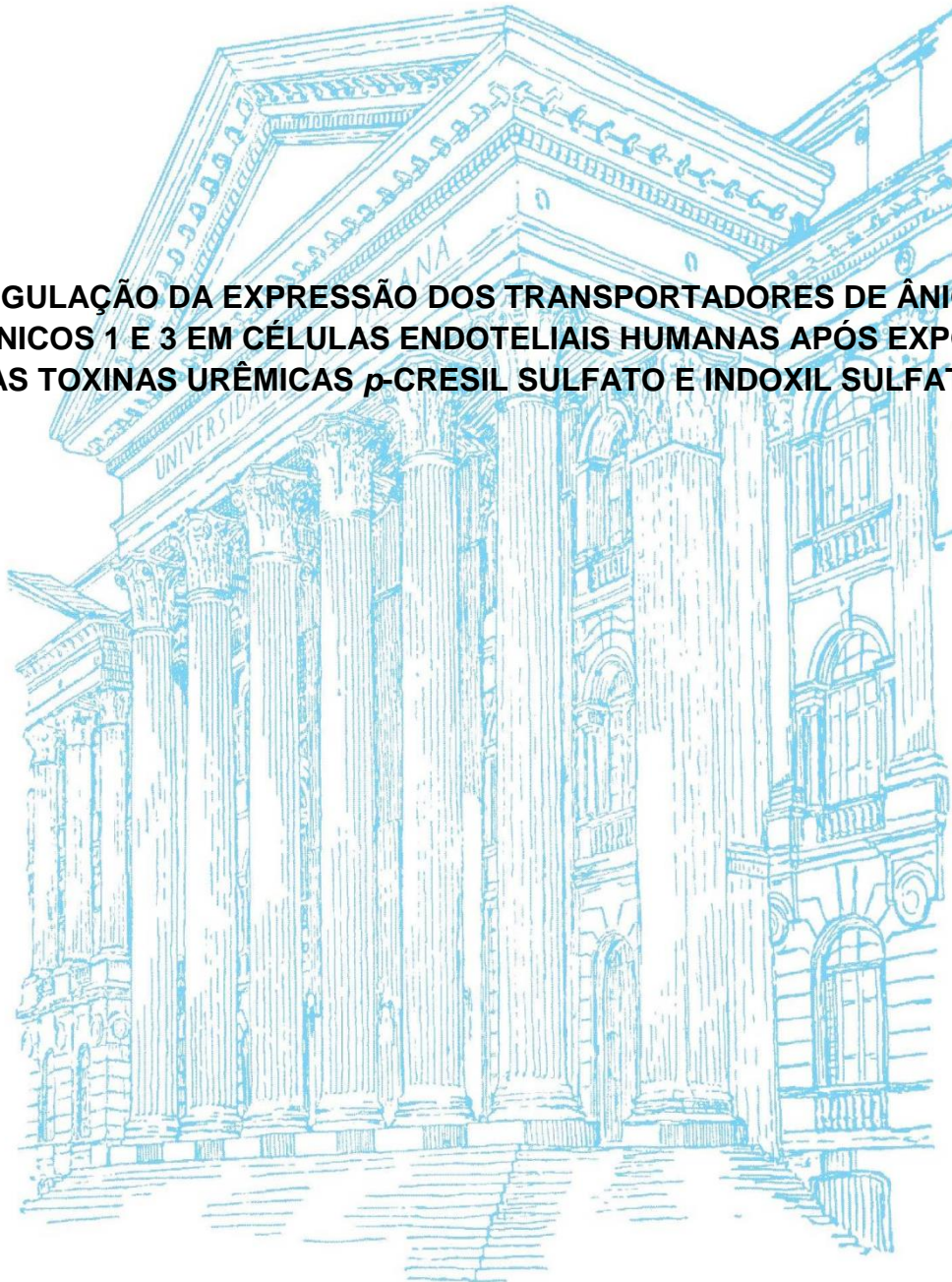


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGIANE STAFIM DA CUNHA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE ÂNIONS
ORGÂNICOS 1 E 3 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS APÓS EXPOSIÇÃO
ÀS TOXINAS URÊMICAS *p*-CRESIL SULFATO E INDOXIL SULFATO**



CURITIBA

2017

REGIANE STAFIM DA CUNHA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE ÂNIONS
ORGÂNICOS 1 E 3 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS APÓS EXPOSIÇÃO
ÀS TOXINAS URÊMICAS *p*-CRESIL SULFATO E INDOXIL SULFATO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen.

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cunha, Regiane Stafim da

Regulação da expressão dos transportadores de ânions orgânicos 1 e 3 em células endoteliais humanas após exposição às toxinas urêmicas *p*-cresil sulfato e indoxil sulfato. / Regiane Stafim da Cunha. – Curitiba, 2017.
93 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Andréa Emilia Marques Stinghen

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Doença renal. 2. Toxicidade. 3. Estresse oxidativo. Título II. Stinghen, Andréa Emilia Marques. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576.163



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Regulação da expressão dos transportadores de ânions orgânicos 1 e 3 em células endoteliais humanas após exposição às toxinas urêmicas p-cresil sulfato e indoxil sulfato”

por

Regiane Stafim da Cunha

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen – Presidente


Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni


Prof. Dr. Fellipe de Carvalho Barreto

Curitiba, 05 de abril de 2017.

Dedico este trabalho à minha família.

NOTA BIOGRÁFICA

REGIANE STAFIM DA CUNHA, graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) em 2015, tendo defendido a monografia na modalidade de bacharelado com o título “Efeito das toxinas urêmicas *p*-cresol e *p*-cresil sulfato na expressão de OAT1 e OAT3 em células musculares lisas vasculares de coelho (RASM)” e o trabalho de conclusão de curso na modalidade de licenciatura intitulado “A neuroeducação e sua importância na formação continuada de profissionais da Educação Básica”. Fez estágio no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) na área de Bioquímica, especificamente em estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas de carboidratos vegetais. Fez parte do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência (PIBID) com o projeto intitulado "Interface entre ensino de ciências e múltiplas linguagens". Foi integrante do Projeto de Extensão "Neurociência e educação". Possui trabalhos e resumos publicados nas áreas de toxicidade urêmica e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela força e proteção de todos os dias.

Aos meus pais, Dorival e Regina, pelo amor, orações e apoio incondicional. A toda minha família e amigos que tem sido meu suporte nas alegrias e nas tribulações.

À minha orientadora, Professora Doutora Andréa Stinghen, pela oportunidade, dedicação e apoio. Mesmo nos momentos de dificuldades para concluir este estudo, a Professora sempre esteve forte e determinada, revigorando também minhas forças. Da mesma forma, estendo meus agradecimentos ao Professor Doutor Wesley Souza por toda a sua contribuição.

Ao Laboratório de Nefrologia Experimental que possibilitou meu crescimento científico e pessoal. Giane, Paulo, Rayana, Valentina, Bruna e Renato, sou grata por conviver com vocês, verdadeiros exemplos de profissionalismo e de pessoas de bom coração. Agradeço também ao grupo brasileiro de estudo em Toxicidade Urêmica (Brutox) que promove a discussão e a pesquisa científica nessa área.

À banca avaliadora deste trabalho, Professora Doutora Maria Aparecida Dalboni e Professor Doutor Fellype Barreto, pelas sugestões e considerações.

Aos mestres e colegas da Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Epigenética pela disposição em me auxiliar em etapas cruciais no desenvolvimento desta pesquisa. Um agradecimento especial à Andressa, à Mariana e à Lara por toda a ajuda, estudos, conversas e companheirismo. Ao Laboratório de Neurobiologia, de Imunoquímica e de Parasitologia que compartilharam conhecimentos e forneceram material e equipamentos. Em especial, agradeço à Melisa, à Sze, ao Celso, ao Teles, ao Fábio, à Andressa, à Amanda, à Nathly, à Bruna, à Alessandra, à Sabrina e à Franciele por toda a ajuda. Aos meus amigos, principalmente à Heloisa, à Anne e à Mai que me ajudaram em momentos importantes.

À Universidade Federal do Paraná, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a todos que possibilitaram a realização deste estudo.

Muito obrigada,

Regiane.

*Necessitamos um do outro, para
sermos nós mesmos.*

Santo Agostinho

*A ciência é um enigma que renasce,
cada solução traz um novo problema.*

Gaston Bachelard

RESUMO

As toxinas urêmicas *p*-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS) são associadas a disfunção endotelial, induzindo a produção de moléculas inflamatórias e o estresse oxidativo. Tais efeitos estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), tais como a aterosclerose em pacientes com doença renal crônica (DRC). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a captação destas toxinas pelo endotélio vascular é mediada por transportadores de ânions orgânicos 1 e 3 (OAT1 e OAT3). O presente estudo avaliou em células endoteliais humanas o efeito das toxinas urêmicas PCS e IS na expressão de OAT1 e OAT3 bem como de seus fatores de transcrição *cAMP responsive element binding protein-1* (CREB1), *activating transcription factor-1* (ATF1) e *hepatocyte nuclear factor-4 α* (HNF4 α). Para tanto, as células endoteliais foram tratadas com PCS e IS nas concentrações normal, urêmica e máxima urêmica por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT com as toxinas na presença ou ausência dos inibidores de OATs *probenecid* (Pb) ou benzilpenicilina potássica (Bp). A concentração proteica de OAT1 e OAT3 foi avaliada por *Western blotting*. A extração de RNA foi realizada após tratamento por 24 horas com PCS e IS, com ou sem Pb, Bp, o antioxidante vitamina C (Vit C) e o inibidor da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). A expressão gênica dos fatores de transcrição foi analisada por RT-PCR e RT-qPCR. A viabilidade celular foi significativamente reduzida nos tratamentos com PCS em todas as concentrações testadas ($P < 0,0001$), enquanto com IS foram significativas apenas nas concentrações urêmica ($P < 0,001$) e máxima urêmica ($P < 0,0001$), sendo restabelecida após tratamento com Pb ou Bp ($P < 0,001$). Observou-se uma maior expressão proteica de OAT1 e OAT3 após tratamento das células com PCS na concentração máxima urêmica ($P < 0,05$) em comparação ao controle (células sem tratamento). As análises de RT-qPCR demonstraram um aumento significativo ($P < 0,01$) na expressão de CREB1 e ATF1 nos tratamentos com PCS e IS em relação ao controle, efeito que foi revertido pelo Pb, Bp, Vit C e L-NAME ($P < 0,05$). Já o HNF4 α teve a expressão aumentada significativamente ($P < 0,05$) apenas nos tratamentos com PCS em relação ao controle. Em conclusão, sugerimos que o ambiente urêmico, especificamente as toxinas PCS e IS, é capaz de modular a expressão gênica dos OATs, possivelmente via aumento do estresse oxidativo. Dessa forma, avanços nessa área podem auxiliar a elucidar os mecanismos celulares e moleculares da toxicidade do PCS e IS no endotélio, possibilitando novos estudos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas a fim de melhorar a sobrevida do paciente.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica. Toxicidade urêmica. Disfunção endotelial. OATs.

ABSTRACT

Uremic toxins, such as *p*-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS), are associated with endothelial dysfunction, inducing the production of inflammatory molecules and oxidative stress. These effects are strongly related to the development of cardiovascular diseases (CVD), such as atherosclerosis in patients with chronic kidney disease (CKD). Recently, our group demonstrated the uptake of PCS and IS by vascular endothelium is mediated by organic anions transporters 1 and 3 (OAT1 and OAT3). The present study evaluated the effect of PCS and IS on the expression of OAT1, OAT3 and their transcription factors cAMP responsive element binding protein-1 (CREB1), activating transcription factor-1 (ATF1) and hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α). For that, endothelial cells were treated with PCS and IS at normal, uremic and maximum uremic concentrations for 24 hours. Cell viability was assessed by MTT assay with the toxins in the presence or absence of OATs inhibitors, such as probenecid (Pb) and benzylpenicillin potassium (Bp). The protein concentration of OAT1 and OAT3 was evaluated by Western blotting. RNA extraction was performed with PCS and IS treatment for 24 hours, with or without Pb, Bp, the antioxidant vitamin C (Vit C) and the inhibitor of the enzymatic activity nitric oxide synthase, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). The gene expression of the transcription factors was analyzed by RT-PCR and RT-qPCR. The cell viability was significantly reduced in PCS treatments at all concentrations tested ($P < 0.0001$), whereas in IS it was significant only in uremic ($P < 0.001$) and maximal uremic ($P < 0.0001$) concentrations, being restored with Pb or Bp ($P < 0.001$). An increased OAT1 and OAT3 protein expression was observed in the cells after treatment with PCS at maximal uremic concentration ($P < 0.05$) compared to control (untreated cells). The RT-qPCR analysis showed a significant increase ($P < 0.01$) in the CREB1 and ATF1 expression in cells treated with PCS and IS compared to the control, which was restored with Pb, Bp, Vit C and L-NAME ($P < 0.05$). HNF4 α had significantly increased expression ($P < 0.05$) only in the treatments with PCS compared to the control. In conclusion, we suggest that the uremic environment, specifically the PCS and IS toxins, is able to modulate the gene expression of OATs, possibly increasing oxidative stress. These findings could help to elucidate the endothelium cellular and molecular of PCS and IS toxicity, enabling further studies for the development of therapeutic interventions in order to improve patient survival.

Keywords: Chronic Kidney Disease. Uremic toxicity. Endothelial dysfunction. OATs.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – FORMAÇÃO DO <i>p</i> -CRESIL SULFATO (PCS)..... | 24 |
| FIGURA 2 – FORMAÇÃO DO INDOXIL SULFATO (IS) | 27 |
| FIGURA 3 – MODELO DA ESTRUTURA DE UM TRANSPORTADOR DE ÂNION ORGÂNICO (OAT) | 32 |
| FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DOS OATs..... | 35 |
| FIGURA 5 – MODELO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES DE OAT1 E OAT3..... | 39 |
| FIGURA 6 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS EXPOSIÇÃO AO PCS E IS | 49 |
| FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DE OAT1 E OAT3 POR <i>WESTERN BLOTTING</i> | 50 |
| FIGURA 8 – EXPRESSÃO DE GENES DETECTADOS POR RT-PCR..... | 51 |
| FIGURA 9 – EXPRESSÃO RELATIVA DE CREB1 DETERMINADA POR RT-qPCR | 52 |
| FIGURA 10 – EXPRESSÃO RELATIVA DE ATF1 DETERMINADA POR RT-qPCR | 53 |
| FIGURA 11 – EXPRESSÃO RELATIVA DE HNF4 α DETERMINADA POR RT-qPCR | 53 |
| FIGURA 12 – MODELO ESQUEMÁTICO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS PELO PCS E IS NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – ESTADIAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) PROPOSTO PELO KDIGO..... | 19 |
| TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DAS TOXINAS URÊMICAS..... | 23 |
| TABELA 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA RT-PCR E RT-qPCR..... | 47 |
| TABELA 4 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CREB1, ATF1 E HNF4 α | 54 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| AhR | Receptor de aril hidrocarboneto |
| ARNT | Translocador nuclear do AhR |
| ATF1 | <i>Activating transcription factor-1</i> |
| Bp | Benzilpenicilina potássica |
| CRE | <i>cAMP response element</i> |
| CREB1 | <i>cAMP responsive element binding protein-1</i> |
| DRC | Doença renal crônica |
| DCVs | Doenças cardiovasculares |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotelial |
| EPM | Erro padrão médio |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| HNF1 α | <i>Hepatocyte nuclear factor 1α</i> |
| HNF1 β | <i>Hepatocyte nuclear factor 1β</i> |
| HNF4 α | <i>Hepatocyte nuclear factor 4α</i> |
| HPRT | Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase |
| HUVEC | Células endoteliais de cordão umbilical humano |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular-1 |
| IFN- γ | Interferon γ |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-8 | Interleucina-8 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| IS | Indoxil sulfato |

| | |
|---------|---|
| L-NAME | N-nitro-L-arginina metil éster |
| MCP-1 | Proteína quimiotática de monócitos-1 |
| MRP4 | Proteína de resistência a multidrogas-4 |
| MTT | Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| NAC | N-acetil-L-cisteína |
| NF-κB | Fator nuclear <i>kappa</i> B |
| NO | Óxido nítrico |
| OAT | Transportador de ânions orgânicos |
| Pb | <i>Probenecid</i> |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PCS | <i>p</i> -Cresil sulfato |
| PKC | Proteína quinase C |
| PEW | Perda energético-proteica |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RT-PCR | Reação de cadeia da polimerase com transcriptase reversa |
| RT-qPCR | Reação de cadeia da polimerase quantitativo com transcriptase reversa |
| siRNA | <i>Small interfering</i> RNA |
| SLC22 | <i>Solute Carrier Family 22</i> |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo simples |
| TFG | Taxa de filtração glomerular |
| TnaA | Enzima bacteriana triptofanase |
| VCAM-1 | Molécula de adesão vascular-1 |
| Vit C | Vitamina C |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) | 18 |
| 2.2 TOXINAS URÊMICAS..... | 22 |
| 2.2.1 <i>p</i> -Cresil sulfato (PCS)..... | 24 |
| 2.2.2 Indoxil sulfato (IS)..... | 27 |
| 2.3 TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs) | 31 |
| 2.3.1 Características gerais..... | 31 |
| 2.3.2 Regulação epigenética | 35 |
| 2.3.3 Regulação transcricional | 37 |
| 2.3.4 Regulação pós-traducional e interações proteína-proteína | 39 |
| 2.3.5 Alterações da expressão do OAT1 e do OAT3 no contexto patológico..... | 41 |
| 3 OBJETIVOS | 43 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 43 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 4.1 CULTIVO CELULAR | 44 |
| 4.2 TRATAMENTOS DAS CÉLULAS..... | 44 |
| 4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)..... | 45 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DE OAT1 E OAT3 POR WESTERN BLOTTING..... | 45 |
| 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA | 46 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 47 |

| | |
|--|----|
| 5 RESULTADOS | 48 |
| 5.1 VIABILIDADE CELULAR..... | 48 |
| 5.2 AVALIAÇÃO PROTEICA DE OAT1 E OAT3..... | 48 |
| 5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA | 51 |
| 6 DISCUSSÃO | 55 |
| 7 CONCLUSÃO | 60 |
| 8 PERSPECTIVAS | 61 |
| REFERÊNCIAS | 62 |
| APÊNDICE | 87 |
| ANEXO | 90 |

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) consiste na perda gradativa e definitiva da função renal que levam ao desenvolvimento de diversas comorbidades e reduzem a expectativa de vida do paciente (TURIN et al., 2012). Nos últimos anos, aumentou o número de pacientes com DRC que afeta milhares de pessoas no Brasil e no mundo (GBD, 2016; SESSO et al., 2016). A prevalência global da DRC é estimada em 13,4% por estudos de meta-análises (HILL et al., 2016). Diante disso, considera-se a DRC um problema de saúde pública, o que requer medidas de prevenção e tratamento adequado (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; KDIGO, 2013b).

Uma das principais consequências da diminuição da função renal é a perda da capacidade de excreção de uma diversidade de toxinas urêmicas que passam a se acumular no organismo, condição denominada uremia. A toxicidade urêmica resultante afeta vários órgãos e tecidos, desregulando o funcionamento dos sistemas biológicos, inclusive o sistema cardiovascular. De fato, pacientes com DRC apresentam maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCVs) que são consideradas também a principal causa de morte na DRC (BANSAL et al., 2016; GLUBA-BRZÓZKA et al., 2016; TONELLI et al., 2012; USRDS, 2016).

O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células que reveste o interior da parede dos vasos do sistema cardiovascular e se encontra em interface com o ambiente urêmico na DRC. Sob esse aspecto, diversos estudos têm sido desenvolvidos a fim de elucidar os efeitos induzidos pela uremia sobre esse tipo celular. Dessa forma, demonstrou-se que as toxinas urêmicas são capazes de induzir a disfunção endotelial, o estresse oxidativo e a produção de moléculas inflamatórias e de ativação endotelial, tais como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) (FAURE et al., 2006; JING et al., 2016; MEIJERS et al., 2009; STINGHEN et al., 2014). Esses eventos comprometem as funções homeostáticas do endotélio e estão intrinsecamente relacionados com a aterogênese. Portanto, a uremia contribui significativamente na disfunção endotelial e no desenvolvimento de DCVs, tal como a aterosclerose (HAN et al., 2016a, 2016b; MEIJERS et al., 2009).

As toxinas urêmicas ligadas às proteínas são consideradas críticas pelo fato de serem de difícil remoção por terapias dialíticas. Os dois principais exemplos de toxinas dessa classe são o *p*-cresil sulfato (PCS) e o indoxil sulfato (IS). Ambos são provenientes da metabolização das proteínas consumidas na dieta pela microbiota intestinal. Essas toxinas são associadas à disfunção endotelial e à inflamação vascular (FAURE et al., 2006; JING et al., 2016; MEIJERS et al., 2009). De fato, estudos clínicos demonstraram que o aumento dos níveis séricos do PCS e do IS estão associados à progressão da DRC e ao desenvolvimento de DCVs (LIN et al., 2015; SHAFI et al., 2015; WU et al., 2011, 2012).

A captação celular do PCS e IS é feita pelos transportadores de ânions orgânicos (OATs) 1 e 3 (MIYAMOTO et al., 2011; WATANABE et al., 2013a). Esses transportadores são expressos nas células do túbulo renal, nas quais são importantes para a excreção de diversos xenobióticos e metabólitos do organismo, inclusive PCS e IS. Além dos rins, o OAT1 e o OAT3 podem ser encontrados no epitélio do corpo ciliar dos olhos, no plexo coroide, nas células endoteliais, entre outros (ITO et al., 2010; LEE et al., 2015a; NAGLE et al., 2013; ZHANG et al., 2008c). Contudo, dados da literatura demonstraram que a expressão desses transportadores pode ser alterada em condições patológicas, inclusive na DRC (ENOMOTO et al., 2002b; NAUD et al., 2011, 2012).

O OAT1 e o OAT3 possuem regulação complexa que compreendem mecanismos epigenéticos, transcricionais e pós-traducionais (JIN et al., 2012; OGASAWARA et al., 2007; TANAKA et al., 2004). Esses mecanismos regulatórios também podem ser modulados pelas toxinas urêmicas, porém não foram ainda estudados nas células endoteliais (SUCAJTYS-SZULC et al., 2016; SUN; CHANG; WU, 2012b). Dentre os mecanismos regulatórios, citam-se os fatores de transcrição *hepatocyte nuclear factor 1*α (HNF1α), 1β (HNF1β) e 4α (HNF4α), *cAMP responsive element binding protein 1* (CREB1) e o *activating transcription factor 1* (ATF1) que participam da regulação transcricional dos genes codificantes do OAT1 (SLC22A6) e do OAT3 (SLC22A8) (MIHALJEVIC et al., 2016; OGASAWARA et al., 2006, 2007).

Considerando o papel que as toxinas urêmicas possuem na patogênese da disfunção endotelial e no desenvolvimento da aterosclerose, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos do PCS e IS sobre a expressão transcricional do OAT1 e OAT3 e dos fatores de transcrição a eles relacionados em células endoteliais

humanas. Dessa forma, elucidar os mecanismos celulares e moleculares vinculados aos OATs pode contribuir no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas visando melhorar a sobrevida dos pacientes com DRC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A doença renal crônica (DRC) é uma condição clínica caracterizada pela perda da capacidade funcional dos rins de forma gradativa e irreversível. É considerada um problema de saúde pública, com altos índices de prevalência e expressivos impactos negativos na qualidade de vida dos pacientes, além dos altos custos de tratamento (MILLS et al., 2015). Estima-se que a prevalência da DRC varia entre 8 e 16% da população mundial (JHA et al., 2013). De acordo com o último *Global Burden of Disease Study* (GBD), a DRC foi responsável por 1,2 milhão de mortes no mundo em 2015. Com base nesses dados, a DRC corresponde a décima sétima maior causa de anos de vida perdidos em nível global, subindo quatro posições apenas na última década (GBD, 2016). Só no Brasil, dados do Censo Nacional da Sociedade Brasileira de Nefrologia apontam aproximadamente 112 mil pacientes sob tratamento dialítico em 2014, quase o triplo do número de pacientes do ano de 2000 (CENSO SBN, 2014; SESSO et al., 2016).

