

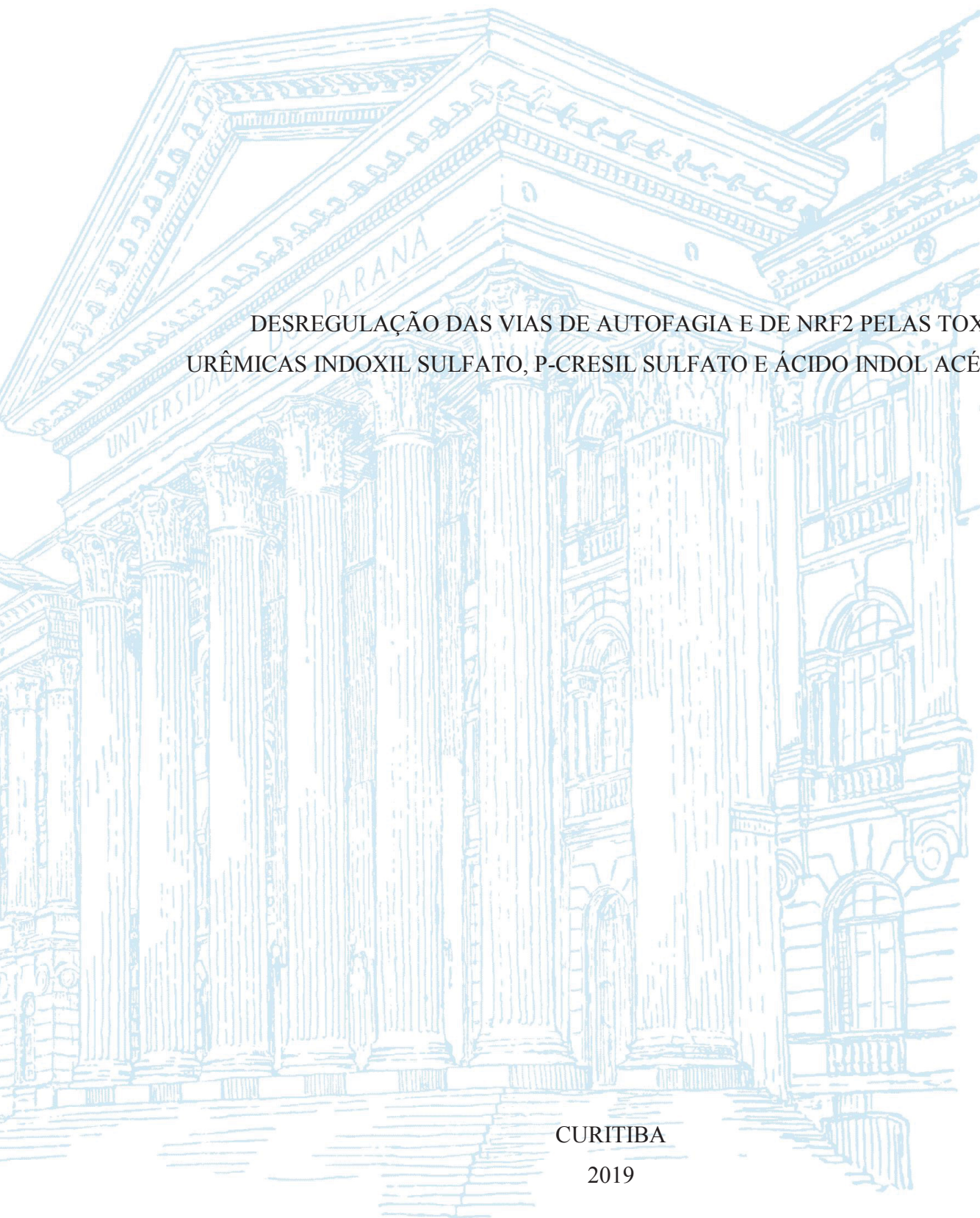
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIA DANIELE RODRIGUES

DESREGULAÇÃO DAS VIAS DE AUTOFAGIA E DE NRF2 PELAS TOXINAS  
URÊMICAS INDOXIL SULFATO, P-CRESIL SULFATO E ÁCIDO INDOL ACÉTICO

CURITIBA

2019



SILVIA DANIELE RODRIGUES

DESREGULAÇÃO DAS VIAS DE AUTOFAGIA E DE NRF2 PELAS TOXINAS  
URÊMICAS INDOXIL SULFATO, P-CRESIL SULFATO E ÁCIDO INDOL ACÉTICO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Básica.

Orientadora: Profa. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Rodrigues, Sílvia Danièle

Desregulação das vias de autofagia e de Nrf2 pelas toxinas urêmicas  
indoxil sulfato, p-cresil sulfato e ácido indol acético. / Sílvia Danièle  
Rodrigues. – Curitiba, 2019.

94 p.: il.

Orientador: Lia Sumie Nakao

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

1. Doença renal 2. Uremia 3. Autofagia 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 (22. ed.) 616.635



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SILVIA DANIELE RODRIGUES** intitulada: "**Desregulação das vias de autofagia e de Nrf2 pelas toxinas urêmicas indoxil sulfato, p-cresil sulfato e ácido indol acético**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO (UFPR)  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. ANDREA EMILIA MARQUES STINGHEN (UFPR)  
Avaliador Interno

Dr. MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA (FIOCRUZ)  
Avaliador Interno

Profa. Dra. GLAUCIA REGINA MARTINEZ (UFPR)  
Avaliador Externo

Profa. Dra. ANDREA NOVAIS MORENO AMARAL (PUCPR)  
Avaliador Externo

*Dedico aos meus pais, João e Eloina,  
pelo imensurável encorajamento e apoio de todas as formas possíveis.  
Aos meus familiares Flávio, Camila, Gustavo e Thiago  
que acreditam no meu potencial e são meus melhores líderes de torcida.  
E aos meus grandes amores da vida:  
Bidu, Susie e Pepperoni*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, professora, amiga e exemplo de pesquisadora Lia Sumie Nakao. Sua paixão à ciência e dedicação ao ensino acadêmico são verdadeiramente encorajadores no cenário atual da pesquisa brasileira.

À Dra Donna Zhang, que me recebeu durante meu estágio nos Estados Unidos e me ensinou o significado de “Workaholic” e “Keep your eyes on the prize”.

Aos professores Silvio Zanata e Adriane Mercadante pelos conselhos e acesso a equipamentos e reagentes.

Aos membros da banca avaliadora, pelo interesse e disponibilidade.

Também quero agradecer as companheiras de ciência: Ingrid, Larissa, Natália, Sze, Pierina, Soraia, Gisele, Sabrina, Tassiana e Karime, meu eterno agradecimento por me ensinarem a cultivar a paciência e a política da boa vizinhança, além disso, por compartilharem seus conhecimentos, boas discussões sobre resultados e muitas risadas.

Também sou grata por ter um apoio de fora do laboratório, seja pelo empréstimo de reagentes ou acesso aos equipamentos, aos alunos dos laboratórios dos professores (e aos professores) Silvio Sanches, Giseli Klassen, Edneia Cavalieri, Juliana de Moura, Larissa Alvarenga, Andrea Stingham, em especial as alunas Regiane Cunha e Giane Favretto.

Não poderia deixar de agradecer imensamente a equipe científica do Laboratório da Dra Zhang: Matt Dodson, Bryan Harder, Wang Tian, Lingjie Bao, Gang Luo e, especialmente a Montse de la Vega e ao Andy Ambrose que me acolheram na vida.

Aos meus amigos, especialmente: Hamanda Badona, Gabriel Massao, Helen Keller, Camilla Pimentel, Lais Romaniuk, Ana Furlanetto, Michele Dietrich, Caroline Fidalgo, Katlyn Campbell, Cintia Aleixo e Rosangela Oliveira.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, bem como, à Universidade Federal do Paraná.

Às agências de fomento CNPq, CAPES (401591/2014-0, 420782/2016-8) e Fundação Araucária pelas bolsas de estudos no Brasil, nos Estados Unidos e pelo financiamento do projeto.

Por último, mas não menos importante, ao Ex-Presidente Luiz Inácio Lula da Silva por implementar os programas PROUNI (Programa Universidade para Todos), REUNI, Ciências sem Fronteiras e por todos os programas de ações sociais afirmativas que incluíram não só a mim mas muitos brasileiros que estavam à margem da sociedade até então, além disso por toda a história de luta e resistência (LULALIVRE).

A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.

(George Bernard Shaw)

## RESUMO

Toxinas urêmicas são substâncias de tamanho variável, que acumulam no sangue de pacientes da doença renal crônica (DRC), e em altas concentrações tornam-se tóxicas. Algumas se ligam a proteínas e por isso não são removidas facilmente pela diálise. Destacam-se indoxil sulfato (IxS), p-cresil sulfato (pCS) e ácido indol acético (IAA), as quais, em concentrações elevadas, estão associadas a mortalidade aumentada dos pacientes de DRC. A principal causa de morte desta população são as doenças cardiovasculares. A autofagia é um processo básico de degradação intracelular, e desempenha uma ação crucial no desenvolvimento, e na sobrevivência de todos os tipos celulares. Em situações de estresse, as células ativam o processo autofágico para lidar com o agente estressor, justificando o efeito deletério da autofagia inibida. Na primeira parte deste trabalho, mostramos que IxS, pCS e IAA, isoladamente ou combinadas, inibem o fluxo autofágico celular. Células tumorais epiteliais (HeLa) tratadas por 4h com as toxinas urêmicas apresentaram uma expressão aumentada das proteínas LC3II e p62, indicando um fluxo autofágico inibido. Este dado foi confirmado por ensaio de fluxo autofágico utilizando bafilomicina A1. A inibição foi demonstrada também por imagem. Células NIH3T3 expressando a proteína mRFP-GFP-LC3 foram incubadas por 4h com as toxinas isoladas ou combinadas e analisadas por microscopia confocal. Além disso, investigamos os efeitos da autofagia inibida em células endoteliais EA.hy926. Os dados obtidos mostraram que células endoteliais tratadas por 48 h com as toxinas urêmicas apresentaram aumento nos níveis de proteínas carboniladas e aumento na sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, efeitos que foram suprimidos quando as células foram pré-tratadas com rapamicina, um agente ativador da autofagia. Na segunda parte deste trabalho, investigamos o efeito das toxinas urêmicas na via de Nrf2, uma vez que já foi demonstrado que autofagia bloqueada pode ativar Nrf2 pela via não-canônica. Nrf2 é uma proteína presente no citossol celular ligado a proteína Keap1 em condições fisiológicas. Quando as células são expostas a agentes eletrofílicos e oxidantes, Nrf2 é acumulada, transloca para o núcleo e atua como fator de transcrição, ativando a transcrição de genes antioxidantes e de detoxificação. Células HeLa expostas por 4 h às toxinas urêmicas apresentaram um aumento na expressão da proteína Nrf2. Para avaliar se esta ativação era resultado da ativação não canônica, comparamos a ativação do gene repórter luciferase em células expressando Keap1 selvagem ou Keap1 C151S, pois a via não-canônica independe do resíduo de cisteína 151. De fato, nossos resultados mostraram que enquanto os ativadores clássicos de Nrf2 sulforafano ou t-butilhidroquinona só ativaram a luciferase em células com Keap1 selvagem, as toxinas urêmicas combinadas ativaram a luciferase tanto em células com Keap1 selvagem como com Keap1 mutado, indicando que a ativação de Nrf2 promovida pelas toxinas é não canônica. Esta ativação, contudo, é transiente, e após 48 h de exposição, é perdida, como demonstrado pela análise de localização subcelular de Nrf2 por microscopia confocal. Finalmente, usando células MEF NRF2 +/+ ou NRF2-/-, mostramos que a viabilidade celular após 48 h de incubação com as toxinas urêmicas apresentou-se diminuída na ausência de Nrf2, corroborando a ideia do importante papel da via Nrf2 na uremia. Em conjunto, nossos dados mostram que as toxinas urêmicas são capazes de inibir o fluxo autofágico após 4h de tratamento, o que leva a uma ativação transiente, mas seguida de uma inativação da via de Nrf2. Estes dados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos de toxicidade urêmica.

Palavras chaves: toxinas urêmicas, autofagia, Keap1- Nrf2, doença renal crônica.

