. Indoleamina, 2-3 dioxigenase (IDO).....	20
2.OBJETIVOS.....	25
3.MATERIAIS MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.1.1 Desenho do estudo – In Vivo.....	28
3.1.2 Modelo OUU e design experimental	28
3.2. Histologia renal	30
3.2.1. Imunohistoquímica	30
3.3. PCR em tempo rea.....	32
3.4. Atividade da IDO	33
3.5. Estudos In Vitro.....	34
3.5.1. Desenho do estudo – In vitro.....	34
3.5.2. Cultura celular MDCK.....	34
3.5.3. Imunohistoquímica e imunocitoquímica	36
3.5.4. Medição de quinureninas	37
3.5.5. Ensaio da ferida.....	38
3.6 Análise estatística	38
4.RESULTADOS.....	39
4.1.Morfologia renal e macrófagos.....	40
4.2. TEM em OUU.....	42
4.3. Expressão de TGF-β1 em modelo OUU.....	44

4.4. Imunohistoquímica paraIDO no tecido renal.....	45
4.5. Atividade daIDO em modelo UUO.....	46
4.6. Efeito do TGF- β 1 sobre a expressão em células MDCK-IDO.....	46
4.7. Efeito da inibição daIDO sobre a TEM em células MDCK.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

Lista de figuras

Figura 1-Transição Epitélio Mesenquimal.....	18
Figura 2-Mecanismos de estímulo de IDO.....	24
Figura 3-Fibrose e macrófagos teciduais.....	40
Figura 4-Imunohistoquímica-transição epitélio-mesenquimal.....	41
Figura 5-Imunohistoquímica-TGF- β 1.....	43
Figura 6-TGF β 1-Expressão relativa.....	44
Figura 7-Imunohistoquímica- IDO cortical e medular.....	45
Figura 8-Relação Triptofano/Quinurenina.....	46
Figura 9-Imunofluorescência-IDO.....	47
Figura 10-Imunocitoquímica- α SMA.....	48
Figura 11-Ensaio de ferida-células MDCK.....	49
Tabela 1-Relação de Anticorpos utilizados.....	31
Tabela 2-Marcadores de transição epitélio-mesenquimais-cortical e tubular.....	43

Lista de Abreviaturas

α SMA – alpha Actina de Músculo Liso
ATCC – American Type Culture Collection
cDNA – DNA complementar CKD –
Chronic Kidney Disease
CL – Contralateral
DAB – diaminobenzidina
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA – Ácido Desoxinucleico
DRC – Doença Renal Crônica
EMT – Epithelial to Mesenchymal Transition
GCN2 – general control nonderepressible 2 IDO
– Indoleamina 2,3 dioxigenase.
IL – Interleucina
IFN – Interferon
INF γ – Interferon Gama
IRAK1 – Receptor de interleucina-1 associado a quinase
Kyn – Quinurenina
MDCK - Madin-Darby canine kidney
MT – 1-metil-D-Triptofano mTor -
mechanistic target of rapamycin NF κ B
- factor nuclear kappa B
OUU – Obstrução de Ureter Unilateral
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PI(K)3 - fosfoinositídeo 3-quinase
PCR – Reação de Cadeia de Polimerase qRT-PCR
– PCR quantitativo em tempo real
RNA – Ácido Ribonucleico
SFB – Soro Fetal Bovino
SHP-1 - Protein-tyrosine phosphatase 1
SHP-2 - Protein-tyrosine phosphatase 2
TEM – Transição Epitélio Mensenquimal
TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TGF β 1 – Fator de transformação de Crescimento Beta 1

Resumo

A doença renal crônica (DRC) é uma doença altamente prevalente e progressiva em todo o mundo. Sua prevalência duplicou na última década e, como tal, merece atenção e preocupação na busca de maior conhecimento sobre seus mecanismos. A fibrose renal é um evento que ocorre na DRC e é caracterizada por um extenso processo inflamatório com vasta migração de macrófagos e acúmulo de matriz extracelular, que podem causar danos na arquitetura renal e função renal e agravando a condição do paciente.

A Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma molécula imunomoduladora que tem sido implicada em vários processos biológicos. Embora a IDO tenha sido associada com algumas doenças renais, o seu papel na fibrose renal, ainda é incerto. Devido a IDO poder ser modulada por TGF- β 1, uma molécula pró-fibrótica potente, há a hipótese de que a IDO poderia estar envolvida na fibrose renal, agindo em especial na transição epitelial-mesenquimal (TEM) tubular induzida por TGF- β 1. Sendo assim, a expressão e a atividade da IDO foi analisada no presente estudo, utilizando-se um modelo de fibrogênese renal. Além disso, o efeito da inibição da IDO por 1-metil-triptofano (MT) na TEM induzida por TGF- β 1 foi avaliado utilizando cultura de células tubulares.

Ratos Wistar machos foram submetidos a 7 dias de obstrução ureteral unilateral OUU. Os rins não obstruídos dos animais que sofreram OUU (CL) e os rins de ratos SHAM foram utilizados como controle. O aumento da deposição de colágeno intersticial foi significativo em rins obstruídos ($13,4\% \pm 2,6\%$ em OUU contra $0,3\% \pm 0,1\%$ em SHAM e $0,9\% \pm 0,1\%$ em CL; $p < 0,0001$). A análise imunohistoquímica revelou um aumento significativo no número de macrófagos em rins OUU ($75,2 \pm 12,6$ células/campo em OUU contra $6,2 \pm 0,8$ células/campo em SHAM e $16,0 \pm 2,7$ células/campo em CL, $p < 0,0001$), acompanhado por redução da expressão de E-caderina tubular ($20,8 \pm 5,4$ em SHAM, contra $21,1 \pm 11,6$ em CL e $2,7 \pm 1,1$ em OUU). Os marcadores de células mesenquimais (α SMA e vimentina) foram aumentadas em rins OUU, particularmente no interstício renal (α SMA: $17,7 \pm 7,1$ em SHAM, contra $74,5 \pm 23,5$ CL e $368,8 \pm 45,8$ ‡ ($p < 0,0001$)(Vimentina: $13,0 \pm 0,9$ em SHAM, contra $17,0 \pm 1,2$ em CL e $141,3 \pm 8,8$ ‡* ($p < 0,0001$) *em OUU e nos

túbulos (α SMA: 27.2 ± 6.5 SHAM, 35.8 ± 0.90 CL e 61.4 ± 4.2 †* ($p < 0,001$) **OUU . Estes resultados caracterizam o processo de transição epitelial-mesenquimal e foram acompanhados por aumento da expressão de TGF-beta1 (qRT-PCR) (expressão relativa de $14,7 \pm 0,1$ em OUU contra $1,0 \pm 2,2$ no SHAM; $p < 0,0001$). AIDO foi claramente expressa nos túbulos corticais e medulares dos rins OUU. Além disso, a atividade daIDO foi analisada a partir de tecido renal, sendo significativamente maior nos rins OUU ($19,9 \pm 3,6\%$ em OUU contra $5,0 \pm 3,4\%$ em SHAM e de $10,8 \pm 1,6\%$ em CL, $p < 0,05$).

Nos experimentos com cultura túbulo distal, células MDCK, foi demonstrado aumento na expressão deIDO após estímulo com TGF- β 1 ($1,6 \pm 0,1$ unidades no controle contra $3,1 \pm 0,3$ unidades em células estimuladas por TGF- β 1; $p < 0,05$). Alfa-actina de músculo liso foi expressa nas células estimuladas por TGF- β 1 e o tratamento com 1-MT potencializou a sua expressão ($24,8 \pm 3,2\%$ de células α SMA⁺ no controle, $40,1 \pm 9,1\%$ de células α SMA⁺ em MT, $58,8 \pm 10,6\%$ de células α SMA⁺ em TGF- β 1 e $66,1 \pm 10,8\%$ de células α SMA⁺ em TGF- β 1 + MT; $p < 0,05$ controle versus TGF- β 1 + MT). Células MDCK estimuladas com TGF- β 1 apresentaram maior atividade migratória (ensaio de ferida), que foi aumentada pelo tratamento com MT ($1,8 \pm 0,2$ mm² no controle, $1,4 \pm 0,3$ mm² em MT, $2,8 \pm 0,1$ mm² em TGF- β 1 e $4,4 \pm 0,3$ mm² em TGF- β 1 + MT; $p < 0,05$ controle versus TGF- β 1 e contra TGF- β 1 + MT).

AIDO é expressa constitutivamente em túbulos distais e sua expressão aumenta durante a fibrogênese renal. Embora aIDO possa ser induzida por TGF- β 1 nas células tubulares, o seu inibidor químico atua como um agente pró-fibrótico, propondo a teoria de que aIDO atua como regulador do processo fibrogênico.

Palavras-chave: Doença renal crônica; Fibrose renal; Indoleamina 2,3-dioxigenase;, Transição epitélio-mesenquimal; Fibroblastos

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a worldwide highly prevalent and progressive disease. Its prevalence has doubled in the last decade and, as such, deserves attention and concern in the search for greater knowledge about its mechanisms. Renal fibrosis is an event that occurs in CKD and is characterized by an extensive inflammatory process with extensive macrophage migration and extracellular matrix accumulation, which may cause damage to the kidney architecture and renal function, and aggravating the condition of the patient.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an immunomodulatory molecule which has been implicated in various biological processes. Although the IDO has been associated with some kidney diseases, their role in renal fibrosis, is still unclear. Because IDO can be modulated by TGF- β 1, a powerful pro-fibrotic molecule, there is the hypothesis that IDO may be involved in renal fibrosis particularly acting in the tubular epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β 1. Thus, the expression and activity of IDO in this study was analyzed using a model of renal fibrogenesis. Furthermore, the effect of inhibition of IDO by 1-methyl-tryptophan (MT) in the EMT induced by TGF- β 1 was evaluated using tubular culture cells.

Male Wistar rats were subjected to 7 days of unilateral ureteral obstruction UUU. Not obstructed kidneys from animals that UUU (CL) and SHAM rat kidneys were used as controls. Increased Interstitial collagen deposition was significant in obstructed kidneys (13.4% \pm 2.6% in UUU versus 0.3% \pm 0.1% in SHAM and 0.9% \pm 0.1% in CL; $p < 0.0001$). Immunohistochemical analysis revealed a significant increase in the number of macrophages in UUU kidneys (75.2 \pm 12.6 cells/field in UUU versus 6.2 \pm 0.8 cells/field in SHAM and 16.0 \pm 2.7 cells/field in CL, $p < 0.0001$), accompanied by reduction in tubular E-cadherin expression (20.8 \pm 5.4 in SHAM, versus 21.1 \pm 11.6 in CL and 2.7 \pm 1.1 in UUU). The markers of mesenchymal cells (α SMA and vimentin) were increased in UUU kidneys, particularly in renal interstitium (α SMA: 17.7 \pm 7.1 in SHAM, versus 74.5 \pm 23.5 CL and 368.8 \pm 45.8 \ddagger ($p < 0.0001$)) (Vimentin: 13.0 \pm 0.9 in SHAM, versus 17.0 \pm 1.2 in CL and 141.3 \pm 8.8 \ddagger^* ($p < 0.0001$)) * and tubules (α SMA: 27.2 \pm 6.5 SHAM, 35.8 \pm 0.90 CL and 61.4 \pm 4.2 \ddagger^* ($p < 0.001$)) **OUU. These results characterize the process of epithelial to mesenchymal transition and

were accompanied by increase of the TGF-beta1 expression (qRT-PCR)(relative expression. of 14.7 ± 0.1 in UUO versus 1.0 ± 2.2 in SHAM; $p < 0.0001$). IDO was clearly expressed in the cortical and medullary tubules of the UUO kidneys. In addition, the activity of IDO was analyzed from kidney tissue, being significantly higher in UUO kidneys($19.9 \pm 3.6\%$ in UUO versus $5.0 \pm 3.4\%$ in SHAM and of $10.8 \pm 1.6\%$ in CL, $p < 0.05$).

