

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA BABY COUTO

ESTUDO DA VIA KEAP1/NRF2 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS
AO ESTIMULO URÊMICO

CURITIBA

2015

LETÍCIA BABY COUTO

ESTUDO DA VIA KEAP1/NRF2 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS
AO ESTIMULO URÊMICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Couto, Leticia Baby

Estudo da via de Keap1/Nrf2 em células endoteliais expostas ao estímulo urêmico. / Leticia Baby Couto. – Curitiba, 2015.

53 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lia Sumie Nakao

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

1. Sistema cardiovascular - Doenças. 2. Estresse oxidativo. I. Título II. Nakao, Lia Sumie. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.87



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

“Estudo da via de Keap1/Nrf2 em células endoteliais expostas ao estímulo urêmico”

por

LETÍCIA BABY COUTO

Tese 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:

Prof^a. Dr^a. Lia Sumie Nakao (presidente)

Prof^a. Dr^a. Andréa Moreno

Prof. Dr. Marcel Ramirez

Curitiba, 25 de março de 2015.

“Um cientista deve acima de tudo ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independente daquilo ser o que ele imaginava ver. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão você só vai ver o que espera ver!”

Douglas Adams

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por ter me feito uma pessoa mais forte, nos momentos de fraqueza, sábia, nos momentos de dúvida, e por toda a paz que traz a minha vida.

À minha orientadora, professora Lia, por ter aberto as portas do seu segundo lar pra mim, desde o primeiro dia que cheguei nessa cidade, pela oportunidade, por todo ensinamento, paciência, dedicação, confiança. Por todas as explicações, ideias, conversas e tentativas, e por fazer nascer em mim o amor pela ciência.

Aos professores Silvio Zanata e Adriana Mercadante, por todos os conhecimentos transmitidos, e por sempre terem nos ajudado de alguma forma.

Aos financiadores deste trabalho (CNPq, Fundação Araucária e Redoxoma), à CAPES e ao Programa de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, por toda ajuda, por sempre estarem dispostos a me ensinar e tentar mais uma vez, pela simplicidade e momentos divertidos.

A todos os colaboradores deste trabalho.

À minha querida avó Zilá, por toda paciência e amor em todos esses anos de estudo, por sempre ter me dado todo apoio e suporte para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje, por ter me mostrado, sem precisar fazer nenhum experimento ou teste, que você é a melhor vó que existe no mundo todo.

Ao meu tão amado avô Joel, a quem agradeço hoje com lágrimas nos olhos. A pessoa que mais me faz falta na vida, mas que se faz tão presente todos os dias em seus ensinamentos, e por toda dedicação que teve a mim enquanto esteve comigo. Esse trabalho todo é muito seu, que sempre sonhou em me ver formada. E sei que onde quer que você esteja, está lendo esse trabalho mesmo sem entender, como fez com todos meus trabalhos sempre.

À minha heroína, mãe Joelma, minha primeira e predileta professora, quem me ensinou a viver na escola da vida, minha grande inspiração na vida docente, minha força, minha confidente, a pessoa mais alegre que eu conheço, e com certeza a mãe que todos gostariam de ter!

À minha irmãzinha, Isadora, minha fonte de doçura e inspiração, quem me faz querer ser melhor todos os dias e me mostra que eu nunca devo perder a inocência e o jeito gostoso de levar a vida que uma criança tem.

Ao meu pai, Laércio, por me mostrar que o que não me mata, fortalece. Por tudo que já vivemos, e principalmente, por ter escolhido ser meu pai.

Ao meu primo, Rodrigo, meu companheiro de casa, que assistiu com paciência esses dois anos de muitos desafios. Que me abraçou quando eu precisava, e me deu forças quando achei que não podia mais.

Ao meu melhor amigo e irmão, Rafael (Elzo), quem descobriu comigo as ciências biológicas, quem sempre me incentivou e serve de inspiração todos os dias. Por ter me dado colo e ombro amigo mesmo estando na Dinamarca e por ser o melhor amigo que eu podia ter.

À minha querida amiga Marília, que compartilhou comigo toda a loucura de ser mes-tranda, mesmo que de longe. Por todas nossas conversas, que foram muitas, por toda paci-ênci-a, amor e carinho, e pela nossa amizade eterna.

À minha amiga Izanara, que esteve comigo desde o primeiro dia de mestrado, apesar de não sermos do mesmo laboratório, sempre estivemos a par das pesquisas uma da outra, nos ajudando o máximo que podíamos.

E em especial ao meu namorado Pedro, por me encher de amor todos os dias desses dois anos, impulsionando minha vontade de realizar todos os meus sonhos. Obrigada por acreditar em mim e na minha capacidade, e por me lembrar disso todas as vezes que eu esqueci. Obrigada por apostar nos meus sonhos e me dar a mão, força e amor pra correr atrás deles todos os dias. Obrigada pelo companheirismo, pela paciência, por entender mi-nhas ausências, frustrações e por muitas vezes ter me dado mãozinhas nos experimentos, nos trabalhos, nos slides.

A todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer pra sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.

Sem vocês eu jamais teria conseguido! O meu muito obrigada e eterna gratidão!

RESUMO

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em doentes renais crônicos. O estresse oxidativo participa de vários eventos da patogênia, progressão e complicações da doença renal crônica (DRC), assim como do comprometimento do sistema cardiovascular neste contexto. A via de Keap1/Nrf2 tem sido reconhecida como um mecanismo adaptativo importante da resposta antioxidante a diversas condições patológicas, como diabetes e doenças neurodegenerativas. Contudo, na DRC, esta via mostrou-se inativada após 8 semanas no rim e na artéria aorta no modelo de nefrectomia de 5/6 em ratos. Como as células endoteliais são protagonistas do desenvolvimento de doenças cardiovasculares durante a progressão da DRC, neste trabalho avaliamos a resposta da via Keap1/Nrf2 em células endoteliais de aorta de coelho expostas a um *pool* de soro urêmico humano ou não urêmico. Verificamos que o soro urêmico induz a ativação da via de Keap1/Nrf2, observada pela translocação de Nrf2 para o núcleo e pela expressão gênica de heme oxigenase-1 (HO1) e cisteína ligase (GCLC), por PCR em tempo real, após 5h de tratamento. Após 24h, estes parâmetros voltaram ao estado basal, indicando uma inativação da via. Neste tempo, o gene de Keap1 estava cerca de 26x vezes mais expresso nas células tratadas com o soro urêmico do que com soro não urêmico. Indoxil sulfato é um metabólito que se acumula na DRC, tornando-se então uma toxina urêmica. Avaliamos o efeito desta toxina isoladamente na resposta celular quanto à expressão gênica de HO1, GCLC e Keap1. Os resultados mostraram que células expostas ao indoxil sulfato por 5h apresentam uma expressão significativamente mais alta do gene HO1, mas não do gene GCLC, em relação ao controle negativo. Este aumento significativo de HO1 desaparece após 24h. Em contrapartida, há um aumento não significativo de Keap1 em células tratadas por 24h. Estes dados estão de acordo com os resultados de células expostas ao soro urêmico. No conjunto, nossos dados evidenciaram uma ativação transitente da via de Keap1/Nrf2 nas células endoteliais expostas ao estímulo urêmico e confirma que a uremia prolongada é capaz de inativar esta via.

Palavras-chave: Keap1/Nrf2; Células endoteliais; Heme oxigenase 1 (HO1); Cisteína ligase (GCLC); Estímulo urêmico.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the main cause of death in chronic kidney disease (CKD) patients. The oxidative stress takes place in several events of CKD pathogenesis, progression and complications, including the cardiovascular events. The Keap1/Nrf2 pathway has been recognized as an important adaptive mechanism of antioxidant response in various pathological conditions, such as diabetes and neurodegenerative diseases. In CKD, however, this pathway was shown to be inactivated after 8 weeks, both in the kidney and aorta of 5/6 nephrectomized rats. Given that endothelial cells have an essential role in cardiovascular diseases development during CKD progression, in the present study we evaluated Keap1/Nrf2 pathway response in rabbit aorta endothelial cells exposed to human pools of uremic or of non-uremic sera. Our results showed that uremic serum induced the activation of the Keap1/Nrf2 pathway, as determined by the Nrf2 translocation to the nucleus, and by the expression (qPCR) of heme oxygenase 1 (HO1) and cysteine ligase (GCLC) genes after 5 h treatment. After 24 hours, these parameters returned to the basal levels, indicating inactivation of the pathway. At this time, Keap1 gene was 26x more expressed in cells treated with uremic serum as compared with the non-uremic serum. Indoxyl sulfate is a metabolite that accumulates in CKD, becoming an uremic toxin. We evaluated the effect of this toxin itself in the cellular response determining HO1, GCLC and Keap1 gene expression. The results showed that cells exposed for 5 hours to indoxyl sulfate present significantly higher expression of HO1 gene, but not of GCLC, compared with the negative control. This increased HO1 expression returned to the basal level after 24 hours. These data are in agreement with the results of the cells exposed to uremic serum. Altogether, our data demonstrated a transient activation of the Keap1/Nrf2 pathway in endothelial cells exposed to uremic stimulus, and confirmed that a long uremic condition is able to inactivate this pathway.

Key words: Keap1/Nrf2; endothelial cells; Heme oxygenase 1 (HO1); Cysteine ligase (GCLC); Uremic stimulus.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARE: Elemento de Resposta Antioxidante

COX-2: ciclo-oxigenase 2

CTRL: controle

DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilindol

DRC: Doença Renal Crônica

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

GCLC: γ -glutamato-cisteína-ligase

HO1: heme-oxigenase 1

HPRT: hipoxantina-guanina fosforibotransferase

KDOQI: Kidney Disease Outcome Quality Initiative

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

LPS: lipopolissacarídeo

Nrf2: fator eritróide de transcrição nuclear 2

NQO1: Nad(p)h desidrogenasequinona 1

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PFA: paraformaldeído

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RAEC: células endoteliais de aorta de coelho

SBN: Sociedade Brasileira de Nefrologia

SNU: soro não urêmico

SU: soro urêmico

tBHQ: *tert*-butilhidroquinona

TFG: taxa de filtração glomerular

LISTA DE IMAGENS

FIGURA 1: *Representação esquemática de um rim.*

FIGURA 2: *Domínios das estruturas de Keap1 e Nrf2.*

FIGURA 3: *O sistema Keap1/Nrf2.*

FIGURA 4: *Efeito do RTA dh404 em Nrf2, alvos de Nrf2 e expressão de Keap1 em aortas de ratos DRC.*

FIGURA 5: *Fluxograma com os passos dos experimentos realizados.*

FIGURA 6: *Caracterização da funcionalidade da via Keap1/Nrf2 nas células RAEC.*

FIGURA 7: *Efeito dos soros não urêmico e urêmico na distribuição de Nrf2 em RAECs tratadas por 5h.*

FIGURA 8: *Efeito dos soros não urêmico e urêmico na distribuição de Nrf2 em RAECs tratadas por 24h.*

FIGURA 9: *Gel de agarose de Keap1, HO1 e GCLC.*

FIGURA 10: *Expressão gênica de HO1 e GCLC em RAECs expostas ao soro não urêmico e urêmico.*

FIGURA 11: *Expressão gênica de Keap1 em RAECs expostas ao soro não urêmico e urêmico.*

FIGURA 12: *Expressão gênica de Keap1, HO1 e GCLC em RAECs expostas a controles positivos e negativos e indoxil sulfato.*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: *Estadiamento da Doença Renal Crônica.*

TABELA 2: *Caracterização dos soros urêmicos.*

TABELA 3: *Primers utilizados em qPCR.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Fisiologia Renal	14
1.2	Insuficiência Renal	16
1.3	Epidemiologia	18
1.4	Complicações da Doença Renal Crônica	18
1.5	Estresse Oxidativo e Uremia	19
1.6	Toxinas Urêmicas Isoladas	20
1.7	Via de Keap1/Nrf2	20
1.8	Ativadores de Nrf2	26
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	<i>Células</i>	29
3.2	<i>Soros humanos</i>	29
3.3	<i>Tratamento celular</i>	29
3.4	<i>Imunofluorescência Indireta</i>	30
3.5	<i>Tratamento para PCR em tempo real</i>	30
3.6	<i>Extração e tratamento do RNA das células</i>	31
3.7	<i>Transcrição reversa</i>	31
3.8	<i>PCR em tempo real</i>	31
3.9	<i>Análises do PCR em tempo real</i>	32
3.10	<i>Análises estatísticas</i>	32
4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fisiologia Renal

Os rins humanos são órgãos encontrados na porção posterior do abdômen, em ambos os lados da coluna vertebral, atrás das últimas costelas, com cerca de 10 a 12 centímetros de comprimento e pesando cerca de 150 gramas, o que equivale a aproximadamente 0,5% do peso corporal em indivíduos adultos. Recebem o sangue circulante sobre o qual realizam importantes funções, a fim de contribuir com a manutenção do metabolismo corporal: regulação do equilíbrio hidroeletrolítico; da osmolaridade dos líquidos corporais e das concentrações de eletrólitos; regulação de hormônios como a eritropoietina e de enzimas como a renina, que, por sua vez, tem papel fundamental na regulação da pressão arterial; e, principalmente, excreção de produtos da degradação metabólica e substâncias químicas estranhas ao organismo (GUYTON, 1998; ANDREOLI, 2005).

Em cada rim existem por volta de um milhão de micro estruturas denominadas néfrons (FIGURA 1), que são as unidades funcionais deste órgão. Estruturalmente, são compostos pelos chamados corpúsculos renais, que compreendem uma rede “filtrante” chamada de glomérulo, formada por mais de 50 capilares sanguíneos paralelos, a qual está envolvida por uma estrutura capsulada, denominada cápsula de Bowman, que por sua vez terminará nos túbulos renais. Estes compreendem o túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e túbulo coletor, regiões especializadas em realizar secreção e reabsorção de substâncias que podem ser reaproveitadas pelo organismo. Além disso, o rim possui um sistema de capilares que são importantes para manter um fluxo sanguíneo constante através e ao redor do néfron, apesar das flutuações da pressão sanguínea (GUYTON, 1998; ANDREOLI, 2005; BRENNER, 2008).