Na mais recente diretriz da organização *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), a DRC é definida pela presença de lesão renal por tempo igual ou superior a três meses, acompanhada por anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, havendo ou não redução na taxa de filtração glomerular (TFG), com implicações ao estado de saúde (KDIGO, 2013b). A partir da avaliação da presença de um ou mais marcadores de dano renal é realizado o diagnóstico da doença. Um dos principais marcadores é a TFG que avalia a depuração por unidade de tempo de compostos urêmicos, tais como a creatinina e a cistatina C, considerando o sexo, a idade e a etnia do paciente (KDIGO, 2013b). O declínio da TFG na progressão da DRC é utilizado para realizar o estadiamento da DRC (TABELA 1). A albuminúria também é utilizada como marcador de dano renal. O KDIGO classifica a taxa de excreção da albumina (expressa em mg/g de creatinina por 24 horas) em normal ou levemente aumentada (até 30 mg/g), moderadamente aumentada (de 30 a 300 mg/g) ou severamente aumentada (acima de 300 mg/g). Outros marcadores de danos renais

incluem as anormalidades patológicas observadas na urina, em biópsias renais e em imagens ultrassonográficas (KDIGO, 2013b).

TABELA 1 – ESTADIAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) PROPOSTO PELO KDIGO

| Estágio | Descrição | Taxa de filtração glomerular (TFG) (mL/min/1,73 m²) |
|----------------|---|---|
| 1 | TFG normal ou aumentada | ≥90 |
| 2 | Leve diminuição da TFG | 60–89 |
| 3a | Leve a moderada diminuição da TFG | 45–59 |
| 3b | Moderada a severa diminuição da TFG | 30–44 |
| 4 | Severa diminuição da TFG | 15–29 |
| 5 | Falência renal ou em terapia substitutiva | <15 |

NOTA: A medida 1,73 m² é o equivalente à média da superfície corporal.
 FONTE: KDIGO (2013).

As principais doenças de base que levam ao desenvolvimento da DRC são a hipertensão e a diabetes. No Brasil, a nefropatia hipertensiva e a diabetes correspondem, respectivamente, a 35% e 29% dos pacientes prevalentes (SESSO et al., 2016). Outras causas incluem as glomerulonefropatias e as doenças renais policísticas (GBD, 2016; SESSO et al., 2016). Exposição a contaminantes ambientais com efeitos nefrotóxicos também podem elevar o risco de DRC. Dentre eles, citam-se as dioxinas, os compostos perfluorados, o cádmio, o mercúrio e a sílica (HUANG et al., 2016; KIM et al., 2015; SHANKAR; XIAO; DUCATMAN, 2011; VUPPUTURI et al., 2012). Já nos casos de DRC que se desenvolvem durante os primeiros 25 anos de vida, as principais causas são as anomalias congênitas nos rins ou no trato urinário, as síndromes nefróticas, as glomerulonefropatias crônicas e as ciliopatias renais (HWANG et al., 2014; KOHL et al., 2014; NAPRTCS, 2014; SADOWSKI et al., 2014).

Fatores genéticos e epigenéticos podem aumentar a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças renais, inclusive a DRC. Muitos deles se associam a grupos étnicos específicos. É o caso dos polimorfismos do gene codificante da enzima conversora da angiotensina (ACE) em asiáticos com hipertensão, dentre os quais

indivíduos portadores do alelo D possuem maior risco de desenvolver a DRC do que aqueles que possuem o alelo I (LIN et al., 2014a; SARKAR et al., 2016). Outro exemplo são os polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) encontrados no *loci* do KCNQ1, gene envolvido no desenvolvimento dos rins. Esses SNPs estão associados à TFG e à albuminúria em indivíduos americanos com ancestralidade africana (LIU et al., 2011). Genes que codificam RNAs regulatórios também podem estar envolvidos no desenvolvimento da DRC. Recentemente, demonstrou-se que SNPs no *loci* do RNA longo não-codificante intergênico LINC00923 estão associados à progressão da DRC em indivíduos não-diabéticos (PARSA et al., 2016).

Uma das principais consequências da DRC é perda da capacidade da excreção de diversos compostos urêmicos que acabam se acumulando no organismo, estado denominado uremia (DE LOOR et al., 2016; DELTOMBE et al., 2015; TOYOHARA et al., 2010). Dados da literatura demonstraram que os compostos urêmicos são capazes de afetar o funcionamento de vários órgãos e sistemas biológicos do paciente com DRC. Dentre eles, cita-se o endotélio que é exposto diretamente ao ambiente urêmico. Em vista disso, estudos experimentais demonstraram que a uremia induz a disfunção das células endoteliais, comprometendo suas propriedades homeostáticas (FAURE et al., 2006; JACOBI et al., 2006; JOURDE-CHICHE et al., 2011; MEIJERS et al., 2009). Dessa forma, o declínio da função renal nos pacientes com DRC é diretamente associado à disfunção endotelial (CHEN et al., 2015; IOANNOU et al., 2015; RYU et al., 2016; STAM et al., 2006).

Outra consequência da uremia é a indução da resposta inflamatória. Diversos estudos clínicos demonstraram níveis aumentados de moléculas inflamatórias em pacientes com DRC (STAM et al., 2003; STENVINKEL et al., 2000; STINGHEN et al., 2009). Biomarcadores de inflamação, tais como interleucina-6 (IL-6), TNF- α e fibrogênio, são inversamente associados à TFG e positivamente associados à albuminúria (AMDUR et al., 2016; GUPTA et al., 2012). No entanto, outros fatores também podem induzir a resposta inflamatória nos pacientes com DRC. Dentre eles, citam-se as alterações na permeabilidade da barreira intestinal, a perda energético-proteica (PEW), as doenças periodontais, entre outras comorbidades da DRC (KSHIRSAGAR et al., 2009; ROSSI et al., 2014; TERPSTRA et al., 2016; VAZIRI et al., 2012).

A disfunção endotelial e a inflamação vascular são eventos que estão vinculados com a patogênese de DCVs, tal como a aterosclerose (BRO et al., 2004; HAN et al., 2016a, 2016b; MEIJERS et al., 2009; STINGHEN et al., 2009). De fato, a perda da função renal é acompanhada pelo comprometimento do sistema cardiovascular, estado conhecido como síndrome cardiorenal (LEKAWANVIJIT; KRUM, 2015; RONCO et al., 2009). A calcificação vascular também contribui para esse processo e é comumente identificada nos pacientes com DRC (TEMMAR et al., 2010). Da mesma forma, são encontradas anormalidades na dilatação fluxo-mediada da artéria braquial e na espessura da camada íntima-média de artérias carótidas que são, respectivamente, marcadores de função endotelial e de aterosclerose (RECIO-MAYORAL et al., 2011). Diante desse quadro, estudos clínicos verificaram que pacientes com DRC apresentam maior risco de desenvolver doenças coronárias e insuficiência cardíaca do que indivíduos sem DRC (ANGELANTONIO et al., 2010; BANSAL et al., 2016; FOSTER et al., 2014; GLUBA-BRZÓZKA et al., 2016; MATSUSHITA et al., 2015; TONELLI et al., 2012). Não só isso, mas as DCVs também são consideradas a principal causa de morte em pacientes com DRC (MATSUSHITA et al., 2010; PUN et al., 2007; USRDS, 2016).

Estudos clínicos demonstraram que pacientes com DRC também podem apresentar quadro de acidose metabólica, alteração do metabolismo mineral, distúrbios da tireoide, dislipidemia, anemia e resistência à insulina (BAYRAM et al., 2015; BESARAB et al., 2015; FANG et al., 2014; FRASER et al., 2015; HOSOYA et al., 2014; KDIGO, 2012, 2013a; OHSAWA et al., 2015). Estudos de meta-análises ainda apontam a DRC como um fator de risco para o declínio cognitivo (ETGEN et al., 2012). Além disso, pacientes com DRC possuem maior risco de serem acometidos por acidentes vasculares cerebrais, apresentando uma expectativa de vida reduzida (BANSAL et al., 2016; SELIGER, 2003; TURIN et al., 2012).

Diante do quadro clínico complexo que o paciente com DRC pode apresentar, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado podem retardar a progressão da DRC e o desenvolvimento de comorbidades. No entanto, uma das dificuldades é o fato da doença ser geralmente assintomática nos estágios iniciais. Com o diagnóstico, é necessário o encaminhamento imediato do paciente ao nefrologista para dar início ao tratamento apropriado que requer a adoção de medidas nefroprotetoras, incluindo o controle da pressão arterial e da glicemia (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011; LOCATELLI;

VECCHIO; POZZONI, 2002). Concomitantemente, torna-se necessário identificar, avaliar e tratar as complicações da DRC, principalmente as DCVs (KDIGO, 2013b). Pacientes em estágio 5 são submetidos à hemodiálise ou diálise peritoneal (KDIGO, 2013b; KIRSZTAJN et al., 2014). No entanto, as terapias substitutivas da função renal possuem eficácia limitada visto que corrigem apenas parcialmente a toxicidade urêmica (STINGHEN et al., 2010).

2.2 TOXINAS URÊMICAS

Toxinas urêmicas são compostos que se acumulam no organismo com o declínio da função renal, gerando efeitos nocivos aos sistemas biológicos do mesmo (VANHOLDER et al., 2003). Dessa forma, para ser considerada toxina urêmica, a molécula deve ser quimicamente identificada e quantificada, apresentar níveis plasmáticos aumentados nos indivíduos urêmicos em comparação com não-urêmicos, além de estar correlacionada às manifestações da uremia (GLASSOCK, 2008). Sob essa perspectiva, nas últimas décadas diversos estudos têm sido desenvolvidos para elucidar os efeitos biológicos e os mecanismos fisiopatológicos das toxinas urêmicas.

As toxinas urêmicas podem ser classificadas em três grandes grupos de acordo com suas propriedades físico-químicas e com a capacidade de remoção pela diálise (TABELA 2) (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008).

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DAS TOXINAS URÊMICAS

| Propriedades físico-químicas | Remoção por diálise | Exemplos |
|--|---|---|
| Compostos solúveis com até 500 Da de peso molecular | Fácil remoção | – Ureia (JOURDE-CHICHE et al., 2009); – Ácido úrico (MÜLLER et al., 2004); – Dimetilarginina assimétrica (ADMA) (KIELSTEIN et al., 2002). |
| Compostos com peso molecular acima de 500 Da | Diálise especial com poros maiores para remoção das moléculas | – β 2-microglobulina (OKUNO et al., 2009); – Leptina (OTTONELLO et al., 2004); – Adiponectina (ZOCCALI et al., 2002); – Hormônio da paratireoide (LEVIN et al., 2007). |
| Compostos com alta afinidade a proteínas, geralmente de baixo peso molecular | Difícil remoção | – Indoxil sulfato (POESEN et al., 2013); – <i>p</i> -Cresil sulfato (LIABEUF et al., 2010); – Homocisteína (JOURDE-CHICHE et al., 2009); – Ácido fenilacético (JANKOWSKI et al., 2003); – Ácido hipúrico (ARONOV et al., 2011). |

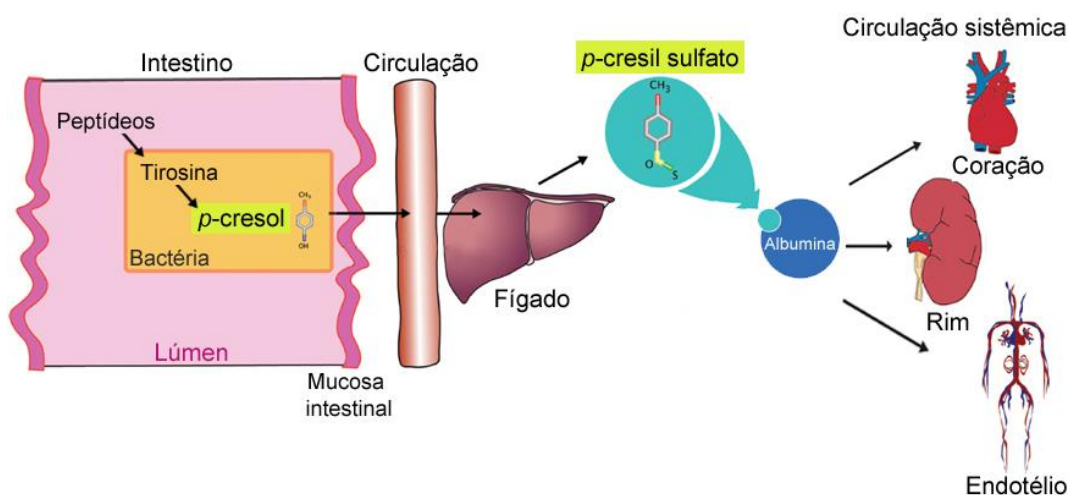
FONTE: adaptado de Vanholder, Van Laecke e Glorieux (2008).

Atualmente 153 compostos estão catalogados como toxinas urêmicas no banco de dados do *European Uremic Toxin Work Group* (EUTOX, 2016). As toxinas com alta afinidade a proteínas, especificamente, ganham notoriedade por possuírem baixa efetividade de remoção por técnicas dialíticas, acumulando-se no organismo do paciente (ITOH et al., 2012; MEYER et al., 2005; SHU et al., 2016). Dentre elas, o *p*-cresil sulfato (PCS) e o indoxil sulfato (IS) se destacam por estarem associados à progressão da DRC e ao desenvolvimento de DCVs (LIN et al., 2015; MELAMED et al., 2013; SHAFI et al., 2015; WU et al., 2011, 2012). Sendo assim, diversos estudos investigaram a toxicidade do PCS e IS a fim de compreender seus mecanismos celulares e moleculares bem como seus efeitos biológicos nas condições urêmicas. Embora ambas toxinas compartilhem de muitos efeitos tóxicos, cada uma apresenta particularidades a respeito de seus mecanismos fisiopatológicos.

2.2.1 *p*-Cresil sulfato (PCS)

O PCS ($C_7H_8O_4S$) é um fenol que apresenta peso molecular de 188,2 Da. Esse composto é derivado da metabolização dos aminoácidos tirosina e fenilalanina provenientes da dieta pela microbiota intestinal, resultando na formação do *p*-cresol (C_7H_8O) (FIGURA 1). Na própria mucosa intestinal ou no fígado após ser absorvido, o *p*-cresol é rapidamente conjugado pelo processo de sulfatação ou glucuronidação formando, respectivamente, PCS ou *p*-cresil glucuronidato. No entanto, os níveis séricos de PCS é superior tanto em relação ao seu precursor *p*-cresol como ao seu co-metabólito *p*-cresil glucuronidato. Dentre essas toxinas, o PCS é considerado o principal responsável pelo efeito biológico em condições urêmicas (LIABEUF et al., 2013; LOOR et al., 2005; POESEN et al., 2016a; VANHOLDER et al., 2011).

FIGURA 1 – FORMAÇÃO DO *p*-CRESIL SULFATO (PCS)



FONTE: adaptado de Meijers e Evenepoel (2011).

Na circulação sistêmica, o PCS pode ser encontrado na forma livre ou ligado ao sítio de ligação Sudlow II da albumina de modo não-covalente (SALDANHA et al., 2016; WATANABE et al., 2012). A depuração renal do PCS é associada à TFG em pacientes com DRC, apresentando declínio da excreção da toxina nos estágios mais avançados da doença (POESEN et al., 2013). A fração livre da toxina,

especificamente, é relacionada como preditor de sobrevida na DRC (LIABEU et al., 2010). Além disso, o PCS é associado ao desenvolvimento de DCVs e à mortalidade em pacientes com DRC (LIN et al., 2014b, 2015). Recentemente, análises de metabólica demonstraram acúmulo de PCS no plasma, no fígado, no coração e nos rins de ratos com DRC (VELENOSI et al., 2016).

A captação celular do PCS é correlacionada aos transportadores de ânions orgânicos (OATs), especialmente as isoformas OAT1 e OAT3 (MIYAMOTO et al., 2011; WATANABE et al., 2013a). Desse modo, o PCS entra na célula e desencadeia diversos efeitos tóxicos que afetam os sistemas biológicos, inclusive as células vasculares. De fato, estudos *in vitro* com células endoteliais de cordão umbilical (HUVECs) demonstraram que o PCS induz de forma dose-dependente a formação de micropartículas, marcador de dano endotelial (MEIJERS et al., 2009). Não só isso, mas o PCS também promoveu nesse mesmo tipo celular a expressão das moléculas inflamatórias e de adesão, tais como MCP-1, ICAM, VCAM e E-selectina (JING et al., 2016; WATANABE et al., 2014). Recentemente, nosso grupo demonstrou *in vitro* que o PCS estimulou a expressão de MCP-1 em células musculares lisas vasculares humanas (MACIEL et al., 2016). Da mesma forma, foi verificado que as concentrações livre e total de PCS estão correlacionadas com os níveis séricos de IL-6 em pacientes com DRC nos estágios 3 e 4 (ROSSI et al., 2014).

O PCS é capaz de provocar o aumento do estresse oxidativo. Estudos *in vitro* demonstraram que o PCS induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células endoteliais e musculares lisas vasculares (JING et al., 2016; WATANABE et al., 2014). Essa indução é associada ao aumento de expressão da Nox4, uma subunidade da NADPH oxidase (NOX), enzima envolvida na regulação da produção de óxido nítrico (NO) (WATANABE et al., 2014). Do mesmo modo, foi verificado *in vivo* um aumento da expressão das subunidades da NOX (Nox1, Nox4 e p22) tanto no nível de RNAm quanto de proteína em aortas de ratos com nefrectomia 5/6 tratados com PCS (JING et al., 2016). O aumento da produção de ROS e da atividade de NOX por PCS também já foi relatado em células do túbulo renal (WATANABE et al., 2013b).

A disfunção endotelial, os processos inflamatórios e o estresse oxidativo são eventos que contribuem para a patogênese da aterosclerose. De fato, os níveis séricos de PCS estão associados à presença de aterosclerose carotídea em pacientes com DRC sob tratamento de hemodiálise. Não só isso, mas também o PCS é

associado à progressão da placa ao longo de cinco anos de acompanhamento desses pacientes (JING et al., 2016). Recentemente, estudos *in vivo* utilizando modelo animal *knockout* de apoE e com nefrectomia 5/6 demonstraram que o PCS induz a formação de placas ateroscleróticas (HAN et al., 2016a, 2016b; JING et al., 2016). No entanto, o efeito aterogênico do PCS foi menor quando os camundongos eram tratados com apocinina, inibidor de NOX (JING et al., 2016). Análises microscópicas das vênulas mesentéricas desses camundongos ainda mostraram que o PCS promoveu maior interação de leucócitos com o endotélio em decorrência da indução da expressão das moléculas inflamatórias e de adesão (HAN et al., 2016b; JING et al., 2016). Esse efeito também foi atenuado pela apocinina (JING et al., 2016). Além disso, o PCS estimulou *in vitro* a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares, processo que resulta na progressão da placa (HAN et al., 2016a). A disfunção vascular causada pela toxicidade urêmica pode levar inclusive ao desenvolvimento de rigidez arterial, afetando a capacidade funcional dos vasos. De fato, os níveis séricos de PCS de pacientes com DRC também foram associados ao aumento da velocidade de onda de pulso (PWV), um marcador de rigidez arterial (ROSSI et al., 2014).

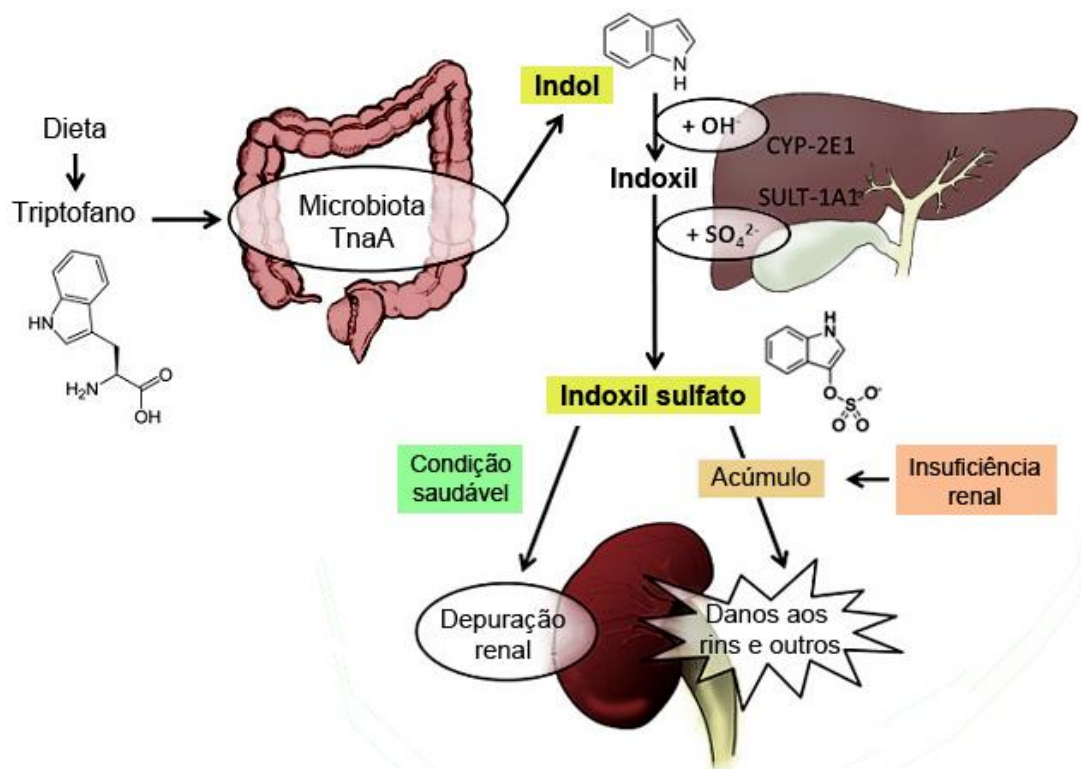
Outro efeito tóxico ao sistema cardiovascular é a indução da apoptose dos cardiomiócitos pelo PCS. Esse evento é acompanhado pelo aumento da atividade da caspase-3, proteína envolvida no processo de morte celular. Da mesma forma, o aumento de apoptose é observado em cortes histológicos de miocárdio de camundongos com nefrectomia 5/6 tratados com PCS (HAN et al., 2015). A partir disso, estudos recentes demonstraram comprometimento das funções cardíacas tanto em modelo animal como em pacientes com DRC (HAN et al., 2015; LU et al., 2016).

O PCS também pode desregular o metabolismo e funções de outros tipos celulares. É o caso dos macrófagos, cuja resposta imune é alterada pelo PCS (AZEVEDO et al., 2016; SHIBA et al., 2016). Nesse exemplo, macrófagos tiveram a produção do mediador pró-inflamatório interleucina-12 (IL-12) suprimida enquanto a citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) foi aumentada na presença da toxina (SHIBA et al., 2016). O PCS também é capaz de induzir a disfunção dos osteoblastos, células responsáveis pela síntese da matriz extracelular do tecido ósseo (TANAKA et al., 2013). Diante da toxicidade do PCS, estudos têm sido desenvolvidos a fim de minimizar os efeitos dessa toxina ou mesmo reduzir a formação da mesma (POESEN et al., 2016b; ROSSI et al., 2016).