## ABSTRACT

Uremic toxins are variable-sized substances that accumulate in the blood of patients with chronic kidney disease (CKD), and in high concentrations become toxic. Some of them bind to proteins and are not easily removed by dialysis. These include indoxyl sulfate (IxS), p-cresyl sulfate (pCS) and indole acetic acid (IAA), which, in high concentrations, are associated with increased mortality in patients with CKD. The main cause of death in this population is cardiovascular diseases. Atherogenesis has been associated with deficiency in the autophagy pathway in vascular cells. Autophagy is a basic process of intracellular degradation, and plays a crucial role in the development, and survival of all cell types. In stress situations, the cells activate the autophagic process to deal with the stressor, justifying the deleterious effect of inhibited autophagy. In the first part of this work, we show that IxS, pCS and IAA, alone or in combination, inhibit the autophagic cellular flow. Epithelial tumor cells (HeLa) treated for 4 h with uremic toxins showed increased expression of the LC3II and p62 proteins, indicating an inhibited autophagic flux. This data was confirmed by autophagic flow assay using bafilomycin A1. Inhibition was also demonstrated by imaging. NIH3T3 cells expressing the mRFP-GFP-LC3 protein were incubated for 4 h with the toxins isolated or combined and analyzed by confocal microscopy. In addition, we investigated the effects of autophagy inhibited on endothelial cells EA.hy926. The data showed that endothelial cells treated for 48 h with uremic toxins showed increased levels of carbonylated proteins and increased sensitivity to hydrogen peroxide, effects that were suppressed when cells were pretreated with rapamycin, an autophagy activating agent. In the second part of this work, we investigated the effect of uremic toxins on the Nrf2 pathway, since it has already been demonstrated that blocked autophagy can activate Nrf2 by the noncanonical pathway. Nrf2 is a protein present in the cellular cytosol bound to Keap1 protein under physiological conditions. When cells are exposed to electrophilic and oxidizing agents, Nrf2 is accumulated, translocates to the nucleus and acts as a transcription factor, activating the transcription of antioxidant and detoxification genes. HeLa cells exposed for 4 h to uremic toxins showed an increase in Nrf2 protein expression. To evaluate whether this activation was a result of non-canonical activation, we compared the activation of the luciferase reporter gene in cells expressing wild Keap1 or Keap1 C151S, since the noncanonical pathway is independent of the cysteine residue 151. Indeed, our results showed that while the classical activators of Nrf2, sulforaphane or t-butylhydroquinone, only activated luciferase in cells with wild Keap1, the combined uremic toxins activated luciferase in both wild-type Keap1 and mutated Keap1 cells, indicating that activation of Nrf2 promoted by toxins is non-canonical. This activation, however, is transient, and after 48 h of exposure, is lost, as demonstrated by the subcellular localization analysis of Nrf2 by confocal microscopy. Finally, using MEF NRF2<sup>+/+</sup> or NRF2<sup>-/-</sup> cells, we showed that cell viability after 48 h of incubation with uremic toxins was decreased in the absence of Nrf2, corroborating the idea of the important role of the Nrf2 pathway in uremia. Taken together, our data show that uremic toxins are able to inhibit autophagic flow after 4h of treatment, which leads to transient activation, but followed by an inactivation of the Nrf2 pathway. These data may contribute to the understanding of uremic toxicity mechanisms.

Keywords: uremic toxins, autophagy, Keap1- Nrf2, chronic kidney disease.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Biossíntese da geração de p-cresol, p-cresilglucoronidato e p-cresilsulfato a partir da tirosina.....	23
FIGURA 2 – Desenho esquemático para síntese metabólica de indoxil sulfato.....	25
FIGURA 3 - Biossíntese de ácido indol acético (IAA).....	26
FIGURA 4 – Estrutura do domínio esquemático de p62.....	28
FIGURA 5 – Visão esquemática do processo de autofagia.....	39
FIGURA 6 – Etapas e funções fisiológicas da autofagia mediada por chaperonas (CMA).....	30
FIGURA 7 – Mecanismos canônicos e não canônicos de ativação de Nrf2.....	33
FIGURA 8 – Determinação da viabilidade celular por ensaio de MTT.....	43
FIGURA 9 – Cromatograma representativo.....	44
FIGURA 10 – Disfunção da autofagia por toxinas urêmicas.....	46
FIGURA 11 – Ensaio do fluxo da autofagia.....	48
FIGURA 12 – Toxinas urêmicas inibem o estágio tardio da autofagia.....	50
FIGURA 13 – Inibição da autofagia provoca acúmulo de proteínas carboniladas e aumenta a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio.....	55
FIGURA 14 – Toxinas urêmicas ativam a via de Keap1-Nrf2 em células HeLa após 4h de tratamento.....	57
FIGURA 15 – Toxinas urêmicas são indutor de Nrf2 de maneira independente de Keap1 C151S.....	59
FIGURA 16 – Translocação nuclear de Nrf2 em células endoteliais.....	61
FIGURA 17 - Ausência de Nrf2 aumenta a toxicidade das toxinas urêmicas.....	64

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Classificação das toxinas urêmicas.....	22
TABELA 2 – Avaliação da internalização de toxinas urêmicas em células HeLa.	43

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ARE	- elemento da resposta antioxidante
As	- arsênico
ATG	- genes relacionados a autofagia
BafA1	- bafilomicina A1
cDNA	- DNA complementar
Ctrl	- controle
DAPI	- 4'6-diamidino-2-fenilindol
DCV	- doença cardiovascular
DHGNA	- doença hepática gordurosa não alcohólica
DRC	- doença renal crônica
EA.hy926	- célula endotelial de veia humana
EROS	- espécies reativas de oxigênio
EUTox	- grupo europeu de trabalho com toxinas urêmicas
GCL	- glutamato cisteína ligase
GST	- glutathione S-transferase
HCQ	- hidroxicloroquina
HEK-293T	- célula embrionária de rim humano
HeLa	- Henrietta Lacks
HO-1	- heme oxigenase
HPLC	- cromatografia líquida de alto desempenho
IAA	- ácido indol acético
IxS	- indoxil sulfato
Keap1	- Kelch-like ECH-associated protein 1
LC3	- microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
MEFs	- células de fibroblasto embrionário de camundongo
mTOR	- alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	-3-(4,5 difenil) tetrazólio de brometo
NIH-3T3	- fibroblasto embrionário de camundongo
NQO1	- quinona oxirredutase 1
Nrf2	- fator eritróide de transcrição nuclear 2
p62	- sequestossomo 1
PBS	- solução salina tamponada com fosfato

PBUT	- toxinas urêmicas que se ligam a proteínas
pCS	- p-cresil sulfato
PFA	- paraformaldeído
Rap	- rapamicina
RE	- retículo endoplasmático
SF	- sulforafano
SFB	- soro fetal bovino
siRNA	- RNA de interferência
SN	- soro normal
SU	- soro urêmico
tBHQ	- tert-butilhidroquinona
TFG	- taxa de filtração glomerular
UT	- toxinas urêmicas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 <i>Doença renal crônica</i> .....	20
2.2 <i>Toxinas urêmicas</i> .....	21
2.2.1 p-Cresil sulfato .....	23
2.2.2 Indoxil sulfato.....	24
2.2.3 Ácido indol acético .....	25
2.3 <i>Autofagia</i> .....	26
2.3.1 Formação do autofagossomo .....	27
2.3.2 Categorias de autofagia .....	29
2.3.3 Regulação da via autofágica no contexto renal .....	30
2.4 <i>Via de sinalização Keap1/Nrf2</i> .....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Reagentes.....	34
3.2 Preparo das toxinas urêmicas .....	34
3.3 Cultura celular .....	35
3.3.2 MEFs nrf2 selvagem (Nrf2 wt) e Nrf2 nocaute (Nrf2-KO) .....	35
3.4 Determinação da incorporação celular de toxinas urêmicas .....	36
3.5 Viabilidade celular.....	36
3.6 Preparação de plasmídeos (mRFP-GFP-LC3, Keap1 wt e Keap1 C151S).....	37
3.7 Transfecção com <i>siRNA</i> , <i>cDNA</i> e ensaio de luciferase. ....	37
3.8 Análise da expressão protéica por western blotting .....	38
3.9 Imagem de célula viva.....	39
3.10 Imunofluorescência para visualização de translocação nuclear de Nrf2 .....	39
3.11 Determinação de proteínas totais carboniladas por ELISA.....	40
3.12 Dosagem de proteínas celulares .....	40
3.13 Análise estatística .....	41
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA MEDIADA PELAS TOXINAS URÊMICAS .....</b>	<b>42</b>
4.1 Avaliação da viabilidade celular após exposição às toxinas urêmicas e incorporação celular das toxinas em hela.....	42

4.2 Caracterização da perturbação da via de autofagia nos estágios finais em células HeLa...	44
4.3 Observação por imagem da inibição do fluxo autofágico .....	48
4.4 Indução da autofagia pode prevenir danos oxidativos e aumentar a resistência a estresse oxidativo .....	52
4.5 Toxinas urêmicas ativam a via de Keap1-Nrf2 em exposição curta de tempo.....	56
4.6 Toxinas urêmicas também ativam a via Nrf2 por uma via não canônica.....	58
4.7 Translocação nuclear de Nrf2 em células endoteliais tratadas com toxinas urêmicas .....	60
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Uremia é uma condição patológica atribuída à retenção de compostos urêmicos no sangue e tecidos durante o estágio final da doença renal crônica (DRC), os quais em indivíduos saudáveis são eliminados durante a filtração renal do sangue (Brady e Singer 1995; Chao e Chiang 2015). Alguns desses compostos, como o indoxil sulfato (IxS), p-cresil sulfato (pCS), ácido indol acético (IAA) e fenil sulfato se ligam a proteínas sanguíneas e não são facilmente eliminados pelas terapias de diálise convencionais.

Esses compostos são chamados de PBUTs, do inglês *protein-bound uremic toxins*, e podem induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Duranton *et al.* 2012; Vanholder *et al.* 2014, 2012; Vanholder, Laecke, e Glorieux 2008; Vanholder *et al.* 2011, 2003; Vanholder e De Smet 1999), inflamação, hipertrofia tubular, necrose, apoptose, fibrose, glomeruloesclerose e outras desordens envolvidas no processo de falência renal (Maggi *et al.* 1994; Lekawanvijit *et al.* 2012; Dou *et al.* 2007; Serradell *et al.* 2002; Duranton *et al.* 2012; Brunet *et al.* 2011).

Entre as toxinas urêmicas, IxS e pCS tem recebido mais atenção nos últimos anos. Ambas estão implicadas na progressão da DRC (Hyun, Paik, e Cho 2013; Wu *et al.* 2013; Pretorius *et al.* 2013; Liabeuf *et al.* 2016; Shimizu *et al.* 2012; Six *et al.* 2015; Lin *et al.* 2015; Lin *et al.* 2016; Chiang *et al.* 2011; Ito *et al.* 2010; Yu, Kim, e Kang 2011; Dias *et al.* 2018; Liu, Tomino, e Lu 2018), em eventos cardiovasculares e na mortalidade em pacientes em diálises. IAA também tem sido associado com o aumento da mortalidade em pacientes DRC (Dou *et al.* 2014; Boelaert *et al.* 2013).

Diferentes grupos evidenciaram o efeito do soro urêmico como um agente de dano vascular, demonstrando que a exposição de células endoteliais a meio contendo soro urêmico resulta em aumento da expressão e da distribuição de moléculas de adesão celular, além de causar o aumento da secreção de moléculas de adesão nos sobrenadantes da cultura celular (Sagripanti *et al.* 1998; Serradell *et al.* 2002; Moe *et al.* 2003; De Groot *et al.* 2004; Fasoli *et al.* 2006; Stinghen *et al.* 2009; Rodrigues *et al.* 2015; Maciel *et al.* 2018).

Também foi demonstrado que a uremia é capaz de inibir a diferenciação de células endoteliais progenitoras, esse dano celular está diretamente relacionado com a falha dos mecanismos de reparo de danos cardiovasculares em pacientes com insuficiência renal. A toxicidade urêmica em cardiomiócitos afeta a capacidade de contração e relaxamento dessas células e isso pode ser a causa ou um agravante para quadros de disfunção diastólica, umas das complicações cardiovasculares mais comuns relacionadas a falência renal (Periyasamy *et al.*

2001). Em leucócitos o efeito deletério do soro urêmico induz estados pró-inflamatórios e pró-oxidativos (Ando *et al.* 1997; Dou *et al.* 1998; Galli *et al.* 2003; Yoon, Pahl, e Vaziri 2007; Bonan *et al.* 2016), o que poderia explicar o aumento do risco de DVC.

Sistemas naturais de defesa antioxidante, incluindo enzimas antioxidantes de fase II e agentes detoxificantes podem oferecer proteção contra danos em tecidos provocados por EROs. O sistema Keap1- Nrf2 Kelch ECH-associated protein 1 (KEAP1) -NF-E2 p45-related factor 2 (Nrf2) compreende um sistema de citoproteção, particularmente, em resposta ao estresse xenobiótico e oxidativo.