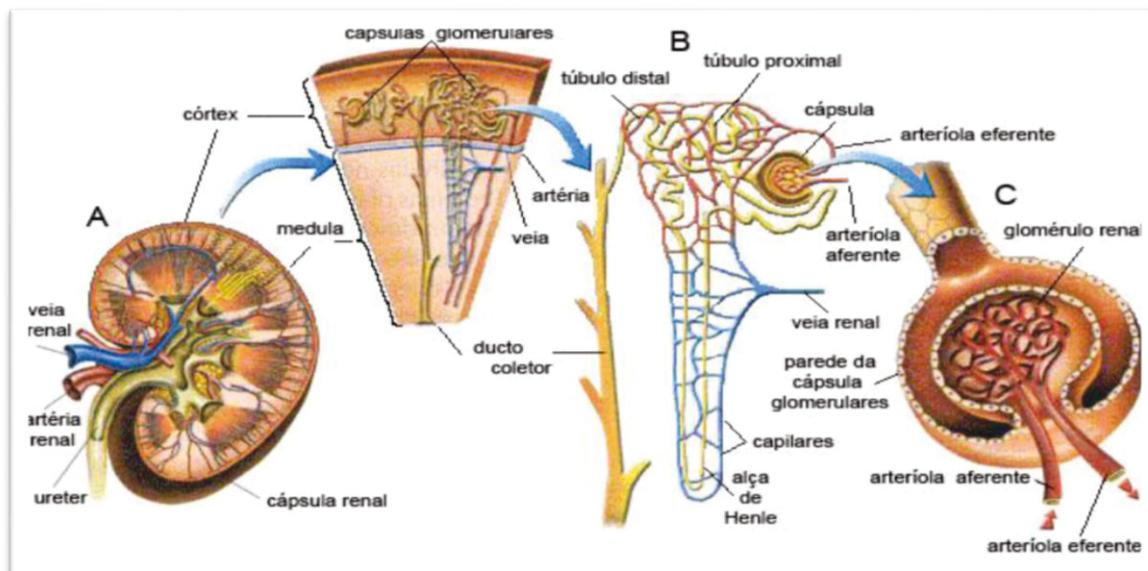


Figura 1: Representação esquemática de um rim e suas estruturas.

Nota: Nesta representação temos esquematizada anatômica e morfologicamente todo aparato do sistema de filtração renal.

Fonte: Adaptado de Cheida,2002.

A filtração glomerular é a primeira etapa na formação da urina. O sangue é conduzido sob alta pressão ao glomérulo através da arteríola aferente. Essa pressão (normalmente 70 a 80 mmHg) possui intensidade suficiente para que parte do plasma passe para a cápsula de Bowman – também denominada Cápsula Renal, por onde as substâncias pequenas - água, sais, vitaminas, açúcares, aminoácidos e excretas - saem do glomérulo (GUYTON, 1998). O líquido que passa do glomérulo para a cápsula de Bowman é conhecido como filtrado glomerular, sendo 98% (cerca de 170 litros/dia) reabsorvido pelos túbulos renais, local em que é processado e os 2% restantes serão transformados em aproximadamente 2 litros de urina/dia em indivíduos saudáveis em idade adulta. Não passarão pelo sistema de filtração da cápsula de Bowman as células sanguíneas- como hemácias e células de defesa por serem muito grandes, e proteínas, pois possuem carga igual à barreira de filtração (ANDREOLI, 2005; BRENNER, 2008).

Sendo assim, o rim realiza a depuração do sangue de substâncias inúteis como produtos finais do metabolismo (uréia, creatinina, ácido úrico, sulfatos e enóis) e também substâncias inorgânicas (íons sódio, potássio, cloreto) que se acumulam no organismo. Este mecanismo é realizado pelo néfron através da combinação de três processos: filtração de grande parte do plasma e elementos sanguíneos não-celulares para o interior dos

túbulos através dos glomérulos; reabsorção de substâncias úteis como água e eletrólitos para os capilares peritubulares, devolvendo-os para a corrente sanguínea; e por fim, a excreção dos componentes indesejáveis do sangue através do líquido resultante, a urina (BRENNER, 2008).

1.2 Insuficiência Renal

A insuficiência renal é conhecida como uma perda da capacidade funcional dos rins, que leva a condições patológicas. Essa insuficiência pode ser dividida em duas categorias principais: Insuficiência Renal Aguda, na qual os rins param de funcionar de forma abrupta, por completo ou quase por completo; e a Insuficiência Renal Crônica, em que ocorre perda lenta e progressiva da função dos néfrons, diminuindo gradualmente a função renal (GUYTON, 1998).

A doença renal crônica é caracterizada pela lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins, seja ela glomerular, tubular ou endócrina (KDOQI – Kidney Disease Outcome Quality Initiative). Em sua fase mais avançada – chamada de fase terminal de insuficiência renal crônica, ou até mesmo de doença renal crônica, os rins não conseguem mais manter a normalidade do meio interno do paciente devido à perda da sua capacidade funcional, sendo necessário assim um tratamento hemodialítico para a filtração do sangue do doente e assim, retirada dos restos metabólicos da circulação, que ao se acumular podem vir a apresentar caráter tóxico às células. Uma característica importante da insuficiência renal crônica é o seu caráter progressivo, que leva à piora da função renal independentemente de sua causa inicial (ROMÃO *ET AL.*, 2004; KOLAGAL *ET AL.*, 2010).

A diminuição do número de néfrons funcionais provoca importante diminuição na excreção renal, sendo o tempo da progressão da doença bastante variável, pois depende de fatores como etiologia da lesão, aspectos étnicos, imunitários e estado hipertensivo. Além disso, a capacidade adaptativa dos néfrons sobreviventes aumenta a taxa de filtração glomerular através de hipertrofia compensatória, mantendo a funcionalidade do rim (GUYTON, 1998). Assim, a perda de até 70% dos néfrons pode ser clinicamente silenciosa, pois não resulta em grave acúmulo de água e eletrólitos nos líquidos corporais.

Sinais clínicos seguidos de terapias substitutivas da função renal, como diálise ou transplante, tornam-se inevitáveis quando o número de néfrons funcionais cai abaixo de

10%. Sendo assim, a taxa de filtração glomerular (TFG) pode ser considerada fator determinante no diagnóstico da insuficiência renal crônica conforme o grau de severidade da doença, classificando-a em cinco estágios (TABELA 1). No estágio 5 o paciente já requer diálise (LEVEY, 2005; BRENER, 2008).

Tabela 1 ESTADIAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA PROPOSTO PELO KDOQI¹ E ATUALIZADO PELO NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITION¹⁰³

Estágios da DRC	Taxa de filtração glomerular*	Proteinúria
1	≥ 90	Presente
2	60-89	Presente
3A	45-59	Presente ou ausente
3B	30-44	
4	15-29	Presente ou ausente
5	<15	Presente ou ausente

*mL/min/1,73m².

Tabela 1: *Estadiamento da Doença Renal Crônica.*

Fonte: KDOQI, atualizado pelo National Collaborating Centre for Chronic Condition – National Kidney Foundation (2002).

A sobrevivência em longo prazo e a qualidade de vida de pacientes com doença renal crônica (DRC) são determinadas pelas complicações que se desenvolvem durante o curso da doença. Os fatores responsáveis por estas complicações têm sido intensivamente investigados. A fase em que começam a aparecer sintomas clínicos e anormalidades bioquímicas em um doente renal crônico é chamada de síndrome urêmica ou uremia, devido ao acúmulo de produtos finais do metabolismo, neste caso consideradas toxinas urêmicas, que devem ser removidos do organismo para garantir continuamente sua normalidade metabólica (GUYTON, 1998). Neste estágio, o paciente sofre com edema generalizado, decorrente da retenção de água e solutos, acidose devido ao acúmulo de produtos ácidos gerados pelo metabolismo, aumento na concentração de solutos nitrogenados não protéico como uréia, creatinina e ácido úrico, e de outras substâncias que devem ser excretadas como fenóis, sulfatos, fosfatos e potássio (GUYTON, 1998; BRENER, 2008).

A detecção precoce da doença renal e condutas terapêuticas apropriadas para o retardamento de sua progressão pode reduzir o sofrimento dos pacientes e os custos financeiros associados à DRC. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DRC são a hipertensão e a diabetes (LEVEY&CORESH, 2012). Além destes, fatores não

clássicos como insuficiência cardíaca, tabagismo, inflamação e estresse oxidativo contribuem para o aparecimento e progressão da doença renal (KARAMOUZIS *ET AL.*, 2008).

1.3 Epidemiologia

Dados da National Kidney Foundation indicam que nos Estados Unidos, Europa e Japão, o número de pacientes com DRC tem aumentado nos últimos anos, sendo assim considerado um importante problema de saúde pública mundial. A Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) divulgou no ano de 2013 que o número de doentes renais no Brasil dobrou na última década. Estima-se que no país 10 milhões de pessoas apresentam alguma disfunção renal, e destas, cerca de 100 mil passam por diálise (SBN, 2013). Os gastos com o programa de diálise e transplante renal no Brasil ultrapassam a faixa de 1,4 bilhões de reais por ano (SBN, 2013).

1.4 Complicações da Doença Renal Crônica

Doenças cardiovasculares são consideradas a maior causa de morte em pacientes no estágio final da doença (LOCATELLI *ET AL.*, 2003; SERRADEL *ET AL.*, 2003). Grandes são os esforços em compreender como a perda da função renal intensifica o risco de doença cardiovascular (CARBO *ET AL.*, 2008; GÜNTNER *ET AL.*, 2009). Considerando a grande ocorrência de doenças cardiovasculares em doentes renais crônicos, as interações entre toxinas urêmicas e células constituintes dos vasos sanguíneos torna-se foco bastante importante devido ao desenvolvimento de lesão vascular (HIMMELFARB *ET AL.*, 2009), sendo esta a principal causa de morte em indivíduos com insuficiência renal crônica em estágio 5 (GÜNTNER *ET AL.*, 2009).

A uremia, proveniente do mau funcionamento renal, afeta as células endoteliais e musculares lisas, através de processos inflamatórios, oxidativo e calcificantes, os quais contribuem para a aterogênese. Já foi demonstrado que o soro urêmico é capaz de ativar células endoteliais (DOU *ET AL.*, 2007; DI MARCO *ET AL.*, 2008, STINGHEN *ET AL.*, 2010), células musculares lisas (MUTELIEFU *ET AL.*, 2012; NIWA *ET AL.*, 2010), células tubulares e células mesangiais (GERLASCO&RAYMOND, 2006). Aumenta a deposição

de cálcio e a expressão de osteopontina em células musculares lisas em cultivo (CHEN *ET AL.*, 2002). Células endoteliais de cordão umbilical humano, em contato com o meio urêmico por 24h, apresentaram mudanças morfológicas, aumento na proliferação celular (SERRADELL *ET AL.*, 2003). Quando células vasculares foram expostas a um meio contendo soro de pacientes em hemodiálise, as células mostraram alterações morfológicas, aumento na taxa de proliferação, sinais de inflamação sem evidência de apoptose, aumentando o risco de aterosclerose (SERRADELL *ET AL.*, 2002; 2003), e um aumento no potencial trombogênico (AZNAR-SALATTI *ET AL.*, 1995; CHITALIA *ET AL.*, 2013). Nosso grupo demonstrou também que o soro urêmico induz HUVEC a expressar moléculas pró-inflamatórias (STINGHEN *ET AL.*, 2009). In vivo, recentemente mostramos que as artérias renais de pacientes de transplantes renais apresentam maior grau de calcificação, lesão aterosclerótica e estresse nitroxidativo do que artérias dos respectivos doadores (GUILGEN *ET AL.*, 2011) e que o estresse oxidativo sistêmico após o transplante renal diminui (AVELES *ET AL.*, 2010). Em conjunto, estes achados associam fortemente a uremia com estresse oxidativo, o que pode induzir a aceleração das doenças cardiovasculares (LEVEY&EKNOYAN, 1999).

1.5 Estresse Oxidativo e Uremia

Outra consequência da DRC é a uremia, caracterizada pelo acúmulo de toxinas urêmicas e metabólitos no sangue, o que causa complicações em vários sistemas, incluindo o vascular. Toxinas urêmicas consistem em um grupo heterogêneo de substâncias que sob condições normais são excretadas pelos rins, mas quando o funcionamento renal está comprometido, essas substâncias permanecem circulantes (BRENNER *ET AL.*, 2008). Uma vez que os rins não são mais capazes de eliminar compostos indesejáveis do sangue, como uréia e creatinina, a hemodiálise é descrita como uma terapia de substituição renal mecânica na qual algumas substâncias são filtradas através de uma membrana semipermeável (HIMMELFARB *ET AL.*, 2009). Entretanto, este processo tem baixa eficiência frente a danos causados por substâncias de baixo peso molecular que se ligam a proteínas maiores, como a albumina, tornando-se difíceis de serem removidas e que se acumulam no sangue dos indivíduos afetados (GÜNTHERNER *ET AL.*, 2009; MASSY *ET AL.*, 2009).

O estresse oxidativo tem sido associado a alguns processos fenotípicos, como apoptose e estresse do retículo endoplasmático (WERNECK *ET AL.*, 2006). Uma elevada taxa de apoptose foi verificada nos leucócitos mononucleares de pacientes renais (GALLI *ET AL.*, 2007; YOON *ET AL.*, 2007), podendo este fato estar ligado ao acúmulo de toxinas urêmicas por retenção (GALLI *ET AL.*, 2007; NIWA *ET AL.*, 2010). Existem também várias evidências mostrando que a aterosclerose frequentemente coexiste com inflamações sistêmicas, especialmente em pacientes diabéticos em hemodiálise (TINTUT *ET AL.*, 2000).