2.2.2 Indoxil sulfato (IS)

O IS ($C_8H_7NO_4S$) é um indol com peso molecular de 213,21 Da. Assim como o PCS, o IS é formado a partir da metabolização das proteínas da dieta. Neste caso, o aminoácido triptofano chega ao intestino onde é metabolizado em indol (C_8H_7N) pela microbiota local por meio da atividade da enzima bacteriana triptofanase (TnaA) (LEE; LEE, 2010). Na sequência, o indol é absorvido pela mucosa intestinal. No fígado, o indol é oxidado em indoxil pela citocromo p450 (CYP)-2E1 e sulfatado pela sulfotransferase (SULT)-1A1, resultando na formação de IS (FIGURA 2) (BANOGLU; JHA; KING, 2001; BANOGLU; KING, 2002; MEIJERS et al., 2008). Na circulação sistêmica, o IS é capaz de se ligar por meio de forças eletrostáticas e de Van der Waals ao sítio de ligação Sudlow II (subdomínio IIIA) da albumina, mesmo sítio ao qual se liga o PCS (DEVINE et al., 2014; SALDANHA et al., 2016).

FIGURA 2 – FORMAÇÃO DO INDOXIL SULFATO (IS)



FONTE: adaptado de Ellis et al. (2015).

Em condições saudáveis, o IS é eliminado pela urina. No entanto, pacientes nos estágios mais avançados da DRC apresentam níveis séricos de IS mais elevados devido ao comprometimento da excreção renal da toxina (BARRETO et al., 2009; POESEN et al., 2013; SHU et al., 2016; YOSHIKAWA et al., 2014). O acúmulo de IS em ratos com DRC é detectado no plasma, no fígado, no coração e nos rins (VELENOSI et al., 2016). Da mesma forma que o PCS, o IS é transportado para dentro da célula pelo OAT1 e OAT3 (DEGUCHI et al., 2002; TAKI et al., 2006). Conseqüentemente, manifestações da toxicidade do IS podem ser verificadas nos diferentes sistemas do organismo. De fato, estudos clínicos demonstraram que o IS em concentrações urêmicas é associado ao desenvolvimento de DCVs, à progressão da DRC, às desordens no metabolismo ósseo e aos distúrbios neurológicos (BARRETO et al., 2009, 2014; CAO et al., 2015; WU et al., 2011; YEH et al., 2016).

Diversos estudos foram realizados nos últimos anos a fim de elucidar os mecanismos celulares e moleculares alterados pelo IS. Estudos *in vitro* demonstraram que IS é agonista do receptor de aril hidrocarboneto (AhR) (ADELIBIEKE et al., 2014; GONDOUIN et al., 2013; SCHROEDER et al., 2010). Com a ligação do IS, o AhR é ativado e translocado para núcleo, onde atua como fator de transcrição para diversos genes na forma de heterodímero com o translocador nuclear do AhR (ARNT) (CORRADA et al., 2016; WATANABE et al., 2013c). Conseqüentemente, o IS aumenta a expressão de diversos genes regulados pelo AhR, tais como o citocromo p450 1a1 (Cyp1a1) e a ciclo-oxigenase-2 (PTGS2) (GONDOUIN et al., 2013; ITO et al., 2016). Outro exemplo é a expressão do fator tecidual, também conhecido como tromboplastina, proteína pró-coagulante que pode contribuir para o desenvolvimento da trombose em pacientes com DRC (SHIVANNA et al., 2016). Neste caso, o IS aumenta a expressão do fator tecidual via ativação do AhR em células endoteliais e em células musculares lisas vasculares, efeito que é revertido com o silenciamento do AhR e com a adição de seu inibidor, a geldanamicina (GONDOUIN et al., 2013; NG et al., 2016). Com base nisso, o IS apresenta potencial pró-trombótico na uremia. De fato, os níveis séricos de IS estão correlacionados com uma maior atividade tanto do AhR como do fator tecidual em pacientes com DRC (SHIVANNA et al., 2016).

Outro efeito do IS é o aumento da expressão da molécula de adesão E-selectina pelas células endoteliais, propiciando a interação destas com os leucócitos (ITO et al., 2010). Recentemente, foi demonstrado que esse aumento é em parte

explicado pela ativação da via do AhR nas células endoteliais (ITO et al., 2016). Isso pode ser observado *in vivo* em análises microscópicas de artérias femorais de camundongos tratados com IS que obtiveram maior quantidade de interações entre leucócitos e endotélio do que os camundongos deficientes de AhR (ITO et al., 2016). A regulação da expressão de E-selectina pelo IS também é explicada pela ativação da via do fator de transcrição fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), uma vez que seus inibidores atenuaram a expressão da E-selectina (ITO et al., 2010). Da mesma forma, a regulação da expressão de outras moléculas inflamatórias pode ser mediada pela ativação das vias do AhR e do NF- κ B pelo IS. É o caso do aumento da expressão de MCP-1 e IL-6 em células endoteliais após exposição ao IS (ADELIBIEKE et al., 2014; MASAI et al., 2010; WATANABE et al., 2013c). Além disso, o IS induziu a expressão de ICAM-1 com a ativação de NF- κ B em células endoteliais (TUMUR et al., 2010). De fato, pacientes com DRC nos estágios 3 e 4 apresentam níveis séricos de IS que estão correlacionados positivamente com os níveis séricos de moléculas inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e interferon γ (IFN- γ) (ROSSI et al., 2014).

O estresse oxidativo também é induzido pelo IS. Essa toxina foi capaz de aumentar a produção de ROS nas células endoteliais, efeito que é revertido por antioxidantes (DOU et al., 2007; STINGHEN et al., 2014). Com o aumento do estresse oxidativo pelo IS, houve uma redução da produção de NO pelas células endoteliais (STINGHEN et al., 2014). O IS estimulou, inclusive, a atividade da NADPH oxidase (DOU et al., 2007). Isso também foi verificado em células musculares lisas vasculares junto com o aumento da expressão de Nox4. Ainda nesse tipo celular, o IS e o estresse oxidativo resultante levaram a expressão de proteínas específicas de osteoblastos, como a osteopontina, evento ao qual é associado a calcificação vascular (ADIJIANG et al., 2008; MUTELIEFU et al., 2009).

Além da inflamação vascular e do estresse oxidativo, a toxicidade do IS ao sistema cardiovascular inclui outros danos às células vasculares e cardíacas. Sobre o endotélio, estudos *in vitro* demonstraram que o IS promove a formação de micropartículas e a senescência celular enquanto inibe a proliferação e a capacidade de reparo das células endoteliais humanas (DOU et al., 2004; FAURE et al., 2006; YU; KIM; KANG, 2011). O IS ainda aumentou a permeabilidade do endotélio, rompendo as junções aderentes (PENG et al., 2012). Por outro lado, o IS estimulou a proliferação de células musculares lisas vasculares (MUTELIEFU; ENOMOTO; NIWA, 2009;

SHIMIZU et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2006). Corroborando com esses dados, estudos *in vivo* também demonstraram que o IS está correlacionado com a disfunção vascular (SIX et al., 2015). Já nas células cardíacas, o IS induziu a hipertrofia dos miócitos e a fibrose cardíaca (LEKAWANVIJIT et al., 2010; YISIREYILI et al., 2013).

O IS ainda proporciona efeitos nefrotóxicos. Estudos *in vitro* com células tubulares proximais demonstraram que o IS aumenta a produção de ROS e ativa os fatores de transcrição NF- κ B e p53 (SHIMIZU et al., 2011). Consequentemente, genes regulados por esses fatores de transcrição apresentam sua expressão alterada. É o caso do ICAM-1, cuja expressão, regulada pela p53, é aumentada nos tratamentos com IS das células tubulares renais (SHIMIZU et al., 2013a). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o IS promoveu senescência celular e a fibrose renal (ADIJIANG et al., 2011; SHIMIZU et al., 2010, 2013b; SUN; CHANG; WU, 2012a).

A toxicidade do IS pode ser verificada em outros órgãos e sistemas. Recentemente, foi demonstrado que o IS também promove alterações metabólicas em células do músculo esquelético, o que pode acarretar no desenvolvimento de sarcopenia em pacientes com DRC (SATO et al., 2016). A toxina também é capaz de inibir a diferenciação dos osteoclastos, célula importante para o remodelamento do tecido ósseo (MOZAR et al., 2012). Experimentos com modelo animal verificaram que o IS altera a expressão de genes relógio no sistema nervoso central, o que pode ocasionar distúrbios ao ciclo circadiano (IWATA et al., 2007). Além disso, elevados níveis séricos de IS estão relacionados com perda na função cognitiva em pacientes com DRC em estágio 3 (YEH et al., 2016). O IS também é capaz de ativar neurônios bulboespinais na região rostral ventrolateral bulbar de ratos que, por sua vez, são responsáveis por controlar a pressão arterial, entre outras funções. Essa ativação ocorre porque os neurônios bulboespinais expressam OAT1 e OAT3 (OSHIMA et al., 2015).

2.3 TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs)

2.3.1 Características gerais

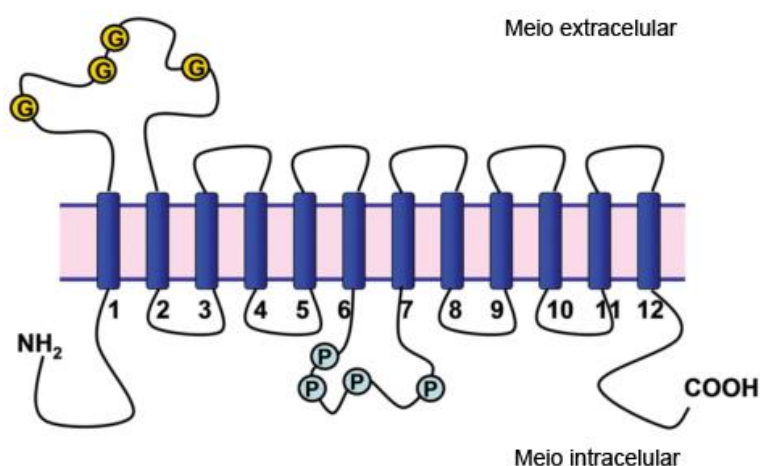
Os OATs formam uma família de proteínas transmembrânicas da superfície celular que, atualmente, incluem as isoformas OAT1–7, OAT10 e o URAT1 encontrados nos humanos, além do OAT8 e OAT9 identificados em outras espécies de vertebrados. Cada isoforma possui distribuição, níveis de expressão e substratos característicos (HONG et al., 2010). Dentre elas, o OAT1 e o OAT3 tem sido correlacionados com a captação celular do PCS e do IS (DEGUCHI et al., 2002; MIYAMOTO et al., 2011; WATANABE et al., 2013a).

Os genes codificantes dos OATs fazem parte da família gênica *Solute Carrier Family 22* (SLC22), conjuntamente com os transportadores de cátions orgânicos (OCTs) e carnitinas/zwitterions (OCTNs) (MIHALJEVIC et al., 2016). O OAT1 e o OAT3 são codificados, respectivamente, pelos genes SLC22A6 e SLC22A8. Nos humanos, ambos os genes estão localizados adjacentes na posição q12.3 do cromossomo 11, distantes por 8,3 quilopares de bases (ERALY; HAMILTON; NIGAM, 2003). Genes ortólogos do OAT1 e OAT3 são encontrados nas demais espécies de vertebrados (MIHALJEVIC et al., 2016). Além disso, estudos evolutivos mostram proximidade filogenética entre os genes SLC22A6 e SLC22A8, cuja origem possivelmente se deve a uma duplicação de um gene ancestral (ASLAMKHAN et al., 2006; HENJAKOVIC et al., 2015; WU et al., 2009; ZHU et al., 2015).

Estruturalmente, os OATs possuem entre 540 e 560 aminoácidos dispostos em 12 domínios transmembrânicos α -hélice, com ambas as terminações NH₂ e COOH no meio citoplasmático. Além disso, apresentam múltiplas glicosilações na alça extracelular entre os domínios 1 e 2 e sítios de fosforilação na alça intracelular entre os domínios 6 e 7 (FIGURA 3) (TANAKA et al., 2004; ZHANG et al., 2008a). Estudos identificaram a importância funcional de determinados aminoácidos e domínios específicos dos OATs. No primeiro domínio transmembrânico, os aminoácidos Leu30 e Thr36 contribuem, respectivamente, no direcionamento do transportador para a

membrana e para o reconhecimento do substrato (HONG; ZHOU; YOU, 2004). Já os domínios transmembrânicos 11 e 12 do OAT1 são essenciais para a funcionalidade e manutenção do transportador na membrana (BAHN et al., 2004). Nestes domínios, os resíduos Tyr490 e Leu503/Leu504 desempenham um papel crucial para a atividade do OAT1 (HONG et al., 2010). A terminação COOH do OAT1, especialmente o aminoácido Glu560, é importante para a manutenção da estrutura terciária da proteína (XU et al., 2006).

FIGURA 3 – MODELO DA ESTRUTURA DE UM TRANSPORTADOR DE ÂNION ORGÂNICO (OAT)



NOTA: G, sítios de glicosilação; P, sítios de fosforilação.
 FONTE: Nigam et al. (2015).

Os OATs são capazes de realizar o transporte mediado de diversos substratos, sendo importantes para a movimentação transcelular de uma variedade de xenobióticos e metabólitos do organismo, inclusive toxinas urêmicas (ENOMOTO et al., 2002b; LIU et al., 2016a; TSURUYA et al., 2016; ZALUPS; AHMAD, 2005). Embora sejam conhecidos pela captação de ânions orgânicos de baixo peso molecular, também são capazes de realizar a captação de outros compostos orgânicos dependendo de suas características físico-químicas e moleculares, tal como a cimetidina que é um cátion (AHN et al., 2009; BURCKHARDT et al., 2003; KALER et al., 2007; LIU et al., 2016b; ZHU et al., 2015). Assim sendo, o OAT1 e o OAT3 são transportadores poliespecíficos que compartilham diversos substratos, tais como *p*-aminohipurato, estrona de sulfato, compostos endógenos (prostaglandinas),

vitaminas, entre outros (HSUEH et al., 2016; KALER et al., 2007; LIU et al., 2016a, 2016c; NIGAM et al., 2015b; WIKOFF et al., 2011). Além disso, o OAT1 realiza a captação de conjugados de mercúrio, contaminante ambiental tóxico (ZALUPS, 2004; ZALUPS; AHMAD, 2005).

Outro aspecto importante dos OATs é a sua capacidade de interagir com drogas utilizadas em tratamentos clínicos, tais como os antibióticos β -lactâmicos (benzilpenicilina), os diuréticos, os antivirais (aciclovir, adefovir), os anti-inflamatórios não esteroides (ibuprofeno), os agentes uricosúricos (probenecida), o ácido carginólico, entre outros (BURCKHARDT, 2012; HOTCHKISS et al., 2015; LIU et al., 2016b; SCHWOB et al., 2014). Muitos desses compostos podem atuar como inibidores dos OATs, como o *probenecid* (Pb), a benzilpenicilina (Bp) e o telmisartan (HOTCHKISS et al., 2015). Diante disso, torna-se importante considerar as potenciais interações dessas drogas devido a sua farmacocinética envolvendo os OATs (TSURUYA et al., 2016).

O OAT1 e o OAT3 são mais expressos nos rins, nos quais desempenham funções que auxiliam na captação e excreção de diversos compostos urêmicos, inclusive das toxinas PCS e IS (ENOMOTO et al., 2002b; HILGENDORF et al., 2007; MIYAMOTO et al., 2011; PRASAD et al., 2016). Ambos os transportadores são expressos na membrana basolateral das células dos túbulos proximais, onde realizam a captação dos substratos da corrente sanguínea e os trocam por dicarboxilatos intracelulares, transporte caracterizado por ser antiporte (BRELJAK et al., 2016; KAUFHOLD et al., 2011; MOTOHASHI et al., 2013). Na sequência, esses compostos podem sair da célula via outros transportadores presentes na membrana apical em direção ao lúmen, pelo qual são excretados na urina. É o caso da proteína de resistência a multidrogas 4 (MRP4), expressa na membrana apical das células tubulares renais e que participa no efluxo celular do PCS (MUTSAERS et al., 2015).

Estudos *in vivo* demonstraram o papel do OAT1 e OAT3 na atividade excretora renal. Em camundongos *knockout* para OAT1 foi verificado o acúmulo de diversos metabólitos no plasma com respectivas baixas concentrações na urina, inclusive de IS (ERALY et al., 2006; WIKOFF et al., 2011). Nesse mesmo modelo animal, células do túbulo proximal renal apresentaram maior resistência ao dano nefrotóxico proveniente da administração de sistêmica de cloreto de mercúrio, metal quando na circulação forma conjugados que servem de substratos aos OATs e

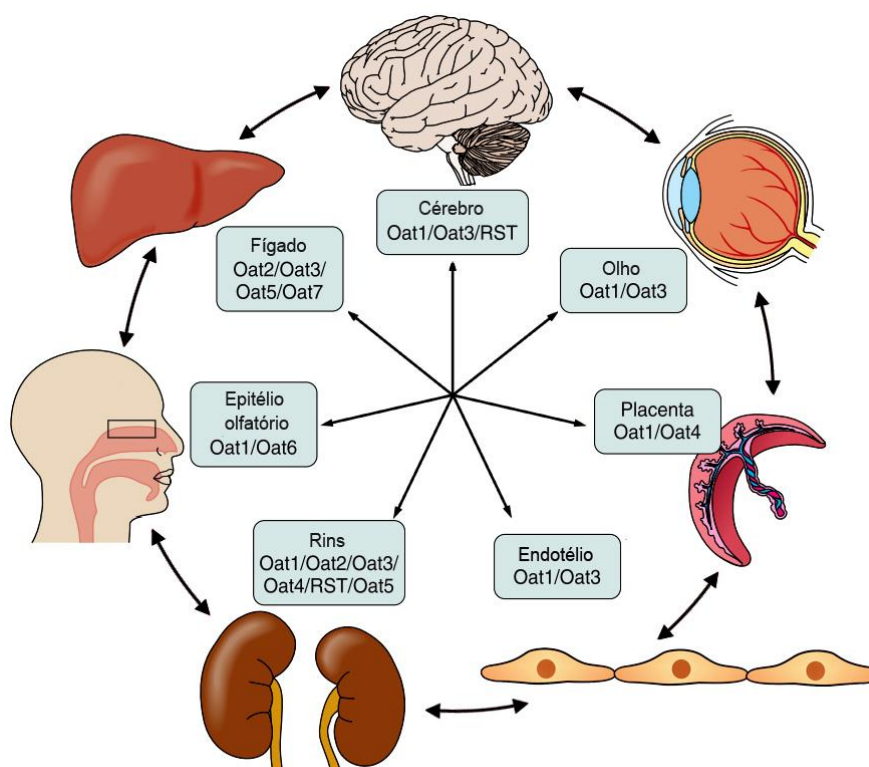
induzem a injúria renal (TORRES et al., 2011; ZALUPS; AHMAD, 2005). Já em camundongos *knouckout* para OAT3, foi encontrado uma redução da captação de *p*-aminohipurato e estrona de sulfato (SWEET et al., 2002). Apesar do OAT1 e OAT3 exercerem funções similares nos rins, experimentos com modelo animal demonstraram que a ausência de um não é totalmente compensada pelo o outro (VALLON et al., 2008).

Além dos rins, OAT1 e OAT3 já foram encontrados no epitélio não pigmentado do corpo ciliar em olhos de humanos e de bovinos (LEE et al., 2015a; ZHANG et al., 2008c). OAT3 também foi detectado nas células endoteliais da retina humana (HOSOYA et al., 2009). Tanto OAT1 como OAT3 foram observados em células de músculo esquelético em humanos (TAKEDA et al., 2004). Ambos inclusive foram identificados no plexo coroide de humanos e camundongos (ALEBOUYEH et al., 2003; NAGLE et al., 2013; SWEET et al., 2002). OAT1 ainda foi detectado no córtex cerebral e no hipocampo de camundongos (BAHN et al., 2005). No entanto, somente OAT1 foi encontrado no epitélio olfatório de camundongos (KALER et al., 2006; MONTE et al., 2004). Em contrapartida, apenas OAT3 foi encontrado expresso em células adrenocorticais humanas (ASIF et al., 2005).

Já nos vasos, verificou-se a presença do OAT3 em células musculares lisas vasculares de ratos (YAMAMOTO et al., 2006). O OAT1 foi detectado também nas células endoteliais vasculares presentes na glândula salivar (IKARASHI; SHIBASAKI; YAMAGUCHI, 2013). Em HUVECs foi observado a presença do RNAm do OAT1 e OAT3 (ITO et al., 2010). Além disso, a expressão do OAT3 foi maior em células endoteliais de capilares cerebrais de ratos e camundongos do que se comparado com essas mesmas células em humanos, demonstrando que existe diferenças de expressão entre espécies (KIKUCHI et al., 2014; UCHIDA et al., 2011).

Outras isoformas de OATs possuem distribuição tecidual distinta. O OAT4 é encontrado principalmente na placenta e na membrana apical das células tubulares dos rins, onde é importante na reabsorção (BLEASBY et al., 2006; CHA et al., 2000). O URAT1 também é encontrado nos túbulos renais (ENOMOTO et al., 2002a). Já o OAT6 é encontrado no epitélio olfatório e nos testículos (KALER et al., 2006; MONTE et al., 2004). O OAT2 e o OAT7 se localizam principalmente no fígado (HILGENDORF et al., 2007; SHIN et al., 2007; SUN et al., 2001). A distribuição tecidual dos OATs é apresentada na Figura 4.

FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DOS OATs



FONTE: adaptado de Nigam et al. (2015).

As diferenças na expressão e abundância de OATs nos tecidos se devem a complexos mecanismos regulatórios epigenéticos, transcricionais e pós-traducionais (JIN et al., 2012; KIKUCHI et al., 2006; OGASAWARA et al., 2007; TANAKA et al., 2004). Diante disso, os OATs acabam desempenhando funções importantes para a manutenção da homeostase ao mediar o transporte de solutos nos diversos tecidos nos quais são expressos (ALEBOUYEH et al., 2003; HILGENDORF et al., 2007; LEE et al., 2015a).

2.3.2 Regulação epigenética

A regulação epigenética dos OATs compreende principalmente a metilação do DNA, evento ao qual é associada a expressão tecido-específica dos OATs. De fato, as regiões promotoras dos genes SLC22A6 e SLC22A8 se encontram hipermetilados

no tecido hepático ao passo que estão hipometilados no tecido renal tanto em humanos como em ratos (JIN et al., 2012). Dessa forma, a metilação do DNA regula negativamente a expressão dos OATs. Isso pode ser observado na supressão pela metilação da atividade do promotor do gene SLC22A8 em células transfectadas, possivelmente por afetar a acessibilidade dos fatores de transcrição HNF1 α e HNF1 β à região promotora (KIKUCHI et al., 2006). Outras proteínas da família dos OATs, tais como o URAT1 e o OAT4, possuem a expressão influenciada pela metilação do DNA (JIN et al., 2012; KIKUCHI et al., 2007).

Fatores de transcrição correlacionados com a expressão de OATs também estão submetidos a eventos epigenéticos de metilação do DNA. É o caso do gene que codifica o fator de transcrição HNF1 α , cujo promotor se encontra hipometilado no fígado e nos rins enquanto está hipermetilado no cérebro de camundongos (KIKUCHI et al., 2010). Outro exemplo é o silenciamento do gene que codifica o HNF1 β pela metilação da região promotora, comumente encontrado em neoplasias (ROSS-ADAMS et al., 2016; TERASAWA et al., 2006). Esse silenciamento leva, por sua vez, a redução da expressão do HNF4 α , fator de transcrição também envolvido da expressão de OATs (TERASAWA et al., 2006).