Em condições normais, Nrf2 é continuamente marcado para poliubiquitinação pela atividade do complexo KEAP1-CUL3 através da ubiquitina ligase E3 e assim consequentemente é degradado pelo proteossoma (Dinkova-Kostova, Kostov, e Canning 2016; Kobayashi *et al.* 2004; Zhang e Hannink 2003). Contudo, expondo células ao estresse oxidativo ou eletrófilos, resíduos de cisteína em Keap1 podem ser modificados conduzindo ao acúmulo de Nrf2 devido a uma ubiquitinação deficiente (Zhang *et al.* 2005). Enquanto isso, uma molécula de Nrf2 dissociada de Keap1 é então translocada para o núcleo, iniciando a transcrição dos seus genes alvo. Os genes alvo possuem em elemento da resposta antioxidante (ARE) em suas regiões reguladoras que são reconhecidos por Nrf2, tais genes como, glutamato cisteína ligase (GCL), quinona oxirredutase 1 (NQO1), glutationa S-transferase (GST), heme oxigenase 1 (HO-1) e seus promotores (Motohashi e Yamamoto 2004).

O sistema Keap1- Nrf2 tem mostrado um efeito protetor em diversas patologias, como a DHGNA (doença hepática gordurosa não alcóolica) (Song *et al.* 2016), asma (Nadeem *et al.* 2016), enfisema (Bahmed *et al.* 2016), diabetes (Choi, Kang, e Kwak 2014; Zheng *et al.* 2011; T. Jiang *et al.* 2010), doenças cardiovasculares (Bai *et al.* 2015; Li *et al.* 2011; Chen *et al.* 2015), doenças renais (Aminzadeh *et al.* 2013; Saito 2013; Choi, Kang, e Kwak 2014)

Além da ativação canônica de Nrf2 que é resultado da oxidação de resíduos de cisteínas em Keap1, uma ativação não canônica foi recentemente descrita, essa ativação acontece quando ocorre acúmulo da proteína p62 (Lau *et al.* 2010; Hayashi *et al.* 2015; Dodson e Zhang 2017).

A proteína p62 serve como um adaptador entre a autofagia seletiva e a sinalização de ubiquitina. Consequentemente, p62 está associado a proteínas e agregados de proteínas malformadas que serão degradadas de maneira dependente da atividade autofágica. Assim, p62 pode interagir com Keap1 sequestrando-o nos autofagossomos, permitindo dessa forma a ativação nuclear de Nrf2.

Dessa forma, torna-se interessante o estudo dos mecanismos que envolvem a ativação ou inativação da resposta celular antioxidante mediados pela toxicidade urêmica.

## 1 OBJETIVOS

Sabendo que a doença cardiovascular é a principal causa de morte em pacientes com DRC e, que distúrbios autofágicos e a diminuição da resposta do sistema antioxidante podem estar associados à disfunção endotelial, este trabalho teve como objetivo principal caracterizar o distúrbio da via autofágica e da via Keap1-Nrf2 em células endoteliais expostas a toxinas urêmicas;

Especificamente:

- avaliar o mecanismo de inibição da autofagia promovido pelas toxinas IxS, pCS e IAA em células HeLa;
- avaliar o impacto da inibição da autofagia em células endoteliais;
- avaliar o papel das toxinas IxS, pCS e IAA na ativação não canônica de Nrf2;
- avaliar a ativação de Nrf2 em tempos curto e longo de exposição de células endoteliais às toxinas IxS, pCS e IAA.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doença renal crônica

A perda da capacidade funcional, completa ou irreversível, dos rins é definida como doença renal crônica (DRC), uma vez que os rins tornam-se incapazes de remover os produtos da degradação metabólica corporal ou realizar funções reguladoras (Ribeiro *et al.* 2008; Bastos, Bregman, and Kirsztajn 2010). Substâncias que deveriam normalmente ser eliminadas na urina acumulam-se no sangue gerando uma condição patológica.

Pacientes com DRC apresentam elevada taxa de mortalidade, devido à alta incidência de complicações relacionadas a doenças cardiovasculares (DCV), responsável por aproximadamente 50% do total de mortes (Muxfeldt *et al.* 2010). De fato, sabe-se que a DCV é a principal causa de morte em doentes renais crônicos em fases iniciais ou não, mesmo para pacientes que se encontram em terapia renal substitutiva (Gansevoort *et al.* 2013; Wright and Hutchison 2009).

Entre os fatores de risco tradicionais associados à DRC que mais são relevantes destacam-se a hipertensão arterial e diabetes mellitus (Brunet *et al.* 2011; Sim *et al.* 2015; Malyszko 2010; Muxfeldt *et al.* 2010). Dos danos vasculares causados por essas duas patologias a redução da densidade capilar é um dos mais deletérios, pois aumenta a pressão intraglomerular causando a esclerose glomerular e conseqüentemente a perda da função renal, além disso, acentuam-se as lesões endoteliais causadas pelos produtos finais da glicolisação avançada (Stinghen *et al.* 2016; Tan *et al.* 2002; Fishman *et al.* 2018) e o aumento da produção de angiotensina-2, este último relacionado com a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que induzem o acúmulo de células leucocitárias no interstício renal (Bruchfeld *et al.* 2009).

De fato, a disfunção endotelial, é um evento bem descrito na falência renal (Malyszko 2010; Stam 2006), é comum que doentes renais possuam múltiplos fatores de risco para a DCV e elevada taxa de mortalidade quando comparado a população geral, dado que os danos vasculares causados principalmente pela inflamação, por aumento do estresse oxidativo e pela calcificação vascular associados a disfunção renal contribuem para o desenvolvimento da uremia (Ravarotto *et al.* 2018; Scholze *et al.* 2016; Vaziri 2004; Himmelfarb *et al.* 2002; Locatelli *et al.* 2003; Dai *et al.* 2017). Outros fatores também podem contribuir para o surgimento e agravamento dos estágios de falência renal, tais como, fatores genéticos (Smyth *et al.* 2014), ambientais (Bruce *et al.* 2009), hemodinâmicos e distúrbios metabólicos (Slee 2012; H. Chen *et al.* 2016).

Devido ao comportamento deletério dos eventos associados ao desenvolvimento da DRC, torna-se crucial a detecção da doença renal em estágios iniciais para que condutas terapêuticas apropriadas possam ser aplicadas para retardar a sua progressão.

Em 2002, foi publicada uma diretriz pela “*National Kidney Foundation*” sobre DRC que compreendeu a avaliação, classificação e a estratificação de risco, baseada em três componentes: marcadores de dano renal, um componente funcional baseado na taxa de filtração glomerular (TFG) e um componente temporal. Dessa forma, baseados nos critérios estabelecidos por essa diretriz, considera-se portador de DRC um indivíduo que apresente uma TFG menor que 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> associada a pelo menos um marcador de dano renal parenquimatoso e lesão renal presente há pelo menos 3 meses (National Kidney Foundation 2002).

O sistema de classificação do estadiamento da DRC é crucial para evitar a ambiguidade e a sobreposição dos dados atualmente em uso, para isso são reunidas observações clínicas, epidemiológicas e funcionais para a caracterização da doença em 5 estágios. Nos estágios finais (4 e 5) a TFG alcança valores criticamente baixos. Nessa etapa da progressão da DRC instala-se a síndrome urêmica, caracterizada principalmente pelo acúmulo de toxinas urêmicas no sangue (Himmelfarb 2009; Vanholder, Laecke, e Glorieux 2008; Vanholder *et al.* 2003) e por disfunções em outros sistemas devido à presença destas toxinas. Nessa fase ocorre o maior risco de morte em doentes renais devido a complicações recorrentes da uremia.

## 2.2 Toxinas urêmicas

Definem-se toxinas urêmicas as substâncias que deveriam ser excretadas pelos rins, na urina, mas que permanecem no sangue e tecidos em virtude da insuficiência renal (Himmelfarb 2009; Vanholder *et al.* 2003).

De acordo com o grupo *EUTox* (*European Uremic Toxin*), cuja proposta é a identificação e caracterização de toxinas urêmicas desconhecidas e, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças renais crônicas, para que um composto possa ser considerado uma toxina urêmica é necessário atender algumas exigências, representadas na tabela 1 (Barreto *et al.* 2014).

Tabela 1. Definição de toxina urêmica

Ser quimicamente identificada e quantificada de forma precisa
Níveis plasmáticos/corporais totais deverão ser mais altos do que em indivíduos saudáveis;
Altas concentrações deverão estar correlacionadas a disfunções/sintomas específicos, que desaparecem à medida que as concentrações são reduzidas;

Fonte: Adaptado de Barreto *et al.*, 2014.

A retenção das toxinas urêmicas no sangue pode causar modificações biológicas e funcionais que contribuem para a síndrome urêmica. Entre os principais fatores estão: acidose metabólica, sobrecarga de líquidos, acúmulo de produtos finais do catabolismo de proteínas (Tonelli, Karumanchi, e Thadhani 2016), desnutrição, desequilíbrios hormonais e principalmente toxinas urêmicas (Lisowska-Myjak 2014; Vanholder *et al.* 2003; Vanholder 2018).

De acordo com as suas propriedades físico-químicas as toxinas urêmicas podem ser divididas em três grupos: compostos solúveis em água de até 500 Daltons, compostos de tamanho médios (acima de 500 Daltons) e moléculas que estão ligadas a proteínas, que podem variar em relação ao tamanho, mas são comumente menores que 500 Daltons.

Compostos urêmicos solúveis em água são facilmente removidos durante a diálise, entretanto quando ligados a proteínas são mais difíceis de serem eliminadas e o acúmulo dessas toxinas produz efeitos tóxicos importantes no sistema cardiovascular, configurando a principal causa de morte em doentes renais (Tonelli, Karumanchi, e Thadhani 2016; Vanholder, Laecke, e Glorieux 2008).

Tais compostos estão envolvidos na lesão cardiovascular, afetando diretamente células endoteliais (Watanabe *et al.* 2015; Inami *et al.* 2014; Tumor and Niwa 2009), leucócitos (Rutkowski *et al.* 2006; Dias *et al.* 2018; Ahmed *et al.* 2013) e células do músculo liso (Muteliefu, Enomoto, and Niwa 2009), inibindo a regeneração e o reparo endotelial e estão envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio na DRC (Vanholder *et al.* 2012; Vanholder *et al.* 2014).

Das toxinas ligadas à proteína destacam-se o indoxil sulfato, um metabolito de triptofano nas proteínas dietéticas que é sintetizado no fígado, normalmente é excretado na urina, mas quando há deterioramento da função renal acumula-se no soro devido à depuração renal reduzida (Niwa e Shimizu, 2012), essa toxina é incorporada na membrana basal de células tubulares renais e proximais, é indutora de senescência celular, disfunção de células tubulares

e também induz a produção de EROs, e p-cresol (4-metilfenol) que possui diversos efeitos deletérios afetando a resposta inflamatória e endotelial (Barreto *et al.* 2014), causando danos às células tubulares induzindo estresse oxidativo pelo aumento da atividade da NADPH-oxidase (Watanabe *et al.* 2013).

### 2.2.1 p-Cresil sulfato

Nas últimas décadas tem se intensificado o interesse no estudo de importantes toxinas urêmicas dentre as quais, aqui investigadas, encontram-se: o indoxil sulfato (IxS) e o p-cresil sulfato (pCS), particularmente, pela inabilidade de remoção através da diálise e pela associação com o progresso da DRC e DCV.

O p-cresil sulfato é uma toxina urêmica sintetizada no fígado a partir da sulfatação do indol, um metabolito do triptofano produzido na flora intestinal (Figura 1) (De Smet *et al.* 2003; Evenepoel *et al.* 2009).