1.6 Toxinas Urêmicas Isoladas

Mais recentemente, algumas toxinas urêmicas têm sido estudadas isoladamente, como indoxil sulfato, *p*-cresil sulfato e fetuina A. Também foi demonstrado que a interação de substâncias relacionadas à uremia, como *p*-cresol e fetuina A, contribuem para o aumento do risco cardiovascular e calcificações vasculares excessivas em pacientes com DRC (STEVINKEL *ET AL.*, 2008). Em cultura, células tubulares renais tratadas com indoxil sulfato apresentavam um calcificação maior que células saudáveis (PATIDAR *ET AL.*, 2013). Estudos relacionando níveis de indoxil sulfato em sangue de pacientes doentes renais, níveis de calcificação vascular e consequente aumento na mortalidade, mostraram que a relação entre a função renal é inversamente proporcional a calcificação vascular, indicando que o indoxil sulfato seria um dos responsáveis pelo aumento da mortalidade desses pacientes devido a complicações cardiovasculares (BARRETO *ET AL.*, 2009).

1.7 Via de Keap1/Nrf2

Durante a evolução, as células desenvolveram mecanismos de defesa para protegerem-se de insultos tóxicos. Vários fatores de transcrição estão envolvidos na ativação dessas defesas celulares. Um deles é o fator eritróide de transcrição nuclear 2, mais conhecido como Nrf2, que foi identificado como um regulador da expressão dos genes da beta-globulina (MOI *ET AL.*, 1994). Logo foi descoberto que essa proteína é uma reguladora positiva do complexo ARE (Elemento de Resposta Antioxidante) (VENUGOPAL&JAISWAL, 1998), induzindo a expressão de várias enzimas de fase II para

destoxificação de xenobióticos e antioxidantes endógenos que defendem as células do estresse oxidativo (KWAK *ET AL.*, 2002). Hoje se sabe que essa proteína é fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo, como o associado a diabetes e doenças cardiovasculares, atuando como um importante fator de regulação da resposta de defesa celular nestas condições patológicas. Nrf2 contribui também em diversas funções celulares incluindo diferenciação, proliferação, inflamação e síntese lipídica, e há associação de aumento de sua expressão em patologias incluindo câncer, neurodegeneração e doenças cardiovasculares (BRYAN *ET AL.*, 2012).

Nrf2 tem basicamente três domínios principais: O N-terminal, uma região de ligação e o domínio Kelch C-terminal (ZHANG *ET AL.*, 2006). O domínio N-terminal é responsável pela homodimerização da proteína que se liga a Nrf2, Keap1 (ZIPPER&MULCAHY, 2002). A região de ligação é um domínio rico em cisteínas reativas, o que se torna vital para a atividade sensorial dessa proteína (ZHANG&HANNINK, 2003). E o domínio Kelch C-terminal contém seis sequências Kelch conservadas repetidas e é essa região que se fixa ao domínio Neh2 do Nrf2 promovendo sua fixação (ZHANG *ET AL.*, 2006) (FIGURA 2).

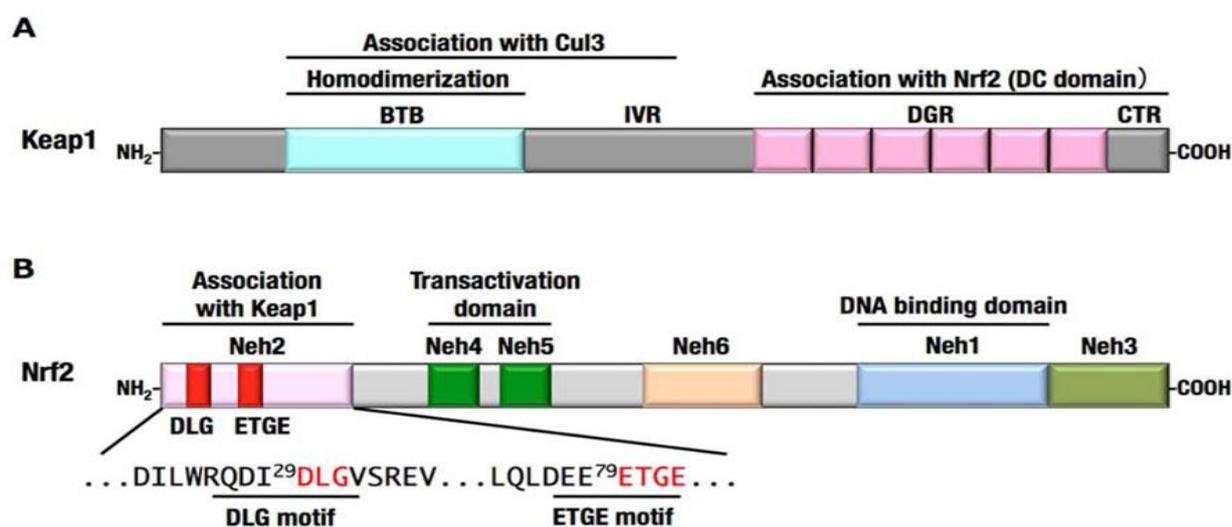


Figura 2: Domínios das estruturas de Keap1 e Nrf2.

Nota: A região N-terminal de Keap1 media a homodimerização e associação com Cul3, e a região C-terminal de Keap1 se liga a Nrf2. A região N-terminal de Nrf2 é designada domínio Neh2, que contém dois motivos responsáveis pela interação com Keap1. Os domínios Neh4, Neh5 e Neh3 são importantes para a transativação de Nrf2 (KATO, 2001; NIOI, 2005). O domínio Neh1 é o local onde ocorre a dimerização com Maf e a ligação com o DNA.

Fonte: MITSUISHI *ET AL.*, 2012.

A regulação da atividade da Nrf2 é um fator crítico para a resposta de defesa celular quando sob estresse oxidativo. Sua atividade é essencialmente regulada pela proteína Keap1, um fator citosólico que se liga a Nrf2 para que esta não migre para o núcleo (FIGURA 3). Quando as células são expostas a um estresse oxidativo, Nrf2 se dissocia de Keap1, transloca para o núcleo e ativa a expressão de genes de resposta antioxidante (ZHANG *ET AL.*, 2006). Os genes ativados pela Nrf2 podem ser classificados como enzimas antioxidantes de fase 2, chaperonas moleculares, enzimas reparadoras de DNA e proteínas de resposta antiinflamatória (HAYES *ET AL.*, 1999), e de acordo com suas funções: responsáveis pela homeostasia redox celular, crescimento celular e apoptose, resposta inflamatória e vias de degradação mediada pela ubiquitina (THIMMULAPPA *ET AL.*, 2002; KWAK *ET AL.*, 2003; LEE *ET AL.*, 2003; RANGASAMY *ET AL.*, 2004).

Quando essa via antioxidante foi descoberta, os pesquisadores tinham indícios que a proteína Keap1 apenas tinha função no sequestro de Nrf2 para que esta proteína ficasse retida no citosol e não translocasse para o núcleo formando um heterodímero com Maf, ligando-se a região ARE ativando a expressão de genes antioxidantes. Mas nos últimos anos, foi demonstrado que Keap1 não só atua no sequestro passivo de Nrf2 no citosol, mas também tem um papel crucial na marcação de Nrf2 para ubiquitinação e degradação pelo proteassomo (CULLINAN *ET AL.*, 2004). Keap1 apresenta várias cisteínas reativas que atuam como sensores do estado redox intracelular (BOLATI *ET AL.*, 2013). Exposições a moléculas endógenas ou exógenas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), 15-desoxi-delta 12, 14-prostaglandina J2, ditioletonas, triterpenóides, isotiocianatos, podem modificar as cisteínas reativas em Keap1 (WAKABAYASHI *ET AL.*, 2004), e levar a dissociação do Nrf2 do complexo Keap1/Nrf2 ou induzir mudanças conformacionais em Keap1 para resgatar Nrf2 da degradação proteassomal (CHARTOUMPEKIS *ET AL.*, 2013).

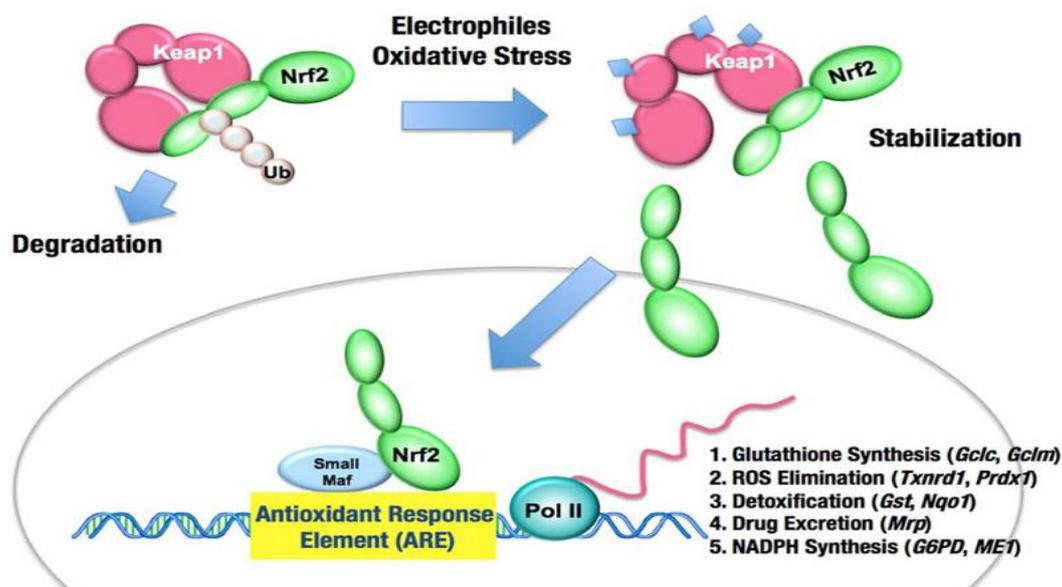


Figura 3: O sistema Keap1/Nrf2.

Nota: Sob condições normais, Nrf2 é constantemente ubiquitinado por um processo dependente de Keap1 e degradado pelo proteassomo. Quando exposto a eletrófilos ou a algum estresse oxidativo, Keap1 é inativado. Assim Nrf2 transloca para o núcleo e ativa a expressão de vários genes protetores celulares.

Fonte: MITSUISHI ET AL., 2012.

Células HEK293T superexpressando Nrf2 apresentam esta proteína predominantemente no núcleo. Já quando co-transfectada com Keap1, as duas proteínas se co-localizam no citoplasma (ITOHI ET AL., 1999). Este foi um dos experimentos que demonstrou a grande importância da proteína Keap1 para a regulação negativa de Nrf2. Outro experimento envolvendo camundongos knockout para Keap1, demonstrou que esses animais não sobreviviam mais do que três semanas e morriam por ulcerações estomacais (WAKABAYASHI ET AL., 2003). Esses e outros achados estabelecem que o papel de Keap1 não é apenas um regulador negativo e responsável pela ubiquitinação da proteína Nrf2, mas também desempenha um papel vital para o funcionamento dessa via antioxidante.

Comparando a atividade inibitória de Keap1 na forma selvagem com mutadas em cultura de células, foram identificadas duas cisteínas críticas (C273 e C288), localizadas no domínio de ligação da proteína Keap1 de humanos, que foram essenciais para mediar a repressão transcricional de Nrf2 (ZHANG&HANNINK, 2003). Após mais pesquisas, o

mesmo grupo identificou uma terceira cisteína importante (a C151) no domínio N-terminal, que era requerida para ativação da transcrição em resposta ao tratamento com tBHQ e sulforafano.

Cada vez mais a literatura tem mostrado mecanismos alternativos de regulação do Nrf2, incluindo fosforilação do Nrf2 por várias proteínas quinases (PKC, P13K/Akt, GSK- β , JNK), interações com outras proteínas (p21, caveolin-1) e fatores epigenéticos (BRYAN *ET AL.*, 2012). Além disso, vale ressaltar que a diminuição da taxa de degradação de Keap1 também pode ser considerada um mecanismo indireto de regulação de Nrf2 (TAGUCHI *ET AL.*, 2012), já que quando há uma maior quantidade de Keap1 no citosol, há uma maior retenção da proteína Nrf2 nessa região (ITOH *ET AL.*, 1999)

Existem também dados conflituosos no mecanismo pelo qual a proteína Nrf2 se torna livre na célula. Alguns indicam que insultos eletrofílicos podem dissociar o complexo Keap1/Nrf2 (LEVONEN *ET AL.*, 2004; NITURI *ET AL.*, 2009), enquanto outros dados sugerem que esses insultos eletrofílicosna verdade desprendem o complexo Cul3 de Keap1, o que impede a degradação proteassomal de Nrf2 (EGGER *ET AL.*, 2009; RACHAKONDA *ET AL.*, 2008).

Quanto à degradação da proteína Keap1, já foi demonstrado que ela é ubiquitinada *in vivo* e *in vitro* pelo mesmo complexo Cul3 que ubiquitina seu substrato, Nrf2 (ZHANG *ET AL.*, 2005). Isso acontece, pois a proteína Keap1 é considerada um membro da família BTB-Kelch, que apresenta mais de 40 proteínas já listadas no genoma humano. As proteínas dessa família também são capazes de atuar como adaptadoras do complexo Cul3. Assim, alguns experimentos utilizando indutores de estresse oxidativo da família das quinonas (como o tBHQ, tert-butilhidroquinona) aumentou a ubiquitinação de Keap1, resultando em maiores quantidades de Nrf2 ativado (ZHANG *ET AL.*, 2005).

Alguns trabalhos demonstram o papel de Nrf2 em sua ação protetora, tanto *in vitro* como *in vivo*, mas ainda não está claro seu papel em doenças cardiovasculares ligadas a DRC. Já foi descrito que o envelhecimento dos vasos sanguíneos pode estar associado ao comprometimento da via de Nrf2 e desregulação da sinalização redox celular, contribuindo para a incapacidade funcional das artérias (VALCARCEL-ARES *ET AL.*, 2012). Foi observada uma inativação dessa via em aortas de ratos nefrectomizados (FIGURA 4) (AMINZADEH *ET AL.*, 2013).