A metilação do DNA, especificamente, é um evento que pode ser influenciado pela uremia. Análises dos perfis de metilação global em células de sangue periférico demonstraram discrepâncias entre os pacientes dialíticos e indivíduos saudáveis. Essas diferenças epigenéticas dos pacientes com DRC incluem tanto hipermetilação quanto hipometilação em determinadas regiões do DNA, dentre as quais foram encontrados 52 genes relacionados com o desenvolvimento de DCVs (ZAWADA et al., 2012). Diferenças também foram verificadas entre os perfis de metilação de pacientes com diabetes e DRC e pacientes com diabetes sem nefropatia (SAPIENZA et al., 2011). Determinados genes que possuem regulação epigenética foram investigados no contexto da DRC. O gene Klotho, por exemplo, tem sua expressão suprimida pela hipermetilação em células do túbulo renal de camundongos nefrectomizados e tratados com PCS e IS. Já células renais tratadas com essas mesmas toxinas tiveram o aumento da expressão das DNA metiltransferases 1, 3a e 3b, enzimas que promovem a metilação do DNA (SUN; CHANG; WU, 2012b). Outros tipos de modificações epigenéticas já foram investigadas na DRC, mas não no estudo de OATs especificamente.

2.3.3 Regulação transcricional

A expressão dos genes de eucariotos é complexa, envolvendo diversos fatores de transcrição que reconhecem sequências específicas na região promotora do gene, nos *enhancers* ou nas outras regiões reguladoras do DNA, podendo levar ao recrutamento da RNA polimerase II para dar início a transcrição (WINGENDER et al., 2015; YIP et al., 2012). Considerando a relevância desse tipo de regulação, estudos que abordaram a expressão dos OATs identificaram diversos fatores que participam da ativação do processo de transcrição desses genes.

Os fatores de transcrição HNF1 α e HNF1 β estão associados à expressão do OAT1 e do OAT3 (JIN et al., 2012). Esses fatores de transcrição se ligam a sequências conservadas do DNA denominadas de *motifs* de HNF1. Nessas regiões, os fatores podem estar na forma de heterodímero HNF1 α /HNF1 β ou homodímeros de HNF1 α ou de HNF1 β , sendo esta última a forma menos potente para a transativação (KIKUCHI et al., 2006; SAJI et al., 2008). Os *motifs* de HNF1 são encontradas nas posições -56 e -44 na região promotora de SLC22A6 tanto de humanos como de camundongos (SAJI et al., 2008). *Motifs* de HNF1 também são encontrados na região promotora do gene SLC22A8 (KIKUCHI et al., 2006). Em ambos os genes, estudos demonstraram que mutações nesses *motifs* reduzem a atividade do promotor (KIKUCHI et al., 2006; SAJI et al., 2008). Além disso, camundongos com HNF1 α inativado apresentaram uma redução de 82% e 39% dos níveis de RNAm de OAT1 e de OAT3 nos rins, respectivamente, enquanto a expressão de OAT3 aumentou em cinco vezes no duodeno (MAHER et al., 2006). Outros estudos demonstraram que HNF1 regula inclusive a atividade dos promotores dos genes que codificam o OAT4, OAT5, OAT7 e URAT1 (JIN et al., 2012; KLEIN et al., 2010).

O fator de transcrição HNF4 α , também conhecido como NR2A1, também está relacionado com a expressão dos OATs. O promotor do gene SLC22A6, por exemplo, é transativado pelo HNF4 α em humanos. Nesse caso, o HNF4 α forma um homodímero que reconhece os elementos IR-8 e DR-2 no DNA. O primeiro elemento consiste em duas sequências repetidas invertidas, separadas por oito nucleotídeos. O DR-2, por sua vez, corresponde a uma região de repetição direta de AGGTCA, separados por dois nucleotídeos. Atribui-se ao IR-8 a atividade basal do promotor ao

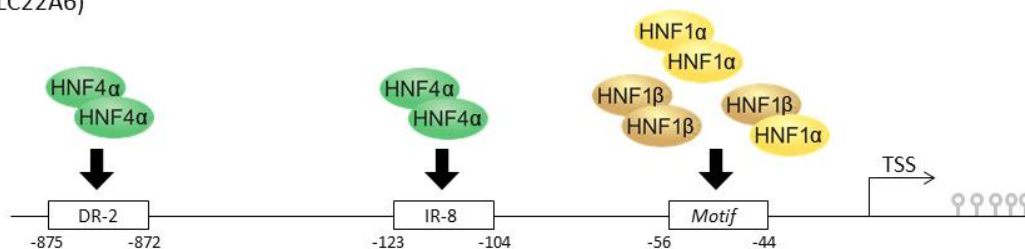
passo que o DR-2 é correlacionado com a superexpressão de OAT1 (OGASAWARA *et al.*, 2007). Ensaio de imunoprecipitação demonstraram que o HNF4 α ocupa de fato as regiões promotoras dos genes SLC22A6 e SLC22A8 durante a maturação dos túbulos proximais renais de ratos. E ainda a expressão tanto dos transportadores como do HNF4 α aumenta no decorrer da nefrogênese (GALLEGOS *et al.*, 2012). Logo, antagonistas do HNF4 α são capazes de reduzir a expressão de OAT1 e OAT3 em rins de ratos (MARTOVETSKY; TEE; NIGAM, 2013). Além dos rins, esse fator se encontra expresso no fígado, no intestino e no pâncreas de mamíferos (HAYHURST *et al.*, 2001; MIQUEROL *et al.*, 1994). Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de HNF4 α e de HNF1 α em fibroblastos embrionários de camundongo induz a expressão de transportadores, como OAT1, URAT1, MATE1, MRP2 e MRP4, e também de proteínas de junções celulares, como ocludinas, claudina 6, ZO-1 e ZO-2 (MARTOVETSKY; BUSH; NIGAM, 2016).

A regulação transcricional de SLC22A8 via *cAMP response element* (CRE) está associada à expressão constitutiva e induzida do OAT3. Esse elemento corresponde a uma região conservada do promotor, ao qual se ligam os fatores de transcrição CREB1 e ATF1 na forma de homodímeros ou heterodímeros. As fosforilações desses fatores pela proteína quinase A (PKA) acarretam no aumento da atividade do promotor e, conseqüentemente, induz a expressão do OAT3 (OGASAWARA *et al.*, 2006). O CREB e o ATF também se ligam às regiões promotoras dos genes ortólogos que codificam o OAT1 e o OAT3 em zebrafish (*Danio rerio*) (MIHALJEVIC *et al.*, 2016). Um esquema geral da regulação transcricional do OAT1 e do OAT3 é apresentado na Figura 5.

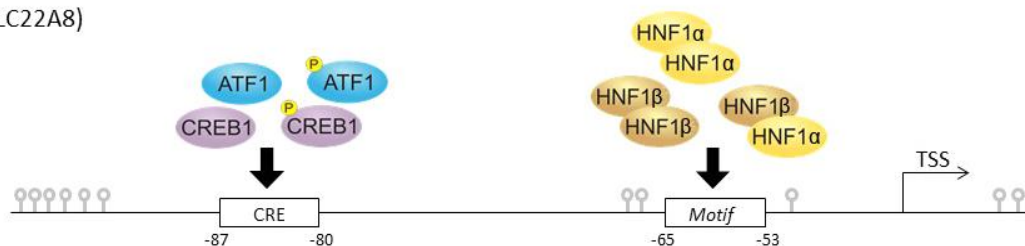
A expressão dependente do sexo de OAT1, de OAT2 e de OAT3 já foi relatada em estudos realizados com ratos e camundongos (BRELJAK *et al.*, 2013; BUIST; CHERRINGTON; KLAASSEN, 2003; BUIST; KLAASSEN, 2004; LJUBOJEVIĆ *et al.*, 2007). De fato, o fator de transcrição *B-cell CLL/lymphoma 6* (BCL6), expresso mais em machos do que em fêmeas, pode ter participação na regulação positiva de OAT1 e OAT3 em células do túbulo proximal de ratos machos (WEGNER *et al.*, 2012). A expressão de ambos os transportadores também é influenciada pelo hormônio sexual testosterona em camundongos (BRELJAK *et al.*, 2013). No entanto, diferenças de expressão de OAT1 e OAT3 dependente do sexo não foram encontradas em humanos (SABOLIĆ *et al.*, 2011).

FIGURA 5 – MODELO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES DE OAT1 E OAT3

(A) OAT1 (SLC22A6)



(B) OAT3 (SLC22A8)



NOTA: TSS, início da transcrição; P, fosforilação; símbolos em cinza, CpGs metilados (citosina metilada seguida de guanina).

FONTE: O autor (2017).

Alterações na expressão dos fatores de transcrição que regulam os OATs já foram relatados em estudos de neoplasias (GROUSSIN et al., 2000; RODÓN et al., 2014; ROSS-ADAMS et al., 2016; TERASAWA et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que ocorre um aumento na expressão tanto no nível de RNAm como de proteína do HNF1α e do HNF4α em hepatócitos de ratos com DRC (SUCAJTYS-SZULC et al., 2016).

2.3.4 Regulação pós-traducional e interações proteína-proteína

A regulação pós-traducional incluem modificações na estrutura da proteína, tais como a glicosilação e a fosforilação que já foram identificados nos OATs. Elas são importantes para a funcionalidade do transportador. De forma similar, a atividade dos

OATs pode ser modulada por interações proteicas (DUAN; WALTHER, 2015; TANAKA et al., 2004; ZHANG et al., 2008a).

Os sítios de glicosilações dos OATs são importantes para o endereçamento e atividade dos transportadores. Isso pode ser verificado na troca do aminoácido asparagina pela glutamina nos sítios de glicosilação do OAT1. Quando essa troca ocorre em apenas um dos sítios, não ocorre alteração na atividade do transportador. Porém, quando isso ocorre em múltiplos sítios simultaneamente, a abundância de OAT1 na membrana reduz significativamente tanto em humanos quanto em ratos, possivelmente devido ao comprometimento do endereçamento do transportador que leva a se acumular nos compartimentos intracelulares (TANAKA *et al.*, 2004). Já o OAT4 tem sua interação pelo substrato afetada com alterações na composição dos oligossacarídeos da glicosilação do transportador (ZHOU *et al.*, 2005).

A atividade dos OATs também é mediada por interações do tipo proteína-proteína. É o caso da proteína quinase C (PKC) que estimula a internalização dos OATs da superfície celular em direção aos compartimentos internos para subsequente reciclagem ou degradação via ubiquitinação. Nesse panorama, o processo de internalização do OAT1 é parcialmente mediado pela via dependente de clatrina e dinamina (ZHANG et al., 2008a). Já a isoforma PKC α promove a ubiquitinação do OAT1, processo que depende dos resíduos Lys297, Lys303 e Lys315 encontrados na alça intracelular entre os domínios 6 e 7 (LI; ZHANG; YOU, 2013). Em contrapartida, a isoforma PKC ζ aumenta a atividade tanto de OAT1 como de OAT3 (BARROS et al., 2009; LI; DUAN; YOU, 2010). Estudos recentes demonstraram que a ubiquitinação tanto do OAT1 como do OAT3 pode ser mediada pela proteína ubiquitina ligase E3 Nedd4-2 (XU et al., 2016; XU; WANG; YOU, 2015). Além disso, dados na literatura sugerem que o OAT3 se encontra localizado em domínios de balsas lipídicas na membrana plasmática de células renais (SRIMAROENG et al., 2013).

2.3.5 Alterações da expressão do OAT1 e do OAT3 no contexto patológico

As condições fisiopatológicas são capazes de alterar a expressão de OATs. No contexto da DRC, estudos demonstraram que ratos com nefrectomia 5/6 apresentaram uma redução significativa da expressão de OAT1 e OAT3 em células renais (NAUD *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2005). O mesmo resultado foi encontrado em células dos túbulos renais de ratos com nefropatia induzida por gentamicina (BAE *et al.*, 2008). Ratos com nefrectomia 5/6 apresentaram uma redução tanto do RNAm quanto da proteína do OAT3 na barreira hematoencefálica (NAUD *et al.*, 2012). No entanto, a administração de IS em ratos nefrectomizados elevou a expressão dos OATs nos túbulos renais, transportadores da toxina aplicada (ENOMOTO *et al.*, 2002b).

Na insuficiência renal aguda induzida pela aplicação em ratos de uma dose nefrotóxica de mercúrio, foi demonstrado um decréscimo de OAT1 e OAT3 tanto em nível de RNAm como de proteína presente na membrana das células renais. Entretanto, os níveis de OAT1 no homogeneizado aumentaram, indicando comprometimento dos mecanismos para a sua degradação (DI GIUSTO *et al.*, 2009). Recentemente, foi verificado que a intoxicação por cádmio, metal nefrotóxico, levou a redução da expressão de OAT1 e OAT3 na membrana basolateral das células renais de ratos (LJUBOJEVIĆ *et al.*, 2016).

No caso da injúria de isquemia e reperfusão renal, observou-se uma elevação nos níveis de RNAm e de proteína do OAT1 e OAT3 no córtex renal e nas membranas basolaterais dos ratos um dia após a operação. Contudo, nos dias subsequentes a expressão decaiu (ZHANG *et al.*, 2008b). De forma similar, estudos em modelo animal com insuficiência renal aguda isquêmica apresentaram redução da expressão de OAT1 e OAT3 nos rins (MATSUZAKI *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2007).

Não apenas complicações que afetam diretamente o rim, mas também doenças em outros tecidos ou órgãos podem alterar a expressão dos OATs. Na obstrução bilateral ureteral, por exemplo, a abundância de OAT1 e OAT3 nas membranas é reduzida no córtex renal. Porém, a expressão de OAT1 é aumentada, indicando internalização do transportador (VILLAR *et al.*, 2005). Ratos com colestase

extra-hepática aguda apresentaram maior abundância de OAT1 e OAT3 na membrana basolateral nos rins (BRANDONI *et al.*, 2006). Já na calcificação vascular, ocorreu um aumento na expressão de OAT1 e OAT3 em células dos túbulos proximais dos rins de ratos com essa condição clínica (BULACIO; HAZELHOFF; TORRES, 2012). Recentemente, foi verificado que a ontogênese e o envelhecimento influenciam a expressão renal de OAT1 e OAT3 em ratos (XU *et al.*, 2017).

Diante das alterações de expressão do OAT1 e OAT3 em contextos patológicos, compreender os mecanismos regulatórios desses transportadores pode auxiliar a esclarecer a toxicidade do PCS e do IS sobre as células endoteliais que exercem importantes funções homeostáticas. Sobre isso, dados da literatura demonstram que o PCS e o IS estão associados à disfunção endotelial e ao desenvolvimento de DCV, tais como a aterosclerose (HAN *et al.*, 2016a; ITO *et al.*, 2010; MEIJERS *et al.*, 2009). Considerando tais evidências, o presente estudo visa analisar os efeitos do PCS e IS em condições urêmicas sobre a expressão de OAT1 e OAT3 e de seus respectivos fatores de transcrição em células endoteliais humanas. Descobertas nessa área podem auxiliar a elucidar os mecanismos fisiopatológicos do PCS e IS a fim de colaborar no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas na DRC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica e a regulação transcricional de OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas após exposição às toxinas urêmicas PCS e IS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a viabilidade celular das células endoteliais humanas após exposição ao PCS e ao IS por 24 horas, na presença ou não de Pb e de Bp, inibidores de OATs;
- ✓ Avaliar a expressão proteica de OAT1 e o OAT3 por *Western Blotting* em células endoteliais humanas tratadas com PCS e IS por 24 horas na presença ou não de Pb e Bp;
- ✓ Analisar por RT-PCR e RT-qPCR a expressão gênica de OAT1, OAT3 e fatores de transcrição (CREB1, ATF1, HNF4 α , HNF1 α e HNF1 β) a eles relacionados em células endoteliais humanas após exposição ao PCS e IS por 24 horas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

As células endoteliais humanas EA.hy926 (ATCC CRL 2922, Virgínia, EUA) foram cultivadas em frascos de cultivo celular contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco, Grand Island, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, EUA) e 1% da solução de penicilina (10000 IU/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco, Grand Island, EUA). Os frascos foram mantidos em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

4.2 TRATAMENTOS DAS CÉLULAS

Para os tratamentos com as toxinas PCS (FAVRETTO et al., 2017) e IS (Sigma, St. Louis, EUA), utilizou-se as concentrações recomendadas pelo *European Uremic Toxin Work Group* (EUTOX, <http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>). Dessa forma, cada toxina foi avaliada em três concentrações: normal (PCS_n = 0,08 mg/L e IS_n = 0,60 mg/L), urêmica (PCS_u = 1,75 mg/L e IS_u = 53,0 mg/L) e máxima urêmica (PCS_m = 2,6 mg/L e IS_m = 236,0 mg/L). Os inibidores de OATs Pb (Sigma, St. Louis, EUA) e Bp (Blau Farmacêutica, São Paulo, Brasil) foram utilizadas nas concentrações 2,5 mM e 1 mM, respectivamente (MIYAMOTO et al., 2011). Vitamina C (Vit C), também conhecido como ácido ascórbico, foi utilizado como antioxidante na concentração de 200 µM (DOU et al., 2007). N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), foi utilizado a 100 µM (STINGHEN et al., 2014).

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada por meio de ensaio colorimétrico utilizando o sal de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma, St. Louis, EUA), conforme Mosmann (1983). Para isso, as células endoteliais foram plaqueadas em placa de cultivo de 96 poços a uma densidade de 10^4 células por poço e incubadas por 18 horas. O meio foi substituído pelos tratamentos com PCS ou IS, com ou sem Pb ou Bp, sendo estes adicionados a cultura celular 1 hora antes das toxinas. Após 24 horas de tratamento, o meio foi trocado por meio novo (90 μ L/poço) e 10 μ L/poço da solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma, St. Louis, EUA). Depois de 4 horas a 37 °C e 5% de CO₂, foi descartado o meio e adicionado 100 μ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, EUA) a fim de dissolver os cristais de formazan. A placa permaneceu quinze minutos sob agitação e, por fim, foi submetida à leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm no leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

4.4 AVALIAÇÃO DE OAT1 E OAT3 POR WESTERN BLOTTING

As células endoteliais foram cultivadas até atingirem confluência em frascos de cultivos e, então, tratadas por 24 horas com PCSm e ISm, com ou sem Pb e Bp, sendo os inibidores pré-incubados 1 hora antes das toxinas. Posteriormente, com o auxílio de uma espátula as células foram soltas do frasco de cultivo em PBS gelado. Após centrifugação por 10 minutos a 1600 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão de lise (1% de Triton-X 100, 150 mM NaCl e 50 mM Tris, pH 8,0), suplementado com inibidores de proteases e fosfatases MS-SAFE (Sigma, St. Louis, EUA). Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14000 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram submetidos a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Califórnia, EUA). O equivalente a 20 μ g de proteínas foi homogeneizado com o tampão da amostra (125 mM Tris-HCl, 10% de SDS, 20% de glicerol e 0,03 mM azul de bromofenol) e aplicados em gel de poliacrilamida-SDS a 15%. Após a

eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e posteriormente incubadas com a solução de bloqueio (3% de caseína e 0,3% de tween 20 em PBS) por 1 hora. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-OAT1 ou anti-OAT3 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) por 18 horas a 4 °C, seguido da incubação com anti-actina (1:5000) (Sigma, St. Louis, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. Na sequência, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit, anti-goat ou anti-mouse (1:10000) (Sigma, St. Louis, EUA) conjugados com HRP por 1 hora a temperatura ambiente. A revelação foi realizada por quimioluminescência utilizando o reagente Amersham ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Os resultados foram interpretados com o auxílio do software Image Studio Lite versão 4.0 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, EUA).

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA total foi isolado das células lisadas com Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram verificadas pela razão da absorbância mensurada a 260 nm e 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose. As moléculas de RNAm foram convertidas em DNA complementar (cDNA), utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 1000 ng do RNA total da amostra. O cDNA foi submetido à análise por RT-PCR para verificar a presença ou ausência da expressão do gene e, posteriormente, ao RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real) para obtenção da quantificação mais precisa dos genes alvos. Para a RT-PCR, o cDNA foi amplificado com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes alvos utilizando o kit de PCR Taq Polymerase Recombinant (Invitrogen, Califórnia, EUA). O produto da PCR foi aplicado em gel de poliacrilamida 8% e corado com nitrato de prata. Para a RT-qPCR, o cDNA foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizando o EvaGreen Master Mix S (Applied Biological Materials, Richmond, Canadá) no termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrália). A expressão relativa dos genes foram analisadas por meio do método

$2^{-\Delta\Delta CT}$, seguindo parâmetros anteriormente preconizados (BUSTIN et al., 2009; HUGGETT et al., 2013; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvos estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA RT-PCR E RT-qPCR

| Gene alvo | Oligonucleotídeos iniciadores | Amplicon |
|------------------|--|-----------------|
| OAT1 | 5'-GGCTGGCATCTCCCTCAACT-3' (F) 5'-ACATAGCCAATCAAGGTGCC-3' (R) | 90 pb |
| OAT3 | 5'-CACCATCCTCTCCTTAAGCTACCT-3' (F) 5'-ACTGTCTCCACGGTCTGCAAGT-3' (R) | 123 pb |
| CREB1 | 5'-GATGGACAGCAGATCTTAGTGCC-3' (F) 5'-TGCTGTGCGAATCTGGTATGTT-3' (R) | 87 pb |
| ATF1 | 5'-GAAGATACACGGGGCAGAAA-3' (F) 5'-CTTGCCAACTGTAAGGCTCC-3' (R) | 146 pb |
| HNF4 α | 5'-ATTGACAACCTGTTGCAGGA-3' (F) 5'-CGTTGGTTCCCATATGTTCC-3' (R) | 109 pb |
| HNF1 α | 5'-TACACCTGGTACGTCCGCAA-3' (F) 5'-CACTTGAAACGGTTCCTCCG-3' (R) | 131 pb |
| HNF1 β | 5'-ACACCTGGTACGTCAGAA-3' (F) 5'-TCTGGACTGTCTGGTTGAAT-3' (R) | 60 pb |
| HPRT | 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' (F) 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' (R) | 101 pb |
| GAPDH | 5'-CTGCACCACCAACTGCTTA-3' (F) 5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3' (R) | 296 pb |

NOTA: F, *forward*; R, *reverse*.