The experiments with distal tubule MDCK culture cells demonstrated increased IDO expression after stimulation with TGF- β 1(1.6 ± 0.1 units in control versus 3.1 ± 0.3 units in cells stimulated by TGF- β 1; $p < 0.05$). Alpha-smooth muscle actin was expressed in cells stimulated by TGF- β 1 and treatment with 1-MT potentiates its expression($24.8 \pm 3.2\%$ of α SMA⁺ cells in control, $40.1 \pm 9.1\%$ de of α SMA⁺ cells in MT, $58.8 \pm 10.6\%$ of α SMA⁺cells in TGF- β 1 and $66.1 \pm 10.8\%$ of α SMA⁺ cells in TGF- β 1 + MT; $p < 0.05$ control versus TGF- β 1 + MT).. MDCK cells stimulated with TGF- β 1 showed higher migration activity (wound assay), which was increased by treatment with MT(1.8 ± 0.2 mm² in control, 1.4 ± 0.3 mm² in MT, 2.8 ± 0.1 mm² in TGF- β 1 and 4.4 ± 0.3 mm² in TGF- β 1 + MT; $p < 0.05$ control versus TGF- β 1 and versus TGF- β 1 + MT).

IDO is constitutively expressed in distal tubules and its expression increases during renal fibrogenesis. Although IDO can be induced by TGF- β 1 in tubule cells, their chemical inhibitor acts as a pro-fibrotic agent, proposing the theory that IDO acts as a regulator of fibrogenic process.

Keywords:Chronic renal disease;Renal fibrosis;Indoleamine 2,3 dioxygenase;Epithelial to mesenchymal transition;Fibroblasts

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica

A doença renal crônica (DRC) é um problema crescente de saúde global. Sua prevalência dobrou na última década, e atualmente cerca de 90.000 pacientes estão sob regime de diálise. É definida pela redução nas taxas de filtração glomerular (TFG), aumento na excreção de albumina urinária ou ambos,

Em 2002, a caracterização da DRC foi proposta pela US National Kidney Foundation sendo definida como dano renal ou TFG inferior a 60mL/min por 1,73m² pelo período superior a 3 meses (National Kidney Foundation., 2002).

Uma análise mais detalhada em 2012 demonstrou a importante relação existente com a albuminúria, sendo incluída como um sinal importante no estabelecimento da DRC (Kdigo et al.,2013). O grau de evolução e estadiamento são mensurados de acordo com a capacidade da TFG e estabelecidos pela *National Kidney Foundation*, apresentando: grau 1 TFG >90; grau 2: TFG entre 60 e 89; grau 3a: TFG entre 45 e 59; grau 3b: TFG entre 30 e 44; grau IV: TFG entre 15 e 29; e grau V, com TFG < 15 (Inkter et al., 2014; Drawz et al., 2015).

Os mecanismos fisiopatológicos associados à DRC produzem efeitos inflamatórios sistêmicos, especialmente devido ao acúmulo das chamadas toxinas urêmicas, além de danos progressivos ao sistema cardiovascular. Este último tornase a principal causa de óbito nos pacientes em estágios mais avançados da DRC (Inkter et al., 2014). Estima-se que entre 50% a 70% dos pacientes com DRC em estágios de 3 a 5 são hipertensos, e seu controle correto e manutenção apresenta dificuldades e constante monitoramento (Levin, 2000), desse modo, um dos fatores agravantes no quadro progressivo da DRC são suas comorbidades associadas, em especial, a

hipertensão, como citado, e a presença de diabetes, que levam à uma maior extensão de danos vasculares e aumento dos estímulos inflamatórios, perpetuando um ciclo de lesões sistêmicas com culminações muitas vezes cardíacas. (Vivekanand et al, . 2015)

1.2 Fibrose renal e mecanismos associados

O processo de fibrose renal pode ser caracterizado pelo acúmulo excessivo de matriz extracelular no glomérulo e no espaço túbulo-intersticial, levando a formação de tecido cicatricial. Formas ativas de fibroblastos intersticiais (miofibroblastos, positivos para alfa-actina de músculo liso) são definidos como as células com maior produção de matriz extracelular no rim fibrótico (Zhou et al, 2015).

As células epiteliais tubulares são as principais constituintes do parênquima renal, sendo altamente vulneráveis em casos de lesão. Tal fato torna importante o melhor entendimento dos mecanismos associados à lesão tubular e ao processo de fibrose renal. Acreditava-se que células tubulares renais eram capazes de realizar a transição epitélio mesenquimal (TEM), mudança fenotípica caracterizada pela progressiva perda dos marcadores epiteliais e ganho de funções e marcadores mesenquimais. (Lovisa et. al., 2015).

No entanto, por meio da inibição de fatores transcricionais chaves da TEM (Snail e Twist) em células epiteliais tubulares, foi demonstrado que processo de transformação fenotípica é crucial para o estabelecimento do quadro fibrótico e acúmulo de miofibroblastos. Além disso tais células passam por mudança fenotípica parcial, apresentando uma condição onde apresentam ambos marcadores epiteliais e

mesenquimais, na qual a migração absoluta de fenótipo é extremamente rara ou, inexistente (Grande et. al. 2015).

1.3 Transição Epitélio Mesenquimal (TEM)

No processo de TEM, a célula epitelial polarizada assume um fenótipo mesenquimal, o que leva ao rompimento das estruturas de perfis epiteliais por meio da destruição da membrana basal, invasividade e produção de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular (Iwaisako et al., 2014; Zeisberg et al., 2003; Kalluri et al., 2009)(Figura 2). As células epiteliais tubulares perdem marcadores epiteliais, aumentando a produção dos marcadores mesenquimais. Estudos demonstraram que as células tubulares renais expressam baixos níveis de alfa-actina de músculo liso (α -SMA), um marcador mesenquimal, fortemente aumentado na presença de TGF- β 1 (Fan et al., 1999; Aihua et al., 2006).

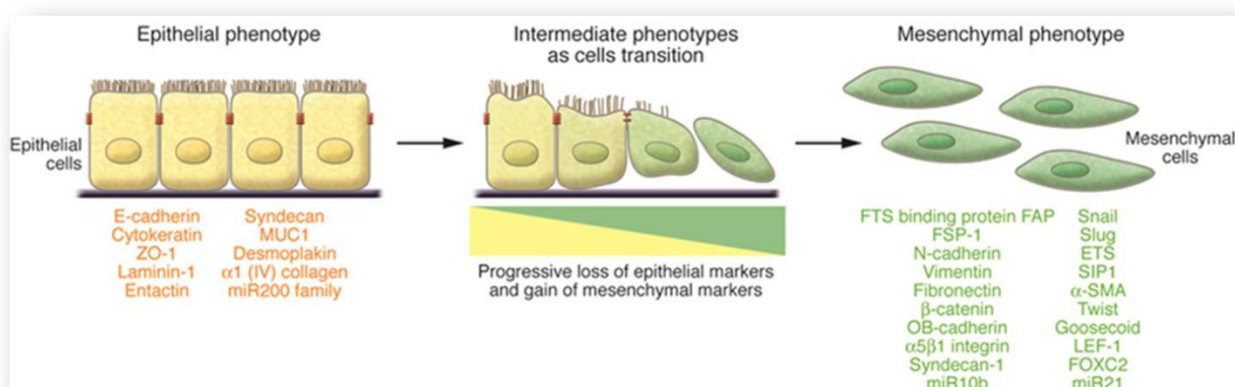


Figura 1 - Demonstração do processo de TEM, com progressiva perda de macadores epitliais e ganho de marcadores mesenquimais - extraído de Kalluri et al, 2009

O estabelecimento do processo de TEM é um importante mecanismo para a progressão da DRC. Ao adquirir fenótipo predominantemente mesenquimal, as células perdem suas funções fisiológicas convencionais, adquirindo resistência a estímulos apoptóticos. O seu bloqueio com o fator de crescimento de hepatócitos impede a fibrose intersticial renal (Junwei et al., 2002).

1.4 TGF- β

O TGF- β é o principal constituinte de uma extensa família de moléculas pleiotrópicas, capazes de desenvolver um importante papel no reparo tecidual e desenvolvimento das respostas celulares (Roberts et al, 1990; Moses et al., 1996; Massague et al.,1990). Disfunções em seu mecanismo de sinalização estão relacionadas ao surgimento de várias desordens metabólicas e inúmeras doenças, incluindo câncer, respostas autoimunes e fibrose tecidual. É sintetizado sob a forma de precursores biologicamente inativos, que são posteriormente clivados para se transformar em sua forma madura ativa, sendo regulados por um sistema de controle altamente preciso e multinívelar (Rifkin et al., 2005).

Diversas evidências sugerem que o TGF- β constitui o maior regulador nos processos inflamatórios e de fibrose. Estudos prévios demonstraram que o TGF- β é capaz de estimular a migração de granulócitos teciduais quando injetado subcutâneamente em camundongos recém nascidos, estimulando a síntese de colágeno pelos fibroblastos (Roberts et al., 1986). Por outro lado, a sua inibição por antissoro anti-TGF- β neutralizador reverte o processo (Border et al., 1990; Giri et al., 1993).

Numerosos estudos demonstraram o papel protetor da inibição do TGF- β na doença renal crônica, atenuando anormalidades funcionais (Border et al., 1990; Border et al 1992; Grygielko et al., 2005). Camundongos knockout para o transdutor de sinal Smad III não apresentaram fibrose renal induzida por obstrução uretérica unilateral. Em contrapartida, camundongos transgênicos para TGF- β 1 apresentaram apoptose de células glomerulares e ativação de células mesangiais com deposição de matriz extracelular (Border et al., 1990; Giri et al., 1993). Confirmando o paradigma de que o TGF- β constitui o mediador central para a progressão da doença renal crônica.

A TEM consiste numa manifestação extrema da plasticidade epitelial, cuja polarização e estruturamento em camadas organizadas são convertidas em fibroblastos móveis (Thiery., 2003). Em células epiteliais não malignas de origem renal, pulmonar ou hepática, as manifestações da TEM podem ser acionadas facilmente por diversos modelos de estresse ou lesão *in vitro* (Kalluri et al., 2003). A ação do TGF- β é suficiente para induzir a TEM em células de fenótipo epitelial e é considerada um fator chave na sua promoção em tumores invasivos e metastáticos *in vivo* (Zawaldil et al., 2005) Iwano e colaboradores demonstraram evidências *in vivo* da TEM renal em modelo de fibrose túbulointersticial induzida pela obstrução de ureter unilateral (OUU) (Iwano et al., 2002).

1.5 Indoleamina, 2-3 dioxigenase (IDO)

Desde que Munn et al. descreveram o papel da IDO durante a gravidez, fornecendo proteção aos embriões contra o sistema imune materno, esta têm sido apontada como uma molécula com propriedades imunomoduladoras (Munn et al., 1998).

O mecanismo de ação imunomoduladora da IDO tem início com sua ação sobre o triptofano, aminoácido essencial e requerido para o funcionamento de diversos processos metabólicos e comunicação de linfócitos T.

Linfócitos são células com uma proporção pequena de citoplasma em relação ao núcleo celular, sendo mais dependentes do estoque de triptofano intersticial do que outras células, sendo assim, com a diminuição do estoque de aminoácido, os linfócitos são levados à apoptose e também anergia.

Adicionalmente, o triptofano catabolizado pela IDO é convertido em uma série de moléculas também com capacidades imunomoduladora e supressoras, dentre estes, as moléculas denominadas quinureninas que parecem desempenhar um papel especial, atuando em conjunto com a debilidade criada pela depressão de triptofano em linfócitos T gerada pela enzima (IDO), são capazes também de provocar a apoptose dessas células, tornando-se um fator imunossupressor adicional(Mellor et al., 1999; Munn et al., 1999).

Durante uma resposta inflamatória, a IDO cataboliza e limita o estoque local de triptofano, levando a um aumento de quinureninas, produtos resultantes da quebra do triptofano pela ação da IDO, que atuam como agentes imunossupressores locais (Terness et al., 2002). Devido às propriedades imunomoduladoras já evidenciadas, a IDO tem sido fortemente associada aos mecanismos inflamatórios de diversas condições renais.