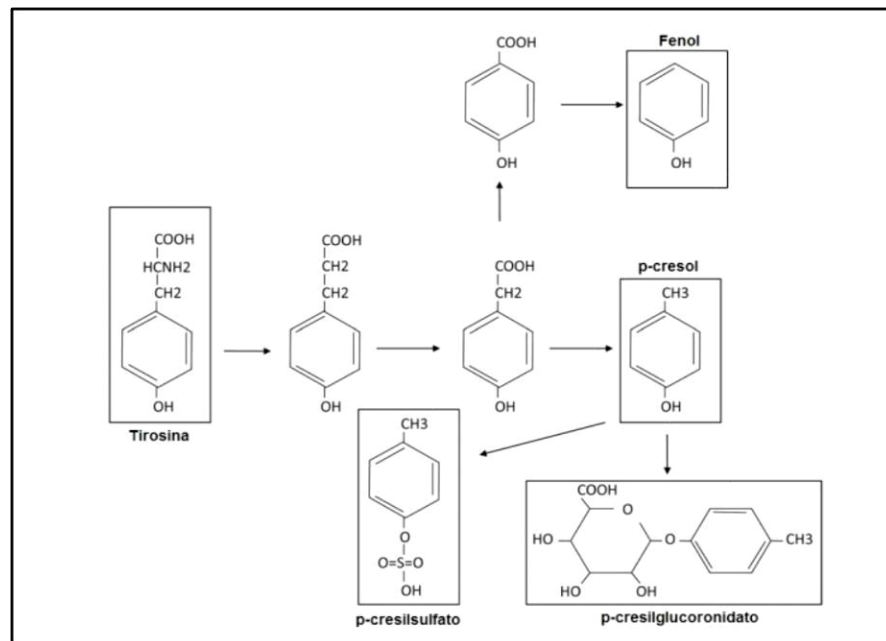


Figura 1. Biossíntese da geração de p-cresol, p-cresilglucoronidato e p-cresilsulfato a partir da tirosina.

Fonte: (Raymond Vanholder *et al.* 2011)

Em condições renais normais o pCS é encontrado em baixas quantidades, sendo secretado pela urina via túbulo proximal, no entanto, quando a função renal está comprometida o acúmulo dessa substância pode trazer graves danos ao organismo (Vanholder *et al.* 2014), uma vez que não é eficientemente removida pela diálise e nem pela dialise peritoneal devido a sua afinidade de ligação com proteínas de alto peso, como a albumina (Watanabe *et al.* 2012).

Além disso, os níveis de  $\rho$ -cresil sulfato aumentam de acordo com a progressão da DRC mostrando uma correlação negativa com a taxa de filtração renal dos doentes renais (Pretorius *et al.* 2013), o aumento dos níveis de pCS sugerem estar relacionado com a taxa de sobrevivência renal e cardíaca em pacientes DRC (Watanabe *et al.* 2015; Lin *et al.* 2010; Wu *et al.* 2012; Vanholder *et al.* 2014).

Sabe-se que o pCS pode contribuir para a progressão da DRC através da ativação de mecanismos patológicos, como a indução do estresse oxidativo e também através de reações inflamatórias (Assis *et al.* 2015; Mutsaers *et al.* 2015; Watanabe *et al.* 2013; Vanholder *et al.* 2014).

Em células tubulares renal HK-2, a presença de pCS em meio de cultura dose tempo/dependente, demonstrou que o  $\rho$ -cresil sulfato aumenta significativamente os níveis da expressão de mRNA de citocinas inflamatórias ou proteínas envolvidas no processo de fibrose renal, como TFG- $\beta$ 1, TIMP-1 e pró- $\alpha$ -1 colágeno (I) e ainda que a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por pCS diminui significativamente a viabilidade celular de HK-2, uma vez que na presença de NAC e probenecide o efeito deletério foi significativamente reduzido (Watanabe *et al.* 2013), dado confirmado por ensaio *in vivo* utilizando nefrectomia em 5/6 em ratos *Wistar* tratados com pCS 50 mg/kg/dia injetado peritonealmente por 4 semanas.

### 2.2.2 Indoxil sulfato

O indoxil sulfato também é uma toxina urêmica sintetizada no fígado a partir da sulfatação do indol (Figura 2), um metabolito do triptofano produzido na flora intestinal (Vanholder *et al.* 2014). IxS se liga a albumina, no subdomínio IIIA (Devine *et al.* 2014), a albumina é a proteína mais abundante presente no plasma (38 g/L ou 570  $\mu$ M). A importância da albumina nesse contexto é devido ao seu papel carregador para diferentes compostos hidrofóbicos encontrados no plasma.

Embora haja uma relação inversamente proporcional entre o acúmulo de IxS e pCS e a taxa de filtração glomerular, é importante notar que, a TFG é um pobre preditor dessas toxinas no soro. Um vez que, as ligações de pCS e IxS com a albumina variam na faixa de 40 a 99% e sendo que apenas as porções livres são capazes de serem removidas através dos transportadores de ânion orgânico (OAT) 1, 3 e 4, ou seja, a remoção da porção livre dessas toxinas está condicionada aos transportadores tubulares (Niwa e Shimizu 2012; Yisireyili *et al.* 2014; Watanabe *et al.* 2015; Stockler-Pinto *et al.* 2014; Sirich *et al.* 2014).

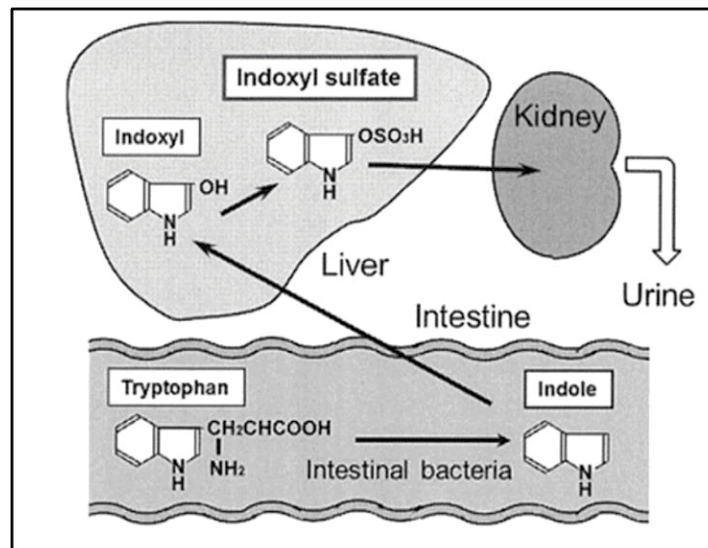


Figura 2. Desenho esquemático para síntese metabólica de indoxil sulfato.

Fonte: (Hirata *et al.* 2015)

### 2.2.3 Ácido indol acético

O ácido indol acético (IAA) outra toxina urêmica ligada a proteína, pertencente ao grupo dos indóis derivados do metabolismo do triptonano (Figura 3). Da mesma forma que IxS e pCS, IAA também possui um efeito deletério relacionado ao seu acúmulo. O aumento de IAA no sangue induz a elevação da expressão ciclooxigenase-2 (COX-2) conduzindo a processos inflamatórios (Laetitia Dou *et al.* 2014), diminui a atividade mitocondrial, reduzindo a atividade da cadeia transportadora de elétrons afetando a capacidade metabólica renal na DRC (Mutsaers *et al.* 2013), além disso há evidências que indicam que IAA junto com IxS podem aumentar o efeito procoagulante em eritrócitos induzindo a morte celular por eritoses, o que também pode ser um indicador de danos cardiovasculares (Gao *et al.* 2015).

IAA também foi associado ao estresse oxidativo em células tubulares HK-2, através do aumento da produção do radical hidroxila, além disso, IAA também induz a expressão da proteína PAI-1, cujo aumento está relacionado com um maior risco de aterosclerose e trombose (Motojima *et al.* 2003; Boelaert *et al.* 2013). Assim, a regulação positiva de PAI-1 induzida por IAA em células tubulares pode contribuir para a lesão túbulo intersticial e ativação de NF-Kappa B na doença renal.

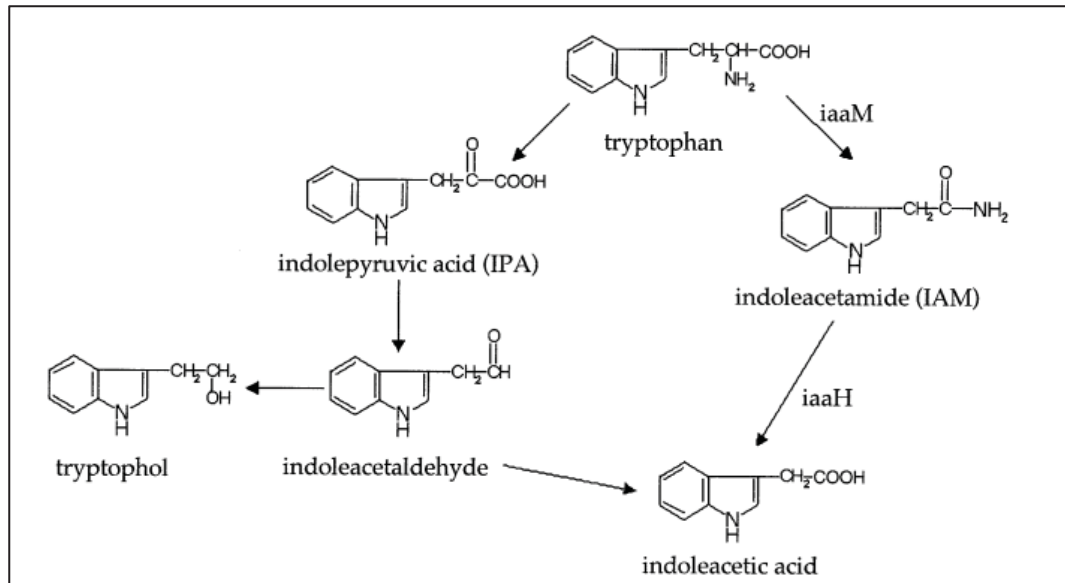


Figure 3. Biossíntese de ácido indol acético (IAA).

Fonte: (Cohen *et al.* 2002)

Vale ainda destacar o papel do ácido hipúrico junto com as demais toxinas urêmicas na progressão da DRC. Embora essa toxina não tenha feito parte da composição experimental desse trabalho, dados da literatura indicam que pacientes com DRC apresentam níveis séricos elevados dessa toxina quando comparados a população saudável (Satoh *et al.* 2003). O acúmulo do hipurato associado a presença de IAA e IxS inibe a utilização da glicose nos músculos estriados, reduz a taxa de filtração glomerular devido ao seu efeito direto na hemodinâmica glomerular, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, todos esses fatores somados aumentam o risco da disfunção endotelial e progressão do quadro urêmico (Huang *et al.* 2018; Satoh *et al.* 2003; Motojima *et al.* 2003).

### 2.3 Autofagia

Embora pareça um simples evento de degradação intracelular, o processo pelo qual a célula mantém a homeostase requer um fino ajuste entre síntese e degradação. Os dois maiores sistemas de degradação de componentes celulares em eucariotos são o sistema ubiquitina-proteossoma e a via de autofagia.

O sistema ubiquitina-proteossoma exerce um papel central na degradação principalmente de proteínas de vida curta ubiquitinadas e polipeptídeos não funcionais (Hershkos *et al.* 1983; Reyes-Turcu, Ventii, e Wilkinson 2009; Leestemaker e Ovaas 2017; Hutchins *et al.* 2013; Tsakiri e Trougakos 2015) e, a autofagia é a via responsável pela

degradação em massa de proteínas e organelas citosólicas de vida longa e proteínas oxidadas (Mizushima e Komatsu 2011; Zhang 2013; Hansen e Johansen 2011; Meléndez e Levine 2009; Mizushima 2007; Mijaljica, Prescott, e Devenish 2011; Yang e Klionsky 2010; Friguet 2006; Pajares *et al.* 2015).

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da autofagia são na sua grande totalidade preservados entre organismos, o processo é coordenado por um conjunto de proteínas, inicialmente descritos em levedura, como ATGs (*Autophagy related genes*) (Reggiori e Klionsky 2013), essa rede de proteínas agrupa-se em complexo funcionais que são ativados e recrutados pelas membranas para iniciar o processo de autofagia (Yu, Chen, e Tooze 2018).

### 2.3.1 Formação do autofagossomo

Das proteínas com o papel central no processo de degradação autofágica, destacam-se, mTOR (Mechanistic target of rapamycin) responsável pela iniciação do processo de formação do fagóforo, Beclin-1 responsável pela fase de alongamento do fagóforo, a adaptadora de cargo sequestossomo 1 p62/SQSTM1 (aqui referida apenas como p62) e a proteína LC3 (proteína associada a microtúbulos 1 de cadeia leve 3 (MAP1)) (Shenhe *et al.* 2018).

A proteína quinase mTOR regula a síntese de proteínas e o crescimento celular em resposta a fatores de crescimento, nutrientes, níveis de energia e estresse. Essas funções são executadas principalmente pelo complexo mTOR 1 (mTORC1) que na sua forma ativa reprime a autofagia regulando a ativação da proteína ULK1 que é uma proteína responsável pelo processo de iniciação da membrana do fagóforo (Hansen e Johansen 2011; Nakatogawa *et al.* 2009; Meléndez e Levine 2009).