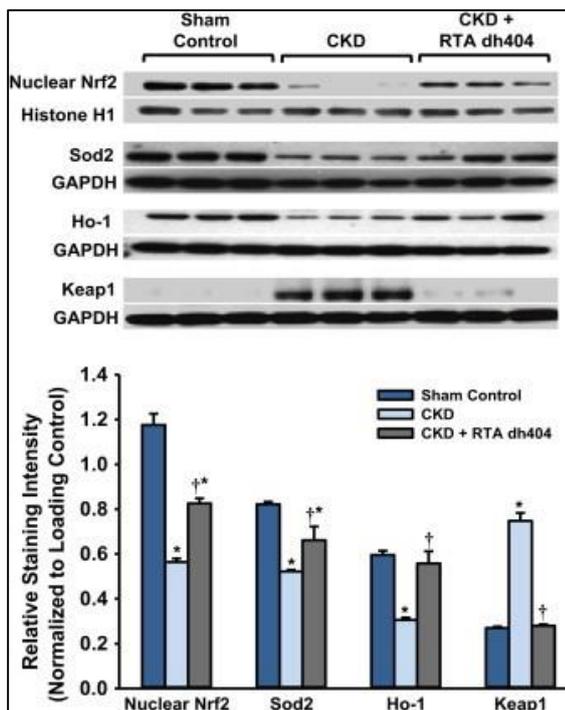


FIGURA 4: Efeito do RTA dh404 em Nrf2, alvos de Nrf2 e expressão de Keap1 em aorta de ratos DRC.

Nota: Representação dos Western blot mostrando a abundância de proteína Nrf2, e genes downstream de Nrf2: superóxido dismutase 2 (SOD2) e heme oxigenase1 (HO-1), bem como Keap1 nas aortas de controle simulado (n = 6) e de 5/6 ratos nefrectomizados [insuficiência renal crônica (IRC)] tratado com veículo (DRC, n = 9) ou dh404 RTA (DRC + RTA dh404, n = 9). A histona H1 serviu como controle de carga para Nrf2, enquanto GAPDH serviu como controle de carga para SOD2, HO-1, e Keap1. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa de controle sham (p < 0,05). Daggers indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de CKD († p < 0,05).

Fonte: AMINZADEH *ET AL.*, 2013.

Em relação a DRC, estudos mostram que o indoxil sulfato, assim como a hipertensão, suprimem a expressão de Nrf2 no rim e em culturas de células tubulares, seguido pela menor expressão de genes antioxidantes como o HO-1 e NQO1, e elevando o nível de 8-OHdG, um produto da oxidação do DNA, indicando estresse oxidativo (BOLATI *ET AL.*, 2013). Já é estabelecido na literatura o papel da via de Keap1/Nrf2 em situações de diabetes, onde se sabe que a hiperglicemia desses pacientes é capaz de ativar a translocação da proteína Nrf2 para o núcleo. Isso ocorre devido à auto-oxidação da glicose, e a produção mitocondrial exagerada de superóxido em células endoteliais de vasos de grande e pequeno portes (LIU *ET AL.*, 2014). Vários estudos têm indicado efeito preventivo da ativação de Nrf2 em situações de glicose elevada induzida em células em cultivo e em estudos de complicações diabéticas em modelos animais (XUE *ET AL.*, 2008). Utilizando células endoteliais em cultivo expostas a alta glicemia, verificou-se que a atividade transcricional de Nrf2 é significativamente aumentada (UNGVARI *ET AL.*, 2011).

1.8 Ativadores de Nrf2

Desde o entendimento da via de Keap1/Nrf2 como fator crucial na defesa celular contra estresse oxidativo, vários estudos têm se voltado a encontrar moléculas que ativem dessa via, a fim de promover uma proteção celular endógena. Já foi relatado que o sulforafano, um dietético natural presente em vegetais como o brócolis, couve de Bruxelas, repolho e couve-flor, é um excelente indutor para a promoção da translocação de Nrf2 para o núcleo celular (HONG *ET AL.*, 2005). Vários estudos têm demonstrado as propriedades protetoras do sulforafano contra danos de isquemia-reperfusão em cérebro (ZHAO *ET AL.*, 2006; CHEN *ET AL.*, 2011) e rim (YOON *ET AL.*, 2008). Em cultivo de cardiomiócitos, o sulforafano promoveu a redução de espécies reativas de oxigênio e a fragmentação do DNA (ANGELONI *ET AL.*, 2009). Experimentos *in vitro* com células tubulares renais da linhagem KH11 mostraram que os danos oxidativos promovidos pelo manitol, um diurético metabolicamente inerte no homem, foi atenuado depois do tratamento com sulforafano (CUI *ET AL.*, 2012).

Além do sulforafano, sabe-se que uma molécula também muito importante e presente em estudos de ativação da via de Keap1/Nrf2 é o tBHQ. Trata-se de um composto antioxidante fenólico sintético amplamente utilizado como conservante em alimentos para prolongar sua validade nas prateleiras. Vários estudos já demonstraram sua eficácia na proteção celular ao estresse oxidativo quando este é provocado por indutores tais como o álcool, a dopamina, o peróxido de hidrogênio, glutamato, entre outros (LI *ET AL.*, 2002; YAN *ET AL.*, 2010). Sabe-se que o papel protetor do tBHQ resulta da ativação de Nrf2 (DINKOVA-KOSTOVA *ET AL.*, 2002; LI *ET AL.*, 2005; YAN *ET AL.*, 2010). Essa ativação ocorre porque este composto é capaz de reagir com o grupo tiol de cisteínas da proteína repressora, Keap1, fazendo com que essa proteína não seja mais capaz de manter Nrf2 ligado, permitindo sua translocação para o núcleo (LI & KONG, 2009).

Estatísticas apontam que um de cada três pacientes diabéticos desenvolvem nefropatia diabética o que aumenta o risco de doenças cardiovasculares. Visando uma melhora neste quadro pela ativação da via de Nrf2, foram realizados estudos com o composto bardoxolone metil, conhecido por reduzir o estresse oxidativo e a inflamação (pela ativação de Nrf2 e inibição de NF- κ B, respectivamente) e pelo aumento na taxa de filtração glomerular em pacientes com DRC associada à diabetes mellitus (ZEEUW *ET AL.*, 2012). Porém o

uso dessa substância foi interrompida após levar a óbito uma alta porcentagem de indivíduos tratados. Esse estudo, que ainda estava em fase de *teste clínico*, foi então interrompido (ZOJA ET AL., 2013).

2 OBJETIVOS

Devido ao impacto das doenças cardiovasculares que acometem doentes renais crônicos (TALL *ET AL.*, 2012) e ao possível papel da via de Keap1/Nrf2 na defesa do organismo contra estresse oxidativo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dessa via em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) expostas ao soro urêmico humano. Para isso, avaliamos:

- 1- A funcionalidade da via Keap1/Nrf2 em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC);
- 2- O efeito da exposição do soro urêmico e não urêmico na ativação da via Keap1/Nrf2 de acordo com o tempo de exposição;
- 3- A expressão dos genes da heme oxigenase1(HO-1) e γ -glutamato-cisteína-ligase (GCLC) ativados pela translocação de Nrf2 para o núcleo celular;
- 4- O papel de uma toxina urêmica isolada, o indoxil sulfato, na indução da via de Keap1/Nrf2.

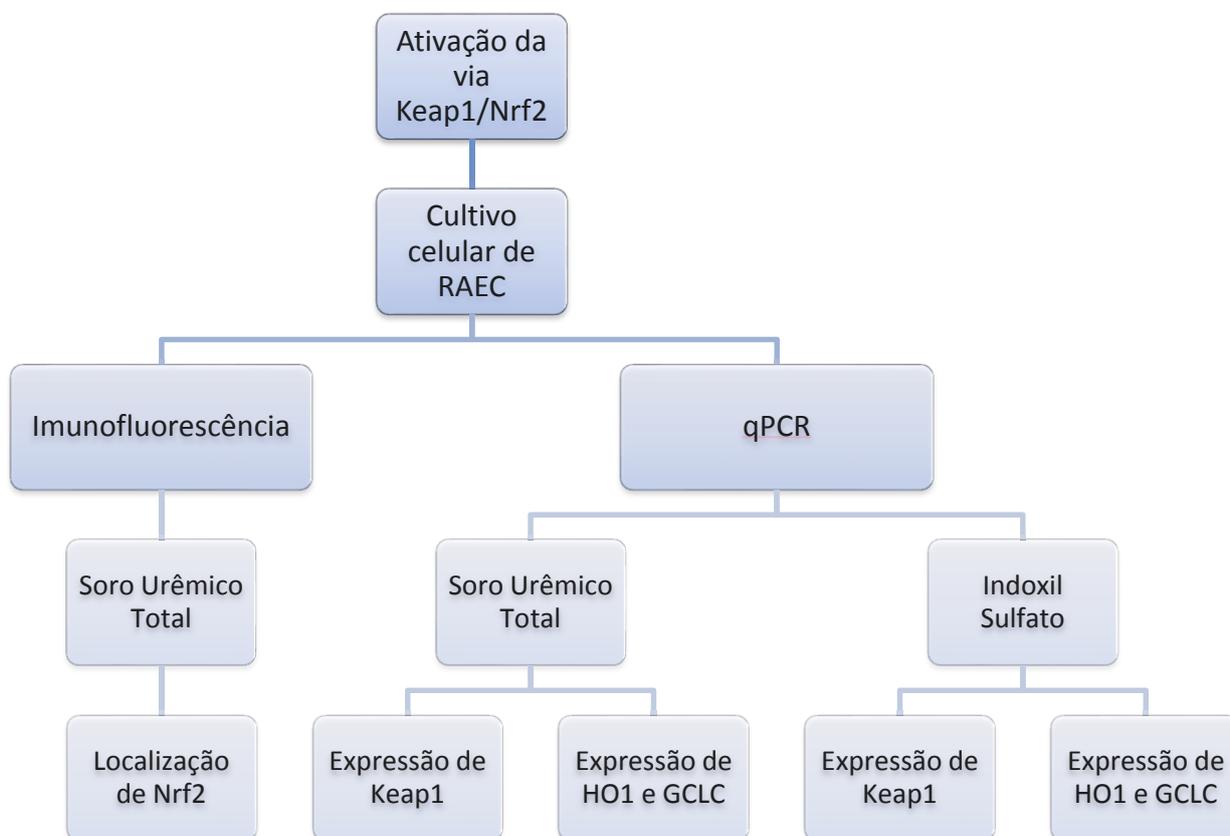


Figura 5: Fluxograma com os passos dos experimentos realizados.
Fonte: O autor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células.

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foram gentilmente cedidas pela Dr^a Helena Nader da UNIFESP. RAECs foram cultivadas em meio F12 (Cultilab) contendo penicilina (100U/mL) e estreptomicina (10µg/mL) e 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Para o repique celular foi utilizada a enzima pancreatina (2,5g/L) para desaderir as células.

3.2 Soros humanos.

Empregamos o uso dos *pools* de soro já utilizado em outras pesquisas em nosso laboratório (RODRIGUES *ET AL.*, 2015). O uso dos soros urêmicos e não urêmicos está aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Paraná, sob processo de número 19868113.3.0000.0102.

Parameters	Non-uremic pool (n = 30)	Uremic pool (n = 29)
Urea (mg/dL)	30.1	151.4
Creatinine (mg/dL)	0.77	8.83
Uric acid (mg/dL)	5.80	7.40
Glucose (mg/dL)	83	115
Calcium (mg/dL)	11	10
Phosphorus (mg/dL)	4.2	6.5
Albumin (mg/dL)	4.7	5.1
Total cholesterol (mg/dL)	215	164
CRP (mg/L)	0.356	1.105
Total thiols (µM)	662	268
Carbonylated proteins (nmol/mg albumin)	0.77	0.97

Tabela 2: Caracterização dos soros urêmicos.

Nota: A caracterização dos soros humanos foi realizada em laboratório de análises clínicas convencional. Esses soros já foram utilizados em outros experimentos realizados pelo nosso grupo.

Fonte: RODRIGUES, 2014.

3.3 Tratamento celular.

As células foram primeiramente carênciadas com 0,5% de soro fetal bovino overnight. Após este passo, foram expostas a tratamentos com ou sem drogas em meio usual (F12 com 10% soro fetal bovino e antibióticos) ou com *pools* de soro humano urêmico (SU) ou *pools* de soro humano não urêmico (SNU), na concentração de 10% v/v. Como controle positivo da translocação de Nrf2 para o núcleo, utilizamos tBHQ (Sigma), na concentração de 50 µM (LI *ET AL.*, 2014), sulforafano (Santa Cruz) na concentração de

5 μ M (ZHANG *ET AL.*, 2003), e glicose, na concentração de 30mM (UNGVARI *ET AL.*, 2011), por 5 e 24 horas, tempos estes escolhidos tomando por referência estudos prévios de nosso grupo (RODRIGUES *ET AL.*, 2015). O controle negativo foi feito com células em cultivo usual, com 10% de soro fetal bovino, em condições normais, sem nenhum estímulo.

3.4 Imunofluorescência Indireta.

As células foram plaqueadas numa confluência aproximada de 3×10^4 células em meio com 0,5% de soro fetal bovino em lamínulas de 13mm (Knitell), e deixadas overnight para adesão. No dia seguinte, as células foram tratadas conforme descrito no item 3.3. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) por 20 minutos. Depois, foram lavadas mais três vezes com PBS e os aldeídos bloqueados com glicina (0,1M) por 5 minutos. A permeabilização das células foi feita utilizando saponina (0,01%) em BSA (1%) em PBS por uma hora. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito pelo BSA contido nas soluções. Após o bloqueio e permeabilização, as células foram incubadas com o anticorpo anti-Nrf2 (Santa Cruz H-300, 1:50) em PBS contendo BSA (1%) durante uma hora em temperatura ambiente. Para retirada do anticorpo não ligado, foram lavadas as lamínulas três vezes com PBS e então, foi feita a adição do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo verde, AlexaFluor 488 (Molecular Probes, 1:1000 em 1% BSA em PBS). O anticorpo secundário foi incubado durante 50 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz (câmara escura). Após a incubação com o secundário, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS. O núcleo foi corado com DAPI (3 μ M, 4'-6-diaminidino-2-fenilindol, Invitrogen) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após estas etapas, as lamínulas foram montadas com fluormount (Sigma) na lâmina e a fluorescência foi avaliada em microscópio de fluorescência no scanner de lâminas (Zeiss) da UFPR, e analisadas. Esses experimentos foram realizados por 5 vezes, independentemente.