Sua presença está intimamente relacionada a sobrevida em transplantados renais (Holmes et al 1992; Brandacher et al.,2006), que sugere um efeito protetor para as células tubulares (Haspot., 2005; Ge.,2010). Curiosamente, a IDO foi encontrada

em outros tipos de doenças renais. Em um modelo de nefrite de soro nefrotóxico, sua expressão foi encontrada em células glomerulares e tubulares, e a inibição utilizando 1-metil-triptofano (1-MT) intensificou a lesão renal (How., 2009). Da mesma forma, a indução de sua expressão em células tubulares foi associada com um aumento de apoptose em modelo de lesão por isquemia e reperfusão renal (Mohib et al., 2008). Além disso, a expressão da IDO foi também se encontra aumentada em modelos de nefropatia diabética (Baban et al., 2013), sendo sua elevação correlacionada com a perda de TFG em pacientes com DRC (Scheffold et al., 2009). Levando, em conta as considerações obtidas de tais estudos, não há no momento uma definição clara do papel da IDO no estabelecimento ou progressão das doenças renais.

Foram estabelecidos dois principais eixos de estímulo e ação da IDO, a partir de seus principais indutores, o primeiro, o ciclo do IFN- γ (Figura 2a), que promove o aumento e ativação da enzima através do acionamento da via JAK/STAT, promovendo sua ação na depleção de triptofano e produção de catabólitos, como as quinureninas, produzindo uma ação antiproliferativa e apoptótica aos linfócitos T.

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que têm sido associada a vários distúrbios mediados por TGF- β 1, atuando como um importante mediador ou marcador eficiente. A IDO é induzida por TGF- β 1(Figura 2b) em alguns tipos celulares, formando um mecanismo conhecido como eixo de TGF- β -ido em células dendríticas (Pallotta et al., 2011).

O TGF- β 1 aciona a via PI(K)3, por meio de Smad-independentes, com o objetivo de induzir a fosforilação da IDO. A expressão de SHP-1 e SHP-2 (SHP) dá-se seletivamente por vias Smad e PI (K) 3-dependentes. Em tal processo, a IDO recruta

SHP-1 e SHP-2, ativando a via do NF-Kb, promovendo fosforilação de quinase IKKa e translocação nuclear da p52-RelB para os genes alvo (a inibição de IRAK1 pode ser necessária). A ativação da via do NF-kB, por sua vez, promove ativação dos genes que codificam IDO, TGF- β , IFN- γ -IFN- γ . O TGF- β produzido por pDCs, induz células Treg Foxp3⁺ em células T CD4⁺ imaturas, que podem iniciar, manter, 'infectar' e amplificar a força imunorreguladora para tolerância imune a longo prazo (Chen et al., 2011).

Recentemente, foi demonstrado que a IDO é capaz de modular a TEM induzida por TGF- β 1 em células tumorais de bexiga, contribuindo no processo metastático, de modo que sua inibição química com 1-metil-triptofano (1-MT) intensifica os marcadores para TEM, levando as células a adquirirem fenótipo predominantemente mesenquimal (Brito et al., 2015).

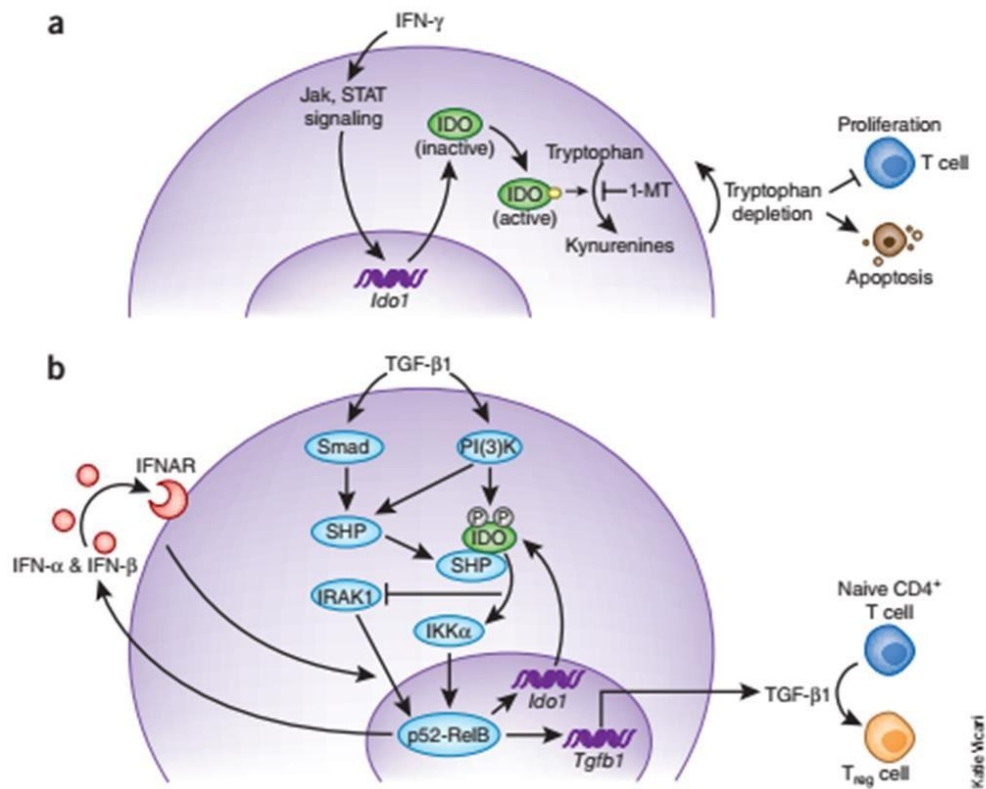


Figura 2 - Principais vias de ativação da IDO, mediadas por IFN- γ (a) e mediadas por TGF β -1

2. OBJETIVO

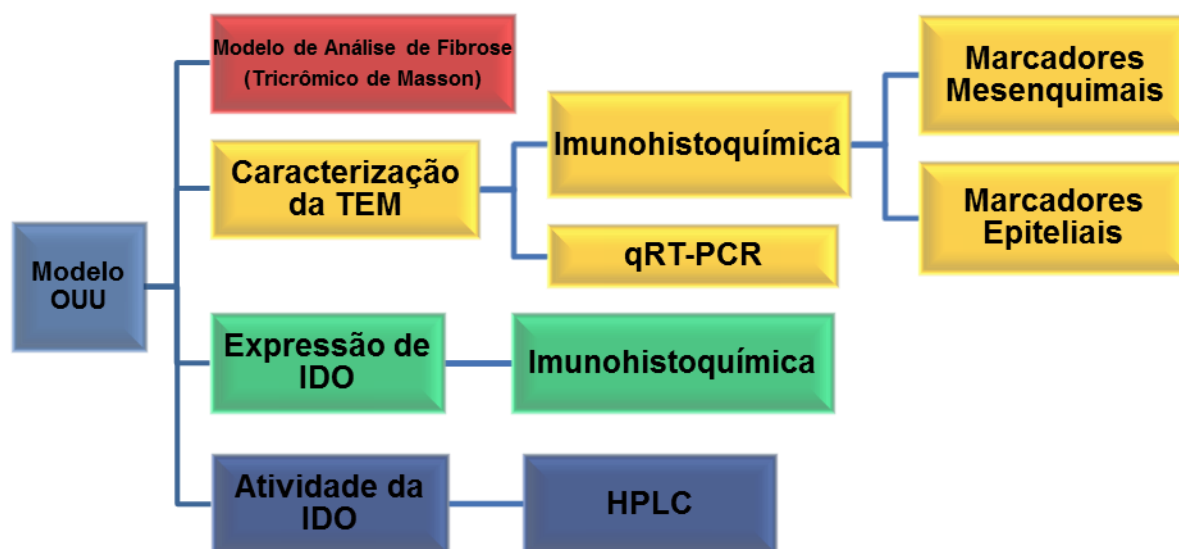
- Analisar a expressão e atividade da IDO em um modelo animal de fibrose renal caracterizado pela TEM.
- Analisar o efeito de 1-metil-triptofano (inibidor da IDO) na TEM induzida por TGF- β 1- usando cultura de células renais tubulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar machos (aproximadamente 280 g de peso) foram obtidos a partir de uma colônia estabelecida na Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas normais e mantidos numa sala com 22 ° C a 12 h ciclo de luz / escuro, e permitido o acesso *ad libitum* à comida e água antes e depois de UUU. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de cuidados com animais e da experimentação e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil (protocolo AN1/2013).

3.1.1 Desenho do estudo – *in vivo*



3.1.2 Modelo OUU e design experimental

Os Animais foram cuidadosamente anestesiados com Cetamina 100 mg/kg (cetamina-S, São Paulo, Brasil) e Xilazina 10 mg/kg (Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha) por via

intraperitoneal. O modelo OUU foi realizado como descrito por Vieira et al, com pequenas modificações (Vieira et al., 2005).

Após a verificação e constatação do estabelecimento da condição anestésica do animal, foi realizada a tricotomia e, após a mesma, o rim e ureter esquerdos foram expostos através de uma pequena incisão abdominal e o ureter foi ligado utilizando um fio 4-0. Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram adequadamente hidratados com solução salina fisiológica e a temperatura do corpo foi mantida a aproximadamente 37°C, utilizando uma almofada de aquecimento regulável. Finalmente, a incisão na pele foi fechada em camadas com suturas simples. Nenhum dos animais desenvolveu sinais de infecções sistêmicas ou locais. Dez ratos foram divididos em dois grupos: SHAM, ratos submetidos à cirurgia, mas sem obstrução ureteral, e OUU, ratos submetidos à cirurgia com obstrução do ureter esquerdo. Os rins direitos colaterais (CL) dos ratos OUU também foram usados como controle.

Os grupos foram acompanhados durante sete dias. Os rins foram recolhidos e uma metade de cada foi fixada em solução Dubosq-Brasil durante 45 minutos e, em seguida, pós-fixadas em solução de formaldeído tamponada a 10%. Duas secções divididas em raio coronal foram embebidas em parafina para análise histológica e imunohistoquímica. A outra metade foi armazenada a -80 ° C para ensaios de qPCR

3.2 Histologia renal

Secções de rim embebidas em parafina com três micrômetros de espessura foram montadas em lâminas e submetidos à coloração com tricrômio de Masson. Características histopatológicas foram determinadas e calculadas utilizando o software Imagem-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, EUA), permitindo a análise automatizada de todas as alterações morfológicas. As medições foram realizadas no compartimento túbulo-intersticial. A percentagem de coloração do tricrômio de Masson foi calculada relativa a toda a área de campo. Todas as análises morfológicas foram realizadas de forma cega sob aumento de 200x de microscopia.

3.2.1 Imunohistoquímica

As secções de tecido renal parafinizadas foram cortadas com uma espessura de 4 µm e fixadas a lâminas de vidro para histologia. As lâminas foram mantidas por 30 minutos dentro de estufa à temperatura de 60°C e submetidas ao processo de desparafinização e reidratação.

Para a remoção da parafina e reidratação do tecido, as lâminas passaram por baterias constituídas por banhos em 3 fases de xilol, por 9 minutos cada, seguidas de 2 banhos em álcool absoluto, e 2 banhos em álcool 96% por 5 e 3 minutos, respectivamente.

Após a remoção do álcool através de um banho em água destilada por 5 minutos, os tecidos foram submetidos à irradiação com micro-ondas, por 15 minutos,

em tampão de citrato, para aumentar a recuperação antigênica e mantidos em temperatura ambiente, por 20 minutos para esfriarem.

A seguir, os cortes foram mergulhados em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena, composto por metanol e Peróxido de hidrogênio (concentração final de 3%) protegidos da luz, por 30 minutos e após lavagem em PBS, tiveram os cortes isolados com o uso de PAP Pen, e submetidas à bloqueios endógenos de avidina e biotina, por 15 minutos cada, com lavagens em PBS entre as etapas.