FONTE: O autor (2017).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi realizada o teste de normalidade, seguido dos testes t de Student ou Anova para os dados paramétricos e dos testes de Mann-Whitney ou Anova on Rank's para os dados não paramétricos. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os valores foram expressos com as médias e \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados com auxílio do pacote estatístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

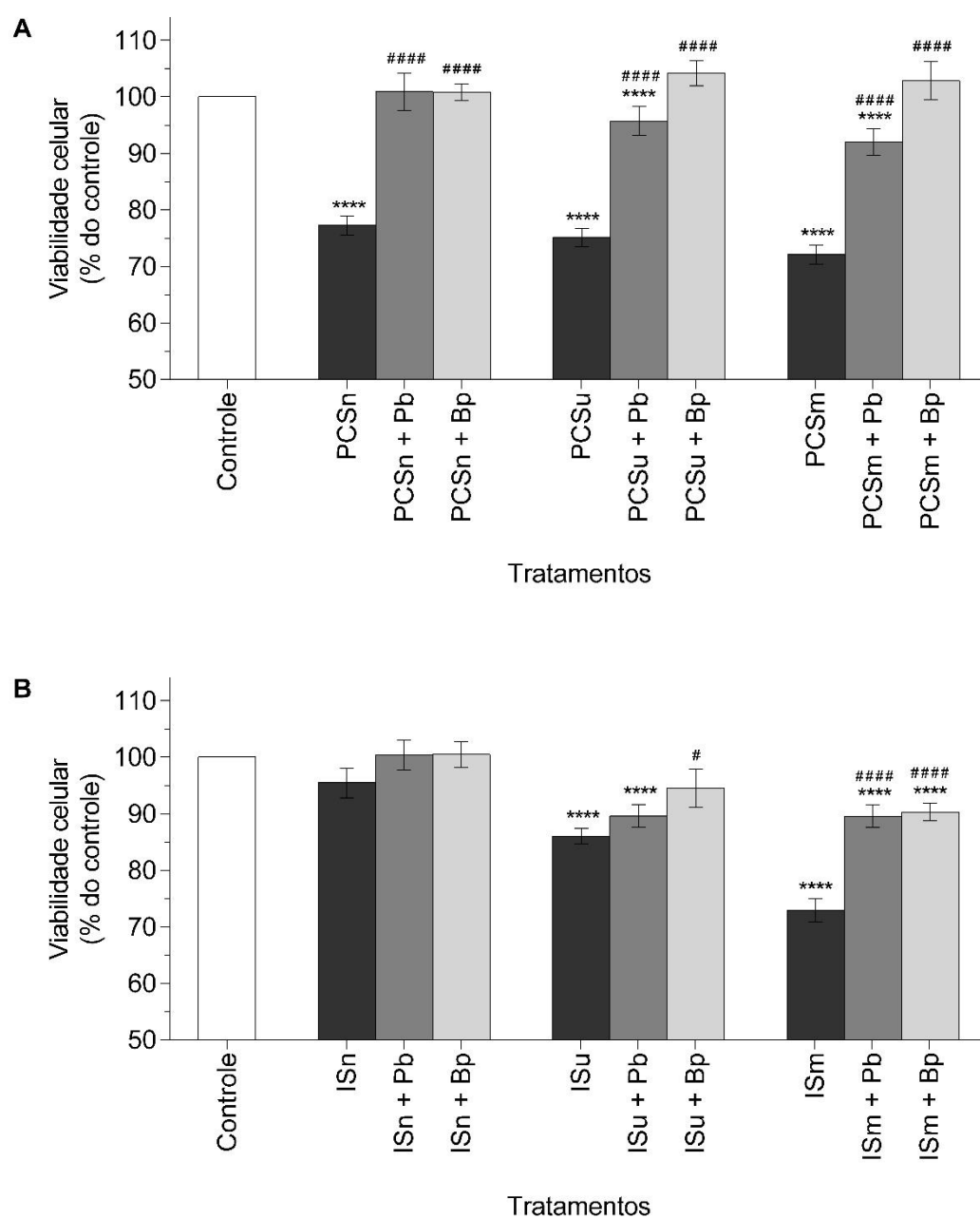
5.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT, no qual as células com metabolismo ativo são capazes de reduzir o sal de MTT em cristais de formazan pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A Figura 6 ilustra que tanto o PCS (FIGURA 6A) como o IS (FIGURA 6B) inibiram significativamente a viabilidade celular de uma forma dose dependente ($P < 0,0001$), sendo mais evidente após o tratamento com IS. Por outro lado, quando as células foram tratadas com as toxinas acrescidas de Pb ou Bp, inibidores de OATs, tiveram sua viabilidade restituída significativamente ($P < 0,01$) se comparado com o tratamento apenas com a toxina.

5.2 AVALIAÇÃO PROTEICA DE OAT1 E OAT3

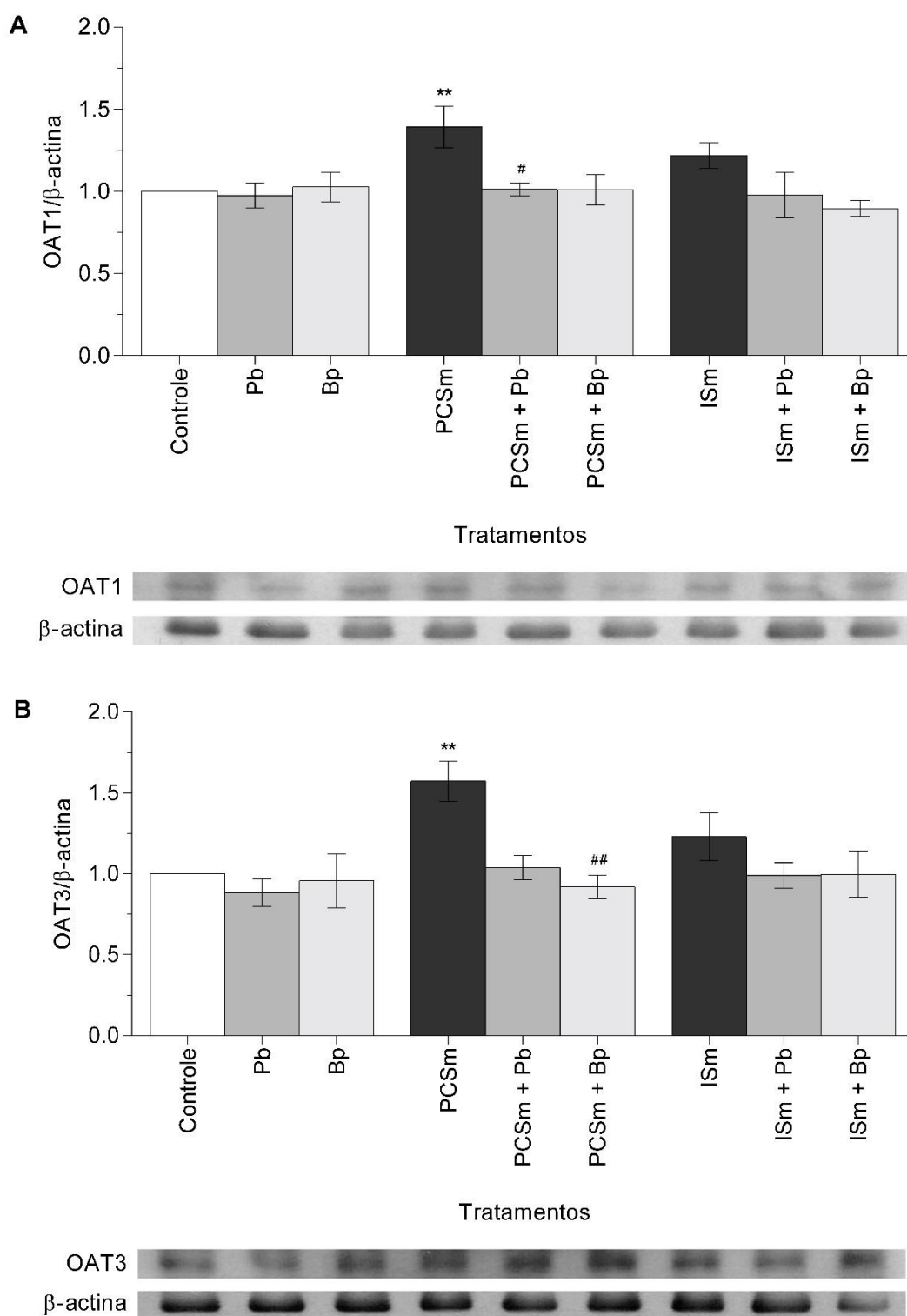
A Figura 7 ilustra a expressão proteica de OAT1 e OAT3 no homogeneizado das células endoteliais humanas por *Western blotting*. Foi encontrado diferença significativa na expressão de OAT1 quando as células foram tratadas com PCS na concentração máxima urêmica em relação ao controle (células sem tratamento) ($P < 0,01$) e em relação ao tratamento com PCS acrescidos de Pb ($P < 0,05$) (FIGURA 7A). Para OAT3, houve diferença significativa no tratamento com PCS na concentração máxima urêmica em relação ao controle ($P < 0,01$) e em relação ao tratamento de PCS acrescido de Bp ($P < 0,01$) (FIGURA 7B). No entanto, não foi observado diferença significativa nos tratamentos com IS em relação ao controle.

FIGURA 6 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS EXPOSIÇÃO AO PCS E IS



NOTA: As células foram tratadas com PCS (A) e IS (B) nas concentrações normal (n), urêmica (u) e máxima urêmica (m) a 37 °C por 24 horas e tratadas com MTT por 4 horas. A viabilidade das células não tratadas (controle) foi considerada 100%. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA on Rank's seguido do teste de Mann-Whitney U e expressos em média \pm EPM de três experimentos independentes (N=3). (A) **** P <0,0001: controle vs PCSn, PCSu, PCSm; #### P <0,001: PCSn vs PCSn + Pb, PCSn + Bp; PCSu vs PCSu + Pb, PCSu + Bp; PCSm vs PCSm + Pb, PCSu + Bp. (B) **** P <0,0001: controle vs ISu, ISm, ISu + Pb, ISm + Pb, ISm + Bp; # P <0,05: ISu vs ISu + Bp; #### P <0,001: ISm vs ISm + Pb, ISm + Bp. Todos os P <0,0001 (ANOVA).
 FONTE: O autor (2017).

FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DE OAT1 E OAT3 POR WESTERN BLOTTING



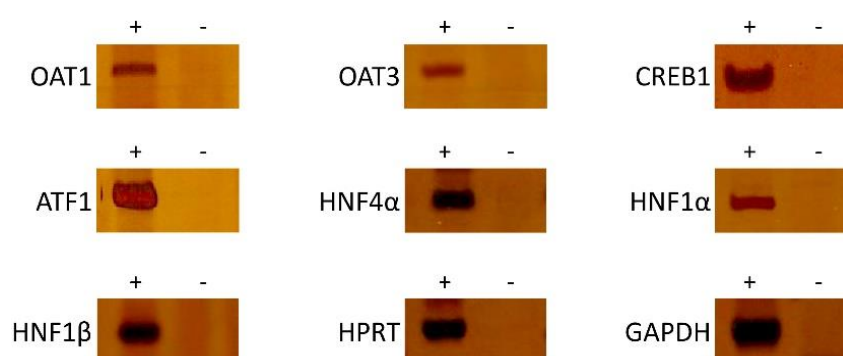
NOTA: Detecção de OAT1 (A) e OAT3 (B) no homogeneizado de células endoteliais após tratamento por 24 horas com PCS ou IS, com ou sem Pb ou Bp. Os dados foram expressos pela razão dos níveis de densitometria de OAT1 ou OAT3 pela proteína constitutiva β -actina e analisados pelo teste de ANOVA on Rank's seguido do teste de Mann-Whitney U. Os valores se referem a média \pm EPM de cinco experimentos independentes (N=5). (A) ** $P < 0,01$: controle vs PCSm; # $P < 0,05$: PCSm vs PCSm + Pb; todos os $P < 0,05$ (ANOVA). (B) ** $P < 0,01$: controle vs PCSm; ## $P < 0,01$: PCSm vs PCSm + Bp; todos os $P < 0,005$ (ANOVA).

FONTE: O autor (2017).

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica do OAT1 e do OAT3 e de seus fatores de transcrição CREB1, ATF1, HNF4 α , HNF1 α e HNF1 β foram detectadas por RT-PCR nas células endoteliais (FIGURA 8).

FIGURA 8 – EXPRESSÃO DE GENES DETECTADOS POR RT-PCR

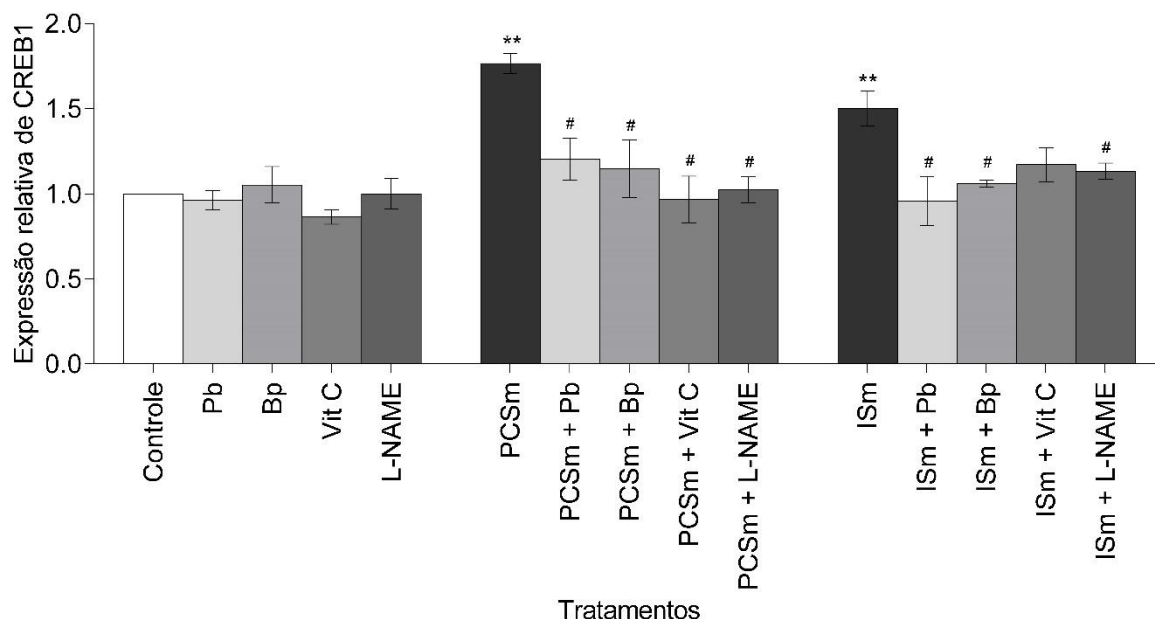


NOTA: Expressão de OAT1 (90 pb), OAT3 (123 pb), CREB1 (87 pb), ATF1 (146 pb), HNF4 α (107 pb), HNF1 α (131 pb), HNF1 β (60 pb), HPRT (101 pb) e GAPDH (296 pb) em células endoteliais controle (não tratadas). Detecção do produto de PCR em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. (+) cDNA das células endoteliais; (-) sem cDNA.

FONTE: O autor (2017).

Realizou-se a análise da expressão gênica por RT-qPCR dos fatores de transcrição CREB1, ATF1 e HNF4 α nas células endoteliais humanas, tratadas ou não por 24 horas com as toxinas PCS e IS na concentração máxima urêmica, na presença ou ausência de Pb, Bp, Vit C ou L-NAME. Dessa forma, foi possível verificar um aumento significativo ($P < 0,01$) na expressão de CREB1 nos tratamentos com PCS e com IS em relação ao controle. No entanto, esse aumento foi revertido de forma significativa ($P < 0,05$) nos tratamentos com PCS acrescidos de Pb, Bp, Vit C e L-NAME assim como nos tratamentos com IS acrescidos de Pb, Bp e L-NAME (FIGURA 9).

FIGURA 9 – EXPRESSÃO RELATIVA DE CREB1 DETERMINADA POR RT-qPCR



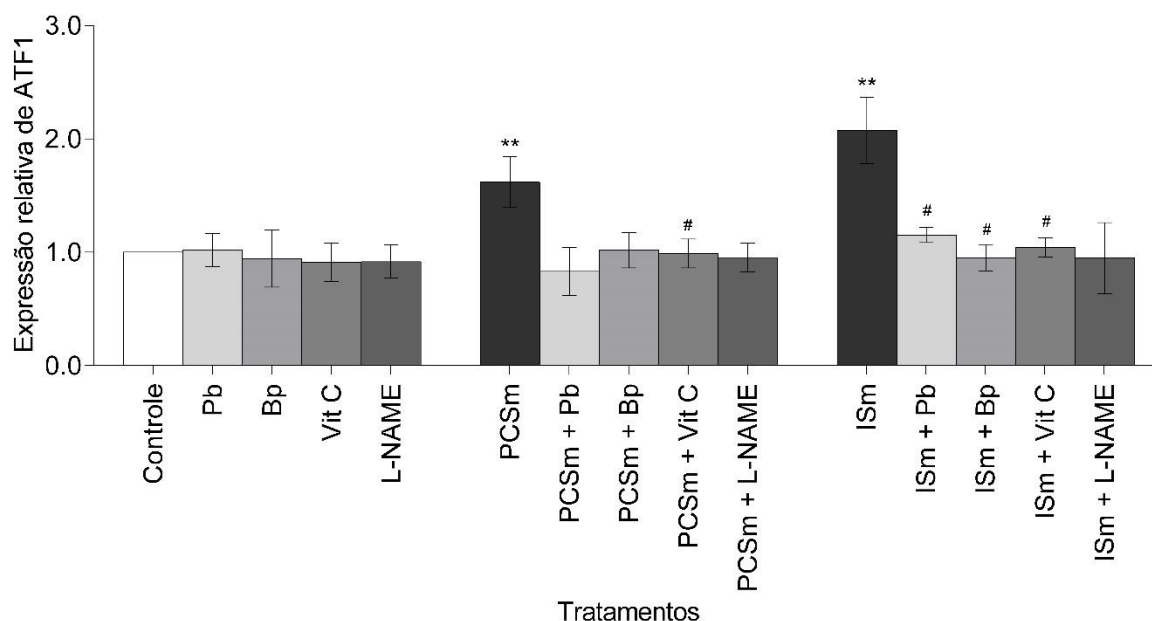
NOTA: Expressão relativa de CREB1 pelas células endoteliais humanas não tratadas (controle) ou tratadas com PCSm, ISm, Pb, Bp, Vit C ou L-NAME por 24 horas. A expressão relativa do RNAm foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o HPRT como gene normalizador. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA on Rank's seguido do teste de Mann-Whitney U. Os valores se referem a média \pm EPM de quatro experimentos independentes (N=4). ** $P < 0,01$: controle vs PCSm, ISm; # $P < 0,05$: PCSm vs PCSm + Pb, PCSm + Bp, PCSm + Vit C, PCSm + L-NAME, ISm vs ISm + Pb, ISm + Bp, ISm + L-NAME. Todos os $P < 0,0001$ (ANOVA).

FONTE: O autor (2017).

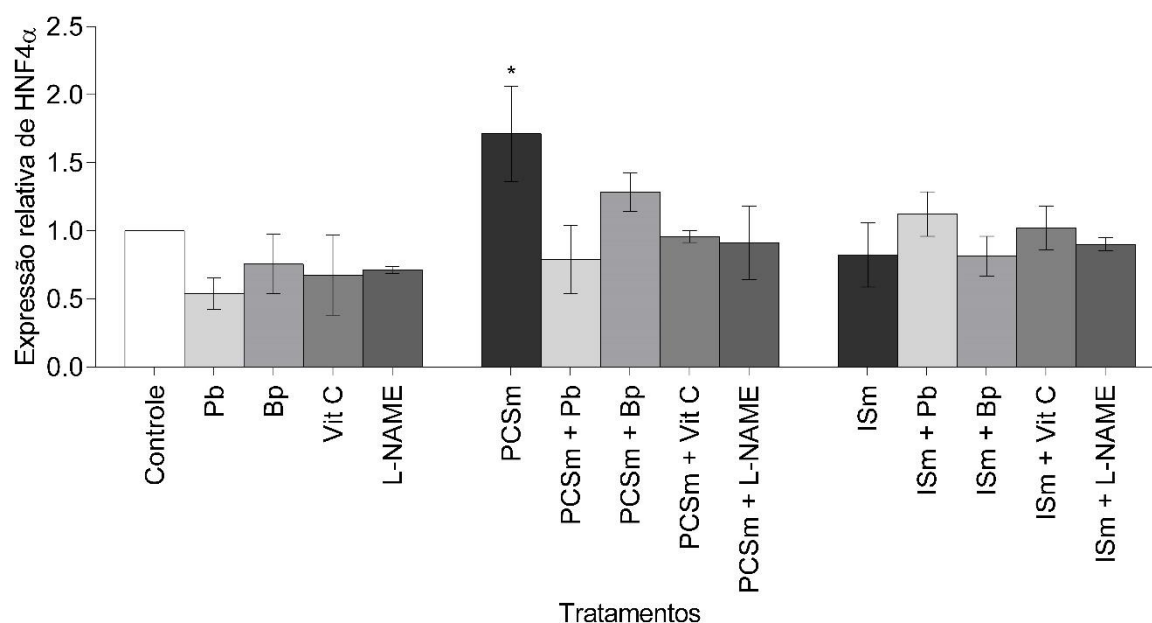
A expressão de ATF1 também aumentou de forma significativa ($P < 0,01$) nos tratamentos com PCS e IS em comparação com o controle. Entretanto, a expressão de ATF1 foi restaurada significativamente ($P < 0,05$) nos tratamentos com IS acrescidos de Pb, Bp e Vit C, e também nos tratamentos com PCS acrescidos de Vit C (FIGURA 10).

O HNF4 α , por sua vez, teve a sua expressão aumentada significativamente ($P < 0,05$) apenas nos tratamentos com PCS em relação ao controle. Por outro lado, não foi observado diferença significativa entre o controle e o tratamento com IS (FIGURA 11).

FIGURA 10 – EXPRESSÃO RELATIVA DE ATF1 DETERMINADA POR RT-qPCR



NOTA: Expressão relativa de ATF1 pelas células endoteliais humanas não tratadas (controle) ou tratadas com PCSm, ISm, Pb, Bp, Vit C ou L-NAME por 24 horas. A expressão relativa do RNAm foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o HPRT como gene normalizador. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA on Rank's seguido do teste de Mann-Whitney U. Os valores se referem a média \pm EPM de quatro experimentos independentes (N=4). ** $P < 0,01$: controle vs PCSm, ISm; # $P < 0,05$: PCSm vs PCSm + Vit C, ISm vs ISm + Pb, ISm + Bp, ISm + Vit C. Todos os $P < 0,001$ (ANOVA). FONTE: O autor (2017).

FIGURA 11 – EXPRESSÃO RELATIVA DE HNF4 α DETERMINADA POR RT-qPCR

NOTA: Expressão relativa de HNF4 α pelas células endoteliais humanas não tratadas (controle) ou tratadas com PCSm, ISm, Pb, Bp, Vit C ou L-NAME por 24 horas. A expressão relativa do RNAm foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o HPRT como gene normalizador. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA on Rank's seguido do teste de Mann-Whitney U. Os valores se referem a média \pm EPM de três experimentos independentes (N=3). * $P < 0,05$: controle vs PCSm. FONTE: O autor (2017).

Os resultados da análise gênica dos fatores de transcrição foram sumarizados na Tabela 4.

TABELA 4 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CREB1, ATF1 E HNF4 α

| Gene | Tratamentos | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|----|----|-------|--------|------|-----------|-----------|--------------|---------------|-----|----------|----------|-------------|--------------|
| | Controle | Pb | Bp | Vit C | L-NAME | PCSm | PCSm + Pb | PCSm + Bp | PCSm + Vit C | PCSm + L-NAME | ISm | ISm + Pb | ISm + Bp | ISm + Vit C | ISm + L-NAME |
| CREB1 | = | = | = | = | = | ++ | = | = | = | = | + | = | = | = | = |
| ATF1 | = | = | = | = | = | + | = | = | = | = | ++ | = | = | = | = |
| HNF4 α | = | = | = | = | = | ++ | = | = | = | = | = | = | = | = | = |

NOTA: Expressão de CREB1, ATF1 e HNF4 α em relação ao controle. (=) sem alteração; (+) expressão induzida moderada; (++) expressão induzida acentuada.

FONTE: O autor (2017).