3.5 Tratamento para PCR em tempo real.

Os tratamentos realizados para PCR em tempo real foram feitos em placas P100 de RAEC, numa confluência aproximada de 80%. Essas células foram tratadas de mesma forma que descreve o item 3.3, adicionado um tratamento extra, com indoxil sulfato (939 μ M, Sigma). Todos esses tratamentos foram realizados por 5h e 24h, num total de cinco experimentos independentes.

3.6 *Extração e tratamento do RNA das células.*

Após o cultivo e tratamento, o RNA dessas células foi extraído com o auxílio do kit Invisorb Spin Cell RNA (Invitek) de acordo com o manual do kit. Após a extração, a concentração de RNA de cada tratamento era medida no Nanodrop (ThermoScientific). Após a extração, uma eletroforese em gel de agarose (1%, Invitrogen) com 0,5µg de RNA total foi feita para verificar se as bandas 28S e 18S (RNAr) estavam claras e visíveis, a fim de se comprovar a integridade das amostras. 5µg de RNA eram submetidas ao tratamento com DNase (Deoxirribonuclease I - Invitrogen), por 30 minutos à 37°C ao colocar a DNase, e após adicionar o EDTA para inativação da enzima, a temperatura era alterada para 60°C por 10 minutos.

3.7 *Transcrição reversa.*

A transcrição reversa dos RNA's foi realizada com o kit RevertAid Reverse Transcriptase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O primer utilizado foi oligodT (18 pares de base, Fermentas) não contido no kit.

3.8 *PCR em tempo real.*

O PCR em tempo real foi realizado com o kit Sybr Green (Qiagen) sob condições descritas no manual da enzima (95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguidos de temperatura de anelamento e extensão 60°C por 60 segundos, terminando com um gradiente de temperatura de 60°C à 95°C, mantendo por 5 segundos em cada passo de temperatura). Foram utilizados primers (TABELA 3) das regiões de interesse dos seguintes genes: Keap1, HO1, GCLR. O gene normalizador utilizado para foi o hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT). Esses primers foram desenhados com o auxílio do programa primerBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) e sintetizados pela empresa GBT Oligos GenBiotech. A reação foi feita utilizando cDNA (referentes a 500 µg de RNA total), 1,5mM de Sybr Green, 10pmol de primer senso e antisense, e água para completar 10µL de reação em cada tubo. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada replicata técnica de experimentos independentes de células tratadas. Os controles negativos de contaminação eram tubos que não continham cDNA. A reação de PCR em tempo real foi

realizada no termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen) e processada de acordo com o software do próprio instrumento.

<i>Gene:</i>	<i>Forward:</i>	<i>Reverse:</i>
Keap1	5'-CCCATGAACACCATCCGAA-3'	5'-CTACGAAGCTCCAGGTTT-3'
HO1	5'-TTTCAGAAGGGCCAGGTGA-3'	5'-GACCGGGTTCTCCTTGTTG-3'
GCLC	5'-TGAGGATGATGAGGCAGCA-3'	5'-CAGCACTCAGAGCCATAACA-3'
HPRT	5'-GGCTTGCTCGAGATGTGAT-3'	5'-GAGCACACAGAGGGCTACA-3'

Tabela 3: *Primers utilizados em qPCR.*

Nota: Oligonucleotídeos desenhados com base no banco de dados NCBI através do BLAST, e sintetizados pela empresa GBT Oligos GenBiotech.

Fonte: O autor.

3.9 Análises do PCR em tempo real.

Após o término da corrida, os dados obtidos foram salvos, e submetidos à análise usando o *threshold* para gerar os Ct de cada amostra.

3.10 Análises estatísticas.

As análises estatísticas foram realizadas a partir dos valores obtidos com os Δ Ct de cada amostra, gerados após obtenção de seus Cts, média das amostras, desvios padrão e comparação com o Ct do *gene normalizador*. Nas análises de expressão de RNAm, os dados foram avaliados utilizando-se o software STATISTICA (versão 8.0), realizando análises de variância ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *a posteriori* de Tukey-Kramer. Todos os dados estão representados por média \pm erro padrão e foi tomado como significativo $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Caracterização da funcionalidade da via Keap1/Nrf2 nas células RAEC. Os resultados de distribuição de Nrf2 por imunofluorescência demonstram que o tratamento com os ativadores clássicos da via, tBHQ 50 μ M, sulforafano 5 μ M e glicose 30mM, por 5h, induziram uma modificação da localização de Nrf2 nas células em relação ao seu controle, sem tratamento. A imunomarcação nas células não tratadas (controle) apresenta-se predominantemente no citosol (FIGURA 6A), enquanto que nas células expostas a esses ativadores a imunomarcação ficou mais concentrada, principalmente na região perinuclear utilizando o tBHQ (FIGURA 6B) e mais nuclear quando tratadas com sulforafano e glicose (FIGURA 6C E 6D). Estes resultados mostram que células RAEC possuem a via de Keap1/Nrf2 funcional, capaz de ser ativada com a indução de um estresse oxidativo, sendo, portanto, um modelo adequado para nossos estudos.

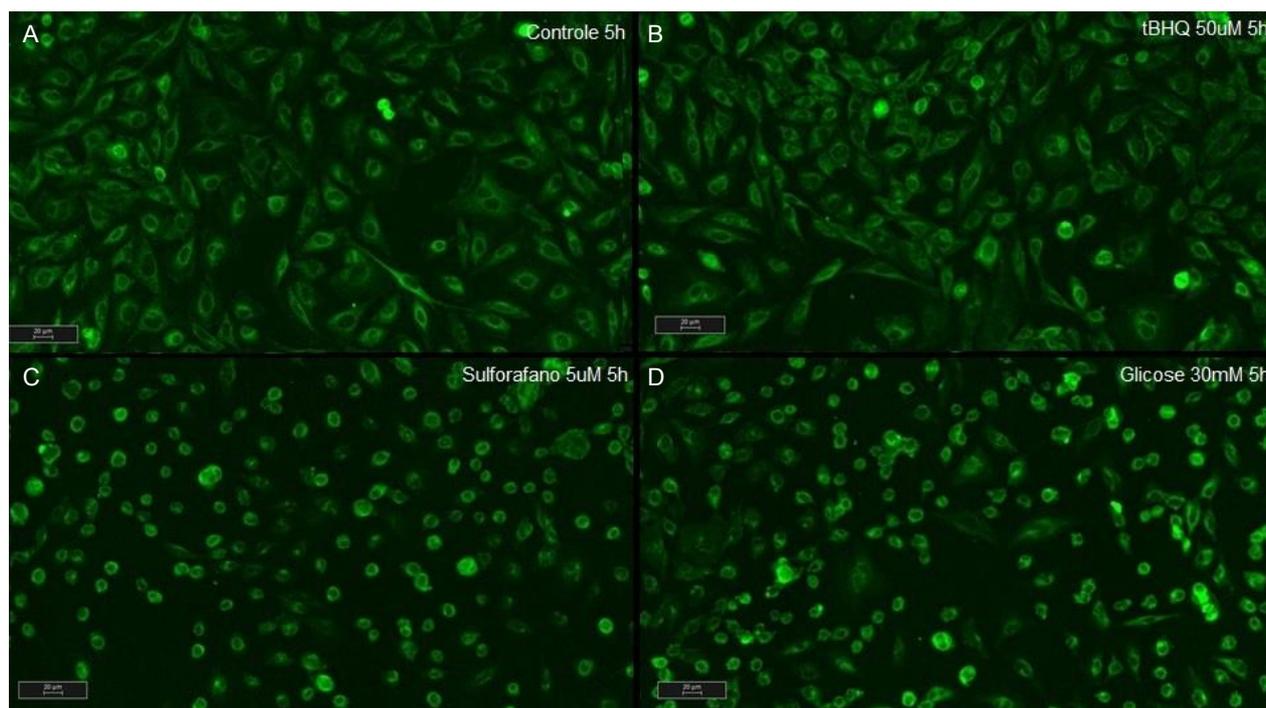


FIGURA 6: *Caracterização da funcionalidade da via Keap1/Nrf2 nas células RAEC.*

Nota: Células RAECs foram plaqueadas em laminulas numa confluência aproximada de $3 \cdot 10^4$ e mantidas em meio completo (10% soro e antibióticos) sem tratamento (A), meio completo acrescido de 50 μ M de tBHQ (B), meio completo acrescido de 5 μ M de sulforafano (C) e meio completo acrescido de glicose 30mM (D) por 5h. Após a reação de imunofluorescência utilizando anti-Nrf2 (1:50) e secundário acoplado a AlexaFluor 488 (Molecular Probes, 1:1000), observou-se a translocação da proteína Nrf2 para a região perinuclear das células que foram expostas ao tratamento com tBHQ (B) e para a região nuclear das células que foram expostas ao tratamento com sulforafano (C) e glicose (D), em comparação com as células mantidas em meio controle (A) Escala em 20 μ m.

Fonte: O autor.

Efeito da exposição das células RAEC ao estímulo urêmico. Com a demonstração de que a proteína Nrf2 transloca para o núcleo em resposta a sulforafano, tBHQ e hiperglicemia nas células RAEC, o próximo passo foi avaliar esta translocação em resposta ao tratamento com *pools* de soros urêmicos e não urêmicos. Os resultados mostraram que enquanto o soro não urêmico não teve efeito na translocação de Nrf2 (FIGURA 7C), o soro urêmico induziu um padrão de imunomarcção mais perinuclear e nuclear em relação ao controle (FIGURA 7D), nas células tratadas por 5h. As imagens controle (FIGURA 7A) e sulforafano (FIGURA 7B) são as mesmas ilustradas acima, e estão no quadro abaixo para fins de comparação.

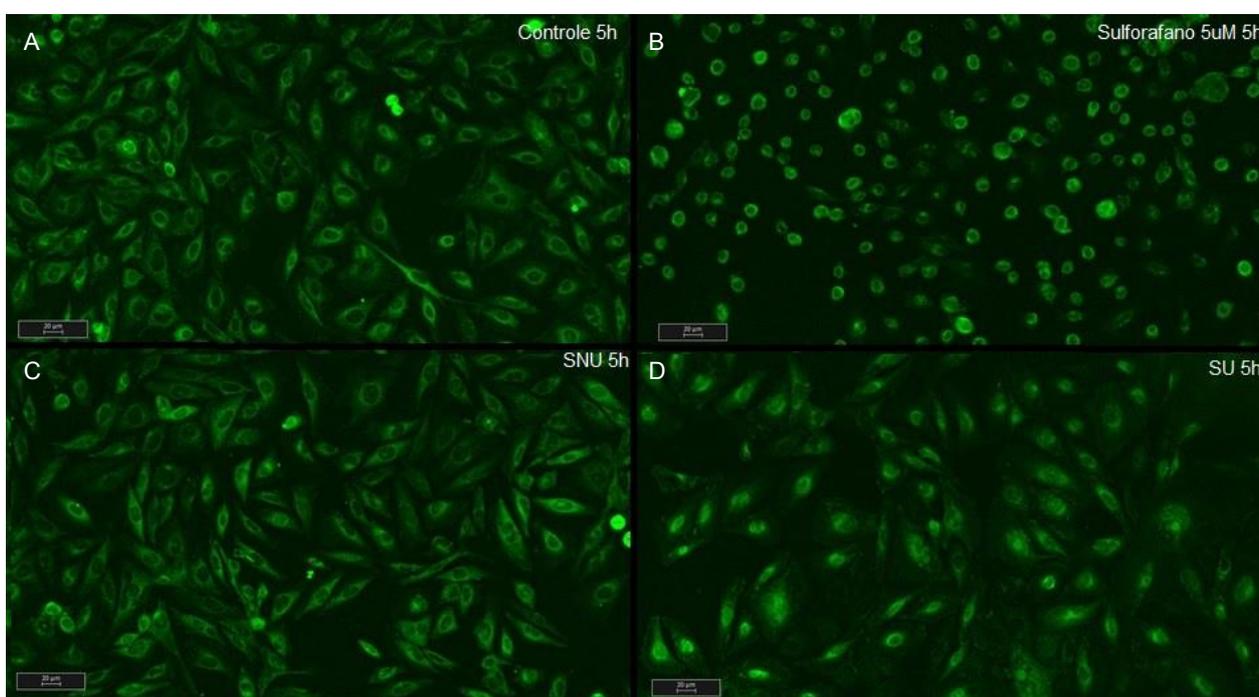


FIGURA 7: Efeito dos soros não urêmico e urêmico na distribuição de Nrf2 em RAECs tratadas por 5h.

Nota: Células RAECs foram plaqueadas em lamínulas numa confluência aproximada de $3 \cdot 10^4$ e mantidas num meio completo (10% soro e antibióticos) sem tratamento (A), meio completo acrescido de 5uM de sulforafano (B), meio acrescido de 10% de soro não urêmico (C) e meio de 10% de soro urêmico (D) por 5h. Após a reação de imunofluorescência utilizando anti-Nrf2 (1:50), e secundário acoplado a AlexaFluor 488 - verde (Molecular Probes, 1:1000), observou-se a translocação da proteína para a região nuclear das células que foram expostas ao tratamento com sulforafano (B) e meio total acrescido de 10% de soro urêmico, em comparação com as células mantidas em meio controle (A) e meio total acrescido de 10% de soro não urêmico (B). Escala em $20\mu\text{M}$.

Fonte: O autor.

Já quando o tratamento dessas células foi feito por 24h, o padrão de imunomarcção das células tratadas com soro urêmico (FIGURA 8D) permaneceu mais abundante no citosol

das células, semelhante as células controle (FIGURA 8A) e nas células tratadas com soro não urêmico (FIGURA 8C), mostrando assim que a translocação nuclear de Nrf2 parece estar inativada após mais horas de exposição, diferentemente do que acontece após a incubação com sulforafano. Nesta condição, Nrf2 permanece no núcleo.

Esses resultados nos mostraram que o soro urêmico induz uma translocação transiente de Nrf2, evidenciada após 5 h de tratamento, seguida de uma inativação da via, observada após 24 h de exposição.