Para aumentar o bloqueio de ligações inespecíficas, as amostras foram submetidas a um último bloqueio composto por 6% de leite reidratado (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Os seguintes Anticorpos foram utilizados como anticorpos primários: CD68 anti-rato (MCA341R, serotec, Oxford, Reino Unido), anti-E-caderina (Ecad, IS059; Dako, Dinamarca), anti- α -actina de músculo liso (α SMA; IS700; Dako Co, Dinamarca), anti-vimentina (M0725; Dako Co, Dinamarca), anti-ido (MAB5412; Merck Millipore, Billerica, MA) e anti-TGF β -1(T0438; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri; Estados Unidos) (Tabela 1). Todos os anticorpos foram diluídos 1:100. Para completar o sanduíche, as secções foram incubadas com reagentes LSAB + System-HRP (K0690; Dako Co, Dinamarca). Finalmente, o substrato-cromógeno DAB foi usado para completar a reação (K346811; Dako Co, Dinamarca).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados em marcações imunes e seus subtipos

Tipo de Anticorpos			
Epitelial	Mesenquimais	Célula-alvo	Proteína-específicos
E-caderina	α -SMA	CD-68	IDO
	Vimentina		TGF- β 1

A análise quantitativa das células intersticiais positivas para cd68, α SMA e vimentina foram conduzidas de forma cega, sob ampliação microscópica x200. As células tubulares positivas e negativas para α SMA e vimentina foram contadas sob ampliação microscópica x200 e os resultados são expressos com o percentual de células positivas. Para analisar a E-caderina e a expressão de IDO, os túbulos positivos e negativos foram contadas para apresentarem uma percentagem de túbulos positivos em relação ao número total de túbulos.

3.3 PCR em Tempo Real

O RNA total foi extraído a partir de tecido de rim (a 4 ° C, utilizando um homogeneizador de tecidos) por tiocianato de guanidina-clorofórmio (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e isolado de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade e pureza de RNA foi medida usando o espectrofotômetro NanoDrop 200 0C (Thermocientífica, Wilmington, EUA). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1 μ l de RNA total de acordo com o protocolo de Transcriptase Reversa M-MLV (Promega, Madison, EUA). A análise da expressão de RNAm foi realizada através de RT-qPCR foi realizada utilizando os protocolos convencionais. O seguinte perfil de ciclo de RTPCR foi utilizado: 10 min a 95 ° C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 ° C para desnaturação, 20 segundos a 60 ° C para o anelamento, e 10 seg a 72 ° C para extensão .

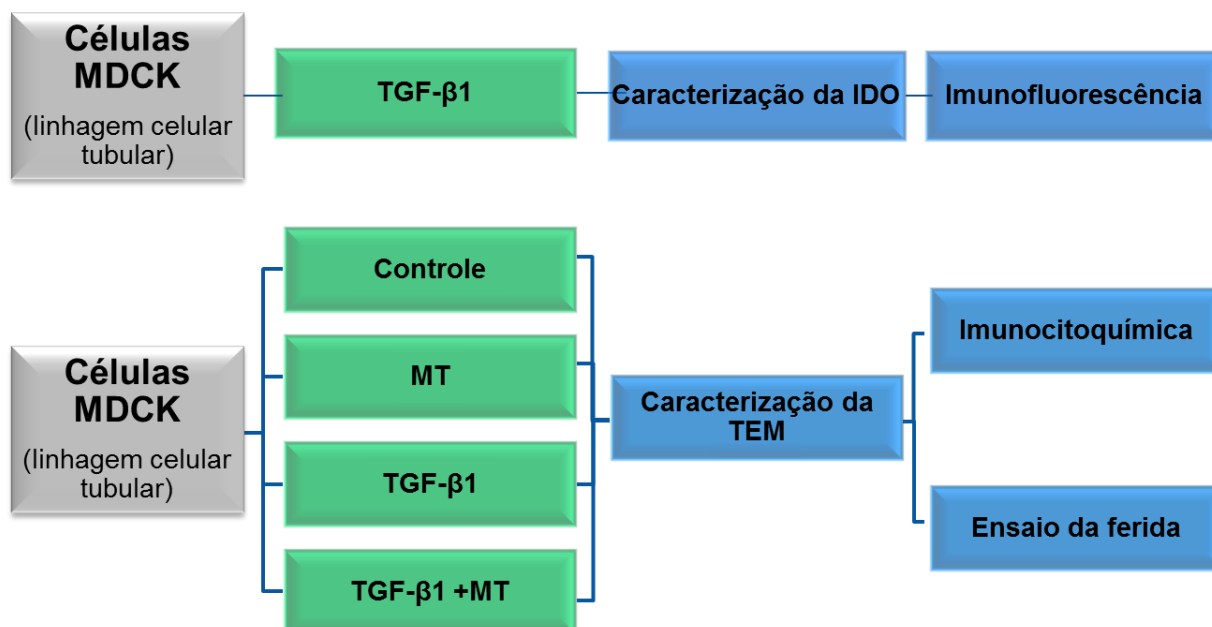
PCR em tempo real foi realizado utilizando os padrões comerciais (Invitrogen, Carlsbad, USA) para β -actina (forward 5'-AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC-3' e reverse 5'-GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT-3', número de acesso NM 031.144,2) como housekeeping e TGF- β 1 (forward 5' - CAACCCGGGTGCTTCCGCAT - 3' e reverse 5' - TGCTCCACCTTGGGCTTGCG -3', número de acesso NM 021.578,2) como gene alvo.

3.4 Atividade da IDO

A atividade da IDO renal foi verificada através da análise de quinureninas no tecido renal produzida após a ação da IDO sobre o triptofano no tecido. No método utilizado, o tecido renal foi homogeneizado em tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) utilizando um homogeneizador de mão (D 130, Wigger Hauser, Berlim, Alemanha) e em seguida, o homogenizado foi centrifugado a 4° C (5 min, 12.000 g). Em paralelo, uma curva padrão foi construída com as seguintes concentrações: 0,5 μ M, 1,0 μ M, 2,0 μ M, 4,0 μ M, 8,0 μ M, e 16,0 μ M. O sobrenadante (ou padrão) (100 μ L) foi misturado com 100 μ l de tampão de digestão (fosfato de potássio 500 mM, 20-ácido ascórbico-mM, 200 ug / ml de catalase, azul de metileno 10 nM, 400 μ M de L-triptofano). A mistura foi incubada a 37 ° C durante 60 min, e em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético a 30% (5:1,v/v), seguido de incubação a 65 ° C durante 15min. As amostras foram centrifugadas a 11.500 g durante 15 min, e os sobrenadantes (100 μ L) foram adicionados a 4-(dimetilamino) benzaldeído (2% em ácido acético), e lido por espectrometria a 480 nm.

3.5 Estudos *in vitro*

3.5.1 Desenho do estudo – *in vitro*



3.5.2 Cultura celular MDCK

As células MDCK (Madin-Darby de rim canino, NBL2; American Type Culture Collection- ATCC, Manassas, VA, EUA), são células tubulares renais distais com um fenótipo epitelial e heterogêneo, constituindo-se como uma população representativa para os diversos tipos de morfologias túbulo-renais, foram adquiridas e cultivadas em meio de Dulbecco Eagle modificado (DMEM; Vitrocell, Campinas, Brasil) suplementado com soro de fetal bovino a 10% (SFB) e penicilinaestreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e mantidas a 37 ° C com 5% de CO₂.

Para analisar o efeito de TGF- β 1 sobre a expressão de IDO, as células MDCK foram mantidas em garrafas com tampas com filtro e mantidas em cultivo para a normalização e estabilização do ciclo celular pós-descongelamento.

Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, o meio de cultura foi removido e foram lavadas com PBS para a remoção de células mortas. Após 5 minutos de incubação com tripsina (0,25%), a monocamada de células foi separada e solta do fundo da garrafa e a ação da tripsina neutralizada pela adição de meio de cultura suplementado com SFB a 10%.

O conteúdo foi aspirado e depositado em um tubo falcon para centrifugação (5 minutos, 1200 rpm) para a remoção dos resíduos de tripsina e finalmente, foram resuspensas, homogenizadas em meio DMEM completo e contadas em câmara de Neubauer.

As células foram então semeadas em placas de 24 -wells (3×10^4 células por poço) e mantidas em meio completo por 24 horas para estabilizarem-se e aderirem novamente. A seguir, foram divididas em 2 grupos, células controle (mantidas normalmente, com meio DMEM, SFB a 1%, sem estímulos adicionais), e células incubadas com 1 ng/ml de TGF- β 1 (Brito et al., 2015) (R & amp; D Systems Inc., Minneapolis, MN) em DMEM 1% SFB durante 48h. Para promover a inibiçãoIDO, utilizou-se DMEM contendo 1 mM de 1- metil-D-triptofano (1MT; cat 452483, SigmaAldrich, St. Louis, MO) e adicionado à metade dos poços de cada um dos grupos formados anteriormente, constituindo assim, 4 condições únicas, células controle, células estimuladas TGF- β 1, estimuladas com 1MT e finalmente, estimuladas com TGF- β 1 e 1MT. Todas os grupos experimentais foram realizadas em triplicata.

3.6 Imunofluorescência e imunocitoquímica

A IDO foi analisada por imunofluorescência. Células MDCK foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS durante 15 minutos a 37°C e em seguida, mantido em PBS contendo 0,5% de albumina de soro bovino e 0,1% de Triton X-100. Foi utilizado o anticorpo primário, monoclonal de rato conjugado com PE anti-IDO (01:25; Clone # 700838, R & D Systems Inc., Minneapolis, MN), e incubado durante 2 h a 37°C. A marcação por fluorescência foi detectada utilizando o aparelho Zoe™ Fluorescente Cell Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Imunocitoquímica foi realizada para analisar a expressão de α SMA em células MDCK. As células foram suavemente lavadas utilizando PBS, e, em seguida, fixadas durante 10 minutos em uma solução de paraformaldeído 4% em PBS. Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi preparada uma solução 3% de H₂O₂ (em metanol) e as células incubadas durante 30 min, cobertas da luz. As células foram incubadas com anti- α SMA (IS700; Dako Co, Dinamarca) a 4°C durante 12 horas (Tabela 1). Para completar a sandwich, as células foram incubadas com os reagentes LSAB + System-HRP, por 30 minutos em cada fase, intercaladas por um banho em PBS, por 5 minutos para remoção dos componentes não ligados à fase anterior (Dako; K0690 Co, Dinamarca). Finalmente, foi utilizado o substrato cromógeno DAB, diluído em tampão específico, fornecido pelo fabricante, por 20 minutos, protegidos da luz, para completar a reação (K346811; Dako Co, Dinamarca). As células foram então, contracordadas com Hematoxilina (Dako; CS700 Co, Dinamarca), por 5 minutos, para a evidência dos núcleos celulares, desse modo, facilitando a visualização e evidência celular.

3.7 Medição de quinureninas

Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi realizada para medir a quinurenina nos sobrenadantes de células MDCK estimuladas por TGF- β -1 e de as células MDCK não estimuladas (controle).

Os sobrenadantes foram desproteinizados por centrifugação a 5000 g (15 min a 4 ° C) com ácido tricloroacético a 10% (1:1, v/v), filtrada em filtro Millipore de 0,25 μ m e 20 μ l foram injetados no instrumento de HPLC equipado com um detector de UV (YL - 9 3 00; YL, Anyang, Coréia). Os dados foram obtidos utilizando uma coluna de fase reversa (LUNA RP-18, 25 cm x 4,5 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA), à temperatura ambiente. A separação foi feita na seguinte fase: tampão de acetato de sódio 10 mM em água MilliQ (A) e acetonitrilo (B): 0-1 min (20%B); 1,01-1,5 min (5%B); 1,51-8 min (4%B). A taxa de fluxo foi mantida constante a 1 mL / min e os picos foram detectados a 254 nm. Todos os produtos químicos utilizados na análise, tais como acetonitrilo e tampão de acetato, eram próprios para uso em HPLC e foram adquiridos pelas empresas Sigma e Merck.