6 DISCUSSÃO

As toxinas urêmicas PCS e IS têm sido associadas à disfunção endotelial que contribui para o desenvolvimento de DCVs em pacientes com DRC, inclusive a aterosclerose. O presente estudo demonstrou que o PCS e o IS foram capazes de reduzir a viabilidade das células endoteliais humanas. No entanto, apenas PCS aumentou de forma significativa a expressão de OAT1 e de OAT3. O Pb e o Bp, dois inibidores de OATs, reverteram os efeitos de PCS e IS, demonstrando de forma indireta a importância desses transportadores na captação de ambas toxinas. Esses resultados corroboram com dados da literatura que associam o OAT1 e OAT3 à captação celular de PCS e IS (FAVRETTO et al., 2017; MIYAMOTO et al., 2011). Além disso, demonstrou-se nas células endoteliais que o PCS e o IS induzem a expressão de CREB1 e de ATF1 enquanto apenas o PCS induz a expressão de HNF4 α , fatores de transcrição que participam da regulação gênica de OAT1 e OAT3.

Os nossos resultados demonstraram que a viabilidade das células endoteliais foi reduzida após 24 horas de tratamentos com PCS e IS de forma dose-dependente. No entanto, a viabilidade foi restabelecida na presença de Pb ou Bp. Similarmente, Lee et al. (2015) demonstraram que o IS reduz a viabilidade de células endoteliais de forma dose-dependente. Tanaka et al. (2013) observaram que o PCS e o IS também diminuíram a viabilidade de osteoblastos e induziram a fragmentação do DNA, marcador de apoptose. Já em células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), Kim et al. (2013) verificaram redução da viabilidade após 72 horas de incubação com IS, sendo restabelecida com Pb ou com os antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC) e probucol. Do mesmo modo, Watanabe et al. (2013b) demonstraram que o PCS diminuiu a viabilidade de células renais (HK-2) que também foi revertida com o Pb e NAC. Além disso, Wang et al. (2014) mostraram que o IS reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente em células mesangiais renais apenas em tempos de incubação superiores a 24 horas. No entanto, a viabilidade não é sempre diminuída em outros tipos celulares. Schepers et al. (2007) mostraram que o PCS não influenciou a viabilidade de leucócitos. Adesso et al. (2013) também verificaram que a viabilidade de macrófagos J774A.1 não é alterada por IS. Da mesma maneira, Shiba et al. (2016)

não encontraram diferenças na viabilidade de macrófagos RAW264.7 tratados com PCS.

A expressão proteica de OAT1 e o OAT3 foi avaliada por *Western blotting*. Neste estudo, observou-se um aumento de OAT1 e OAT3 quando as células foram tratadas com PCS. De forma similar, Favretto et al. (2017) verificaram *in vitro* o aumento de OAT1 nos tratamentos com PCS em concentrações urêmicas em células endoteliais por imunocitoquímica e *Western blotting*. Esses autores ainda demonstraram por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a captação de PCS e IS pelas células endoteliais, efeito que foi inibido pelo Pb. Já em modelo animal, Enomoto et al. (2002) verificaram pela técnica de imuno-histoquímica o aumento de OAT1 e OAT3 nos túbulos renais em ratos nefrectomizados tratados com IS por via oral ao longo de 10 semanas. Diante disso, sugere-se que o PCS e o IS podem hipoteticamente modular a regulação da expressão do OAT1 e do OAT3.

A regulação do OAT1 e OAT3 é complexa, incluindo mecanismos epigenéticos, transcricionais e pós-traducionais. Dentre os mecanismos regulatórios que alteram a expressão gênica dos OATs estão os fatores de transcrição, importantes na ativação ou repressão de genes em eucariotos. Nesse panorama, no presente estudo analisamos a expressão gênica dos fatores de transcrição CREB1, ATF1 e HNF4 α que estão envolvidos na regulação do OAT1 e OAT3 (JIN et al., 2012; OGASAWARA et al., 2006, 2007; SAJI et al., 2008).

O fator de transcrição CREB1 apresentou um aumento de expressão nas células endoteliais tratadas com PCS e IS em concentrações urêmicas, como demonstramos por RT-qPCR. Da mesma forma, Shimizu et al. (2013) observaram que o IS aumenta a expressão de CREB via NF- κ B em células renais do túbulo proximal humano (HK-2). Esses autores verificaram que a expressão induzida de CREB é atenuada quando os tratamentos com IS eram feitos com *small interfering* RNA (siRNA) de NF- κ B ou com o antioxidante NAC, demonstrando também uma participação do estresse oxidativo na regulação. Esse estudo ainda mostrou que o IS induz de forma tempo-dependente a fosforilação da Ser133 do CREB, sítio correlacionado com seu aumento da atividade (NAQVI; MARTIN; ARTHUR, 2014). Conseqüentemente, Shimizu et al. (2013) analisaram a expressão de angiotensinogênio (AGT), cujo gene é regulado por CREB assim como os genes dos

OATs. Com isso, os autores observaram que o IS aumenta a expressão de AGT, efeito que é revertido nas células transfectadas com siRNA de CREB.

Nas células endoteliais, o CREB já foi descrito na ativação de importantes vias, inclusive na resposta inflamatória. Hadad et al. (2011) demonstraram que a ativação de CREB está envolvido no aumento de expressão de ICAM-1 em conjunto com a ativação do NF- κ B. Recentemente, Pozzobon et al. (2016) verificaram que o CREB contribui para a indução da produção da interleucina-8 (IL-8). Além disso, o CREB é um importante fator para a diferenciação das células endoteliais (YAMAMIZU et al., 2012). Nas patologias humanas, especificamente, a regulação e ativação de CREB tem sido estudada em diversos tipos de neoplasias (CHANG et al., 2015; KIKUCHI; TANIMOTO; NAKAYAMA, 2016; PARK et al., 2016).

O ATF1 é um fator de transcrição expresso nas células endoteliais com capacidade de se ligar a região CRE do promotor do OAT3 na forma de homodímero ou heterodímero com CREB1 (MAYO et al., 2001; OGASAWARA et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que a expressão de ATF1 foi maior nos tratamentos com PCS e IS. Shi et al. (2011) demonstraram que a ativação de ATF1 está correlacionado com o aumento de expressão de Nox1, uma das subunidades da NADPH oxidase, em células musculares lisas vasculares após indução por aldosterona. De fato, o silenciamento do ATF1 atenua a expressão induzida de Nox1 (KATSUYAMA et al., 2005; STANIC; KATSUYAMA; MILLER, 2010). Uma maior expressão de Nox1 já foi relatada em células vasculares de ratos com nefrectomia 5/6 tratados com PCS (JING et al., 2016).

O HNF4 α é um fator de transcrição conhecido pela sua atividade na regulação da diferenciação e função do hepatócito (MENG et al., 2016; WANG; BURKE, 2013). No entanto, esse fator também é expresso em outros tecidos e tipos celulares, tais como intestino, rins, células β pancreáticas, leucócitos e células endoteliais (FARKAS et al., 2015; JIANG et al., 2013; YAMAGUCHI et al., 2014; YILMAZ et al., 2011). O HNF4 α induz a transcrição de OAT1 se ligando aos elementos IR-8 e DR-2 da região promotora do gene (MARTOVETSKY; BUSH; NIGAM, 2016; OGASAWARA et al., 2007). Gallegos et al. (2012) demonstraram por imunoprecipitação que o HNF4 α ocupa sítios da região promotora dos genes codificantes de OAT1, OAT3 e do transportador de cátions orgânicos 1 (OCT1) em células renais de ratos. Os nossos resultados mostraram por RT-qPCR que os tratamentos com PCS induziram a

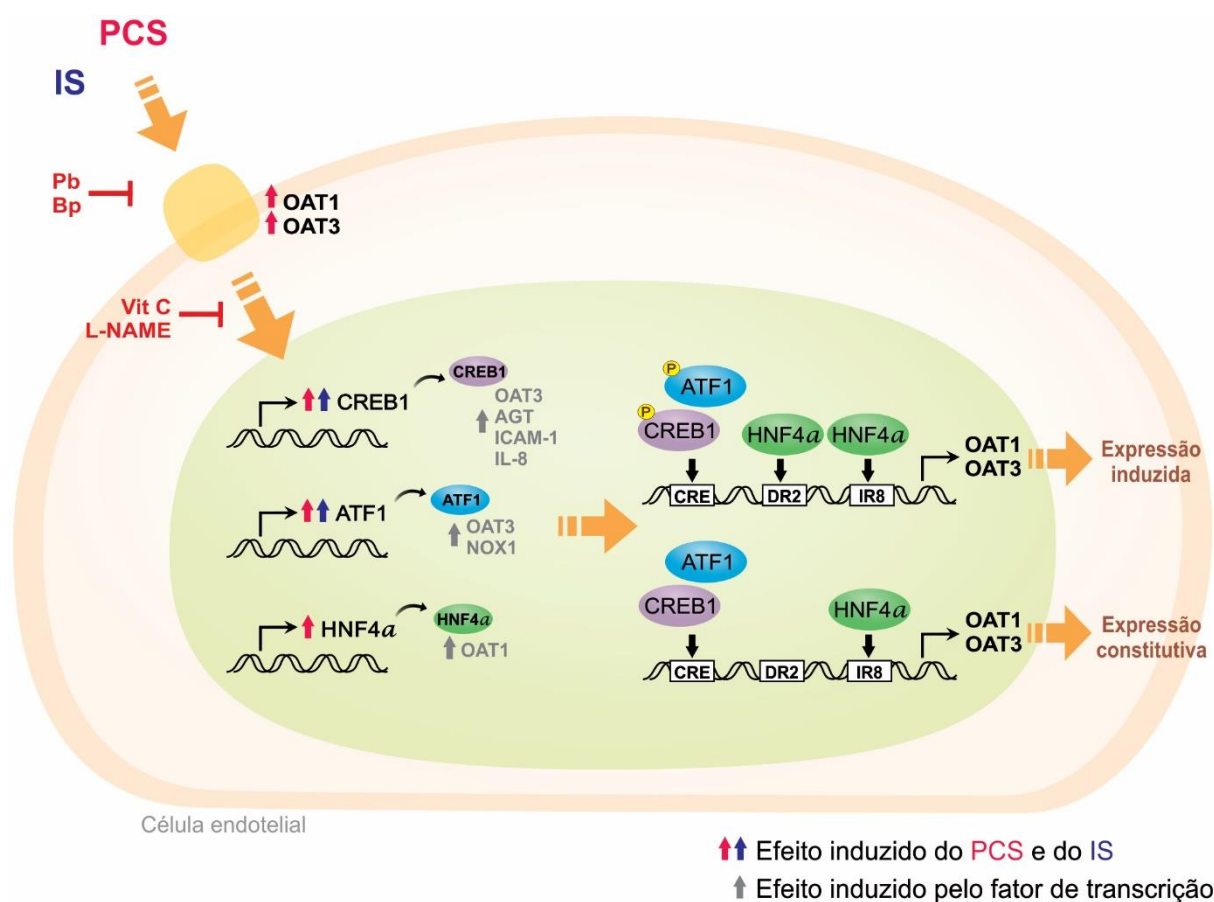
expressão do HNF4 α nas células endoteliais. No modelo *in vivo*, Sucajtys-Szulc et al. (2016) também demonstraram que o HNF4 α bem como o HNF1 α teve sua expressão aumentada em hepatócitos de ratos com nefrectomia 5/6. Dados da literatura sugerem que o estresse oxidativo possa interferir na expressão de HNF4 α . Sobre isso, Qadri et al. (2006) verificaram que os pró-oxidantes peróxido de hidrogênio (tH₂O₂) e terc butil hidroquinona (tBHQ) induziram a atividade do promotor do gene do HNF4 α transfectado em células de hepatocarcinoma humano. Os autores ainda observaram a inibição da expressão da atividade do promotor de HNF4 α quando as células foram tratadas com o antioxidante NAC. Além disso, dados da literatura demonstraram a indução da expressão do HNF4 α em células endoteliais tratadas com soro pós-prandial com dieta hiperlipídica (DEJEANS et al., 2010).

O PCS e IS são capazes de induzir o estresse oxidativo e a produção de moléculas inflamatórias, desregulando a homeostase do endotélio. Diante disso, investigamos a regulação gênica do OAT1 e OAT3 bem como seus fatores de transcrição nas células endoteliais. No entanto, este estudo apresenta limitações que incluem o uso de células de linhagem e a necessidade de analisar outros fatores de transcrição e mecanismos regulatórios envolvidos na regulação dos OATs.

Nossos dados demonstraram que o PCS é capaz de induzir a expressão proteica de OAT1 e OAT3 e expressão gênica de HNF4 α , o que pode indicar que esse fator seja determinante para a indução da expressão dos transportadores. Já o PCS e o IS induzem a expressão gênica de CREB1 e ATF1. Esses fatores de transcrição participam da regulação da transcrição dos OATs e também de outros genes importantes (FIGURA 12). Nesse contexto, sugerimos que as toxinas urêmicas, tais como o PCS e IS, têm potencial para modular o transcriptoma e, dessa forma, modificar o fenótipo celular. De fato, essas alterações podem ser correlacionadas com manifestações clínicas observadas nos pacientes com DRC, como é o caso da indução da resposta inflamatória. No entanto, alterações na expressão gênica não exclui que outros mecanismos estejam envolvidos no processo de regulação. É o caso das alterações pós-traducionais que influenciam a atividade da proteína, tais como as fosforilações. Estudos futuros nessa área, com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos na regulação dos OATs bem como sua importância na captação celular das toxinas PCS e IS, podem contribuir para a identificação de potenciais alvos

terapêuticos e, dessa forma, amenizar os efeitos deletérios das toxinas urêmicas nos pacientes com DRC.

FIGURA 12 – MODELO ESQUEMÁTICO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS PELO PCS E IS NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS



NOTA: As toxinas PCS e IS entram na célula via OAT1 e OAT3, efeito que é revertido com Pb e Bp. O PCS e o IS induzem a expressão dos fatores de transcrição CREB1 e ATF1, enquanto apenas o PCS induz a expressão do HNF4α. Esses fatores de transcrição participam da regulação de diversos genes. O CREB1 e o ATF1 quando fosforilados aumentam a expressão dos OATs. Já o HNF4α depende do elemento regulatório do DNA ao qual se liga. Neste caso, o IR8 é responsável pela expressão constitutiva enquanto o DR2 pela expressão induzida dos OATs. O PCS também aumenta a expressão do OAT1 e OAT3.

FONTE: O autor (2017).

7 CONCLUSÃO

- ✓ A viabilidade das células endoteliais humanas foi reduzida após exposição ao PCS e IS nas concentrações urêmicas por 24 horas, sendo restabelecida na presença de Pb e Bp, inibidores de OATs;
- ✓ A expressão proteica de OAT1 e OAT3 teve um aumento nas células endoteliais tratadas com PCS na concentração máxima urêmica verificado por *Western blotting*;
- ✓ A expressão gênica, analisada por RT-qPCR, do CREB1 e do ATF1 apresentou um aumento nas células tratadas com PCS e IS, já o HNF4 α teve um aumento apenas no tratamento com PCS.

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar a expressão gênica de OAT1 e OAT3 por RT-qPCR;
- ✓ Avaliar vias de ativação intracelulares que hipoteticamente podem ser ativadas pelo PCS e IS, como é o caso da via do AhR;
- ✓ Analisar a o efeito do PCS e IS sobre as fosforilações de CREB1 e de ATF1;
- ✓ Realizar o silenciamento dos genes OAT1, OAT3 e fatores de transcrição a fim de verificar a participação dessas proteínas na captação celular do PCS e IS e regulação dos OATs;
- ✓ Avaliar outros potenciais fatores de transcrição que participam da regulação do OAT1 e do OAT3.

REFERÊNCIAS

ADELIBIEKE, Y. et al. Indoxyl Sulfate Induces IL-6 Expression in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells through OAT3-Mediated Uptake and Activation of AhR/NF- κ B Pathway. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 128, n. 1–2, p. 1–8, 2014.

ADESSO, S. et al. The Uremic Toxin Indoxyl Sulphate Enhances Macrophage Response to LPS. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

ADIJIANG, A. et al. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 23, n. 6, p. 1892–901, jun. 2008.

ADIJIANG, A. et al. Indoxyl sulfate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. **Journal of Renal Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 105–109, 2011.

AHN, S. Y. et al. Interaction of organic cations with organic anion transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31422–31430, 2009.

ALEBOUYEH, M. et al. Expression of Human Organic Anion Transporters in the Choroid Plexus and Their Interactions With Neurotransmitter Metabolites. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p. 430–436, 2003.

AMDUR, R. L. et al. Article Inflammation and Progression of CKD: The CRIC Study. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 1–11, 2016.

ANGELANTONIO, E. DI et al. Chronic kidney disease and risk of major cardiovascular disease and non-vascular mortality: prospective population based cohort study. **BMJ**, v. 341, p. 1–7, 2010.

ARONOV, P. A et al. Colonic contribution to uremic solutes. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 22, n. 9, p. 1769–76, 2011.

ASIF, A. R. et al. Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 450, n. 2, p. 88–95, maio 2005.

ASLAMKHAN, A. G. et al. The flounder organic anion transporter fOat has sequence, function, and substrate specificity similarity to both mammalian Oat1 and Oat3. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 6, p. 1773–1780, 2006.

AZEVEDO, M. L. V et al. p-Cresyl sulfate affects the oxidative burst, phagocytosis process, and antigen presentation of monocyte-derived macrophages. **Toxicology Letters**, v. 263, p. 1–5, 2016.

BAE, W. K. et al. Decreased expression of Na⁺/K⁺-ATPase, NHE3, NBC1, AQP1 and OAT in gentamicin-induced nephropathy. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 12, p. 331–336, 2008.

BAHN, A. et al. Expression studies and functional characterization of renal human organic anion transporter 1 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 4, p. 424–430, 2004.

BAHN, A. et al. Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 289, p. C1075–C1084, 2005.

BANOGLU, E.; JHA, G. G.; KING, R. S. Hepatic microsomal metabolism of indole to indoxyl, a precursor of indoxyl sulfate. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 26, n. 4, p. 235–40, 2001.

BANOGLU, E.; KING, R. S. Sulfation of indoxyl by human and rat aryl (phenol) sulfotransferases to form indoxyl sulfate. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 2, p. 135–140, 2002.

BANSAL, N. et al. Absolute Rates of Heart Failure, Coronary Heart Disease, and Stroke in Chronic Kidney Disease: An Analysis of 3 Community-Based Cohort Studies. **JAMA Cardiology**, v. 98104, p. 1–5, 2016.

BARRETO, F. C. et al. Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 11, p. 1551–1558, 2009.

BARRETO, F. C. et al. Association between indoxyl sulfate and bone histomorphometry in pre-dialysis chronic kidney disease patients. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 3, p. 289–296, 2014.

BARROS, S. A et al. Activation of protein kinase Czeta increases OAT1 (SLC22A6)- and OAT3 (SLC22A8)-mediated transport. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 5, p. 2672–9, 30 jan. 2009.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.

BAYRAM, D. et al. The effects of allopurinol on metabolic acidosis and endothelial functions in chronic kidney disease patients. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 19, n. 3, p. 443–449, 2015.

BESARAB, A. et al. Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 10, p. 1665–1673, 2015.

BLEASBY, K. et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. **Xenobiotica**, v. 36, n. 10–11, p. 963–88, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDONI, A. et al. Expression of Rat Renal Cortical OAT1 and OAT3 in Response to Acute Biliary Obstruction. **Hepatology**, v. 43, n. 5, p. 1092–1100, 2006.

BRELJAK, D. et al. Sex-dependent expression of Oat3 (Slc22a8) and Oat1 (Slc22a6) proteins in murine kidneys. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 304, n. Md, p. F1114-26, 2013.

BRELJAK, D. et al. Distribution of the organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 311, p. F227–F238, 2016.

BRO, S. et al. Increased Expression of Adhesion Molecules in Uremic Atherosclerosis in Apolipoprotein-E-Deficient Mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1495–1503, 1 jun. 2004.

BUIST, S. C. N.; CHERRINGTON, N. J.; KLAASSEN, C. D. Endocrine regulation of rat organic anion transporters. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 5, p. 559–564, 2003.

BUIST, S. C. N.; KLAASSEN, C. D. Rat and mouse differences in gender-predominant expression of organic anion transporter (OAT1-3; SLC22A6-8) mRNA levels. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 6, p. 620–625, 2004.

BULACIO, R.; HAZELHOFF, M. H.; TORRES, A. M. Renal expression and function of oat1 and oat3 in rats with vascular calcification. **Pharmacology**, v. 90, n. 1–2, p. 66–77, jan. 2012.

BURCKHARDT, B. C. et al. Transport of cimetidine by ounder and human renal organic anion transporter 1. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 284, p. 503–509, 2003.

BURCKHARDT, G. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 106–130, 2012.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAO, X. SEN et al. Association of indoxyl sulfate with heart failure among patients on hemodialysis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 1, p. 111–119, 2015.

CENSO SBN. Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2014. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2014-15-15.pdf>. Acesso em: 13/07/2016.

CHA, S. H. et al. Molecular Cloning and Characterization of Multispecific Organic Anion Transporter 4 Expressed in the Placenta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 6, p. 4507–4512, 2000.

CHANG, H. et al. Expression of ROR1, pAkt, and pCREB in gastric adenocarcinoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 19, n. 5, p. 330–334, 2015.

CHEN, J. et al. Interrelationship of Multiple Endothelial Dysfunction Biomarkers with Chronic Kidney Disease. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132047, 2015.

CORRADA, D. et al. Deciphering Dimerization Modes of PAS Domains: Computational and Experimental Analyses of the AhR:ARNT Complex Reveal New Insights Into the Mechanisms of AhR Transformation. **PLOS Computational Biology**, v. 12, n. 6, p. e1004981, 2016.

DE LOOR, H. et al. A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to measure a selected panel of uremic retention solutes derived from endogenous and colonic microbial metabolism. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 149–156, 2016.

DEGUCHI, T. et al. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. **Kidney International**, v. 61, n. 5, p. 1760–1768, 2002.

DEJEANS, N. et al. Modulation of gene expression in endothelial cells by hyperlipaemic postprandial serum from healthy volunteers. **Genes and Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 263–274, 2010.

DELTOMBE, O. et al. Exploring protein binding of uremic toxins in patients with different stages of chronic kidney disease and during hemodialysis. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 3933–3946, 2015.

DEVINE, E. et al. Binding affinity and capacity for the uremic toxin indoxyl sulfate. **Toxins**, v. 6, n. 2, p. 416–430, 2014.

DI GIUSTO, G. et al. Expression and function of Oat1 and Oat3 in rat kidney exposed to mercuric chloride. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 887–897, 2009.

DOU, L. et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. **Kidney International**, v. 65, n. 2, p. 442–451, 2004.

DOU, L. et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 6, p. 1302–1308, 2007.

DUAN, G.; WALTHER, D. The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. **PLOS Computational Biology**, v. 11, n. 2, p. 1–23, 2015.

ELLIS, R. J. et al. Indoxyl sulphate and kidney disease: causes, consequences and interventions. **Nephrology (Carlton)**, v. 21, n. 3, p. 170–177, 2015.

ENOMOTO, A. et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 447–452, 2002a.

ENOMOTO, A. et al. Role of Organic Anion Transporters in the Tubular Transport of Indoxyl Sulfate and the Induction of its Nephrotoxicity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 7, p. 1711–1720, 1 jul. 2002b.

ERALY, S. A. et al. Decreased Renal Organic Anion Secretion and Plasma Accumulation of Endogenous Organic Anions in OAT1 Knock-out Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5072–5083, 2006.