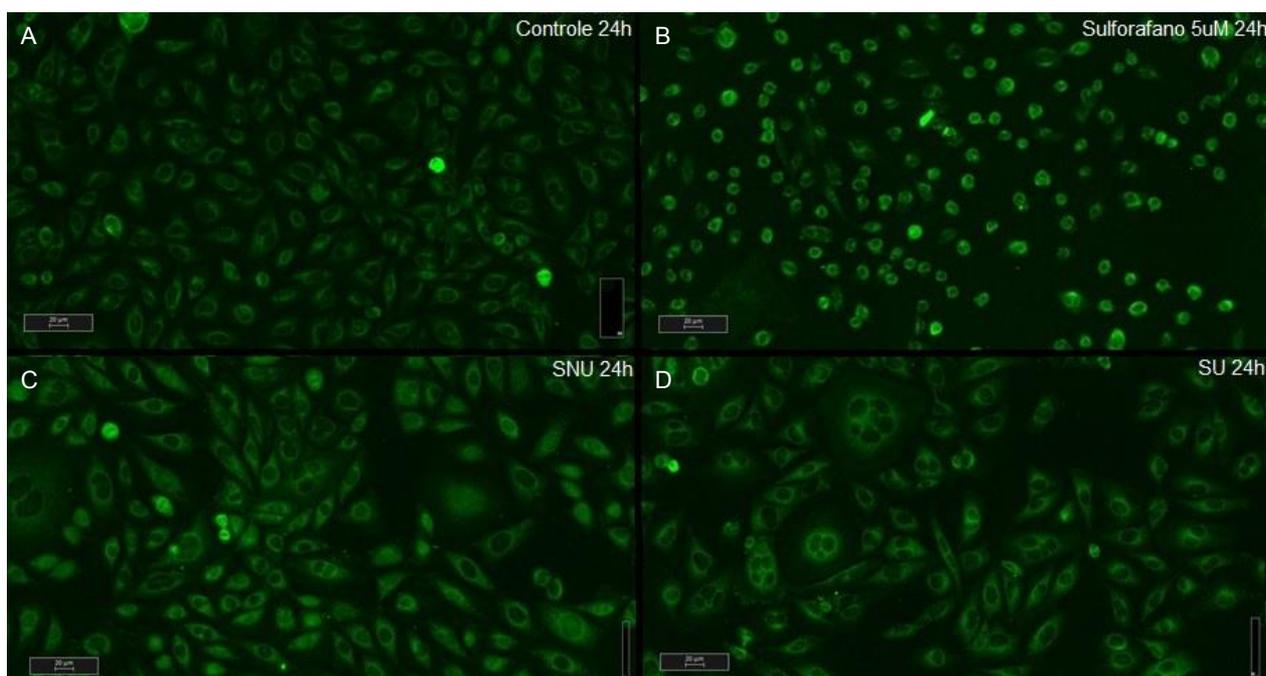


FIGURA 8: Efeito dos soros não urêmico e urêmico na distribuição de Nrf2 em RAECs tratadas por 24h. **Nota:** Células RAECs foram plaqueadas em lamínulas numa confluência aproximada de $3 \cdot 10^4$ e mantidas num meio completo (10% soro e antibióticos) sem tratamento (A), meio completo acrescido de 5uM de sulforafano (B), meio acrescido de 10% de soro não urêmico (C) e meio de 10% de soro urêmico (D) por 5h. Após a reação de imunofluorescência utilizando anti-Nrf2 (1:50), e secundário acoplado a AlexaFluor 488 - verde (Molecular Probes, 1:1000). Observou-se a translocação da proteína para a região nuclear das células que foram expostas ao tratamento com sulforafano (B) em comparação com as células mantidas em meio controle (A). Enquanto as células exposta ao meio total acrescido de 10% de soro urêmico (D) e meio total acrescido de 10% de soro não urêmico (B) apresentaram uma imunomarcacão concentrada no citosol celular. Escala em 20µM.

Fonte: O autor.

Validação dos resultados em qPCR. Para a validação dos resultados em qPCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose para analisar se apenas um fragmento estava sendo amplificado pelos determinados pares de *primers*, confirmando o anelamento do primer apenas na sequência de interesse.

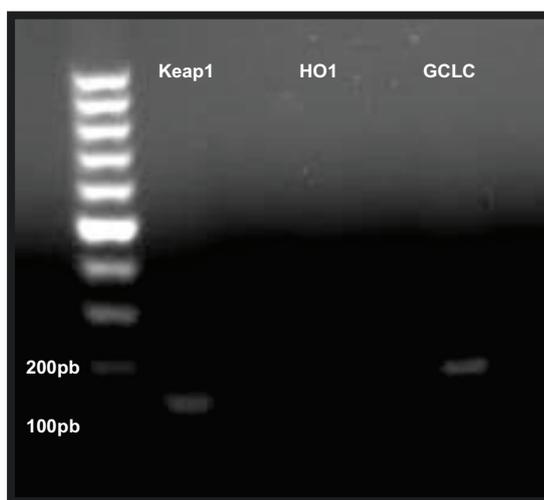


Figura 9: Gel de agarose de Keap1, HO1 e GCLC.

Nota: Gel de agarose de amostras aleatórias de PCR em tempo real, ilustrando que os amplicons únicos em cada amplificação, com tamanhos entre 100 e 200 pares de base, o que está de acordo com os tamanhos esperados.

Fonte: O autor.

Efeito dos soros urêmico e não urêmico na expressão gênica de HO1 e GCLC. Os níveis da expressão dos genes HO1 e GCLC foram analisados em RAEC tratadas com soros não urêmico e urêmico por 5h e 24h. Os resultados mostraram um aumento significativo da expressão destes genes em relação ao controle negativo (dado não mostrado). A expressão desses dois genes apresentou-se significativamente aumentado nas células tratadas com o soro urêmico em comparação às tratadas com soro não urêmico por 5 h. Após 24h, contudo, os níveis regrediram para níveis próximos aos do tratamento com soro não urêmico (FIGURA 10).

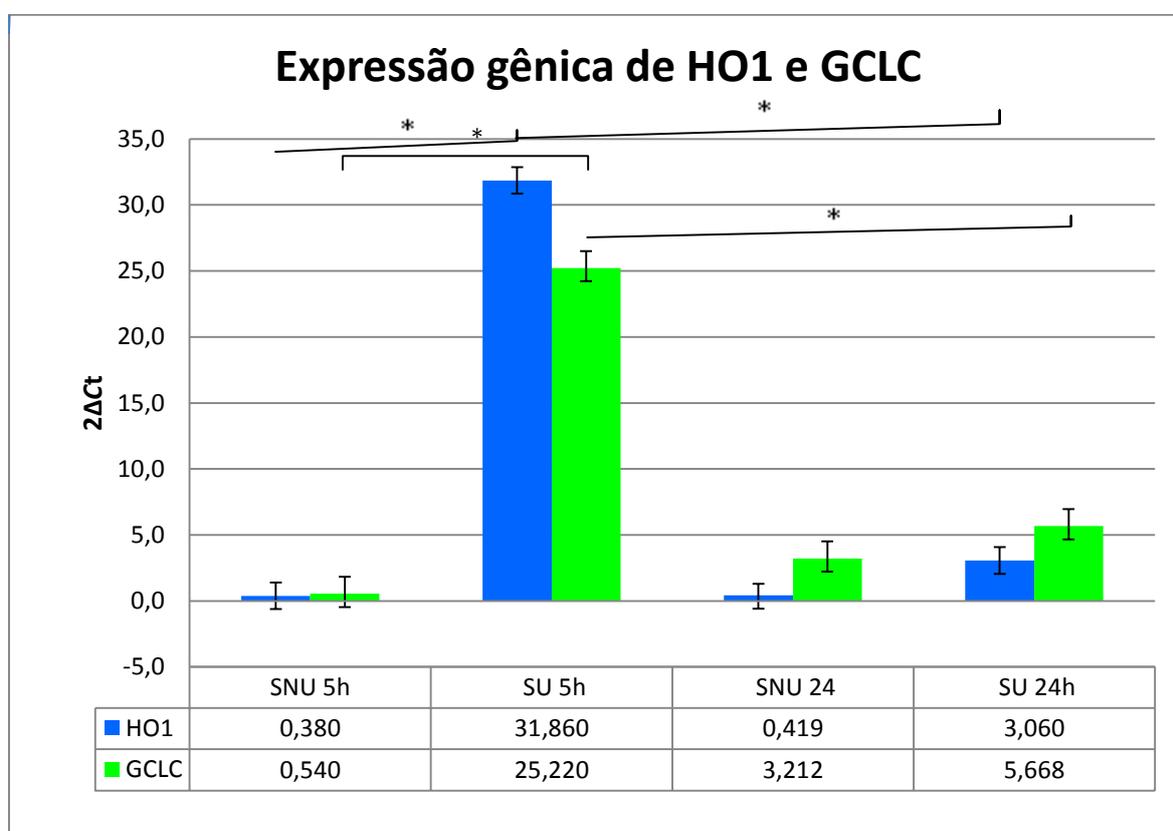


Figura 10: *Expressão gênica de HO1 e GCLC em RAECs expostas ao soro não urêmico e soro urêmico.*

Nota: Células RAEC foram plaqueadas em placas P100 e tratadas com soros não urêmicos e soros urêmicos, mantidas em tratamento por 5h ou 24h. Após o tratamento, o RNA dessas células foi extraído, tratado com DNase, transformado em cDNA e submetido a técnica de PCR em tempo real. *P<0,05.

Fonte: O autor.

Efeito dos soros urêmico e não urêmico na expressão gênica de Keap1. Para verificar um possível papel da proteína repressora na redução da expressão dos genes *downstream* de Nrf2 nessas células, também foi analisada a expressão gênica de Keap1 em células RAEC tratadas com soro não urêmico e soro urêmico. Interessantemente, os níveis de Keap1 não sofreram alterações significativas pela exposição ao soro urêmico após 5h. Após 24h, houve um aumento significativo, de cerca de 26x, nas células tratadas com soro urêmico quando comparadas aos níveis nas células tratadas com o soro não urêmico. Estes resultados indicam que o soro urêmico induz um aumento marcante na expressão gênica de Keap1 após 24 h de exposição (FIGURA 11).

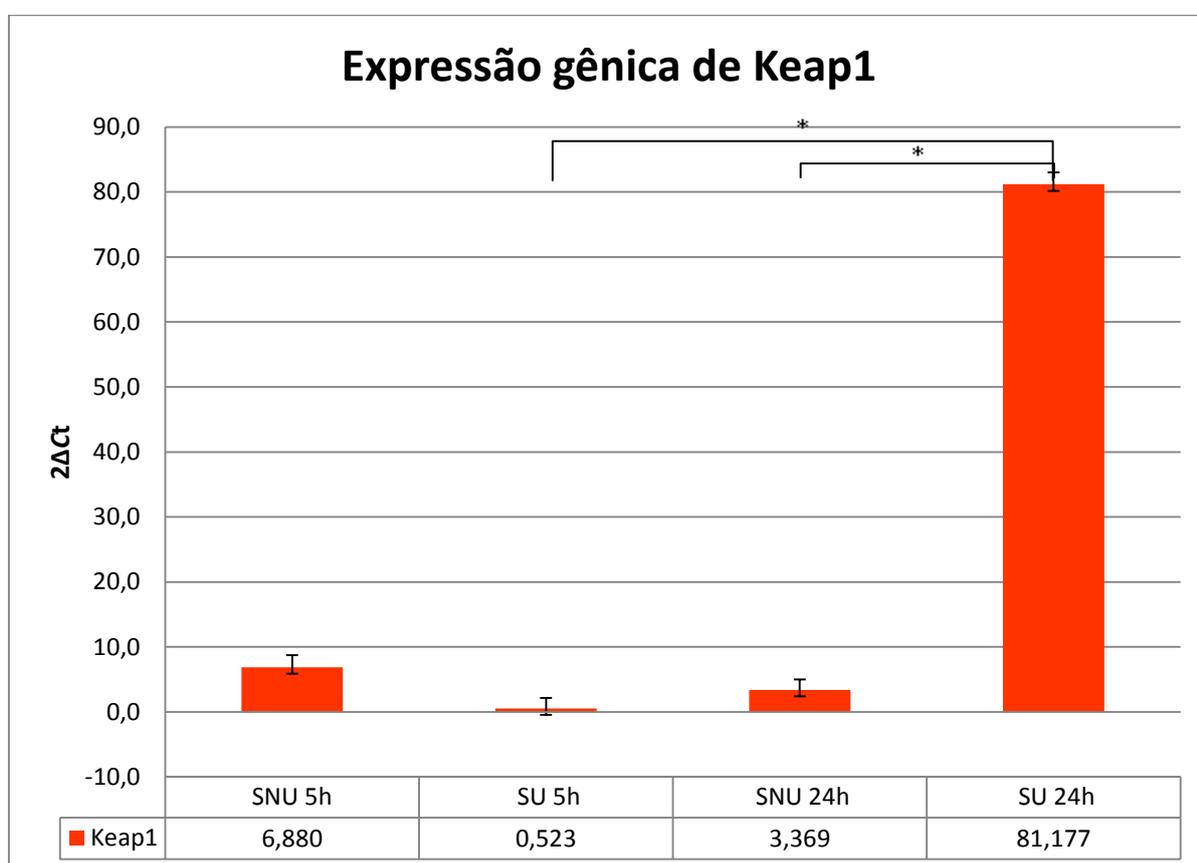


Figura 11: Expressão gênica de Keap1 em RAECs expostas ao soro não urêmico e soro urêmico.

Nota: Células RAEC foram plaqueadas em placas P100 e tratadas com soro não urêmico e soro urêmico, mantidas em tratamento por 5h ou 24h. Após o tratamento, o RNA dessas células foi extraído, tratado com DNase, transformado em cDNA e submetido a técnica de PCR em tempo real..*P<0,05

Fonte: O autor.

Efeito da toxina isolada - indoxil sulfato – na expressão de Keap1 e dos genes downstream HO1 e GCLC. O indoxil sulfato é um dos metabólitos que mais se acumula no sangue em situações de DRC. Para avaliarmos seu papel na inativação da via Keap1/Nrf2 também realizamos tratamentos em RAEC com esta toxina isolada.