Uma curva padrão de quinurenina foi construída (2,0 μ M, 4,0 μ M, 8,0 μ M e 16,0 μ M). As medições foram efetuadas em triplicata e a quinurenina foi detectada por UV a 254 nm. A linearidade foi observada no intervalo de concentração de 0,5 a 100 μ M de quinurenina e as amostras foram quantificadas de acordo com as curvas padrão de calibração, em que Y é o pico de tensão (mV) e x a concentração em μ M ($Y = 1,1x - 0,0468$ $R^2 = 0,998$) e tempos de retenção de 2,1.

3.8 Ensaio da ferida

As células MDCK, dispostas em grupos com diferentes condições, conforme descritas anteriormente, foram cultivadas em placas de 24 poços (3×10^4 por poço) e cultivadas até atingirem 80% de confluência (aproximadamente 24 h). Um risco por poço foi realizado utilizando uma ponteira de pipeta de 10 μ L.

Para observar o processo de migração e recuperação da lesão na monocamada celular, quatro imagens por poço foram capturadas com a ampliação de 40X de um microscópio invertido (Ti-S; Nikon Corp., Tóquio, Japão).

Depois de doze horas, imagens adicionais das mesmas áreas foram adquiridas. Cada área de ferida foi calculada utilizando o programa ImageProPlus 6.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD).

3.9. Análise estatística

Todos os resultados estão representados pela média \pm erro padrão. Para a comparação entre os diferentes grupos, foi utilizado o teste ANOVA One-way com pós-teste de Tukey quando tratou-se de mais de 2 grupos ou t-Student não pareado para análises com apenas 2 grupos. A significância estatística será considerada a partir do $p < 0,05$.

4.1 Morfologia renal e macrófagos

Após sete dias do procedimento de oclusão de ureter, a análise por tricrômio de Masson revelou que os rins obstruídos apresentaram dilatação tubular, acompanhada de atrofia, com um aumento significativo do volume intersticial preenchido por colágeno e infiltrados celulares.

Glomérulos e vasos mantiveram sua estrutura preservada e não foram observadas mudanças significativas nos rins contralaterais. As análises quantitativas mostraram aumento considerável da área intersticial dos rins obstruídos em comparação aos tecidos SHAM e CL ($13,4\% \pm 2,6\%$ em OUU contra $0,3\% \pm 0,1\%$ em SHAM e $0,9\% \pm 0,1\%$ em CL; $p < 0.0001$) (Figura 3).

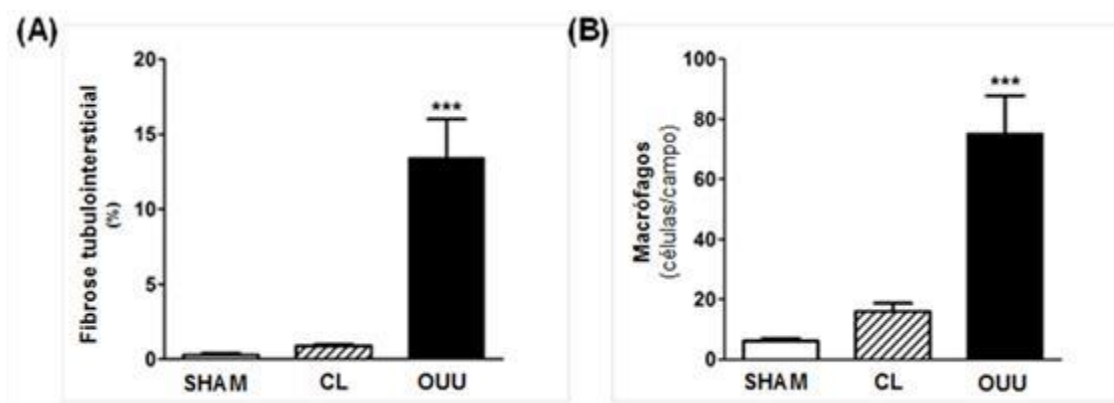


Figura 3. Análise comparativa da porcentagem de fibrose tubulointersticial (A) e macrófagos intersticiais (B) entre rins SHAM, CL obstruídos (n = 5). A fibrose e o número de macrófagos foram significativamente maiores nos rins obstruídos. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,0001$ contra SHAM e CL.**

Análise imunohistoquímica mostrou que o número médio de macrófagos foi significativamente maior no rim obstruído quando comparado aos rins SHAM e CL ($75,2 \pm 12,6$ células/campo em OUU contra $6,2 \pm 0,8$ células/campo em SHAM e $16,0 \pm 2,7$ células/campo em CL, $p < 0.0001$) (Figura 4). Mais detalhadamente, o infiltrado glomerular foi predominante sobre a região do interstício.

CL

OUU

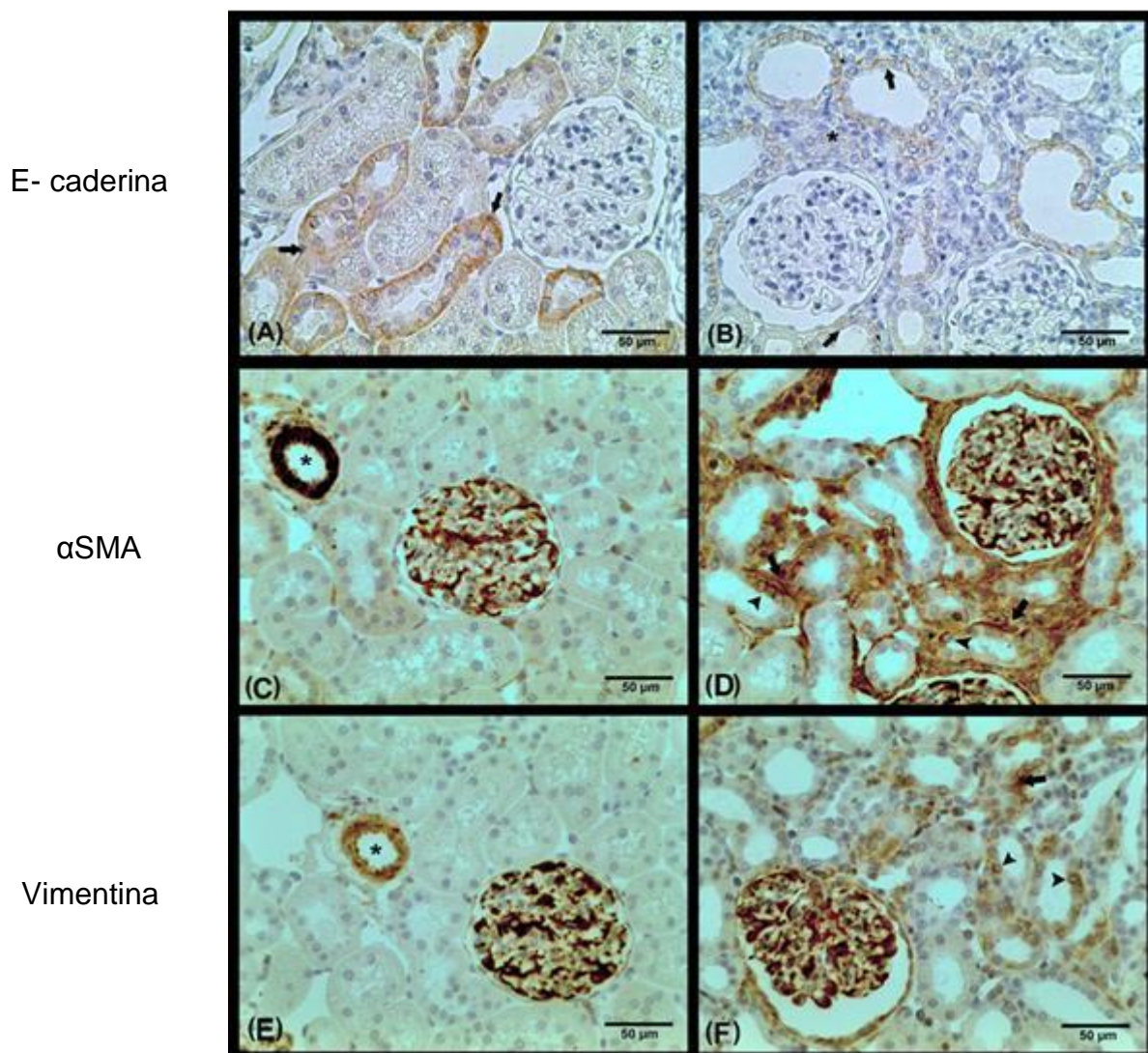


Figura 4. Imagens representativas de imuno-histoquímica para E-caderina (A e B), α SMA (C e D), e vimentina (E e F). A presença e marcação de E-caderina foi notável nos túbulos dos rins CL (A), enquanto que foi significativamente reduzida nos rins obstruídos (B). As setas em A e B indicam a marcação de E-caderina nos túbulos, e o asterisco indica as células intersticiais. A imunohistoquímica para α SMA revelou que em rins CL (C), a marcação para α SMA foi encontrada constitutivamente em vasos (asterisco) e dentro de glomérulos (células mesangiais). Em rins obstruídos (D), a marcação de α SMA encontra-se forte no interstício (seta) e nos túbulos (seta). Semelhante a α SMA, a marcação de vimentina foi encontrada nos vasos e nos glomérulos dos rins CL (E), enquanto rins obstruídos (F) também foi apresentada positividade para vimentina em células intersticiais (seta) e nos túbulos (ponta de seta).

4.2 TEM em OUU

A fim de caracterizar a TEM, foi realizada imunohistoquímica para, E-cad, α SMA e vimentina foi realizada. Enquanto E-cad, um marcador epitelial, foi expressa constitutivamente nos túbulos dos rins SHAM e CL, foi drasticamente reduzida nos rins obstruídos, especialmente em áreas que apresentavam aumento no volume intersticial (Tabela 2, Figura 5). Em contraste, a marcação para α SMA moderada e vimentina, dois marcadores mesenquimais, foi encontrada em células tubulares dos rins SHAM e CL, com uma expressão significativa encontrada em células tubulares dos rins obstruídos (Tabela 2, Figura 5). Ao mesmo tempo, células intersticiais α SMA⁺ e vimentina⁺ raramente foram encontradas em rins SHAM e CL, mas um grande número de células com tais características foram encontradas em rins obstruídos (Tabela 2, Figura 5). Rins CL expressam constitutivamente α -SMA nas células musculares lisas das arteríolas, sendo assim, seu padrão de expressão normal não foi influenciada pela obstrução ureteral.

Tabela 2 marcação imunohistoquímica para E-caderina, α SMA, e vimentina no túbulo renal e interstício de OUU de 7 dias. Os dados são expressos como a média \pm SEM. † $p < 0,001$ contra SHAM e CL; ‡ $p < 0,0001$ contra SHAM e CL.