ERALY, S. A.; HAMILTON, B. A.; NIGAM, S. K. Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 333–342, 2003.

ETGEN, T. et al. Chronic kidney disease and cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Nephrology**, v. 35, n. 5, p. 474–482, 2012.

EUTOX. **European Uremic Toxin Work Group**, n. Disponível no link: <<http://eutodb.oddeesoft.com/index.php>>. Acesso em 15/08/2016, 2016.

FANG, Y. et al. CKD-Induced Wingless/Integration1 Inhibitors and Phosphorus Cause the CKD-Mineral and Bone Disorder. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 8, p. 1760–73, 2014.

FARKAS, A. E. et al. HNF4 α regulates claudin-7 protein expression during intestinal epithelial differentiation. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 8, p. 2206–18, 2015.

FAURE, V. et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 3, p. 566–573, 2006.

FAVRETTO, G. et al. Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-bound Uremic Toxins by Human Endothelial Cells and MCP-1 expression. **Journal of Vascular Research**, In press, 2017.

FOSTER, M. C. et al. Potential effects of reclassifying CKD as a coronary heart disease risk equivalent in the us population. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 5, p. 753–760, 2014.

FRASER, S. D. S. et al. The burden of comorbidity in people with chronic kidney disease stage 3: a cohort study. **BMC Nephrology**, v. 16, p. 193–103 11p, 2015.

GALLEGOS, T. F. et al. Organic anion and cation SLC22 “drug” transporter (Oat1, Oat3, and Oct1) regulation during development and maturation of the kidney proximal tubule. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40796, jan. 2012.

GBD. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 385, n. 385, p. 117–171, 2016.

GLASSOCK, R. J. Uremic Toxins: What Are They? An Integrated Overview of Pathobiology and Classification. **Journal of Renal Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 2–6, 2008.

GLUBA-BRZÓZKA, A. et al. Markers of increased atherosclerotic risk in patients with chronic kidney disease: a preliminary study. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 22, p. 1–12, 2016.

GONDOUIN, B. et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. **Kidney International**, p. 1–12, 2013.

GROUSSIN, L. et al. Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 1, p. 345–54, 2000.

GUPTA, J. et al. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 12, p. 1938–1946, 2012.

HADAD, N. et al. Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2 α via both NF- κ B and CREB transcription factors. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 3, p. 1816–1827, 2011.

HAN, H. et al. p-Cresyl Sulfate Aggravates Cardiac Dysfunction Associated With Chronic Kidney Disease by Enhancing Apoptosis of Cardiomyocytes. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 6, p. e001852–e001852, 2015.

HAN, H. et al. p-Cresyl sulfate promotes the formation of atherosclerotic lesions and induces plaque instability by targeting vascular smooth muscle cells. **Frontiers of Medicine**, v. 10, n. 3, p. 320–329, 2016a.

HAN, H. et al. Atorvastatin attenuates p-cresyl sulfate induced atherogenesis and plaque instability in ApoE knockout mice. **Molecular Medicine Reports**, p. 1–7, 2016b.

HAYHURST, G. P. et al. Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (Nuclear Receptor 2A1) is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1393–1403, 2001.

HENJAKOVIC, M. et al. The human organic anion transporter 2 (OAT2) is distinct from OAT1 and OAT3 with respect to transport function. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 309, p. F843–F851, 2015.

HILGENDORF, C. et al. Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 8, p. 1333–1340, 2007.

HILL, N. R. et al. Global prevalence of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 71, n. 3, p. 244–254, 2016.

HONG, M. et al. Putative Transmembrane Domain 12 of the Human Organic Anion Transporter hOAT1 Determines Transporter Stability and Maturation Efficiency. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 650–658, 2010.

HONG, M.; ZHOU, F.; YOU, G. Critical amino acid residues in transmembrane domain 1 of the human organic anion transporter hOAT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31478–82, 2004.

HOSOYA, K. et al. Roles of Inner Blood-Retinal Barrier Organic Anion Transporter 3 in the Vitreous / Retina-to-Blood Efflux Transport of p-Aminohippuric Acid, Benzylpenicillin, and 6-Mercaptopurine. **Pharmacology**, v. 329, n. 1, p. 87–93, 2009.

HOSOYA, K. et al. Insulin resistance in chronic kidney disease is ameliorated by spironolactone in rats and humans. **Kidney International**, v. 87, n. 10, p. 749–760, 2014.

HOTCHKISS, A. G. et al. Organic Anion Transporter 1 Is Inhibited by Multiple Mechanisms and Shows a Transport Mode Independent of Exchange. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 12, p. 1847–1854, 2015.

HSUEH, C.-H. et al. Identification and Quantitative Assessment of Uremic Solutes as Inhibitors of Renal Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3. **Molecular**

Pharmaceutics, v. 13, n. 9, p. 3130–3140, 2016.

HUANG, C. Y. et al. Association between blood dioxin level and chronic kidney disease in an endemic area of exposure. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2016.

HUGGETT, J. F. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 2013.

HWANG, D.-Y. et al. Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract. **Kidney International**, v. 85, n. 6, p. 1429–1433, 2014.

IKARASHI, R.; SHIBASAKI, K.; YAMAGUCHI, A. Immunohistochemical studies of organic anion transporters and urate transporter 1 expression in human salivary gland. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, p. 312–316, 2013.

IOANNOU, K. et al. Inflammation, endothelial dysfunction and increased left ventricular mass in chronic kidney disease (CKD) patients: A longitudinal study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2015.

ITO, S. et al. Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 38869–38875, 2010.

ITO, S. et al. Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 23, n. 8, p. 960–975, 2016.

ITOH, Y. et al. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 7, p. 1841–1850, 2012.

IWATA, K. et al. Involvement of indoxyl sulfate in renal and central nervous system toxicities during cisplatin-induced acute renal failure. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 4, p. 662–671, 2007.

JACOBI, J. et al. Subtotal nephrectomy impairs ischemia-induced angiogenesis and hindlimb re-perfusion in rats. **Kidney International**, v. 69, n. 11, p. 2013–2021, 2006.

JANKOWSKI, J. et al. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 2, p. 256–264, 2003.

JHA, V. et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**, v.

382, n. 9888, p. 260–72, 20 jul. 2013.

JIANG, K. et al. Genomic characterization of remission in juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, n. 4, p. R100, 2013.

JIN, L. et al. Regulation of tissue-specific expression of renal organic anion transporters by hepatocyte nuclear factor 1 α/β and DNA methylation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 2091–2097, mar. 2012.

JING, Y. J. et al. p-Cresyl sulfate is associated with carotid arteriosclerosis in hemodialysis patients and promotes atherogenesis in apoE^{-/-} mice. **Kidney International**, v. 89, n. 2, p. 439–449, 2016.

JOURDE-CHICHE, N. et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 9, p. 1576–84, 2009.

JOURDE-CHICHE, N. et al. Vascular Incompetence in Dialysis Patients-Protein-Bound Uremic Toxins and Endothelial Dysfunction. **Seminars in Dialysis**, v. 24, n. 3, p. 327–337, 2011.

KALER, G. et al. Olfactory mucosa-expressed organic anion transporter, Oat6, manifests high affinity interactions with odorant organic anions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, n. 4, p. 872–876, 2006.

KALER, G. et al. Structural Variation Governs Substrate Specificity for Organic Anion Transporter (OAT) Homologs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 23841–23853, 2007.

KATSUYAMA, M. et al. Essential role of ATF-1 in induction of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase: involvement of mitochondrial respiratory chain. **The Biochemical Journal**, v. 386, n. Pt 2, p. 255–61, 2005.

KAUFHOLD, M. et al. Differential interaction of dicarboxylates with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v. 301, n. 5, p. F1026–F1034, 2011.

KDIGO. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. **Kidney International**, v. 2, n. 4, p. 279–335, 2012.

KDIGO. Clinical Practice Guideline for Lipid Management in Chronic Kidney Disease. **Kidney International**, v. 3, n. 3, p. 182–189, 2013a.

KDIGO. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney International Supplements**, v. 84, n. 3, p. 136–150,

set. 2013b.

KIELSTEIN, J. T. et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 170–176, 2002.

KIKUCHI, D.; TANIMOTO, K.; NAKAYAMA, K. CREB is activated by ER stress and modulates the unfolded protein response by regulating the expression of IRE1 α and PERK. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 2, p. 243–250, 2016.

KIKUCHI, R. et al. Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 α /beta and DNA methylation. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 887–896, set. 2006.

KIKUCHI, R. et al. Regulation of Tissue-Specific Expression of the Human and Mouse Urate Transporter 1 Gene by Hepatocyte Nuclear Factor 1 and DNA Methylation. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1619–1625, 2007.

KIKUCHI, R. et al. Genome-wide analysis of epigenetic signatures for kidney-specific transporters. **Kidney International**, v. 78, n. 6, p. 569–577, 2010.

KIKUCHI, T. et al. OAT3-mediated extrusion of the 99mTc-ECD metabolite in the mouse brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 34, n. 4, p. 585–588, 2014.

KIM, N. H. et al. Environmental Heavy Metal Exposure and Chronic Kidney Disease in the General Population. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, p. 272–277, 2015.

KIM, Y.-H. et al. Indoxyl sulfate promotes apoptosis in cultured osteoblast cells. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 14, p. 60, 2013.

KIRSZTAJN, G. M. et al. Fast Reading of the KDIGO 2012: Guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease in clinical practice. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 1, p. 63–73, 2014.

KLEIN, K. et al. The human organic anion transporter genes OAT5 and OAT7 are transactivated by hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α). **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1079–1087, 2010.

KOHL, S. et al. Mild Recessive Mutations in Six Fraser Syndrome-Related Genes Cause Isolated Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 9, p. 1–6, 2014.

KSHIRSAGAR, A. V et al. Periodontal disease adversely affects the survival of patients

with end-stage renal disease. **Kidney International**, v. 75, n. 7, p. 746–751, 2009.

LEE, J. et al. A Renal-Like Organic Anion Transport System in the Ciliary Epithelium of the Bovine and Human Eye. **Molecular Pharmaceutics**, v. 87, n. 4, p. 697–705, 2015a.

LEE, J. H.; LEE, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 426–444, 2010.

LEE, W.-C. et al. Indoxyl Sulfate-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Impaired Biogenesis Are Partly Protected by Vitamin C and N-Acetylcysteine. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–6, 2015b.

LEKAWANVIJIT, S. et al. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? **European Heart Journal**, v. 31, n. 14, p. 1771–1779, 2010.

LEKAWANVIJIT, S.; KRUM, H. Cardiorenal syndrome: Role of protein-bound uremic toxins. **Journal of Renal Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 149–154, 2015.

LEVIN, A. et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. **Kidney International**, v. 71, n. 1, p. 31–38, 2007.

LI, S.; DUAN, P.; YOU, G. Regulation of human organic anion transporter 3 by peptide hormone bradykinin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 333, n. 3, p. 970–975, 2010.

LI, S.; ZHANG, Q.; YOU, G. Three ubiquitination sites of organic anion transporter-1 synergistically mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. **Molecular Pharmacology**, v. 84, n. July, p. 139–46, 2013.

LIABEUF, S. et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 25, n. 4, p. 1183–1191, abr. 2010.

LIABEUF, S. et al. Does p-cresylglucuronide have the same impact on mortality as other protein-bound uremic toxins? **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67168, jan. 2013.

LIN, C. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes high risk for chronic kidney disease in Asian male with hypertension—a meta-regression analysis of 98 observational studies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2014a.

LIN, C. J. et al. P-cresyl sulfate is a valuable predictor of clinical outcomes in pre-ESRD patients. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014b.

LIN, C. J. et al. Meta-analysis of the associations of p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–14, 2015.

LIU, C. T. et al. Genetic association for renal traits among participants of African Ancestry reveals new loci for renal function. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 9, 2011.

LIU, H. C. et al. Construction and Evaluation of an Organic Anion Transporter 1 (OAT1)-Centered Metabolic Network. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 37, p. 19474–19486, 2016a.

LIU, H. C. et al. Molecular Properties of Drugs Interacting with SLC22 Transporters OAT1, OAT3, OCT1, and OCT2: A Machine-Learning Approach. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 1, p. 215–229, 2016b.

LIU, H. C. et al. Analysis of Molecular Properties of Drugs Interacting with SLC22 Transporters OAT1, OAT3, OCT1, and OCT2: A Machine-Learning Approach. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 1, p. 215–229, 2016c.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LJUBOJEVIĆ, M. et al. Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 292, n. 1, p. F361–F372, 2007.

LJUBOJEVIĆ, M. et al. Expression of basolateral organic anion and cation transporters in experimental cadmium nephrotoxicity in rat kidney. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 3, p. 525–541, 2016.

LOCATELLI, F.; VECCHIO, L. DEL; POZZONI, P. The importance of early detection of chronic kidney disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 17, n. suppl 11, p. 2–7, 2002.

LOOR, H. DE et al. Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis for Measurement of p-Cresol and Its Conjugated Metabolites in Uremic and Normal Serum. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 1533–1535, ago. 2005.

LU, L.-F. et al. Associations among chronic kidney disease, high total p-cresylsulfate and left ventricular systolic dysfunction. **Clinica Chimica Acta**, v. 457, p. 63–68, 2016.

MACIEL, R. A. P. et al. p-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF- κ B p65 in human vascular smooth muscle cells. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 2, p. 153–160, 2016.

MAHER, J. M. et al. Alterations in transporter expression in liver, kidney, and

duodenum after targeted disruption of the transcription factor HNF1alpha. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 512–22, 14 ago. 2006.

MARTOVETSKY, G.; BUSH, K. T.; NIGAM, S. K. Transcription factor-mediated regulation of kidney versus liver specification of SLC and ABC drug transporters, tight junction molecules and signature biomarkers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, p. 1050–1060, 2016.

MARTOVETSKY, G.; TEE, J. B.; NIGAM, S. K. Hepatocyte nuclear factors 4 α and 1 α regulate kidney developmental expression of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. **Molecular Pharmacology**, v. 84, n. December, p. 808–23, 2013.

MASAI, N. et al. Indoxyl sulfate stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells by inducing oxidative stress through activation of the NADPH oxidase-nuclear factor-kappaB pathway. **Circulation Journal**, v. 74, n. 10, p. 2216–2224, 2010.

MATSUSHITA, K. et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality: a collaborative meta-analysis of general population cohorts. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2073–2081, 2010.

MATSUSHITA, K. et al. Subclinical Atherosclerosis Measures for Cardiovascular Prediction in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 2, p. 439–447, 2015.

MATSUZAKI, T. et al. Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. **Kidney International**, v. 71, n. 6, p. 539–47, 2007.

MAYO, L. D. et al. Vascular Endothelial Cell Growth Factor Activates CRE-binding Protein by Signaling through the KDR Receptor Tyrosine Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25184–25189, 2001.

MEIJERS, B. K. I. et al. A review of albumin binding in CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, n. 5, p. 839–850, maio 2008.

MEIJERS, B. K. I. et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, n. 5, p. 891–901, nov. 2009.

MEIJERS, B. K. I.; EVENEPOEL, P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 3, p. 759–761, mar. 2011.

MELAMED, M. L. et al. Retained organic solutes, patient characteristics and all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis: results from the retained organic solutes

and clinical outcomes (ROSCO) investigators. **BMC Nephrology**, v. 14, p. 1, 2013.

MENG, J. et al. Identification of HNF-4 α as a key transcription factor to promote ChREBP expression in response to glucose. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 23944, 2016.

MEYER, T. W. et al. The clearance of protein-bound solutes by hemofiltration and hemodiafiltration. **Kidney International**, v. 68, n. 2, p. 867–877, 2005.

MIHALJEVIC, I. et al. Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of slc22 genes in zebrafish (*Danio rerio*). **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 626, 2016.

MILLS, K. T. et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. **Kidney International**, v. 88, n. 5, p. 950–957, 2015.

MIQUEROL, L. et al. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 12, p. 8944–8951, 1994.

MIYAMOTO, Y. et al. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 8, p. 2498–2502, ago. 2011.

MONTE, J. C. et al. Identification of a novel murine organic anion transporter family member, OAT6, expressed in olfactory mucosa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, n. 2, p. 429–436, 2004.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOTOHASHI, H. et al. Precise Comparison of Protein Localization Among OCT, OAT, and MATE in Human Kidney. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 102, n. 9, p. 3302–3308, 2013.

MOZAR, A. et al. Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 2176–2181, 2012.

MÜLLER, C. et al. Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. **Free Radical Research**, v. 38, n. 10, p. 1093–1100, 2004.

MUTELIEFU, G. et al. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 24, n. 7, p. 2051–2058, jul. 2009.

MUTELIEFU, G.; ENOMOTO, A.; NIWA, T. Indoxyl sulfate promotes proliferation of human aortic smooth muscle cells by inducing oxidative stress. **Journal of Renal Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 29–32, 2009.

MUTSAERS, H. A. M. et al. Proximal tubular efflux transporters involved in renal excretion of p-cresyl sulfate and p-cresyl glucuronide: Implications for chronic kidney disease pathophysiology. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1868–1877, 2015.

NAGLE, M. A. et al. Organic anion transport pathways in antiviral handling in choroid plexus in Oat1 (Slc22a6) and Oat3 (Slc22a8) deficient tissue. **Neuroscience Letters**, v. 534, n. 1, p. 133–138, 2013.

NAPRTCS. Collaborative Studies NAPRTCS 2014 Annual Transplant Report. p. 102, 2014.

NAQVI, S.; MARTIN, K. J.; ARTHUR, J. S. C. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. **The Biochemical Journal**, v. 458, n. 3, p. 469–79, 2014.

NAUD, J. et al. Effects of Chronic Renal Failure on Kidney Drug Transporters and Cytochrome P450 in Rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 8, p. 1363–1369, 2011.

NAUD, J. et al. Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 1, p. 39–46, jan. 2012.

NG, H.-Y. et al. Indoxyl Sulfate Downregulates Mas Receptor via Aryl Hydrocarbon Receptor/Nuclear Factor-kappa B, and Induces Cell Proliferation and Tissue Factor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. **Nephron**, v. 133, n. 3, p. 205–212, 2016.

NIGAM, S. K. et al. The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 1, p. 83–123, 2015a.

NIGAM, S. K. et al. Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p. 1–11, 2015b.

OGASAWARA, K. et al. Human organic anion transporter 3 gene is regulated constitutively and inducibly via a cAMP-response element. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 1, p. 317–322, 2006.

OGASAWARA, K. et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human organic anion transporter 1 gene in the kidney. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 292, p. F1819–F1826, 2007.

OHSAWA, M. et al. Effects of pitavastatin add-on therapy on chronic kidney disease

with albuminuria and dyslipidemia. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. no pagination, 2015.

OKUNO, S. et al. Serum β 2-microglobulin level is a significant predictor of mortality in maintenance haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 2, p. 571–577, 2009.

OSHIMA, N. et al. Uric acid, indoxyl sulfate, and methylguanidine activate bulbospinal neurons in the RVLM via their specific transporters and by producing oxidative stress. **Neuroscience**, v. 304, p. 133–145, 2015.

OTTONELLO, L. et al. Leptin as a Uremic Toxin Interferes with Neutrophil Chemotaxis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 9, p. 2366–2372, 2004.

PARK, S. I. et al. Inhibition of cyclic AMP response element-directed transcription by decoy oligonucleotides enhances tumor-specific radiosensitivity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 3, p. 363–369, 2016.

PARSA, A. et al. Genome-Wide Association of CKD Progression: The Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. 1–12, 2016.

PENG, Y. SEN et al. Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 3, p. 1034–1043, 2012.

POESEN, R. et al. Renal clearance and intestinal generation of p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 9, p. 1508–1514, set. 2013.

POESEN, R. et al. Metabolism, Protein Binding, and Renal Clearance of Microbiota-Derived p-Cresol in Patients with CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 1–9, 2016a.

POESEN, R. et al. The Influence of Prebiotic Arabinoxylan Oligosaccharides on Microbiota Derived Uremic Retention Solutes in Patients with Chronic Kidney Disease: A Randomized Controlled Trial. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153893, 2016b.

POZZOBON, T. et al. Treponema pallidum (syphilis) antigen TpF1 induces angiogenesis through the activation of the IL-8 pathway. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 18785, 2016.

PRASAD, B. et al. Abundance of drug transporters in the human kidney cortex as quantified by quantitative targeted proteomics. **Drug Metabolism and Disposition**, 2016.

PUN, P. H. et al. Predictors of Survival after Cardiac Arrest in Outpatient Hemodialysis Clinics. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, n. 3, p. 491–500, 2007.

QADRI, I. et al. Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 627–636, 2006.

RECIO-MAYORAL, A. et al. Endothelial dysfunction, inflammation and atherosclerosis in chronic kidney disease - a cross-sectional study of predialysis, dialysis and kidney-transplantation patients. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 446–451, 2011.

RODÓN, L. et al. Active CREB1 promotes a malignant TGFβ2 autocrine loop in glioblastoma. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 10, p. 1230–1241, 2014.

RONCO, C. et al. The cardiorenal syndrome. **Blood Purification**, v. 27, n. 1, p. 114–126, 2009.

ROSS-ADAMS, H. et al. HNF1B variants associate with promoter methylation and regulate gene networks activated in prostate and ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, 2016.

ROSSI, M. et al. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 4, p. 309–317, maio 2014.

ROSSI, M. et al. Synbiotics easing renal failure by improving gut microbiology (SYNERGY): A randomized trial. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 223–231, 2016.

RYU, J. H. et al. AST-120 improves microvascular endothelial dysfunction in end-stage renal disease patients receiving hemodialysis. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 942–949, 2016.

SABOLIĆ, I. et al. Are mice, rats, and rabbits good models for physiological, pharmacological and toxicological studies in humans? **Periodicum Biologorum**, v. 113, n. 1, p. 7–16, 2011.

SADOWSKI, C. E. et al. A Single-Gene Cause in 29.5% of Cases of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. 1–11, 2014.

SAJI, T. et al. Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1 α/β . **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 2, p. 784–790, fev. 2008.

SALDANHA, J. F. et al. Determination of the binding properties of the uremic toxin phenylacetic acid to human serum albumin. **Biochimie**, v. 125, p. 53–58, 2016.

SAPIENZA, C. et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic differences between diabetes patients with ESRD and diabetes patients without nephropathy. **Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 20–28, 2011.

SARKAR, T. et al. Does angiotensin-converting enzyme-1 (ACE-1) gene polymorphism lead to chronic kidney disease among hypertensive patients? **Renal Failure**, v. 38, n. 5, p. 765–769, 2016.

SATO, E. et al. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 36618, 2016.

SCHEPERS, E. et al. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, n. 2, p. 592–6, fev. 2007.

SCHNEIDER, R. et al. Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 292, n. 5, p. F1599–F1605, 2007.

SCHROEDER, J. C. et al. The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. **Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 393–400, 2010.

SCHWOB, E. et al. Transporters involved in renal excretion of N-carbamoylglutamate, An orphan drug to treat inborn n-acetylglutamate synthase deficiency. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 307, n. 12, p. F1373–F1379, 2014.

SELIGER, S. L. Risk Factors for Incident Stroke among Patients with End-Stage Renal Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 10, p. 2623–2631, 2003.

SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 1, p. 54–61, 2016.

SHAFI, T. et al. Free levels of selected organic solutes and cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients: Results from the retained organic solutes and clinical outcomes (ROSCO) investigators. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.

SHANKAR, A.; XIAO, J.; DUCATMAN, A. Perfluoroalkyl chemicals and chronic kidney disease in US Adults. **American Journal of Epidemiology**, v. 174, n. 8, p. 893–900, 2011.

SHI, G. et al. Activation of Src-ATF1 pathway is involved in upregulation of Nox1, a catalytic subunit of NADPH oxidase, by aldosterone. **Endocrine Journal**, v. 58, n. 6, p. 491–9, 2011.