Primeiramente, comparamos a expressão dos genes HO1 e GCLC em RAECs tratadas e não tratadas com sulforafano (controle positivo de ativação de Nrf2). Os resultados mostraram que há um aumento dos genes nas células incubadas com sulforafano em relação ao controle negativo após ambos os tempos de exposição, de acordo com os resultados de translocação nuclear de Nrf2 (FIGURA 12). A incubação com indoxil sulfato por 5h induziu um aumento significativo da expressão de HO1, cerca de 7x maior em relação ao controle negativo, mas não na expressão de GCLC. Interessantemente, tal aumento na expressão de HO1 desapareceu após 24h (FIGURA 12). Quando comparadas as expressões dos genes *downstream* nas células tratadas com indoxil sulfato por 5h e 24h, verificamos que há uma diminuição significativa nos níveis de ambos os genes, indicando que o indoxil sulfato contribui para inativar a via de Nrf2 após 24h (FIGURA 12).

A expressão gênica de Keap1 está diminuída nas incubações com sulforafano. E nas incubações com indoxil sulfato, apesar de parece mais expressa que em seu controle, não apresentou diferença estatística após 24h (FIGURA 12).

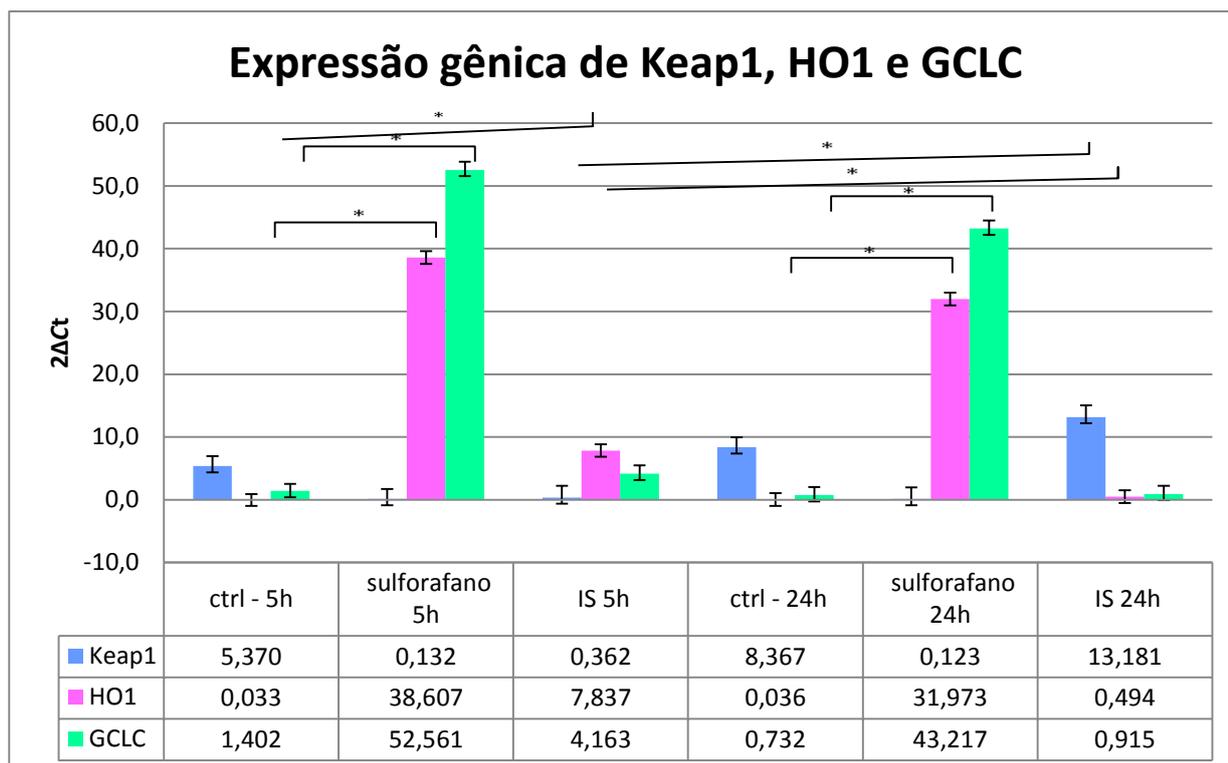


Figura 12: Expressão gênica de Keap1, HO1 e GCLC em RAECs expostas a controles positivos e negativos e indoxil sulfato.

Nota: Células RAEC foram plaqueadas em placas P100 e tratadas com controle positivo, controle negativo e indoxil sulfato, mantidas em tratamento por 5h ou 24h. Após o tratamento, o RNA dessas células foi extraído, tratado com DNase, convertido em cDNA e submetido a PCR em tempo real. *P<0,05

Fonte: O autor.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho analisamos os efeitos do pool de soro urêmico, obtido de pacientes doentes renais crônicos em hemodiálise, assim como de uma das toxinas urêmicas encontradas em maior abundância nestes pacientes – o indoxil sulfato - na ativação da via de Keap1/Nrf2 em células endoteliais de aorta. Estas células foram escolhidas por participarem da constituição da camada mais interna dos vasos sanguíneos. Assim, ficam diretamente expostas às toxinas urêmicas, suscetíveis ao estresse oxidativo associado à uremia (DOU *ET AL.*, 2015).

Nossos dados mostraram que as RAEC apresentam a via Keap1/Nrf2 funcional. A proteína Nrf2 dessas células em cultura é capaz de ser ativada por ativadores clássicos, como o tBHQ, sulforafano e hiperglicemia. Portanto, RAEC mostraram-se um modelo viável em nosso estudo.

Na literatura, já encontramos várias evidências que mostram que a via de Keap1/Nrf2 encontra-se ativada sustentadamente em células endoteliais nos casos de diabetes (UNGVARI *ET AL.*, 2011), uma doença conhecida por gerar estresse oxidativo sistêmico nos pacientes. Deste modo, essa via têm sido considerada um importante alvo terapêutico (ZHENG *ET AL.*, 2011) para uma possível melhora no prognóstico dos indivíduos que sofrem com essa doença. Vários estudos têm se voltado a descobrir tratamentos alternativos às medicações para doenças que expõem o paciente a um estresse oxidativo crônico, como é o caso do diabetes e também da DRC.

Já no caso da cardiovascular relacionada à DRC, foi demonstrada recentemente a inativação da via de Keap1/Nrf2 na aorta de ratos que sofreram nefrectomia de 5/6 (AMINZADEH *ET AL.*, 2013). Esta inativação foi mostrada pela diminuição da expressão de proteínas *downstream* de Nrf2, como a superóxido dismutase 2 e heme oxigenase 1. Tal resultado foi justificado pelo aumento da expressão da proteína Keap1 em animais nefrectomizados. Provavelmente essa proteína estava atuando reprimindo o funcionamento dessa via, por impedir o desligamento do complexo Keap1/Nrf2 encontrado no citosol celular sob condições fisiológicas. Este mesmo resultado - diminuição da expressão de genes *downstream* e aumento da expressão de Keap1 – também foi observado pelo mesmo grupo nos tecidos renais de ratos nefrectomizados em relação ao controle saudável (KIM&VAZIRI, 2010). Nossos dados confirmam que também em células endoteliais a uremia, a longo prazo,

causa uma inativação desta via, possivelmente pelo aumento da expressão gênica de Keap1, que também foi observada. O aumento da expressão proteica de Keap1 já foi observado em aortas de ratos nefrectomizados (AMINZADEH *ET AL.*, 2013). A regulação da expressão desta proteína é complexa, e envolve tanto processos pós-traducionais, como a taxa de sua degradação (TAGUCHI *ET AL.*, 2012), ea expressão transcricional (MISHRA *ET AL.*, 2014), observada em nossos dados.

Um dado interessante que foi observado em nossos experimentos foi a ativação transiente da via de Keap1/Nrf2. Nas primeiras horas de exposição aos estímulos urêmicos, essas células pareceram iniciar um mecanismo de defesa através da expressão de genes antioxidantes de defesa, transcrição essa que é mediada pelo fator nuclear Nrf2. Porém, essa adaptação celular parece não ser sustentada com uma situação de estresse oxidativo grande, por horas prolongadas, e essa via acaba por ser inativada depois de algumas horas. Este dado pode estar relacionado a um resultado recente de nosso grupo, em que o soro urêmico induziu um aumento da relação GSH total/GSSG tanto em RASM (células de músculo liso de coelho) quanto em RAEC após 3 h de incubação, embora não estatisticamente diferente dos níveis obtidos em células tratadas com soro não urêmico. Contudo após 6 e 24h, a relação GSH total/GSSG foi menor nas células tratadas com o soro urêmico do que nas tratadas com o soro não urêmico (RODRIGUES *ET AL.*, 2015).

Nas primeiras 5h de exposição ao soro urêmico, foi observada uma maior translocação de Nrf2 para o núcleo em relação ao controle nas imunofluorescências, e um aumento na expressão dos genes heme oxigenase 1 (HO1) e cisteína ligase (GCLC). Porém, chamamos essa ativação de transiente, pois, depois de 24h de exposição ao estímulo urêmico, houve um retrocesso na translocação de Nrf2 para o núcleo em relação ao seu controle, e uma baixa na expressão dos genes *downstreams* citados anteriormente. Essa queda na expressão de genes *downstream* de Nrf2 após exposição ao estímulo urêmico total ou a toxinas urêmicas isoladas, seja em situações *in vitro* (BOLATI *ET AL.*, 2013) ou *in vivo* (AMINZADEH *ET AL.*, 2013; KIM&VAZIRI *ET AL.*, 2010) também já foi demonstrada em alguns estudos.

Este dado corrobora o aumento da expressão do gene Keap1 em células RAEC tratadas por 24h com soro urêmico, obtido em nossos experimentos. De fato, essa proteína repressora pode estar impedindo a translocação de Nrf2 para o núcleo, impedindo seu papel protetor no sistema antioxidante endógeno celular. O aumento da expressão de Keap1, bem

como a queda na sua degradação, pode ter papel crucial na repressão do funcionamento da via de Keap1/Nrf2.

Como as proteínas *downstream* de Nrf2 têm efeito citoprotetivo e em situações de estresse urêmico suas expressões estão diminuídas em células endoteliais, este fato pode estar relacionado aos altos índice de eventos cardiovasculares e morte em doentes renais crônicos.

Para esclarecer o papel da toxina urêmica isolada, indoxil sulfato, que já foi caracterizada como uma das toxinas urêmicas mais abundantes em soros de pacientes urêmicos, e devido ao seu papel chave nas lesões endoteliais (BARRETO *ET AL.*, 2014), também realizamos experimentos com essa toxina isolada, a fim de fazer uma possível relação dessa toxina com a ativação da via de Keap1/Nrf2. Utilizamos em nossos experimentos a concentração máxima urêmica (939 μ M) de indoxil sulfato no soro urêmico já detectada, e padronizada pelos estudiosos de toxicidade urêmica. Entretanto, estudos recentes apontam para uma revalidação dos efeitos celulares do indoxil sulfato e do *p*-cresil sulfato empregando concentrações médias encontradas nas populações de DRC (VANHOLDER *ET AL.*, 2014)

Nossos resultados de PCR em tempo real mostraram um aumento não significativo de GCLC em células expostas ao estímulo com indoxil sulfato por 5h, e um aumento significativo de HO1. Este aumento foi inferior ao observado para células expostas ao soro urêmico total. Este dado pode estar relacionado ao fato de que o indoxil sulfato, apesar de ser uma das toxinas mais abundantes na circulação de pacientes renais crônicos, pode não causar uma toxicidade tão grande quando está isolado de outras toxinas urêmicas. Além disso, outras toxinas encontradas no soro urêmico total podem, em conjunto, provocar uma maior ativação da via de Keap1/Nrf2.

Quando essas células foram tratadas com a toxina urêmica isolada, indoxil sulfato, por 24h, foi observado um aumento da expressão gênica de Keap1 em relação às células tratadas por 5h, apesar de não significativo. Esse dado, em conjunto com a queda da expressão de genes *downstream* após 24h, parece explicar a menor citoproteção endógena pela inativação da via de Keap1/Nrf2, corroborando os dados de soro urêmico. Assim, foi observado um menor poder de ativação da via quando utilizamos esta toxina urêmica isolada em nossos experimentos, quando estas células eram expostas ao tratamento por 5h. Apesar de vários estudos já terem demonstrado um papel fundamental na inativação da via de

Keap1/Nrf2 provocado pelo indoxil sulfato (BOLATI, 2013; NIWA, 2010), nossos dados nos mostraram que, apesar de aparentemente essa toxina estar inativando a via, seu papel é menos evidente do que nos resultados observados para soro urêmico.

Já foi mostrado na literatura que indoxil sulfato pode estar envolvido na lesão endotelial e é capaz de desencadear a produção de moléculas pró-inflamatórias, como a COX-2, além de ser capaz de inibir a regeneração e reparo do endotélio, e atuar na produção endotelial de radicais livres (DOU, 2004). O mesmo grupo já demonstrou um efeito transiente de ácido indol acético-3 na expressão de COX-2 em células endoteliais, com um aumento de expressão nas primeiras horas e queda nas horas subseqüentes (DOU, 2014). Esse dado nos mostra que outras toxinas urêmicas também são capazes de fazer uma ativação transiente de outras vias redox-celulares.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- 1) As células RAEC possuem a via Keap1/Nrf2 responsivas aos ativadores clássicos, como tBHQ, e principalmente à alta concentração de glicose e sulforafano;
- 2) A exposição ao soro urêmico induz uma ativação transiente da via de Keap1/Nrf2, sendo ela ativa nas primeiras horas de exposição mas inativada depois de 24h de exposição, em relação ao soro não urêmico e aos controles.
- 3) A expressão dos genes da heme oxigenase 1 (HO1) e cisteína ligase (GCLC) foi maior nas primeiras horas de exposição ao soro urêmico, sendo ela reduzida a níveis basais após 24h de exposição ao soro urêmico, em relação ao soro não urêmico e aos controles;
- 4) A toxina isolada, indoxil sulfato, parece ter um papel ativador da via nas primeiras horas, sendo significativo para o gene HO1 e não significativo pra GCLC, porém depois de 24h essa via encontra-se inativada. Mas todos os resultados obtidos para indoxil sulfato foram inferiores aos obtidos para o soro urêmico total.