Quando a via mTOR está bloqueada ocorre a ativação da via de Classe III PI3K, que recruta uma série de proteínas, entre elas a proteína Beclin-1, que é responsável pelo alongamento do fagóforo (Wirawan *et al.* 2012). A proteína Beclin-1 é expressa em muitos tecidos e está envolvida em vários processos biológicos que vão desde a adaptação ao estresse até o envelhecimento e morte celular, sendo localizada principalmente em estruturas citoplasmáticas que incluem o retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias e, até mesmo na membrana perinuclear (McKnight e Yue 2013).

Assim, no processo de alongamento da membrana do fagóforo um complexo de genes ATGs presentes na membrana, fazem o recrutamento da proteína LC3 na sua forma lipídada. A proteína LC3 (proLC3) sofre uma modificação pós-traducional, na qual a carboxila da região C-terminal de LC3 é clivada para se tornar uma forma solúvel, LC3I (forma citosólica),

expondo a carboxila da sua glicina terminal. No resíduo de glicina, LC3I é então conjugado com PE (fosfatidiletanoamina) sendo então convertido a sua forma lipidada LC3II, assim LC3II é encontrado tanto na membrana interna quanto externa do autofagossomos (Figura 4).

A proteína p62 se liga diretamente a LC3 através da região LIR que reconhece especificamente LC3. A proteína p62 também é conhecida como sequestrador 1 (p62/SQSTM1), é uma proteína que possui domínios múltiplos que intermedeiam as suas interações com diversos parceiros ligantes, entre esses domínios estão um domínio Phox1 e B1 (PB1), uma região zinc finger (ZZ), dois sinais de localização nuclear (NLSs), um domínio de ligação a TRAF6 (TB), um sinal de exportação nuclear (NES), uma região que interage com LC3 (LIR), uma região que interage com Keap1 (KIR) e está envolvida na regulação da ativação do fator de transcrição da resposta ao estresse oxidativo Nrf2 (X. Lin *et al.* 2013; Lau *et al.* 2010) e um domínio associado a ubiquitina (UBA) que liga proteínas ubiquitiniladas (Long *et al.* 2010) (Figura 4). A interação de p62 e LC3II necessária para a degradação dos corpos proteicos ubiquitinados ligados a p62 (Jiang e Mizushima 2013, 2014; Mizushima 2007; Feng *et al.* 2014). Após a formação do autofagossomo, ocorre a fusão da membrana do autofagossomo com a membrana de um lisossomo e assim o conteúdo intra-vesicular é então degradado.

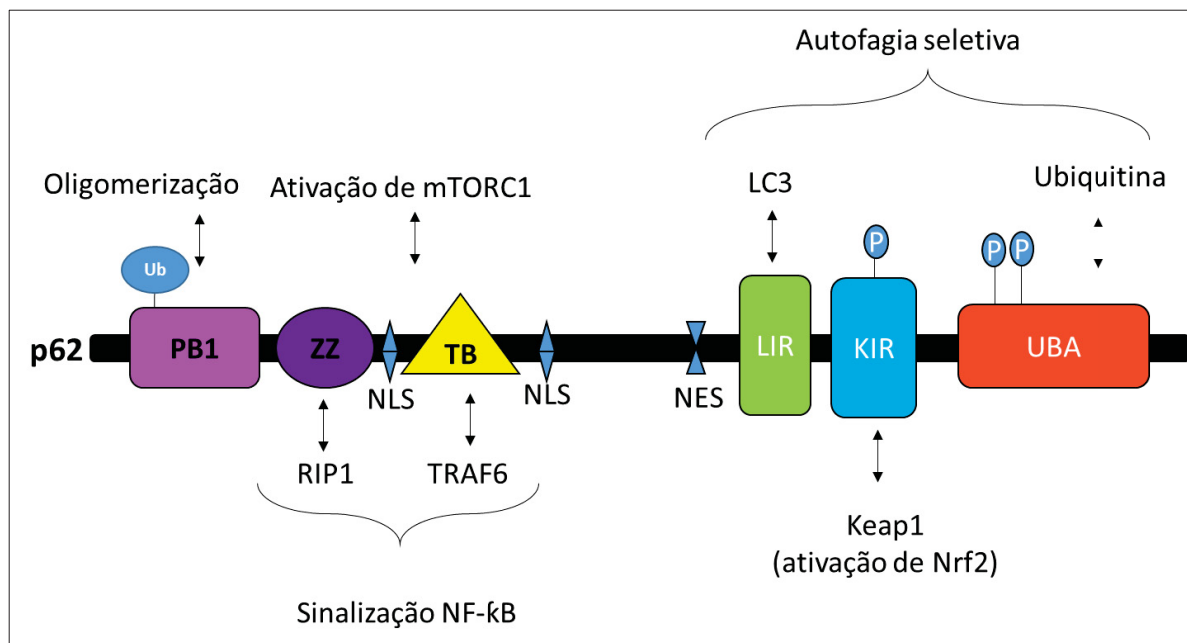


Figura 4. Estrutura do domínio esquemático de p62.  
Fonte: Adaptado de Lin *et al.*, 2013

### 2.3.2 Categorias de autofagia

A classificação da autofagia é dividida em três categorias: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas e, a diferença principal entre elas é que podem ser seletivas ou não seletivas.

A macroautofagia, ou simplesmente autofagia (Figura 5), é o processo de degradação celular mais investigado, envolve a formação de uma membrana dupla, chamada de fagóforo que sofre expansão e alongamento até se auto fundir dando origem a uma estrutura, semelhante a uma vesícula que é chamada de autofagossomo, posteriormente o autofagossomo se funde com o lisossomo formando o autolisossomo. Essa fusão fornece enzimas necessárias para a digestão de componentes sequestrados que devem ser degradados (Yang e Klionsky 2010; Feng *et al.* 2014).

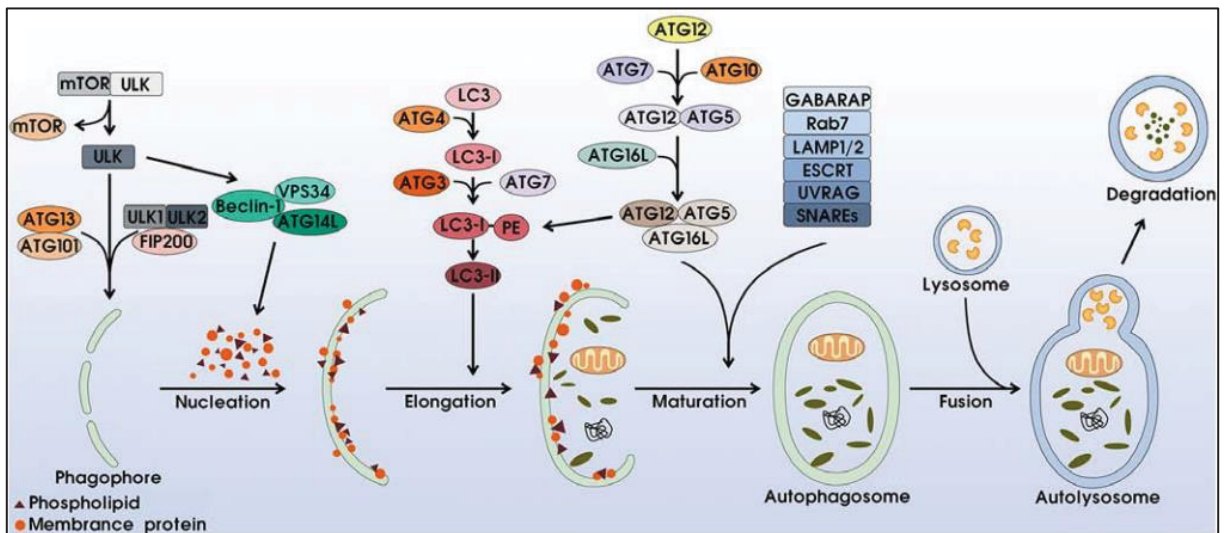


Figura 5. Visão esquemática do processo de autofagia.

Nota: A autofagia é iniciada a partir da inibição de mTOR, seguida pela formação e nucleação do fagóforo, alongamento, fechamento da membrana, maturação do autofagossomo e degradação final do cargo.

Fonte: (Shenhe *et al.* 2018)

Um processo semelhante ocorre na microautofagia, mas nesse caso é a própria membrana lisossomal que se encarrega de fagocitar substratos citosólicos (Mijaljica, Prescott, e Devenish 2011) e por fim, na autofagia mediada por chaperonas (CMA).

Na autofagia mediada por chaperona todos os substratos de CMA (proteínas citosólicas solúveis) contém um motivo proteico (KERFQ-like) pelo qual ligam-se seletivamente a um receptor na membrana lisossomal, LAMP-2A (proteína de membrana associada ao lisossomo do tipo 2A) (Figura 6A), que medeia a sua translocação para o lúmen do lisossoma, a seletividade é dependente do reconhecimento de um sinal que direciona a sequência de

aminoácidos das proteínas de substrato para uma chaperona citosólica HSP70 (Cuervo 2004; Cuervo e Wong 2014).

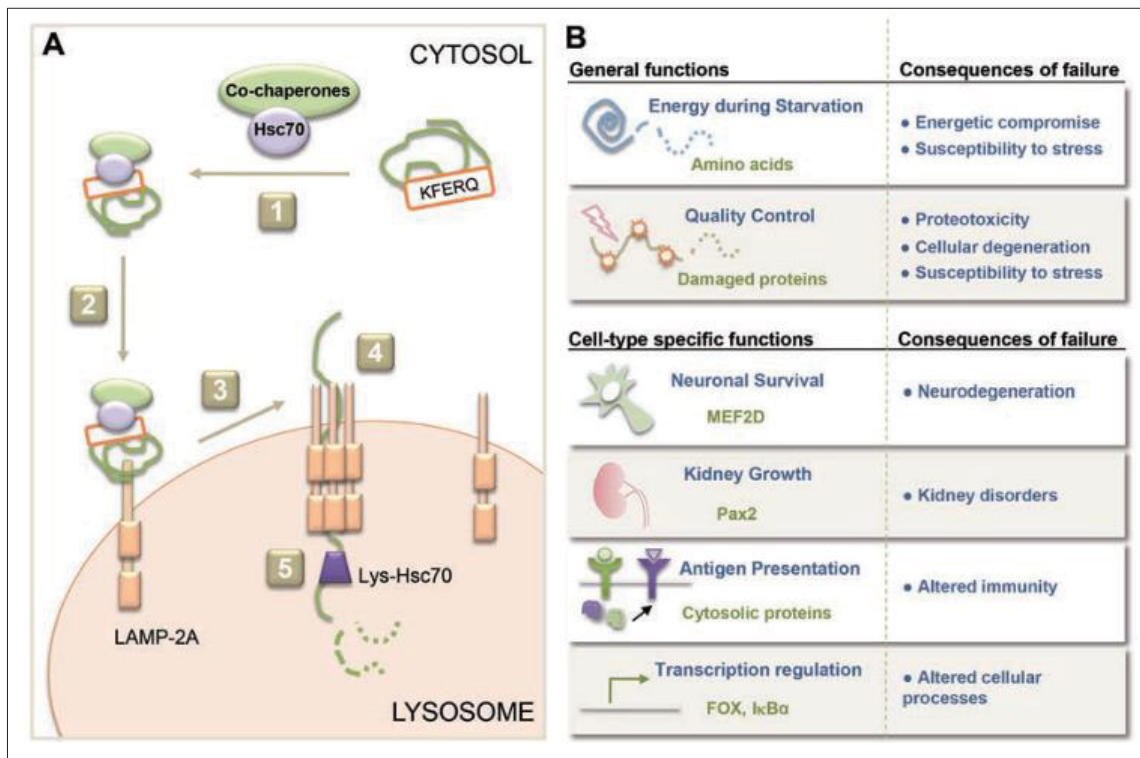


Figura 6. Etapas e funções fisiológicas da autofagia mediada por chaperonas (CMA).

Nota: (A) Proteínas degradadas por CMA são identificadas no citosol por um complexo de chaperona que, ao se ligar ao motivo de direcionamento na proteína substrato (1), traz à superfície dos lisossomos (2). A ligação do substrato à cauda citosólica da proteína receptora LAMP-2A promove a multimerização de LAMP-2A para formar um complexo de translocação (3). Ao se desdobrar, as proteínas atravessam a membrana lisossômica (4) auxiliada por um capilar luminal e alcançam a matriz lisossômica onde sofrem completa degradação (5). (B) Funções gerais e específicas do tipo celular do CMA e consequências da falha do CMA em diferentes órgãos e sistemas.