SHIBA, T. et al. p-Cresyl sulfate suppresses lipopolysaccharide-induced anti-bacterial immune responses in murine macrophages in vitro. **Toxicology Letters**, v. 245, p. 24–30, 2016.

SHIMIZU, H. et al. ROS and PDGF-beta receptors are critically involved in indoxyl sulfate actions that promote vascular smooth muscle cell proliferation and migration. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 297, n. 2, p. C389-96, 2009.

SHIMIZU, H. et al. Senescence and dysfunction of proximal tubular cells are associated with activated p53 expression by indoxyl sulfate. **American Journal of Cell Physiology**, v. 299, n. 5, p. C1110-7, 2010.

SHIMIZU, H. et al. NF- κ B plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 301, n. 5, p. C1201–C1212, nov. 2011.

SHIMIZU, H. et al. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. **Life Sciences**, v. 92, n. 2, p. 143–148, 2013a.

SHIMIZU, H. et al. Indoxyl sulfate enhances p53-TGF-beta1-Smad3 pathway in proximal tubular cells. **American Journal of Nephrology**, v. 37, n. 2, p. 97–103, 2013b.

SHIMIZU, H. et al. CREB , NF- κ B , and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. **American Journal of Physiology**, p. 685–692, 2013c.

SHIN, H. J. et al. Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. **Hepatology**, v. 45, n. 4, p. 1046–1055, 2007.

SHIVANNA, S. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor is a Critical Regulator of Tissue Factor Stability and an Antithrombotic Target in Uremia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 1, p. 189–201, 2016.

SHU, C. et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of serum p- cresyl sulfate and indoxyl sulfate in patients undergoing peritoneal dialysis. **Biomedical Chromatography**, n. April, 2016.

SIX, I. et al. Deleterious vascular effects of indoxyl sulfate and reversal by oral

adsorbent AST-120. **Atherosclerosis**, v. 243, n. 1, p. 248–256, 2015.

SRIMAROENG, C. et al. Regulation of renal organic anion transporter 3 (SLC22A8) expression and function by the integrity of lipid raft domains and their associated cytoskeleton. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 4–5, p. 565–578, 2013.

STAM, F. et al. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 5, p. 892–898, 2003.

STAM, F. et al. Endothelial Dysfunction Contributes to Renal Function-Associated Cardiovascular Mortality in a Population with Mild Renal Insufficiency: The Hoorn Study. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 2, p. 537–545, 2006.

STANIC, B.; KATSUYAMA, M.; MILLER, F. J. An Oxidized Extracellular Redox State Increases Nox1 Expression and Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells via EGFR Activation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30, n. 11, p. 2234–2241, 2010.

STENVINKEL, P. et al. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predicts death in predialysis patients: associations with malnutrition, inflammation and cardiovascular disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 1624–1630, 2000.

STINGHEN, A. E. M. et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron Clinical Practice**, v. 111, n. 2, p. c117–c126, jan. 2009.

STINGHEN, A. E. M. et al. Immune Mechanisms Involved in Cardiovascular Complications of Chronic Kidney Disease. **Blood Purification**, v. 29, n. 2, p. 114–120, jan. 2010.

STINGHEN, A. E. M. et al. Differential effects of indoxyl sulfate and inorganic phosphate in a murine cerebral endothelial cell line (bEnd.3). **Toxins**, v. 6, n. 6, p. 1742–1760, 2014.

SUCAJTYS-SZULC, E. et al. Up-regulation of Hnf1 α gene expression in the liver of rats with experimentally induced chronic renal failure - A possible link between circulating PCSK9 and triacylglycerol concentrations. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 17–26, 2016.

SUN, C.-Y.; CHANG, S.-C.; WU, M.-S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. e34026, jan. 2012a.

SUN, C.-Y.; CHANG, S.-C.; WU, M.-S. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. **Kidney International**, v. 81, n. 7, p. 640–650, abr. 2012b.

SUN, W. et al. Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, n. 2, p. 417–422, 2001.

SWEET, D. H. et al. Impaired Organic Anion Transport in Kidney and Choroid Plexus of Organic Anion Transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) Knockout Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 30, p. 26934–26943, 2002.

TAKEDA, M. et al. Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, n. 2–3, p. 133–138, jan. 2004.

TAKI, K. et al. Accumulation of Indoxyl Sulfate in OAT1/3-Positive Tubular Cells in Kidneys of Patients With Chronic Renal Failure. **Journal of Renal Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 199–203, 2006.

TANAKA, H. et al. p-Cresyl sulfate induces osteoblast dysfunction through activating JNK and p38 MAPK pathways. **Bone**, v. 56, n. 2, p. 347–54, out. 2013.

TANAKA, K. et al. Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14961–14966, 9 abr. 2004.

TEMMAR, M. et al. Pulse wave velocity and vascular calcification at different stages of chronic kidney disease. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 1, p. 163–169, 2010.

TERASAWA, K. et al. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 6, p. 914–921, 2006.

TERPSTRA, M. L. et al. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease. **World Journal of Nephrology**, v. 5, n. 4, p. 378–88, 2016.

TONELLI, M. et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: A population-level cohort study. **The Lancet**, v. 380, n. 9844, p. 807–814, 2012.

TORRES, A. M. et al. Altered renal elimination of organic anions in rats with chronic renal failure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 29–37, 2005.

TORRES, A. M. et al. Deletion of Multispecific Organic Anion Transporter Oat1/Slc22a6 Protects against Mercury-induced Kidney Injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26391–26395, 2011.

TOYOHARA, T. et al. Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. **Hypertension Research**, v. 33, n. 9, p. 944–952, 2010.

TSURUYA, Y. et al. Investigation of endogenous compounds applicable to drug - drug interaction studies involving the renal organic anion transporters, OAT1 and OAT3, in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 12, p. 1925–1933, 2016.

TUMUR, Z. et al. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF- κ B activation. **American Journal of Nephrology**, v. 31, p. 435–441, 2010.

TURIN, T. C. et al. Chronic kidney disease and life expectancy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 8, p. 3182–3186, 2012.

UCHIDA, Y. et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 2, p. 333–345, 2011.

USRDS, United States Renal Data System. **2016 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States**. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2016.

VALLON, V. et al. Overlapping in vitro and in vivo specificities of the organic anion transporters OAT1 and OAT3 for loop and thiazide diuretics. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 92161, n. 9151, p. 867–873, 2008.

VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, p. 1934–1943, 2003.

VANHOLDER, R. et al. Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 26, n. 5, p. 1464–1467, maio 2011.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1211–1221, ago. 2008.

VAZIRI, N. D. et al. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 2686–2693, jul. 2012.

VELENOSI, T. J. et al. Untargeted plasma and tissue metabolomics in rats with chronic kidney disease given AST-120. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22526, 2016.

VILLAR, S. R. et al. Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction. **Hepatology**, v. 43, p. 1092–1100, 2005.

VUPPUTURI, S. et al. Occupational silica exposure and chronic kidney disease. **Renal Failure**, v. 34, n. 1, p. 40–6, 2012.

WANG, W.-J. et al. Indoxyl sulfate induces renin release and apoptosis of kidney mesangial cells. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 39, n. 4, p. 637–43, 2014.

WANG, Z.; BURKE, P. A. The role of microRNAs in hepatocyte nuclear factor-4alpha expression and transactivation. **Biochim Biophys Acta**, v. 29, n. 5, p. 997–1003, 2013.

WATANABE, H. et al. Interaction between Two Sulfate-Conjugated Uremic Toxins, p-Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate , during Binding with Human Serum Albumin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 7, p. 1423–1428, 2012.

WATANABE, H. et al. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 18, n. 5, p. 814–820, 2013a.

WATANABE, H. et al. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. **Kidney International**, v. 83, n. 4, p. 582–592, abr. 2013b.

WATANABE, H. et al. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2014.

WATANABE, I. et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. **Circulation Journal**, v. 77, n. 1, p. 224–230, 2013c.

WEGNER, W. et al. Male-dominant activation of rat renal organic anion transporter 1 (Oat1) and 3 (Oat3) expression by transcription factor BCL6. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2012.

WIKOFF, W. R. et al. Untargeted metabolomics identifies enterobiome metabolites and putative uremic toxins as substrates of organic anion transporter 1 (Oat1). **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 6, p. 2842–2851, 2011.

WINGENDER, E. et al. TFClass: A classification of human transcription factors and their rodent orthologs. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D97–D102, 2015.

WU, I.-W. et al. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 26, n. 3, p. 938–947, mar. 2011.

WU, I. W. et al. Serum free p-cresyl sulfate levels predict cardiovascular and all-cause

mortality in elderly hemodialysis patients-A prospective cohort study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 3, p. 1169–1175, 2012.

WU, W. et al. Analysis of a large cluster of SLC22 transporter genes, including novel USTs, reveals species-specific amplification of subsets of family members. **Physiological Genomics**, v. 38, n. 2, p. 116–124, 2009.

XU, D. et al. Nedd4-2 but not Nedd4-1 is critical for protein kinase C-regulated ubiquitination, expression, and transport activity of human organic anion transporter 1. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 310, n. 9, p. F821-31, 2016.

XU, D.; WANG, H.; YOU, G. An Essential Role of Nedd4-2 in the Ubiquitination, Expression, and Function of Organic Anion Transporter-3. **Molecular Pharmaceutics**, p. acs.molpharmaceut.5b00839, 2015.

XU, W. et al. Functional role of the C terminus of human organic anion transporter hOAT1. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31178–83, 2006.

XU, Y. J. et al. Age-associated differences in transporter gene expression in kidneys of male rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 1, p. 474–482, 2017.

YAMAGUCHI, N. et al. Competitive regulation of human intestinal β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1) gene expression by hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 α and HNF-4 α . **Life Sciences**, v. 119, n. 1–2, p. 34–39, 2014.

YAMAMIZU, K. et al. PKA/CREB signaling triggers initiation of endothelial and hematopoietic cell differentiation via Etv2 induction. **Stem Cells**, v. 30, n. 4, p. 687–696, 2012.

YAMAMOTO, H. et al. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. **Kidney International**, v. 69, n. 10, p. 1780–1785, maio 2006.

YEH, Y.-C. et al. Indoxyl sulfate, not p-cresyl sulfate, is associated with cognitive impairment in early-stage chronic kidney disease. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 148–152, 2016.

YILMAZ, E. et al. The effects of Ankaferd Blood Stopper on transcription factors in HUVEC and erythrocyte protein profile. **Turkish Journal of Hematology**, v. 28, p. 276–285, 2011.

YIP, K. Y. et al. Classification of human genomic regions based on experimentally determined binding sites of more than 100 transcription-related factors. **Genome Biology**, v. 13, n. 9, p. R48, 2012.

YISIREYILI, M. et al. Indoxyl sulfate promotes cardiac fibrosis with enhanced oxidative stress in hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 92, n. 24–26, p. 1180–1185, 2013.

YOSHIKAWA, D. et al. Plasma Indoxyl Sulfate and Estimated Glomerular Filtration Rate. **Circulation Journal**, v. 78, n. October, p. 3–6, 2014.

YU, M.; KIM, Y. J.; KANG, D.-H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 1, p. 30–9, 2011.

ZALUPS, R. K. Homocysteine and the Renal Epithelial Transport and Toxicity of Inorganic Mercury: Role of Basolateral Transporter Organic Anion Transporter 1. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, p. 2023–2031, 2004.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Handling of the Homocysteine S-Conjugate of Methylmercury by Renal Epithelial Cells: Role of Organic Anion Transporter 1 and Amino Acid Transporters. **Pharmacology**, v. 315, n. 2, p. 896–904, 2005.

ZAWADA, A. M. et al. SuperTAG methylation-specific digital karyotyping reveals uremia-induced epigenetic dysregulation of atherosclerosis-related genes. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 5, n. 6, p. 611–620, 2012.

ZHANG, Q. et al. Organic anion transporter OAT1 undergoes constitutive and protein kinase C-regulated trafficking through a dynamin- and clathrin-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32570–32579, 2008a.

ZHANG, R. et al. Upregulation of rat renal cortical organic anion transporter (OAT1 and OAT3) expression in response to ischemia/reperfusion injury. **American Journal of Nephrology**, v. 28, p. 772–783, 2008b.

ZHANG, T. et al. Drug Transporter and Cytochrome P450 mRNA Expression in Human Ocular Barriers: Implications for Ocular Drug Disposition. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 7, p. 1300–1307, 2008c.

ZHOU, F. et al. The Role of N-Linked Glycosylation in Protein Folding, Membrane Targeting, and Substrate Binding of Human Organic Anion Transporter hOAT4. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 868–876, 2005.

ZHU, C. et al. Evolutionary Analysis and Classification of OATs, OCTs, OCTNs, and Other SLC22 Transporters: Structure-Function Implications and Analysis of Sequence Motifs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0140569, 2015.

ZOCCALI, C. et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 134–141, 2002.

APÊNDICE

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos):

1. GREGORIO, P. C.; FAVRETTO, G.; SASSAKI, G. L.; CUNHA, R. S.; FINCO, A. B.; PECOITS-FILHO, R.; SOUZA, W. M.; BARRETO, F. C.; STINGHEN, A. E. M. Sevelamer Carbonate reduces inflammation in human endothelial cells exposed to Advanced Glycation end Products (AGEs) In: 53RD ERA-EDTA CONGRESS, 2016, Vienna. **Nephrology Dialysis Transplantation**. Nephrology Dialysis Transplantation, 2016. p.i200 - i213
2. FAVRETTO, G.; CUNHA, R. S.; GREGORIO, P. C.; FINCO, A. B.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; PECOITS-FILHO, R.; SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M. p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate uptake by human endothelial cells through organic anion transporters In: 52nd ERA-EDTA CONGRESS, 2015, Londres. **p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate uptake by human endothelial cells through organic anion transporters**. Londres: Oxford University Press, 2015. v.30. p.iii38 - iii39

Apresentação de trabalho:

1. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; MACIEL, R. A. P.; FINCO, A. B.; PECOITS-FILHO, R.; STINGHEN, A. E. M. **Efeito de p-cresol e p-cresil sulfato na expressão de OAT1 em células RASM**, XXVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2016. (Apresentação oral).
2. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; MACIEL, R. A. P.; FINCO, A. B.; PECOITS-FILHO, R.; STINGHEN, A. E. M. **Efeito de p-cresol e p-cresil sulfato na expressão do transportador de ânion orgânico- 1 (OAT1) em células vasculares musculares lisas de coelho (RASM)**, 3ª Mostra de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas – Ciência no Espelho, 2016. (Apresentação de pôster).
3. GREGORIO, P. C.; FAVRETTO, G.; SASSAKI, G. L.; CUNHA, R. S.; FINCO, A. B.; PECOITS-FILHO, R.; SOUZA, W. M.; BARRETO, F. C.; STINGHEN, A. E. M. **O Carbonato de Sevelamer reduz a inflamação em células endoteliais humanas expostas aos produtos de glicação avançada (AGEs)**, 3ª Mostra de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas - Ciência no Espelho, 2016. (Apresentação de pôster).

4. FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; CUNHA, R. S.; FINCO, A. B.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; PECOITS-FILHO, R.; SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M. **Avaliação da captação de *p*-cresil sulfato e indoxil sulfato por células endoteliais via *organic anion transporters* (OATs)**, VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015. (Apresentação oral).

5. FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; CUNHA, R. S.; FINCO, A. B.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; PECOITS-FILHO, R.; SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M. **Captação do *p*-Cresil Sulfato e do Indoxil Sulfato por Células Endoteliais via *Organic Anion Transporter* (OATs)**, 2ª Mostra de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas - Ciência no Espelho, 2015. (Apresentação de pôster).

Participações em eventos:

1. 3ª Mostra de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas Ciência no Espelho, 2016.
2. 4º Encontro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia, 2016.
3. IV Semana Científica de Bioquímica, 2016.
4. Curso em RNA: Informação em Tempo-Real, UFPR, 2016.
5. XXVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2016.
6. Curso de Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial: Baciloscopia. Sistema de Educação Permanente, Telelab, Brasil, 2016.
7. 2ª Mostra Anual do Setor de Ciências Biológicas Ciências no Espelho, 2015.
8. III Simpósio de Toxicidade Urêmica, 2015.
9. Semana ECOS 2015, 2015.
10. VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015.
11. Curso em Redox Biology of Vascular Cells, UFPR, 2015.
12. Workshop em Ecotoxicologia, 2015.
13. 2nd Uremic Toxicity Symposium, 2014.

Demais produções técnicas:

1. Participação como palestrante no **Curso de Cultivo Celular** na VIX Jornada do Curso de Biomedicina e Semana de Iniciação Científica da UniBrasil – Evinci, Curitiba, 2016.
2. Participou da organização do **4º Encontro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia**, UFPR, 2016.
3. Participa da organização da **1ª Semana de Microbiologia, Patologia e Parasitologia**, UFPR, 2017.

ANEXO

Artigo aceito para publicação em *Journal of Vascular Research*:

**Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-bound Uremic
Toxins by Human Endothelial Cells and MCP-1 expression**

Giane Favretto¹, Lauro M. Souza^{2,3}, Paulo C. Gregório¹, Regiane S. Cunha¹, Rayana Ariane Pereira Maciel¹, Guilherme L. Sasaki², Maria G. Toledo⁴, Roberto Pecoits-Filho⁵, Wesley M. Souza⁶, Andréa E. Stinghen^{1*}

¹*Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

²*Biochemistry Department, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

³*Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Pequeno Príncipe Complex, 80250-200, Curitiba, PR, Brazil.*

⁴*Pharmacy Department, Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.* ⁵*School of Medicine - CCBS, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, PR, Brazil.*

⁶*Bacteriology and Molecular Biology Laboratory, Clinical Analysis Department Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.*

*Corresponding author: Andréa E. Stinghen, Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Mail Box 19031, Centro Politécnico, Jardim das Américas, CEP 80531-98, Curitiba, Paraná (Brazil). Tel. +55-41-32611691.

E-mail address: andreastinghen@ufpr.br (Andréa E. M. Stinghen)

Artigo submetido em *Clinical Kidney Journal*:

**SEVELAMER REDUCES ENDOTHELIAL INFLAMMATORY RESPONSE TO
ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS**

Paulo C. Gregório¹, Giane Favretto¹, Guilherme L. Sasaki², Regiane S. Cunha¹, Alessandra B. Finco¹, Roberto Pecoits-Filho³, Wesley M. Souza⁴, Fellype de C. Barreto⁵, Andréa E. Stinghen^{1*}

¹*Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.*

²*Biochemistry Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.*

³*School of Medicine - CCBS, Pontifícia Universidade Católica do Paraná,, Curitiba, PR, Brazil.*

⁴*Pharmacy Department, Universidade Federal do Paraná, , Curitiba, PR, Brazil.*

⁵*Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.*

*Corresponding author: Andréa E. Stinghen, Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Mail Box 19031, Centro Politécnico, Jardim das Américas, CEP 80531-98, Curitiba, Paraná (Brazil). Tel. +55-41-32611691.

E-mail address: andreastinghen@ufpr.br (Andréa E. M. Stinghen)

Artigo publicado em *Ciência & Educação*:

doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1516-731320160030003>

Formação inicial docente e suas relações dentro do âmbito escolar

Teachers in Initial training and their relationships
in the school context

Regiane Stafim da Cunha¹ · Marina Rosa Stec dos Santos² ·
Jaqueline Dittrich³ · Maiara Vicentini⁴ ·
Liege da Silva Oliveira Stavis² · Christiane Gioppo Marques da Cruz⁵

Resumo: A formação inicial de professores inclui o estágio em docência, que proporciona a vivência do cotidiano escolar. A partir disso, o presente estudo investiga a experiência de quatro estagiários de professores de Biologia em diferentes turmas de Ensino Médio da Educação Básica. Para tanto, cada estagiário produziu relatos que foram submetidos à análise da ação docente utilizando o instrumento Matriz 3x3 baseado no sistema didático de Chevallard e na gestão das relações com o saber de Charlot, proposto por Arruda, Lima e Passos. O estágio foi marcado pelo uso de diferentes práticas metodológicas, tais como criação e montagem de modelos didáticos, vídeos e gravuras, de forma que os estagiários puderam refletir sobre a prática docente e sobre as relações existentes no âmbito da escola.

Palavras-chave: Formação inicial de professores. Prática docente. Estágio. Ensino de biologia. Ensino médio.

Abstract: Initial training in teaching includes traineeship, providing future teachers the experience of everyday school life. From this, the present study investigates the experience of four biology teacher trainees in different high school classes. Each trainee has produced reports that were submitted to analyze their teaching activities using the 3x3 Matrix instrument based on Chevallard's didactic system and in the relationships with knowledge management of Charlot, which was proposed by Arruda, Lima and Passos. The teaching practice was marked by the use of different methodological practices, such as creating and mounting didactic models, videos and pictures. Thus, the trainees were able to reflect on the teaching practice and on the relationships within the school.

Keywords: Initial teachers training. Teaching practice. Traineeship. Biology teaching. High school.

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: <regidacunha@gmail.com>.

² Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

³ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Maringá, PR, Brasil.

⁴ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Curitiba, PR, Brasil.

⁵ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Teoria e Prática de Ensino, Curitiba, PR, Brasil.

Artigo submetido em Educação & Realidade:

Ciclo de Aprendizagem 5E: relatos de experiência de prática docente

Jaqueline Dittrich¹, Regiane Stafim da Cunha²

Guilherme Sereneski de Oliveira³, João Paulo de Souza Figueiró³, Laura Simões da Costa Pinto⁴,
Sirlei Rosemeri Rothe³, Thais Schaedler⁵, Thaysa Carolina Kruger³, Thiago Brobio Massanti³

¹Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupelia). Av. Colombo, 5790 - PEA - Sala 9 - Bloco G-90, CEP 87.020-900. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

²Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Av. Cel. Francisco H. dos Santos, S/N, Setor de Ciências Biológicas, CEP 81.531-970. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas. Av. Cel. Francisco H. dos Santos, S/N, Setor de Ciências Biológicas, CEP 81.531-970. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁴Pós-graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas. Av. Cel. Francisco H. dos Santos, S/N, Setor de Ciências Biológicas, CEP 81.531-970. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁵Pós-graduação em Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas. Av. Cel. Francisco H. dos Santos, S/N, Setor de Ciências Biológicas, CEP 81.531-970. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

RESUMO – Ciclo de Aprendizagem 5E: relatos de experiência de prática docente. O Ciclo de Aprendizagem 5E é uma proposta pedagógica na qual o aluno gera suas próprias reflexões. Este estudo tem como objetivo relatar a experiência de aplicação do ciclo por estudantes universitários em estágio docente com alunos do sétimo ano. As atividades realizadas foram descritas e as falas dos docentes foram analisadas por meio de uma Matriz 3x3, que considera a gestão de relação com o saber e os segmentos professor-saber, professor-estudante e estudante-saber. Houve uma maior concentração de frases na gestão do segmento professor-estudante, indicando preocupação dos estudantes em relação ao ensino e à forma de abordar os conteúdos em sala de aula. Constatou-se que essa experiência foi construtiva para a formação dos docentes.

Palavras-chave: **Ciclo de Aprendizagem 5E. Metodologia de ensino. Formação de professores. Relação com o saber.**

ABSTRACT – 5E Learning Cycle: reports of teaching practice experience. The 5E Learning Cycle is a pedagogical proposal in which the student is induced to reflect and conclude about various subjects. This study aims to expose the use of the 5E Learning Cycle by graduation students in teacher training with middle school students. The activities were described and the trainees' reports were analyzed based on a 3x3 Matrix, which considers the management of the relationships between knowledge-teacher, teacher-student and student-