REFERÊNCIAS

AMINZADEH, Mohammad A. et al. The synthetic triterpenoid RTA dh404 (CDDO-dhT-*FEA*) restores Nrf2 activity and attenuates oxidative stress, inflammation, and fibrosis in rats with chronic kidney disease. **Xenobiotica**, v. 44, n. 6, p. 570-578, 2013.

ANGELONI, Cristina et al. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5615-5622, 2009.

AVELES, Paulo R. et al. Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. **Nephron. Clinical practice**, v. 116, n. 4, p. c294-9, 2009.

AZNAR-SALATTI, J. et al. Uraemic medium causes endothelial cell dysfunction characterized by an alteration of the properties of its subendothelial matrix. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 10, n. 12, p. 2199-2204, 1995.

BALIGA, Radhakrishna et al. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. **American journal of kidney diseases**, v. 29, n. 3, p. 465-477, 1997.

BARRETO, Fellype 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. 10, p. 1551-1558, 2009.

BOLATI, Dilinaer et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- κ B. **BMC nephrology**, v. 14, n. 1, p. 56, 2013.

Brenner BM. Brenner and Rector's. The Kidney. **8^a ed. Philadelphia**: Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 2008.

BRYAN, Holly K. et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and-independent mechanisms of regulation. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 705-717, 2013.

CARBÓ, Carla et al. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, n. 4, p. 603-612, 2008.

CARRERO, Juan J.; STENVINKEL, Peter. Inflammation in End-Stage Renal Disease—What Have We Learned in 10 Years?. In: **Seminars in dialysis**. Blackwell Publishing Ltd, 2010. p. 498-509.

CECIL, R. L.; ANDREOLI, T.; CECIL, E. Medicina interna básica. **4^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara**, 1998.

CHARTOUMPEKIS, Dionysios V.; KENSLER, Thomas W. New player on an old field; the keap1/Nrf2 pathway as a target for treatment of type 2 diabetes and metabolic syndrome. **Current diabetes reviews**, v. 9, n. 2, p. 137, 2013.

CHEIDA, LE. Biologia Integrada. **São Paulo: Ed FTD**, 2002.

CHITALIA, Vipul C. et al. Uremic Serum and Solutes Increase Post-Vascular Interventional Thrombotic Risk Through Altered Stability of Smooth Muscle Cell Tissue Factor. **Circulation**, v. 127, n. 3, p. 365-376, 2013.

CUI, Wenpeng et al. Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

CULLINAN, Sara B. et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 19, p. 8477-8486, 2004.

DE ZEEUW, Dick et al. Rationale and Trial Design of Baradoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes: The Occurrence of Renal Events (BEACON). **Am J Nephrol**, v. 37, p. 212-222, 2013.

DESCAMPS-LATSCHA, Béatrice; DRÜEKE, Tilman; WITKO-SARSAT, Véronique. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. In: **Seminars in dialysis**. Blackwell Science Inc, 2001. p. 193-199.

DI MARCO, Giovana Seno et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 294, n. 6, p. F1381-F1387, 2008.

DINKOVA-KOSTOVA, Albena T. et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11908-11913, 2002.

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.

DOU, Laetitia et al. The Cardiovascular Effect of the Uremic Solute Indole-3 Acetic Acid. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, 2014.

DOU, Laetitia 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.

DRAGER, Luciano F. et al. Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 7, p. 1803-1807, 2004.

DUFFY, Steven; SO, Austin; MURPHY, Timothy H. Activation of Endogenous Antioxidant Defenses in Neuronal Cells Prevents Free Radical-Mediated Damage. **Journal of neurochemistry**, v. 71, n. 1, p. 69-77, 1998.

EGGLER, A. et al. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. **Biochem. J**, v. 422, p. 171-180, 2009.

GALLI, Francesco et al. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 8, p. 1592-1600, 2003.

- GALLI, Francesco. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, n. suppl 5, p. v20-v36, 2007.
- GELASCO, Andrew K.; RAYMOND, John R. Indoxyl sulfate induces complex redox alterations in mesangial cells. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 6, p. F1551-F1558, 2006.
- GOLBIDI, Saeid; BADRAN, Mohammad; LAHER, Ismail. Diabetes and alpha lipoic acid. **Frontiers in pharmacology**, v. 2, 2011.
- GÜNTNER, Thomas et al. PROGRESS IN UREMIC TOXIN RESEARCH: Endothelium and Vascular Smooth Muscle Cells in the Context of Uremia. In: **Seminars in dialysis**. Blackwell Publishing Ltd, 2009. p. 428-432.
- Guyton, AC, Hall, JE. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. **6a Edição, Guanabara Koogan**, 1998.
- HALLAN, Stein I. et al. Age and association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease. **Jama**, v. 308, n. 22, p. 2349-2360, 2012.
- HAYES, John D.; MCLELLAN, LESLEY I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free radical research**, v. 31, n. 4, p. 273-300, 1999.
- HELOISA, MARIA et al. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. **Kidney international**, v. 68, n. 5, p. 2208-2217, 2005.
- HIMMELFARB, Jonathan. Innovation in the Treatment of Uremia: Proceedings from the Cleveland Clinic Workshop: Uremic Toxicity, Oxidative Stress, and Hemodialysis as Renal Replacement Therapy. In: **Seminars in dialysis**. Blackwell Publishing Ltd, 2009. p. 636-643.
- HONG, Fei; FREEMAN, Michael L.; LIEBLER, Daniel C. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. **Chemical research in toxicology**, v. 18, n. 12, p. 1917-1926, 2005.
- INNAMORATO, Nadia G. et al. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 1, p. 680-689, 2008.
- ITOH, Ken et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & development**, v. 13, n. 1, p. 76-86, 1999.
- KARAMOUZIS, Ioannis et al. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. **American journal of nephrology**, v. 28, n. 3, p. 397-404, 2007.
- KAY, Jay et al. Acetylcysteine for prevention of acute deterioration of renal function following elective coronary angiography and intervention: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 289, n. 5, p. 553-558, 2003.

KIM, Hyun Ju et al. Role of intrarenal angiotensin system activation, oxidative stress, inflammation, and impaired nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 activity in the progression of focal glomerulosclerosis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 3, p. 583-590, 2011.

KIM, Hyun Ju; VAZIRI, Nosratola D. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 298, n. 3, p. F662-F671, 2010.

KOLAGAL, V. et al. Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. **Indian journal of nephrology**, v. 19, n. 1, p. 8, 2009.

KWAK, Mi-Kyoung et al. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway Identification of novel gene clusters for cell survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8135-8145, 2003.

LAHERA, Vicente et al. Oxidative stress in uremia: the role of anemia correction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 12 suppl 3, p. S174-S177, 2006.

LEE, Jong-Min et al. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 12029-12038, 2003.

LEVEY, Andrew S. et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney international**, v. 67, n. 6, p. 2089-2398, 2005.

LEVEY, Andrew S.; EKNOYAN, Garabed. Cardiovascular disease in chronic renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 14, n. 4, p. 828-833, 1999.

LEVONEN, A. et al. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. **Biochem. J**, v. 378, p. 373-382, 2004.

LI, Jiang et al. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. **Toxicological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 313-328, 2005.

LI, Jiang; JOHNSON, Jeffrey A. Time-dependent changes in ARE-driven gene expression by use of a noise-filtering process for microarray data. **Physiological genomics**, v. 9, n. 3, p. 137-144, 2002.

LI, Lixin et al. Vascular oxidative stress and inflammation increase with age: ameliorating effects of α -lipoic acid supplementation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1203, n. 1, p. 151-159, 2010.

LI, Wenge; KONG, Ah-Ng. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. **Molecular carcinogenesis**, v. 48, n. 2, p. 91-104, 2009.

LOCATELLI, Francesco et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 7, p. 1272-1280, 2003.

LONDON, Roger et al. Examination of resource use and clinical interventions associated with chronic kidney disease in a managed care population. **Journal of managed care pharmacy: JMCP**, v. 9, n. 3, p. 248-255, 2002.

MARTINES, AEMSSMGE; RIELLA, LS Nakao MC; PECOITS-FILHO, CA Aita R. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron Clin Pract**, v. 111, p. c117-c126, 2009.

MATSUYAMA, Yukie et al. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. **Clinical and experimental nephrology**, v. 13, n. 4, p. 308-315, 2009.

MISHRA, Manish; ZHONG, Qing; KOWLURU, Renu A. Epigenetic modifications of Keap1 regulate its interaction with the protective factor Nrf2 in the development of diabetic retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 55, n. 11, p. 7256-7265, 2014.

MITSUISHI, Yoichiro; MOTOHASHI, Hozumi; YAMAMOTO, Masayuki. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. **Frontiers in oncology**, v. 2, 2012.

MURPHY, Timothy H.; LONG, Mary J.; COYLE, Joseph T. Enhanced NAD (P) H: quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress. **Journal of neurochemistry**, v. 56, n. 3, p. 990-995, 1991.

MUTELIEFU, Gulinuer et al. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 303, n. 2, p. C126-C134, 2012.

NITURE, Suryakant K.; JAIN, Abhinav K.; JAISWAL, Anil K. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. **Journal of cell science**, v. 122, n. 24, p. 4452-4464, 2009.

Niwa T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. **J RenNutr**;20(5 Suppl):S2-6, 2010.

PATIDAR, Ashish et al. Human uraemic serum displays calcific potential in vitro that increases with advancing chronic kidney disease. **Clinical Science**, v. 125, n. 5, p. 237-245, 2013.

PECOITS-FILHO, Roberto. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. **Blood Purif**, v. 330327, p. 2, 2011.

PECOITS-FILHO, Roberto. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. **Blood Purif**, v. 330327, p. 2, 2011.

POLLMAN, Matthew J.; HALL, Jennifer L.; GIBBONS, Gary H. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury influence of redox state and cell phenotype. **Circulation research**, v. 84, n. 1, p. 113-121, 1999.

QUIJANO, Celia et al. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 6, p. H3404-H3414, 2007.

RACHAKONDA, Girish et al. Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 3, p. 705-710, 2008.

RANGASAMY, Tirumalai et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 9, p. 1248, 2004.

RODRIGUES, Silvia D. et al. N-acetylcysteine as a potential strategy to attenuate the oxidative stress induced by uremic serum in the vascular system. **Life sciences**, v. 121, p. 110-116, 2015.

ROMÃO JUNIOR, João Egidio. Doença renal crônica: definição epidemiologia e classificação. **J. bras. nefrol**, v. 26, n. 3, supl. 1, p. 1-3, 2004.

SBN - **Sociedade Brasileira de Nefrologia**. Censo 2013. (2013) Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?censo>>. Acesso em: 28 Jan. 2015

SEGURO, Antonio Carlos; DE FIGUEIREDO, Luiz F. Poli; SHIMIZU, Maria Heloisa M. N-acetylcysteine (NAC) protects against acute kidney injury (AKI) following prolonged pneumoperitoneum in the rat. **Journal of Surgical Research**, v. 175, n. 2, p. 312-315, 2012.

SERRADELL, Mireia et al. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 6, p. 1079-1085, 2003.

SERRADELL, Mireia et al. Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. **haematologica**, v. 87, n. 10, p. 1053-1061, 2002.

STENVINKEL, Peter et al. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle?. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 2, p. 505-521, 2008.

STINGHEN, Andréa EM et al. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. **Blood purification**, v. 29, n. 2, p. 114, 2010.

TAGUCHI, Keiko et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13561-13566, 2012.

TASTEKIN, Nurettin et al. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. **Pharmacological Research**, v. 56, n. 4, p. 303-310, 2007.

TEPEL, Martin et al. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 3, p. 180-184, 2000.

THIMMULAPPA, Rajesh K. et al. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. **Cancer research**, v. 62, n. 18, p. 5196-5203, 2002.

TINTUT, Yin et al. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. **Circulation**, v. 102, n. 21, p. 2636-2642, 2000.

TONG, Kit I. et al. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. **Biological chemistry**, v. 387, n. 10/11, p. 1311-1320, 2006.

UNGVARI, Zoltan et al. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 4, p. H1133-H1140, 2011.

VALCARCEL-ARES, M. Noa et al. Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, p. glr229, 2012.

VANHOLDER, Raymond et al. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 9, p. 1897-1907, 2014.

VAZIRI, Nosratola D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 13, n. 1, p. 93-99, 2004.

WAKABAYASHI, Nobunao et al. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. **Nature genetics**, v. 35, n. 3, p. 238-245, 2003.

WAKABAYASHI, Nobunao et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2040-2045, 2004.

WILLENBERG, Torsten et al. Impact of renal insufficiency on clinical outcomes in patients with critical limb ischemia undergoing endovascular revascularization. **Journal of vascular surgery**, v. 53, n. 6, p. 1589-1597, 2011.

XUE, Mingzhan et al. Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. **Diabetes**, v. 57, n. 10, p. 2809-2817, 2008.

YAN, Dong et al. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response by tert-butylhydroquinone prevents ethanol-induced apoptosis in cranial neural crest cells. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 144-149, 2010.

YAO, Qiang et al. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v. 38, n. 5, p. 405-416, 2004.

YOON, J. W.; PAHL, M. V.; VAZIRI, N. D. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. **Kidney international**, v. 71, n. 2, p. 167-172, 2007.

YU, Xiaofang et al. Oxidative stress in 5/6 nephrectomized rat model: effect of alpha-lipoic acid. **Renal failure**, v. 34, n. 7, p. 907-914, 2012.

ZHANG, Donna D. et al. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30091-30099, 2005.

ZHANG, Donna D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway*. **Drug metabolism reviews**, v. 38, n. 4, p. 769-789, 2006.

ZHANG, Donna D.; HANNINK, Mark. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 22, p. 8137-8151, 2003.

ZHAO, Jie et al. Mangiferin increases Nrf2 protein stability by inhibiting its ubiquitination and degradation in human HL60 myeloid leukemia cells. **International journal of molecular medicine**, v. 33, n. 5, p. 1348-1354, 2014.

ZHENG, Hongting et al. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 3055-3066, 2011.

ZIPPER, Laurie M.; MULCAHY, R. Timothy. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36544-36552, 2002.

ZOJA, Carlamaria; BENIGNI, Ariela; REMUZZI, Giuseppe. The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, p. gft224, 2013.