Fonte: (Cuervo e Wong 2014)

### 2.3.3 Regulação da via autofágica no contexto renal

A autofagia desempenha um papel importante no desenvolvimento, na função e na sobrevivência de todos os tipos de células e tecidos e está sujeita a regulação por uma variedade de sinais, incluindo disponibilidade de nutrientes, atividades metabólicas e alterações ambientais (Figura 6B).

Estudos sugerem que a atividade autofágica exerce um papel importante na função renoprotetora. Recentemente, foi demonstrado que a proteinúria causa a diminuição da atividade autofágica em células tubulares renais HK-2 através da diminuição da formação dos autofagossomos (Nolin *et al.* 2016), além disso, foi verificado que células tubulares tratadas com rapamicina – um ativador clássico da via de autofagia- apresentaram redução do dano celular quando expostas a proteinúria, diminuindo, por exemplo, a apoptose celular (Liu *et al.* 2014).

A diminuição da atividade autofágica também foi demonstrada em leucócitos de pacientes com DRC e foi associada a anormalidades cardíacas medidas por eletrocardiogramas, sugerindo que o bloqueio da autofagia possa estar relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na DRC (Chen *et al.* 2013a).

Sabemos que as disfunções endoteliais, comumente presentes nas doenças renais, aumentam o estresse oxidativo, contribuindo para a inflamação e morte celular. Quando a autofagia está funcional, ela pode eliminar organelas disfuncionais, como mitocôndrias danificadas pela acidose metabólica, uma das complicações comuns em pacientes com DRC (Namba *et al.* 2014), o que indiretamente diminui a produção de EROs, dessa forma atuando como mecanismo de proteção. Portanto, se há diminuição da atividade autofágica isso poderia ser um novo mecanismo para doenças cardiovasculares em pacientes DRC. Consistente com isso, placas ateroscleróticas de amostras humanas e de camundongos demonstraram o acúmulo de p62 e proteínas poliubiquitinadas condizentes com a diminuição da atividade autofágica (Grootaert *et al.* 2018).

#### 2.4 Via de sinalização Keap1/Nrf2

O estresse oxidativo contribui para o envelhecimento e para o desenvolvimento de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, inflamação crônica e neurodegenerativas. Contudo, as células desenvolveram mecanismos adaptativos de defesa capazes de neutralizar ambientes pró-oxidantes através de mecanismos que ativam fatores de defesa antioxidante (Zhang *et al.* 2005).

A regulação da resposta celular e de sistemas antioxidantes ao estresse oxidativo ocorre através de inúmeras moléculas sinalizadoras, dentre as quais se destaca o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) que coordena a expressão de uma rede de genes que codificam proteínas com diversas atividades citoprotetoras (Dinkova-Kostova e Abramov 2015) mediante a ligação a elementos da resposta antioxidante (ARE) em regiões promotoras.

Em condições fisiológicas normais, a transcrição de Nrf2 é inibida pela proteína repressora Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) localizada no citoplasma das células. Keap1 é um adaptador para o substrato protéico Cullin 3 (Cul3)/RBX1 ubiquitina ligase (Itoh *et al.* 1999), suprimindo a atividade transcricional de Nrf2 por um complexo ubiquitina ligase que realiza a ubiquitinação e degradação proteossômica de Nrf2 e ao mesmo tempo Keap1 é continuamente regenerado permitindo que o ciclo continue (Yi-min, Shuo, e Chun-yi 2016).

Entretanto, um aumento na produção de EROs no organismo promove a liberação de Nrf2 de Keap1 permitindo sua translocação do citoplasma ao núcleo. Dessa forma Nrf2 torna-

se ativado (Dinkova-Kostova e Abramov 2015). Contudo, não há um consenso se o que ocorre é a síntese de uma nova molécula de Nrf2 (Kansanen *et al.* 2013) ou se Nrf2 ao dissociar-se de Keap1 é translocado ao núcleo celular. O que sabemos é que uma vez ativado e no núcleo Nrf2 liga-se a elementos da resposta antioxidante (ARE) na região promotora de genes que codificam enzimas antioxidantes (Figura 7A).

A ativação de Nrf2-ARE induz a produção de enzimas e peptídeos que representam um potente mecanismo antioxidante de defesa, através da regulação genes que atuam sobre o estresse oxidativo, o metabolismo e excreção xenobiótica, autofagia, etc exemplos: heme oxigenases, glutamato cisteína ligase, quinona oxirredutases, p62, tiorredoxina redutases entre outros (Kensler, Wakabayashi, e Biswal 2007; Hayes e Dinkova-Kostova 2014; Tebay *et al.* 2015b). Após restabelecido o equilíbrio redox celular, Nrf2 então é dissociado do núcleo por Keap1 e transportado para o citosol onde é ubiquitinado e degradado (Figura 7) (Sun *et al.* 2011).

Além disso, como mencionado na introdução deste trabalho, ocorre também a ativação da via Nrf2 de maneira independente dos resíduos de cisteína presentes em Keap1, a esse mecanismo dá-se o nome de ativação não canônica (Figura 7B) (Lau *et al.* 2010; Silva-Islas e Maldonado 2018).

Proteínas como p62, p21, DPP3 (dipeptidil peptidase III) entre outras, são capazes dissociar Nrf2 do complexo Keap1 através da interação direta com Keap1, diminuindo assim a ubiquitinação de Nrf2 e conseqüentemente aumentando sua translocação nuclear (Lau *et al.* 2013, 2010; Jiang, Harder, Vega, *et al.* 2015; Chen *et al.* 2009).

De fato, o mecanismo não canônico mais estudado é através da interação de p62 com Keap1 (Silva-Islas e Maldonado 2018). Durante a disfunção autofágica ocorre a agregação ou acúmulo de p62 que sequestra Keap1 dentro dos autofagossomos, resultando numa ativação prolongada de Nrf2. É interessante o fato da expressão de p62 ser regulada por Nrf2 criando um looping de feedback positivo. A modulação de Nrf2 por p62 depende de vários fatores, como abundância de p62 ou modificações pós-traducionais (Vega *et al.* 2016). A manutenção de Nrf2 ativado pela disfunção autofágica causa um estresse redutor ao promover a quimioresistência a drogas anti-tumorais e aumentar a proliferação celular em cânceres (Kansanen *et al.* 2013; Huo *et al.* 2014; Lau *et al.* 2010; Li, Paonessa, e Zhang 2012; Homma *et al.* 2009; Jaramillo e Zhang 2013).

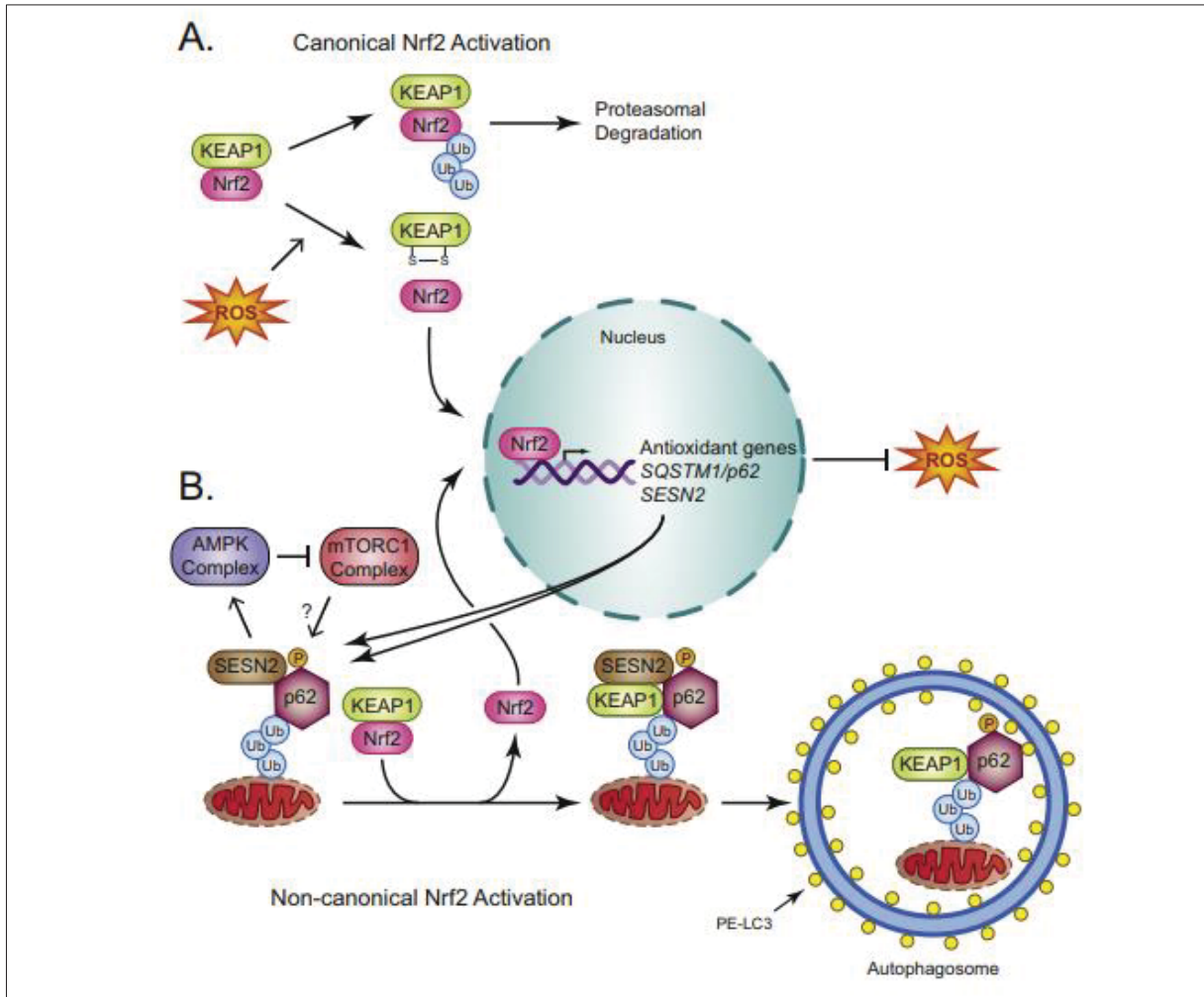


Figura 7. Mecanismos canônicos e não canônicos de ativação de Nrf2.

Nota: (A) Ativação canônica de Nrf2 através da oxidação de Keap1, que libera Nrf2 e permite sua translocação nuclear. (B) Ativação não canônica de Nrf2 por intermédio da interação de entre p62 e Keap1, resultando no deslocamento de Nrf2 e consequentemente na degradação seletiva de Keap1.

Fonte: (Wible e Bratton 2018)

Sabe-se que na DRC a ação protetora de Nrf2 parece estar diminuída em aorta e rim remanescente de ratos nefrectomizados em 5/6 (Aminzadeh *et al.* 2013) e a expressão de Keap1 está aumentada.

A ação da toxina urêmica indoxil sulfato parece suprimir a expressão de Nrf2 em tecido renal, uma vez que em ensaios de cultura com células tubulares foi observada uma diminuição da expressão de heme oxigenase e quinona oxirredutase, em contrapartida houve elevação dos níveis de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina indicando dessa forma a produção de EROs (Bolati *et al.* 2013).

As toxinas urêmicas, aqui estudadas, se acumulam em pacientes HD e ativam a via inflamatória NF- $\kappa$ B, os níveis de expressão de Nrf2 nesses pacientes estão reduzidos (Leal *et al.* 2015). Por outro, foi demonstrado em modelo animal que a ativação de Nrf2 e de seus genes

alvo atenuaram a lesão renal diminuindo o estresse oxidativo e a morte celular nos túbulos renais (Nezu *et al.* 2017).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Sulforafano (SF), tert-butilhidroquinona (tBHQ) ácido indol acético (IAA), indoxil sulfato (IxS), Bafilomicina A1 (BafA1), hidroxicloroquina (HCQ), Minimal Essential Medium (MEM), MTT (difetil trazolio de brometo), sulfato de canamicina, ácido tricloroacético (TCA), ampicilina, 4',-6 diamidino-2-fenil indol (DAPI), penicilina-estreptomicina, hidrocloreto de guanidina, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), glicina, meio LB, meio LB-ágar e rapamicina (Rap) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, p-cresil sulfato foi gentilmente cedido pela Dra. Griet Glorieux (University Hospital Ghent, Bélgica). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB), meio Optimem, tripsina-EDTA, dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da empresa Gibco. 2-4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) empresa Alfa caesar. Metanol grau HPLC adquiridos da empresa J.T.Baker. Extrato de levedura adquirido pela empresa Himedia. Marcador de massa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), TMB (cromógeno para ELISA, código 002023) adquiridos da empresa Thermo Fischer scientific. Albumina de soro bovino adquirido da empresa Inlab. Lipofectamina 3000 Invitrogen. Anticorpos utilizados: SQSTM1/p62 (D-3, Santa Cruz-28359; 1:1500), LC3 A/B (Abcam – 128025; 1:1500), GAPDH (6C-5, Santa Cruz-32233; 1:4000), anti-DNP (Molecular Probes, A6430, 1:2700). Anti-rabbit IgG (A0545, Sigma; 1:5000) e anti-mouse IgG (Santa Cruz, SC-2005; 1: 3000) conjugados com HRP. Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Molecular Probes, A11008).