		SHAM	CL	O UU
E-caderina	Tubular <i>% tubulos positivos</i>	20.8 \pm 5.4	21.1 \pm 11.6	2.7 \pm 1.1
	Tubular <i>% células positivas</i>	27.2 \pm 6.5	35.8 \pm 0.9	61.4 \pm 4.2 † ($p < 0,001$)
αSMA	Intersticial <i>Células positivas/campo</i>	17.7 \pm 7.1	74.5 \pm 23.5	368.8 \pm 45.8 ‡ ($p < 0,0001$)
	Tubular <i>% células positivas</i>	2.0 \pm 0.5	2.5 \pm 0.5	33.8 \pm 2.7 ‡ ($p < 0,0001$)
Vimentina	Intersticial <i>Células positivas/campo</i>	13.0 \pm 0.9	17.0 \pm 1.2	141.3 \pm 8.8 ‡ ($p < 0,0001$)

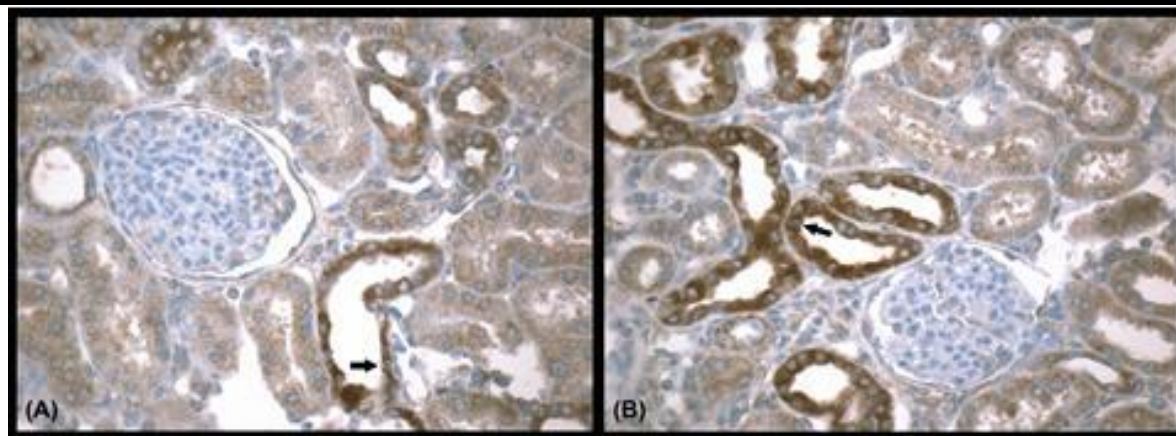


Figura 5. Imunohistoquímica para o TGF- β 1 em rim CL (A) e rim obstruído (B). A positividade da marcação para TGF- β 1 foi encontrada predominantemente nos túbulos distais (seta), sendo mais abundante e presente nos rins obstruídos.

4.3 Expressão de TGF- β 1 em modelo de OUU

Para verificação adicional dos mecanismos envolvidos na patogênese do processo de fibrose renal, medimos a expressão de TGF- β 1 em tecido renal por PCR em tempo real. Como mostrado na Figura 6, a OUU promoveu um aumento significativo na expressão dos níveis de TGF- β do que nos rins SHAM (expressão relativa de $14,7 \pm 0,1$ em OUU contra $1,0 \pm 2,2$ no SHAM; $p < 0,0001$). Curiosamente, os rins CL expressaram maior expressão de TGF- β 1 em comparação com rins SHAM (expressão relativa de $6,8 \pm 0,3$ em rins CL contra $1,0 \pm 2,2$, em SHAM, $p < 0,05$). Estes dados confirmaram a associação entre a formação de fibrose e a expressão de TGF- β 1 neste modelo

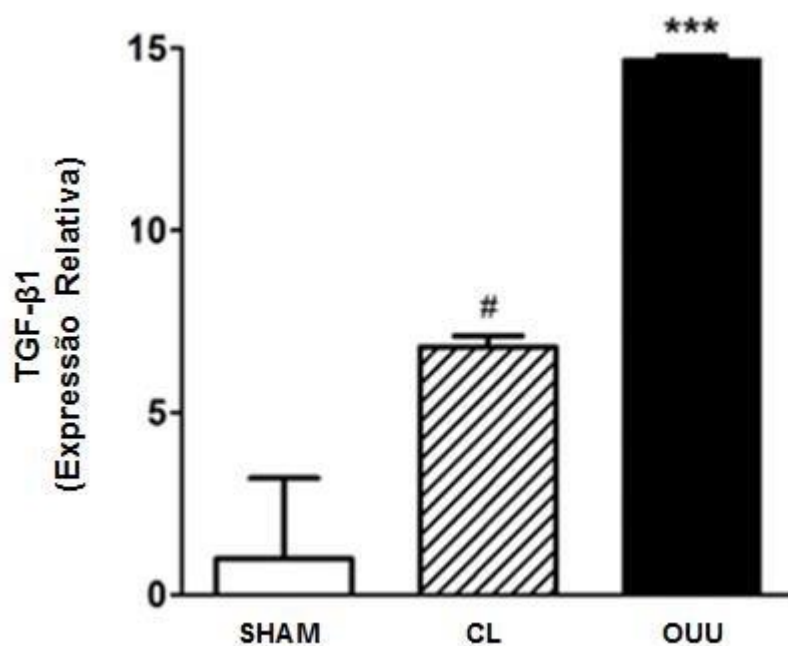


Figura 6. Expressão relativa de TGF- β 1 em tecido renal em OUU de 7 dias analisados por PCR em tempo real. # $P < 0,05$ versus SHAM; *** $p < 0,0001$ contra SHAM e CL.

4.4 Imunohistoquímica para IDO no tecido renal

Conforme ilustrado na Figura 7, rins CL apresentaram marcação positiva para IDO em alguns túbulos do córtex e da medula (semelhantes ao SHAM). Em rins OUU, a positividade para IDO foi significativamente maior em ambas as áreas (Figura 5). A análise quantitativa mostrou que a percentagem de túbulos corticais IDO⁺ foi significativamente maior nos rins OUU que em rins SHAM e CL ($19,9 \pm 3,6\%$ em OUU contra $5,0 \pm 3,4\%$ em SHAM e de $10,8 \pm 1,6\%$ em CL, $p < 0,05$), com um efeito semelhante encontrado na medula renal ($16,9 \pm 5,2\%$ em UUU contra $3,3 \pm 1,5\%$ em SHAM e de $1,5 \pm 0,3\%$ em CL, $p < 0,05$) (Figura 7).

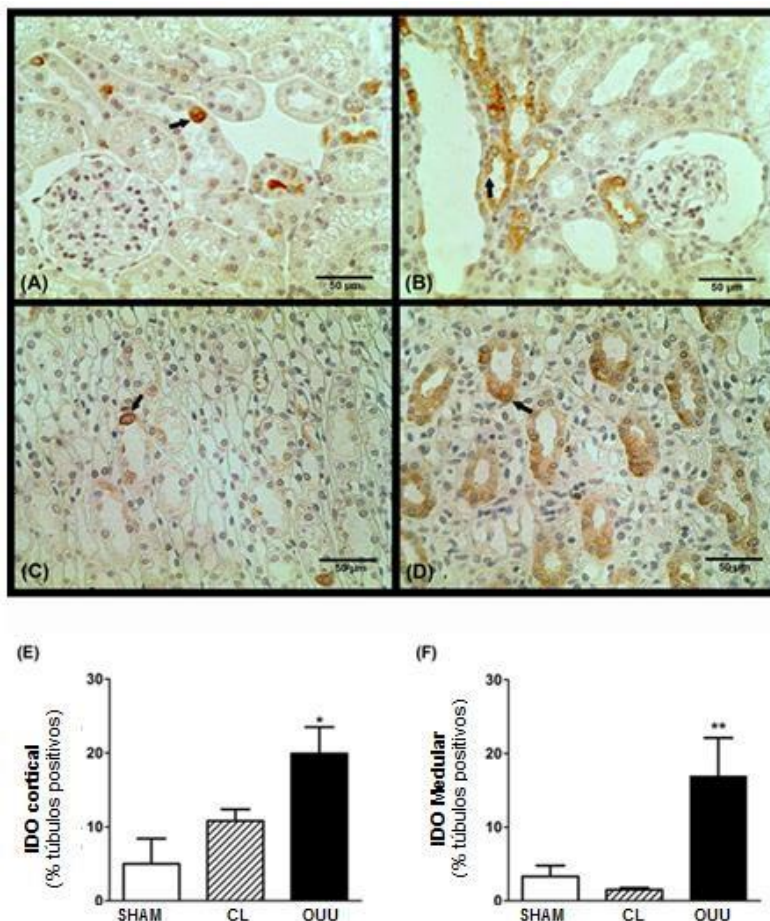


Figura 7. Imunohistoquímica para IDO no córtex renal (A e B) e medula renal (C e D) do rim CL (A e C) e do rim obstruído (B e D). marcação positiva de IDO foi encontrado nas células tubulares (seta). Positividade de IDO foi significativamente maior em rins OUU em ambos córtex (E) e medula (F) (n = 5). ** P < 0,01 versus SHAM e CL.

4.5 Atividade da IDO no modelo UUU

A fim de analisar a atividade enzimática da IDO no tecido renal, medimos as quinureninas produzidas, resultantes da catabolização de triptofano pela IDO renal. A atividade da IDO foi significativamente maior nos rins OUU em comparação com rins SHAM e CL ($7,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ em OUU contra $5,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ em SHAM e de $6,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ em CL, $p < 0,05$) (Figura 8).

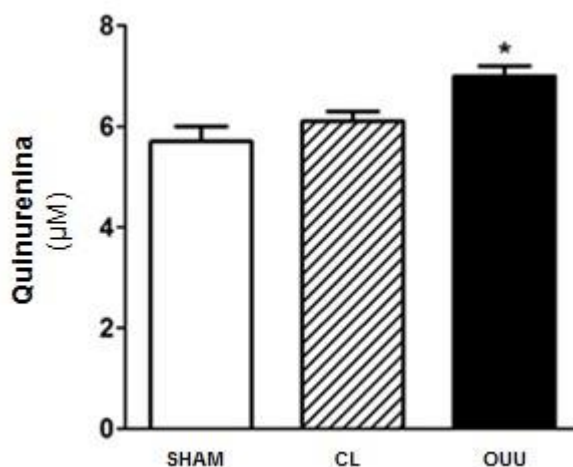


Figura 8. Atividade da IDO em tecido renal analisada por quantificação de quinureninas ($n = 5$). A atividade da IDO foi significativamente maior no OUU. * $P < 0,05$ vs. SHAM e CL

4.6 Efeito de TGF- β 1 sobre a expressão em células MDCK IDO

Como demonstrado na Figura 9, o TGF- β 1 aumentou a marcação por imunofluorescência para IDO em células MDCK, após 48 horas ($1,6 \pm 0,1$ unidades no controle contra $3,1 \pm 0,3$ unidades em células estimuladas por TGF- β 1; $p < 0,05$). Embora a quinurenina tenha aumentado no sobrenadante das células estimuladas com TGF- β 1, tal aumento não apresentou relevância estatística ($7,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ no controle contra $9,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ em células estimuladas por TGF- β 1).