#### 3.2 Preparo das toxinas urêmicas

IxS, pCS e IAA foram preparadas a partir de padrões autênticos diluídos separadamente em água ultra pura (Milli-Q). As soluções estoques foram preparadas nas concentrações 100 mM IxS, 100 mM pCS e 10 mM e armazenadas a -20°C.

Foi realizado ensaio de dose-resposta para cada uma das toxinas urêmicas (Duranton *et al.* 2012): 100, 200 ou 400 µM IxS, 100, 200 ou 400 µM de pCS e 10, 20 ou 40 µM de IAA. Em alguns ensaios, as toxinas foram combinadas de acordo com as concentrações: concentrações consideradas abaixo da média urêmica (UT baixa), contendo IxS 25 µM, pCS 25 µM e 2,5 µM IAA, toxinas urêmicas mix 1 (UT1), contendo 100 µM IxS, 100 µM pCS e 10 µM IAA,

toxinas urêmicas mix 2 (UT2), contendo 200  $\mu$ M IxS, 200  $\mu$ M pCS e 20  $\mu$ M IAA) ou toxinas urêmicas mix 3 (UT3), contendo 400  $\mu$ M IxS, 400  $\mu$ M pCS e 40  $\mu$ M IAA. Todas as incubações foram realizadas em meio completo, contendo 10% de SFB, a menos que especificado. Diferentes condições ou tratamentos são descritos nas legendas das figuras. Ao estudar os efeitos dos *pools* de soros urêmicos, as células foram tratadas em meio contendo 10% de soro humano urêmico ou 10% de soro humano saudável. Estes *pools* foram previamente caracterizados através da análise dos níveis séricos dos compostos nitrogenados de baixa massa molecular, como ureia, creatinina e ácido úrico e dos íons fósforo e cálcio (Rodrigues *et al.* 2015).

### 3.3 Cultura celular

Todas as células foram cultivadas sob uma atmosfera de 37 °C, contendo 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Todas as células utilizadas nesse trabalho foram plaqueadas 16 horas antes do tratamento em meio completo. No dia seguinte, com aproximadamente 80-90% de confluência, elas foram tratadas por 4 horas ou, com aproximadamente 60% de confluência as células foram tratadas por 48 horas.

#### 3.3.1 HeLa, NIH-3T3, HEK293T, EA.hy926

Células de origem epitelial humana (HeLa), fibroblasto de tecido embrionário de camundongo (NIH-3T3) e embrionárias de rim humano (HEK293T) foram adquiridas da empresa American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Células endoteliais humanas (EA.hy926) foram gentilmente cedidas pela Dra. Andrea Stinghen (Universidade Federal do Paraná). As células foram mantidas meio DMEM (exceto HEK293T mantida em meio MEM enriquecido com 1 mM de piruvato de sódio), 10 % de SFB, e 10 U/mL de uma associação de antibióticos contendo penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000  $\mu$ g/mL). O repique celular foi realizado lavando a monocamada de células, com 5 mL de PBS por duas vezes, em seguida as células foram dissociadas com uma solução de 1 mL de 0,25 % tripsina-EDTA.

#### 3.3.2 MEFs *Nrf2* selvagem (*Nrf2 wt*) e *Nrf2* nocaute (*Nrf2-KO*)

Fibroblasto de embrião de camundongo (MEF) foram isoladas de camundongos *Nrf2* selvagem (*Nrf2-wt*) ou *Nrf2* nocaute (*Nrf2-KO*) no laboratório Keap1-Nrf2-ARE Signal Transduction Laboratory e gentilmente cedidas pela Dra. Donna D. Zhang (Universidade do Arizona, Estados Unidos). As células foram cultivadas em meio DMEM alta glicose, com 15%

de SFB e 10 U/mL de uma associação de antibióticos contendo penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL).

### 3.4 Determinação da incorporação celular de toxinas urêmicas

Células HeLa ( $1 \times 10^6$ ) foram semeadas em placas 60 mm (P60). No dia seguinte, foram tratados com toxinas urêmicas (UT1, UT2 e UT3) em meio completo pelos períodos indicados. As células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS gelado e raspadas com 1 mL de PBS. As células foram coletadas (7000 rpm, 5 min, temperatura ambiente, Eppendorf Minispin), ressuspensas em 150 µL de PBS. Esta suspensão foi sonicada (2x70W, 30 segundos), aquecida (95 °C, 30 min) e centrifugada (13000 rpm, 10 min, temperatura ambiente, Sorvall). O sobrenadante foi filtrado (0,22 µm) e analisado por HPLC. O sistema cromatográfico consistiu de um sistema Shimadzu Prominence equipado com um amostrador automático (Shimadzu SIL-10AF), uma bomba quaternária (Shimadzu LC-20AD), controlada pelo software LC Solution, e um detector de fluorescência (Shimadzu RF-20A). A fase móvel consistiu em uma solução de 50 mM% de formiato de amônio pH 3,0 e metanol, cuja proporção aumentou de 25 para 70% (v / v) ao longo da corrida, fluxo 0,7 mL / min. Durante a corrida os comprimentos de onda de fluorescência variaram:  $\lambda_{exc} = 283$  nm e  $\lambda_{em} = 380$  nm para IS e IAA (de Loor *et al.*, 2009) e  $\lambda_{exc} = 265$  nm e  $\lambda_{em} = 290$  nm para pCS. A quantificação foi realizada por comparação das áreas de pico com as de padrões autênticos. A quantidade de toxinas foi então normalizada pela quantidade de proteína nos lisados.

### 3.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida através do ensaio funcional de mudança em mitocôndrias usando 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl) -2,5 difenil tetrazólio de brometo (MTT) (Sigma). Aproximadamente,  $8 \times 10^3$  células -por poço- foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas por 16 horas. No dia seguinte, as células foram tratadas com as concentrações crescentes das toxinas urêmicas isoladas ou combinadas em meio completo por 48 horas, após esse período foi adicionado diretamente ao meio 20 µL de MTT 2 mg/mL. Após 2 horas de incubação com MTT, o meio foi removido e às células foram adicionados 100 µL de HCl/isopropanol (1:1000) em cada poço e os cristais formados foram dissolvidos por agitação em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em leitor de microplaca à 570 nm (BioTek© synergy 2).

### 3.6 Preparação de plasmídeos (mRFP-GFP-LC3, Keap1 wt e Keap1 C151S)

Os plasmídeos de Keap1 selvagem e mutado (Zhang e Hannink 2003) e mRFP-GFP-LC3 (Lau *et al.* 2013) utilizados nesse trabalho foram gentilmente cedidos pela Dra Donna Zhang.

Bactérias quimiocompetentes da linhagem DH5 $\alpha$  foram incubadas em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado aproximadamente 1 ng de DNA plasmidial (mRFP-GFP-LC3, Keap1 wt ou Keap1 C151S) em 50  $\mu$ L de bactérias quimiocompetentes. As bactérias foram aquecidas por 1.5 minutos em banho seco a 42 °C, retornando ao gelo imediatamente após o choque térmico, recuperadas em 1 mL de meio LB (10 g/L de peptona de soja, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) sem antibióticos e incubadas em banho seco por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, foram centrifugadas em temperatura ambiente a 1677g por 30 segundos. Então, foi removido 900  $\mu$ L de sobrenadante e gentilmente homogeneizado os 100  $\mu$ L de mix de bactérias. Essa suspensão foi então dividida em 10  $\mu$ L e 90  $\mu$ L os quais foram plaqueados em meio sólido LB-ágar (10 g/L de peptona de soja; 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) e canamicina (50  $\mu$ g/mL para mRFP-GFP-LC3) ou ampicilina (100  $\mu$ g /mL Keap1 wt ou Keap1 C151S). As colônias cresceram por 16 horas a 37 °C em estufa.

O inóculo foi realizado escolhendo uma colônia separada e incubando em meio LB acrescido de antibiótico por 16 horas, sob agitação (250 rpm), a 37 °C. No outro dia, a cultura saturada foi centrifugada a 12000 x g por 30 minutos para obtenção de um sedimento de células.

As purificações foram realizadas como descrito pelo protocolo do Kit da QIAGEN para purificação em larga escala de plasmídios (QIAGEN Plasmid Maxi Kit – QIAGEN). A concentração foi determinada por NanoDrop (ND-1000 espectrofotômetro).

### 3.7 Transfecção com *siRNA*, *cDNA* e ensaio de luciferase.

A transfecção com RNA de interferência siRNA (siRNA #1027281, KEAP1 siRNA #SI03246439, Qiagen) foi realizada utilizando o Kit HiPerfect (Qiagen) e a transfecção dos plasmídeos foi feita 24 horas após a transfecção com siRNA usando Lipofectamina 3000 (Invitrogen). Ambas as transfecções foram feitas de acordo com a instrução do fabricante. Brevemente, 16 horas antes da transfecção, células HEK293T foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de  $4 \times 10^4$  células/poço em meio MEM completo (contendo soro fetal bovino e antibióticos). No segundo dia, 37.5 ng de siRNA foi diluído em 100  $\mu$ L de meio de cultura sem soro e, adicionado 3  $\mu$ l de HiPerFect Transfection Reagent e misturado rapidamente por agitação em vórtex, essa solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente para

que fosse permitida a formação dos complexos de transfecção. Após esse tempo, as células foram incubadas por 24 horas com o complexo contendo o siRNA.

No dia seguinte o meio das células foi substituído por meio fresco, as células foram então co-transfectadas com o vetor de expressão para Keap1 selvagem (Keap1-wt) ou Keap1 mutante (Keap1-C151S) (Zhang e Hannink 2003), juntamente com os plasmídeos codificantes de hNQO1-ARE firefly luciferase e o gene repórter de renilla luciferase (Tao *et al.* 2016, 2013). 24 horas após a transfecção, as células foram tratadas com sulforafano (SF -5  $\mu$ M), arsênico (As - 5  $\mu$ M), ou com as toxinas mistas UT3 (400  $\mu$ M IxS, 400  $\mu$ M pCS e 40  $\mu$ M IAA) por 16 h, em seguida as células foram lisadas para análise da atividade dos genes repórteres utilizando o ensaio Promega dual luciferase para gene repórter (Promega). A atividade firefly luciferase foi normalizada pela atividade da renilla luciferase. O ensaio foi realizado em triplicata e expresso como media  $\pm$  DP.

### 3.8 Análise da expressão protéica por western blotting

Após os tratamentos, as células foram lavadas 2 vezes com PBS [1x] gelado em seguida foram coletadas em tampão de amostra 1X LDS sample buffer Nupage® contendo (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% glicerol, 100 mM dithiothreitol (DTT), 0.1% azul de bromofenol) (100  $\mu$ L/ $\sim$ 10<sup>6</sup> células). Os extratos foram fervidos por 10 minutos e então foram sonicados com dois ciclos de 30 segundos com intervalo de 15 segundos entre ciclos, 70 W. Após sonicação, o extrato celular foi centrifugado por 1 minutos a 13.000 rpm (centrifuga mini spin Eppendorf).

O lisado celular total foi separado por SDS-PAGE e submetidas a reação de *Western Blotting*. Brevemente, as amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose durante 90 minutos sob amperagem constante 120 mA em tampão de transferência gelado (Tris-glicina, 0.1 % de SDS e 20% metanol) para aparato Mini-Protean Wet (Bio-Rad). As membranas foram então bloqueadas (durante 1 hora à temperatura ambiente) com tampão de bloqueio TBST (120 mM de NaCl, 20 mM de Tris-base e 0,05% de Tween 20) contendo 1% de BSA ou 5 % de leite desnatado (Molico®). Após bloqueio, as membranas foram então incubadas com os anticorpos primários, previamente diluídos em tampão de bloqueio. As reações com os anticorpos primários foram feitas a 4°C por 16 horas sob agitação. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. Após o período de incubação as membranas foram lavadas 6 vezes por 10 minutos com TBST.