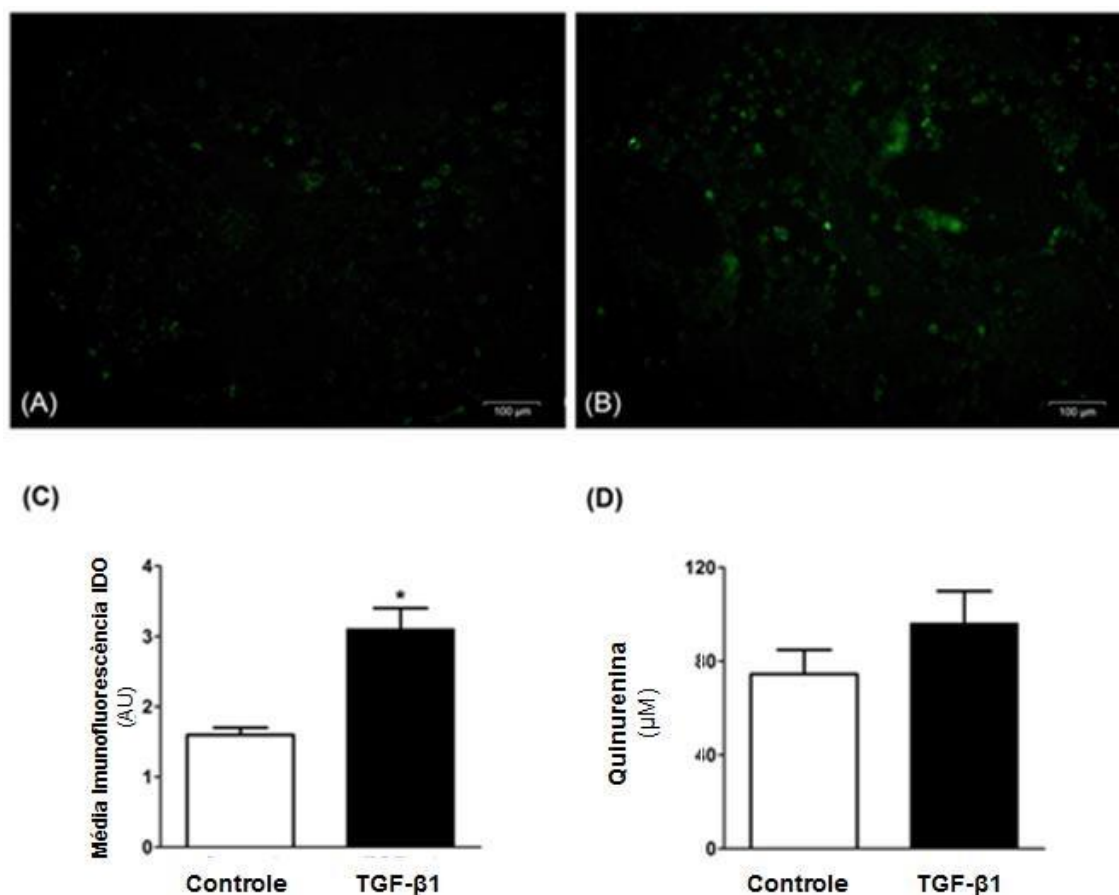


Figura 9. Imunofluorescência para IDO (A e B) em células MDCK. As células MDCK foram cultivadas em meio DMEM suplementado com SFB a 10% a 37°C com 5% de CO₂. As células MDCK foram estimuladas com TGF-β 1 (1 ng / ml) durante 48 horas (B) e células não estimuladas foram utilizados como controle (A). A imunofluorescência para IDO foi significativamente maior em células estimuladas por TGF-β 1 (C). As quantificações por HPLC demonstraram que a concentração de quinureninas, o principal catabólito da ação da IDO, foi aumentada no sobrenadante de células estimuladas por TGF-β 1, mas sem significância estatística (D). Cada condição foi realizada em triplicata. * P <0,05 vs. Controle.

4.7 Efeito da inibição da IDO sobre a TEM em células MDCK

A expressão de αSMA foi analisada por imunocitoquímica e utilizada para identificar um fenótipo mesenquimal para as células MDCK TGF-β 1-estimuladas, demonstrando o fenômeno da TEM. Como demonstrado na Figura 10, o TGF-β 1 aumentou a expressão αSMA em células MDCK, e o tratamento com MT potencializou o efeito (24,8 ± 3,2% de células αSMA⁺ no controle, 40,1 ± 9,1% de células αSMA⁺ em MT, 58,8 ± 10,6% de células αSMA⁺ em TGF-β 1 e 66,1 ± 10,8% de células

α SMA⁺ em TGF- β 1 + MT; $p < 0,05$ controle versus TGF- β 1 + MT).

O tratamento apenas com MT aumentou o número de células α SMA⁺ quando comparado ao controle, mas sem significância estatística.

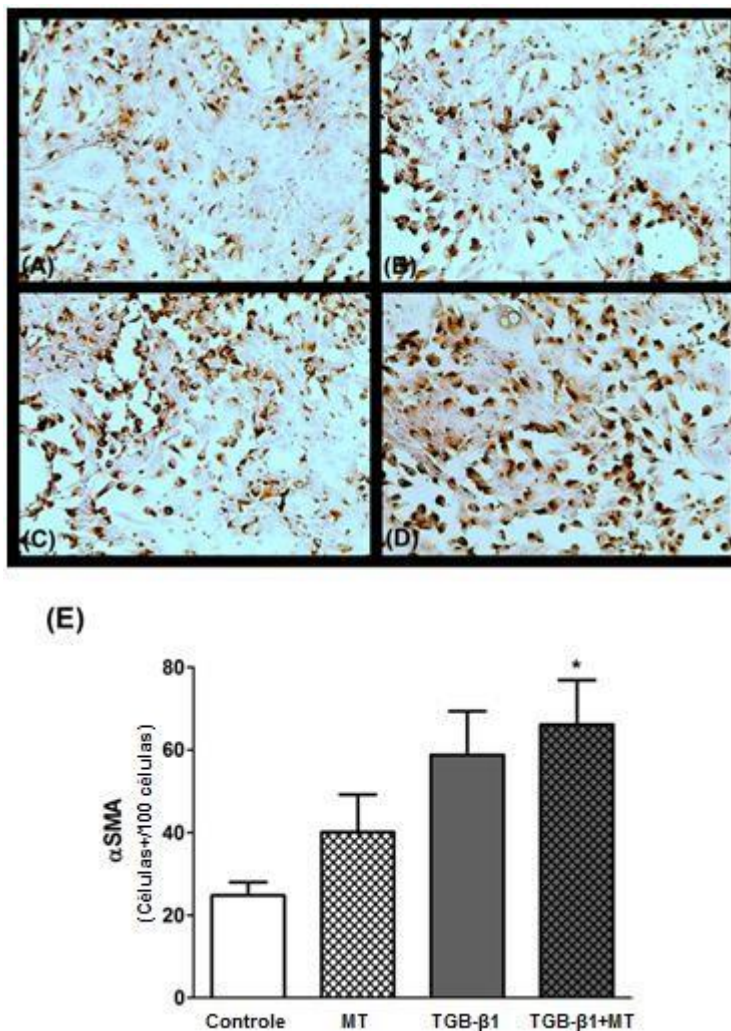


Figura 10. Imunocitoquímica para α SMA em células MDCK. As células MDCK foram cultivadas em meio DMEM suplementado com FBS a 10% a 37°C com 5% de CO₂. Células não estimuladas MDCK (Controle) (A), (B) células MDCK incubadas com o inibidor da IDO, 1-metilD-triptofano (MT; 1 mM), (C) Células MDCK estimuladas por TGF- β 1, e (D) Células MDCK estimuladas por TGF- β 1 e tratadas com MT-1. A análise quantitativa demonstrou que o número de células α SMA⁺ foi aumentada por TGF- β 1 e o tratamento com MT potencializou o efeito (E). As condições foram realizadas em triplicata. * P < 0,05 vs. Controle

Em adição à expressão de α SMA, investigou-se a capacidade migratória das células MDCK. A Figura1 ilustra a área coberta por células MDCK. O TGF- β 1 potencializa a capacidade migratória das células, e o tratamento com MT intensificou

significativamente este efeito ($1,8 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ no controle, $1,4 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ em MT, $2,8 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ em TGF- β 1 e $4,4 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ em TGF- β 1 + MT; $p < 0,05$ controle versus TGF- β 1 e contra TGF- β 1 + MT).

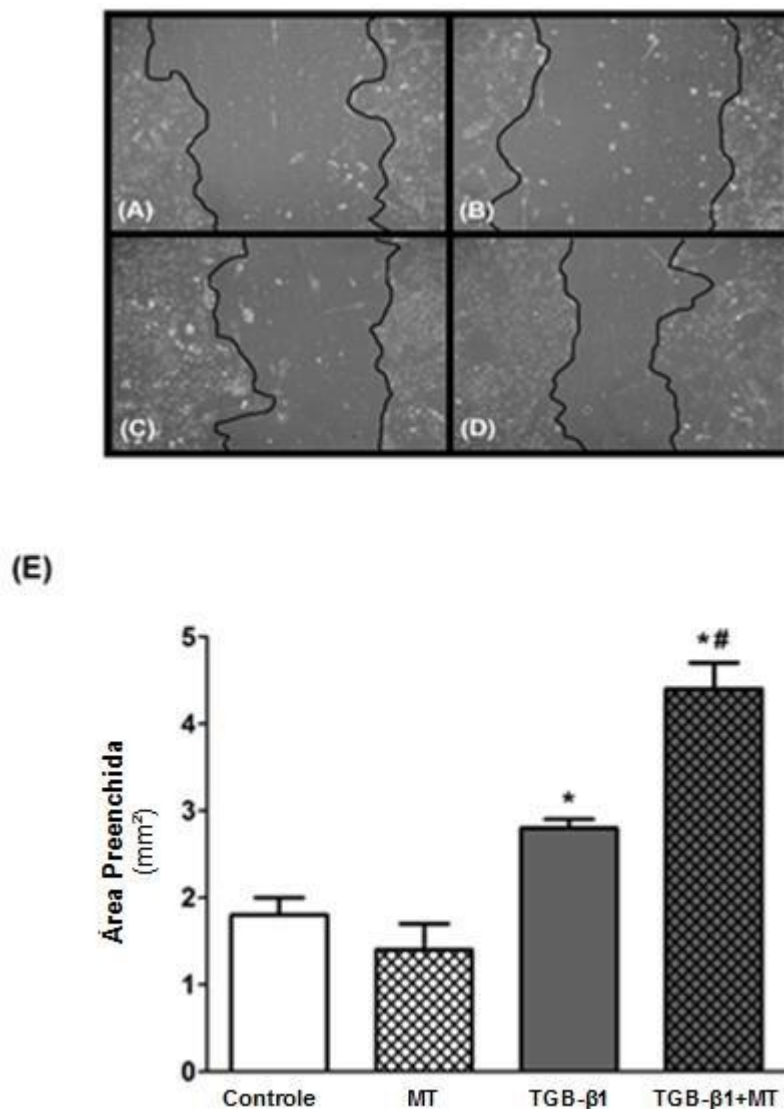


Figura 11. Migração das células MDCK em ensaio de ferida. As células MDCK foram cultivadas em placas de 24 poços e um risco por poço foi realizado utilizando uma ponta de pipeta 10 μ l. Após doze horas de migração, as imagens foram adquiridas. Células MDCK não estimuladas (Controle) (A), (B) células MDCK incubadas com o inibidor de IDO 1-metil-Driptofano (MT; 1 mM), (C) células MDCK estimuladas com TGF- β 1 e (D) Células MDCK estimuladas com TGF- β 1 tratadas com MT-1. TGF- β 1 promoveu a migração de células, e o tratamento com MT aumentou esse efeito (E). * $P < 0,05$ vs. Controle e MT; # $P < 0,05$ vs. TGF- β 1.

A expressão de IDO têm sido correlacionada a diversos tipos de condições onde há fibrose e perda de função tecidual, incluindo diversos tipos de doenças renais. No entanto, sua associação a fibrose renal ainda havia sido explorada. Levando à necessidade de se averiguar e definir com abordagens mais diretas o seu papel e função no quadro fibrótico. A primeira e significativa observação foi o aumento da expressão de IDO durante a OUU, modelo de doença renal não imune que leva à fibrogênese.

O modelo de OUU é caracteriza-se por inflamação renal intensa, o que leva à ativação de fibroblastos mesenquimais e rápido aumento da produção e depósito de matriz extracelular. As análises e quantificações histológicas revelaram a natureza dos danos renais, caracterizadas por alterações tubulointersticiais, incluindo dilatação e atrofia tubular, com a presença de cicatriz fibrótica no interstício. Estas alterações morfológicas foram descritas anteriormente por Vieira e colaboradores. (Vieira et al., 2005).

Dados coletados através de imunohistoquímica identificaram aumento no número de macrófagos, acompanhado por elevação na expressão de marcadores mesenquimais tubulointersticiais, como α SMA e vimentina. Em contrapartida, marcadores epiteliais como E-caderina, mostraram-se diminuídos na região tubular dos rins obstruídos. Tais resultados corroboram com estudos anteriores (Vieira et al., 2005; Kato et al., 2011; Lan et al., 2014; Wynn., 2008).

A análise de PCR em tempo real demonstrou elevação nos níveis de TGF- β 1 nos rins obstruídos, e por meio da imunohistoquímica observou-se que o TGF- β 1 foi predominantemente expresso nas células tubulares distais. Apesar da presença de constante marcação de fundo pela técnica de imunomarcação para TGF- β 1, os

resultados combinados com qRT-PCT estão de acordo com a literatura e reafirmam a hipótese de que a fibrose é tipicamente o resultado final de condições inflamatórias crônicas, advindas de uma série de danos nos teciduais liberação de citocinas, à exemplo do TGF- β 1 (Wynn., 2008; Kaneto et al., 1993).

Neste estudo, foi demonstrado que células tubulares expressam IDO constitutivamente, em maior disposição nos túbulos distais dos néfrons. A expressão renal de IDO foi significativamente maior nos ratos submetidos à OUU. Foi verificada a atividade enzimática da IDO, sendo que os rins obstruídos apresentaram uma maior atividade da enzima quando comparado com o rim contralateral. Tal expressão tubular foi demonstrada anteriormente em rins com distintas condições fisiopatológicas. Em biópsias de pacientes com transplante renal, Brandacher et al. demonstraram que a expressão de IDO foi significativamente maior em túbulos renais rejeitados quando comparado com órgãos não rejeitados (Brandacher et al., 2006). Mohib et al. demonstraram que ratos submetidos a lesão de isquemia e reperfusão renal apresentaram quantidades elevadas de IDO no epitélio tubular sem distinção do tipo de células tubulares (Mohib et al., 2008). Em um modelo de nefropatia diabética tipo 2, a IDO foi encontrada em células intersticiais, em associação com citocinas pró-inflamatórias (Baban et al., 2013). No modelo de ratos com insuficiência renal induzida por adriamicina, a IDO foi encontrada em túbulos dilatados, estando relacionada ao agravamento da doença (Arioka et al., 2012). O mecanismo para explicar porque há um aumento na expressão de IDO em células tubulares renais durante fibrogênese ainda não foi elucidado.

Nossos resultados mostraram que a IDO aumenta conforme a progressão da fibrose renal e sua expressão coincide localmente com a de TGF- β 1. Para compreender o possível mecanismo de associação entre IDO e fibrose renal

induzida por TGF- β 1, foram utilizadas as células MDCK, uma linhagem representativa para a células tubulares distais, e foram analisadas características que fossem capazes de evidenciar o processo de TEM. Células MDCK na presença de TGF- β 1, promovem aumento na expressão de IDO, e produção de quinureninas no sobrenadante. O tratamento destas células estimuladas com TGF- β -1 com MT exacerbou a marcação imune citoplásmica de α SMA e intensificou a capacidade migratória. É possível que a IDO realize a mediação da TEM em células tubulares. Pallota et al. demonstraram que a IDO é regulada por TGF- β 1 em células dendríticas, e estabelecendo uma via importante para promover a diferenciação e aquisição de um fenótipo regulador (Pallota et al., 2011).

Outra observação importante é o possível efeito sistêmico gerado pela condição inflamatória no rim esquerdo dos animais. Observou-se discreto aumento na expressão de TGF- β 1 e IDO nos rins contralaterais quando comparados aos animais SHAM. Tal fato pode ser justificado pela liberação de fatores próinflamatórios sistêmicos atingindo o órgão sadio, havendo a presença fibrose, e fatores lesivos à sua funcionalidade.

O mecanismo para explicar o aumento na expressão de IDO nas células tubulares renais durante fibrogênese ainda não foi elucidado, entretanto, acredita-se que haja um mecanismo compensatório e controle do processo fibrótico, induzido por TGF- β 1 nos túbulos renais.

Apesar da correlação negativa entre o aumento da atividade e expressão de IDO, a completa análise dos mecanismos conhecidos nos leva a acreditar que a IDO pode atuar de maneira benéfica no processo de fibrose renal, onde a enzima IDO é estimulada por fatores inflamatórios e fibróticos em uma tentativa de manutenção

funcional e diminuição do ataque do sistema imunológico, de modo que ela possa ser utilizada como marcador de evolução e agressão tecidual frente a uma lesão.

Assim, em conjunto com os resultados deste estudo, podemos propor que aIDO tem uma propriedade renoprotetora devido a observação de que sua inibição potencializou a TEM tubular. Um possível mecanismo seria através da ativação de uma resposta dependente de GCN2. A privação de triptofano promovida pela IDO no microambiente deflagra a ativação do GCN2. Em modelos com camundongos de nefrite com soro nefrotóxico, Chaudhary et al. demonstraram que a ativação de GCN2 induzida por IDO foi eficaz na supressão da lesão renal através da indução de autofagia (Chaudhary et al., 2015). Curiosamente, células da medula renal, que são regularmente expostas a condições de stress com alta osmolalidade são protegidas pela ativação da via GCN2 (Cai e Brooks., 2011). A perda da ativação de GNC2 diminui a sobrevivência das células e induz a expressão de caspase-3 ativada (Cai e Brooks, 2011).

Outra via mediada pela privação de triptofano gerada pela ação da IDO é a mTOR (Metz et al., 2012). A atividade da IDO inibe o suprimento de triptofano que estimula a Mtor. Tal via é importante para indução da TEM e conseqüentemente, à fibrose renal (Wang et al., 2015). É possível que o efeito deletério encontrado com o tratamento com MT ao induzir a TEM em células MDCK esteja relacionado com a capacidade do MT de agir como triptofano para a inibição de CGN2 e / ou para a ativação da via mTOR. Mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

AIDO é constitutivamente expressa em células tubulares e aumenta durante a fibrogênese renal. Embora a expressão deIDO e sua atividade sejam potencializadas por TGF- β 1, aIDO não parece agir intensificando a fibrose renal. AIDO apresentou uma tendência de papel renoprotetor, uma vez que a sua inibição potencializou a TEM induzida por TGF- β 1.

Assim como no processo inflamatório, em queIDO é uma molécula que evita respostas inflamatórias potencialmente prejudiciais, é provável que aIDO possa desempenhar um papel fisiopatológico relevante ao suavizar a fibrose renal durante os picos de expressão de TGF- β 1. Este equilíbrio entre aIDO e TGF- β 1 deve ser considerado durante o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que busquem a modulação daIDO.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aihua Zhang, Zheng Dong, Tianxin Yang. Prostaglandin D2 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in MDCK cells. *American Journal of PhysiologyRenal Physiology*. 2006;291;6:F1332-F1342.

Arioka Y, Yamamoto Y, Hoshi M, Matsumoto K, Takamatsu M, Hara A, Seishima M, Saito K. Pre-administration of L-tryptophan improved ADR-induced early renal failure in mice. *Life Sci*. 2012; 91:100-6.

Baban B, Liu Jy, Mozaffari Ms. Endoplasmic reticulum stress response and inflammatory cytokines in type 2 diabetic nephropathy: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and programmed death-1. *Exp Mol Pathol*. 2013; 94(2):343-51.

Brandacher G, Cakar F, Winkler C, Schneeberger S, Obrist P, Bosmuller C, Wernerferlmayer G, Werner ER, Bonatti H, Margre-Iter R, Fuchs D. Noninvasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation. *Kidney Int*. 2006; 70: 60–67.

Brenner DA, Kisseleva T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 12;111(32).

Brito RB, Malta CS, Souza DM, Matheus LH, Matos YS, Silva CS, Ferreira JM, Nunes VS, França CM, Dellê H. 1-Methyl-D-tryptophan potentiates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in T24 human bladder cancer cells. *PLoS One*. 2015;12;10(8).

Cai Q, Brooks HL. Phosphorylation of eIF2 α via the general control kinase, GCN2, modulates the ability of renal medullary cells to survive high urea stress. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(6):202-207.

Chaudhary K, Shinde R, Liu H, Gnana-Prakasam JP, Veeranan-Karmegam R, Huang L, Ravishankar B, Bradley J, Kvirkvelia N, McMenamin M, Xiao W, Kleven D, Mellor AL, Madaio MP, McGaha TL. Amino acid metabolism inhibits antibody-driven kidney injury by inducing autophagy. *J Immunol*. 2015;194(12):5713-24.

Chen W. IDO: More than an enzyme. *Nature Immunology* 2011 Aug 18;12(9):809-11.

Cook JS, Pogson CI, Smith SA. Indoleamine 2,3-dioxygenase. A new, rapid, sensitive radiometric assay and its application to the study of the enzyme in rat tissues. *Biochem J.* 1980;189(3):461-6.

Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol. Cell.* 2000;6:269–279.

Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. (1999). Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 1999; 56(4):1455–1467.

Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation.* 2010; 27(12):1312-20.

Grande MT, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med.* 2015;21:989–997.

Goldenstein PT, Elias RM, Pires de Freitas do Carmo L, Coelho FO, Magalhães LP, Antunes GL, Custódio MR, Montenegro FL, Titan SM, Jorgetti V, Moysés RM. Parathyroidectomy improves survival in patients with severe hyperparathyroidism: a comparative study. *PLoS One.* 2013; 8(8):68870.

Haspot F, Séveno C, Dugast As, Coulon F, Renaudin K, Usal C, Hill M, Anegon I, Heslan M, Josien R, Brouard S, Soulillou Jp, Vanhove B. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant.* 2005; 5(10):2339-48.

Holmes EW1, Russell PM, Kinzler GJ, Reckard CR, Flanigan RC, Thompson KD, Bermes EW Jr. Oxidative tryptophan metabolism in renal allograft recipients: increased kynurenine synthesis is associated with inflammation and OKT3 therapy. *Cytokine*. 1992; 4(3):205-13.

Hou W, Li S, Wu Y, Du X, Yuan F. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol*. 2009; 156(2):363-72.

Humphreys, B. D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T. E., Nowlin, B. T., Bonventre, J. V., Duffield, J. S. Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 2010; 176(1):85–97.

Inker, Lesley A. et al. KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. *American Journal of Kidney Diseases* , 2014; Volume 63 , Issue 5 , 713 - 735

Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(32):E3297-E3305.

Junwei Yang and Youhua Liu. (2001). Blockage of Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition by Hepatocyte Growth Factor Prevents Renal Interstitial Fibrosis. *JASN*. 2002; 13(1):96-107.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119(6):1420-8.

Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int*. 1993; 44(2):313-21.

Kato N1, Kosugi T, Sato W, Ishimoto T, Kojima H, Sato Y, Sakamoto K, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K. Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol.* 2011; 178(2):572-9.

Lan A, Zhang J, Xiao Z, Peng X, Qi Y, Du J. Akt2 is involved in loss of epithelial cells and renal fibrosis following unilateral ureteral obstruction. *PLoS One.* 2014;9(8):e105451.

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J.* 2004; 18(7):816-27.

LeBleu, V. S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V. G., Woda, C., Kalluri, R. (2013). Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Nature Medicine.* 2013; 19(8):1047–1053.

Lovisa S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015;21:998–1009.

Mohib K, Wang S, Guan Q, Mellor AL, Sun H, Du C, Jevnikar AM. Indoleamine 2,3-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480171> dioxygenase expression promotes renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295(1):F226-34.

Mellor, A.L., and D.H. Munn. 1999. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol. Today.* 20:469–473.

Metz R, Rust S, Duhadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, Link CJ, Prendergast GC. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology.* 2012;1(9):1460-1468.

Munn, D.H., E. Shafizadeh, J.T. Attwood, I. Bondarev, A. Pashine, and A.L. Mellor. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189:1363–1372.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998;281(5380):1191-3.

Pallotta MT¹, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Bicciato S, Mazza EM, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011;12(9):870-8.

Peng W, Robertson L, Gallinetti J, et al. Surgical Stress Resistance Induced by Single Amino Acid Deprivation Requires Gcn2 in Mice. *Science translational medicine*. 2012;4(118):118ra11.

Schefold Jc, Zeden Jp, Fotopoulou C, Von Haehling S, Pschowski R, Hasper D, Volk Hd, Schuett C, Reinke P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24(6):1901-8.

Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem*. 1986;261(8):3648-53.

Terness P, Bauer TM, Rose L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002; 196:447-57.

Vieira JM Jr, Mantovani E, Rodrigues LT, Dellê H, Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20(8):1582-91.

Wang B, Ding W, Zhang M, Li H, Gu Y. Rapamycin attenuates aldosterone-induced tubulointerstitial inflammation and fibrosis. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(1):116-25.

Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans*. 2006;34:7–11.

Wek SA, Zhu S, Wek RC. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF2 α protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol*. 1995;15:4497–4506.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214(2):199-210.

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*. 2003; 9(7):964-8.

Zhou D, Liu Y. Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. *Nature reviews Nephrology*. 2016;12(2):68-70. doi:10.1038/nrneph.2015.215.