As reações foram realizadas utilizando um kit de quimioluminescência West Pico ou Femto (Pierce) e as bandas foram detectadas em filmes de autorradiografia (Carestream Health, França) ou pelo sistema de documentação de gel ChemiDoc CRS (BioRad). A intensidade relativa das bandas foi quantificada usando o software Quantity One (BioRad) e Image J (NIH).

### 3.9 Imagem de célula viva

Células NIH-3T3  $1 \times 10^4$  foram crescidas em placas com fundo de vidro de 35-mm (In Vitro Scientific). O plasmídeo mRFP-GFP-LC3 foi transfectado usando Lipofectamine Plus (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após 16 horas de transfecção, as células foram tratadas com toxinas urêmicas isoladas ou mistas ou com 10% de pool de soro urêmico ou não urêmico por 4 horas (Rodrigues *et al.* 2015). As imagens foram capturadas com o microscópio Zeiss Observer.ZI usando o software Slidebook 4.2.0.11 e o programa do computador (Intelligent Imaging Innovations, Inc) e com o microscópio confocal Nikon A1RSi, utilizando objetivas Nikon N Apo 60x NA 1.4  $\lambda$ s oil immersion e o software NIS-elements.

### 3.10 Imunofluorescência para visualização de translocação nuclear de Nrf2

Células EA.hy926 na densidade de  $3 \times 10^4$  (células/poço) foram semeadas sobre lamínulas de 13 mm (Knitell) em uma placa de 24 poços (Corning) e cultivadas por 24 horas e em seguida carenciadas por 16 horas em meio DMEM e 0.1% SFB. Após esse período as células foram tratadas por 4, 24 e 48 horas com as toxinas isoladas ou combinadas em diferentes concentrações e com 5  $\mu$ M de sulforafano. Após o tratamento as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 4% paraformaldeído (PFA) por 20 minutos. Depois, foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com glicina por 5 minutos para bloqueio dos sítios de aldeídos e após três lavagens com PBS foram permeabilizadas e bloqueadas por 20 minutos com 0,01% saponina em 1% BSA-PBS. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-Nrf2 na diluição 1:50 em 1% BSA-PBS, durante 2 horas em câmara úmida a 25° C. Para remoção dos anticorpos não ligados, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, em seguida as células foram incubadas com anticorpo secundário Alexa-fluor 488 anti-rabbit, diluído 1:1000 em 1% BSA-PBS. O anticorpo secundário foi incubado na mesma solução de bloqueio durante 60 minutos à temperatura ambiente e, protegido da luz (câmara escura). Após a incubação com o secundário, as células foram novamente lavadas 5 vezes com PBS. As lamínulas foram então incubadas com uma solução de DAPI (1  $\mu$ g/mL) em PBS-glicerol (1:1) para a marcação do núcleo das células e montagem das lâminas.

As imagens foram capturadas com o microscópio confocal Nikon A1RSi, utilizando objetivas Nikon N Apo 60x NA 1.4  $\lambda$ s oil immersion e o software NIS-elements e Image J (NIH).

### 3.11 Determinação de proteínas totais carboniladas por ELISA

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e coletadas em 100  $\mu$ L de tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% Triton X-100, mais coquetel inibidor de protease completo, Roche®), o homogenato foi lisado por sonicação, centrifugado por 10 min a 11.300 x g, a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. Os níveis de carbonilação proteica foram determinados usando um método ELISA modificado como descrito (Buss *et al.* 1997; Alamdari *et al.* 2005) com as seguintes modificações: 200  $\mu$ L de 1  $\mu$ g / mL de lisado de proteína foram adsorvidos em uma placa Maxsorb de 96 poços (NUNC) (os brancos foram incubados apenas com tampão 100 mM carbonato-bicarbonato, pH 9,6). A placa foi coberta com papel alumínio e incubada durante 16 horas a 4 °C. Após adsorção, as amostras foram lavadas suavemente 3 vezes com PBST (PBS contendo 0,05% Tween 20) e depois derivatizadas com 200  $\mu$ L de uma solução 0,05 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (1,2 mg de DNPH foi dissolvido em 333  $\mu$ L de ácido fosfórico (85%) e foi adicionado a 40 mL de H<sub>2</sub>O). O pH foi ajustado para 6,2 adicionando gotas de 10 M NaOH, e o volume final foi ajustado para 50 mL e filtrado com um filtro de 0,2  $\mu$ m, à temperatura ambiente por 45 min. Após 5 lavagens com PBS: EtOH (1:1) e uma lavagem com PBS, as proteínas adsorvidas foram incubadas com 200  $\mu$ L de tampão de bloqueio (PBS contendo 1% de leite desnatado e 0,05% Tween 20) durante 90 minutos à temperatura ambiente. Os poços das amostras foram então incubados com anti-DNP (A6430, Molecular Probes, 1: 2700) em 100  $\mu$ L de tampão de bloqueio, por 1 hora a 37°C, lavados 5 vezes com PBST e incubados com anticorpo IgG anti-rabbit conjugado com HRP (A0545, Sigma, 1: 4000) durante mais 1 hora a 37 °C. Após 5 lavagens com PBST, as amostras foram incubadas com 100  $\mu$ L de substrato TMB (código 002023, Thermo Fischer scientific) à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 50  $\mu$ L de 2 M HCl. A absorbância foi lida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas (Epoch Biotek).

### 3.12 Dosagem de proteínas celulares

As proteínas foram quantificadas pelo método adaptado de Bradford (1976), fazendo o uso do corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. O reagente de Bradford Bio-Rad Protein Assay foi diluído em proporção de 1 parte do reagente para 4 partes de água ultra pura (Milli-

Q). Em placa de 96 poços foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do reagente diluído. Para a curva padrão foi utilizado BSA em duplicata variando de 1 a 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Em cada poço foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de extrato celular de cada tratamento em duplicata. A leitura da absorbância foi feita a 595 nm.

### 3.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ( $\pm$ ) e desvio padrão (SD). Para comparar valores entre grupos, one-way ANOVA e teste t-Student foram utilizados (Graphpad Software, Prism6). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de  $P$  foi menor que 0.05.

## 4 RESULTADOS

Neste trabalho avaliamos os efeitos das toxinas urêmicas indoxil sulfato (IxS), p-cresil sulfato (pCS) e ácido indol acético (IAA), isoladas ou combinadas, na desregulação das vias de autofagia e de Nrf2. A primeira parte refere-se à demonstração de que as toxinas levam à inibição da fase final da autofagia, enquanto que a segunda parte se refere à demonstração de que as toxinas levam à ativação não-canônica da via de Nrf2, após 4-24h de incubação, seguida de sua inativação após 48 h de incubação.

### INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA MEDIADA PELAS TOXINAS URÊMICAS

#### 4.1 Avaliação da viabilidade celular após exposição às toxinas urêmicas e incorporação celular das toxinas em HeLa

Primeiramente, determinamos se a toxicidade urêmica causada pelas toxinas isoladas poderia alterar a viabilidade em células HeLa (utilizada para os ensaios mecanísticos). Para essa análise realizamos o ensaio de MTT. Esse ensaio consiste basicamente na redução do anel de tetrazólio do composto MTT a um produto de coloração roxa pela ação de enzimas oxirredutases mitocondriais. Para essa avaliação expusemos as células por 48 horas a esses compostos urêmicos (IxS 50 a 400  $\mu$ M, pCS 50 a 400  $\mu$ M e IAA 5 a 50  $\mu$ M) e o resultado obtido demonstrou que não houve diferença significativa entre o padrão de viabilidade celular com as células tratadas com as toxinas quando comparadas ao controle negativo (células não tratadas), como mostra a figura 8.

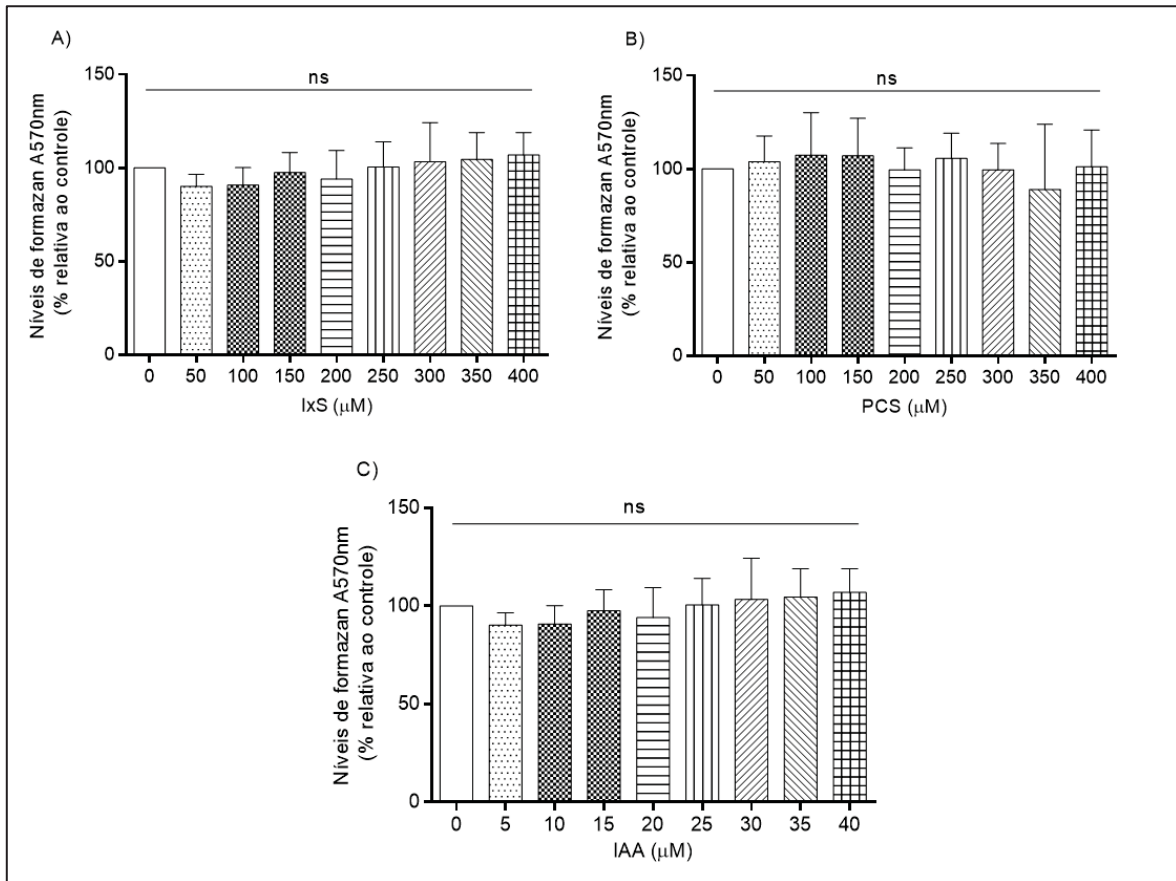


Figura 8. Determinação da viabilidade celular por ensaio de MTT.

Nota: (A) Indoxil sulfato, (B) p-Cresil sulfato e (C) Ácido indol acético. As células HeLa foram tratadas com concentrações crescentes das toxinas por 48 horas. Os gráficos são uma média de 4 ensaios diferentes. Não houve diferença significativa na viabilidade celular quando as diferentes concentrações utilizadas foram comparadas com o controle não tratado.

Fonte: A autora, 2019.

Em seguida, nós analisamos a quantidade de toxinas incorporadas pelas células HeLa após 4 horas de incubação com misturas das toxinas urêmicas (UT1, UT2 e UT3) pela metodologia de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (Figura 9). O resultado foi normalizado pela quantidade de proteínas determinadas pelo ensaio de Bradford. Os dados estão apresentados na tabela 2. Como esperado, as quantidades de toxinas incorporadas aumentaram de forma dependente da concentração.

**Tabela 2** Avaliação da internalização de toxinas urêmicas em células HeLa .

	Controle	UT1	UT2	UT3
IxS (pmol/µg prot)	0.11±0.20	0.76±0.58	1.21±0.58	1.99±0.71
pCS (pmol/ µg prot)	ND*	0.38±0.19	0.90±0.70	1.34±0.94
IAA (fmol/ µg prot)	2.92±4.6	56.2±46.4	89.8±51.2	150.4±79.3

\*ND: não detectado.

Fonte: A autora, 2019.

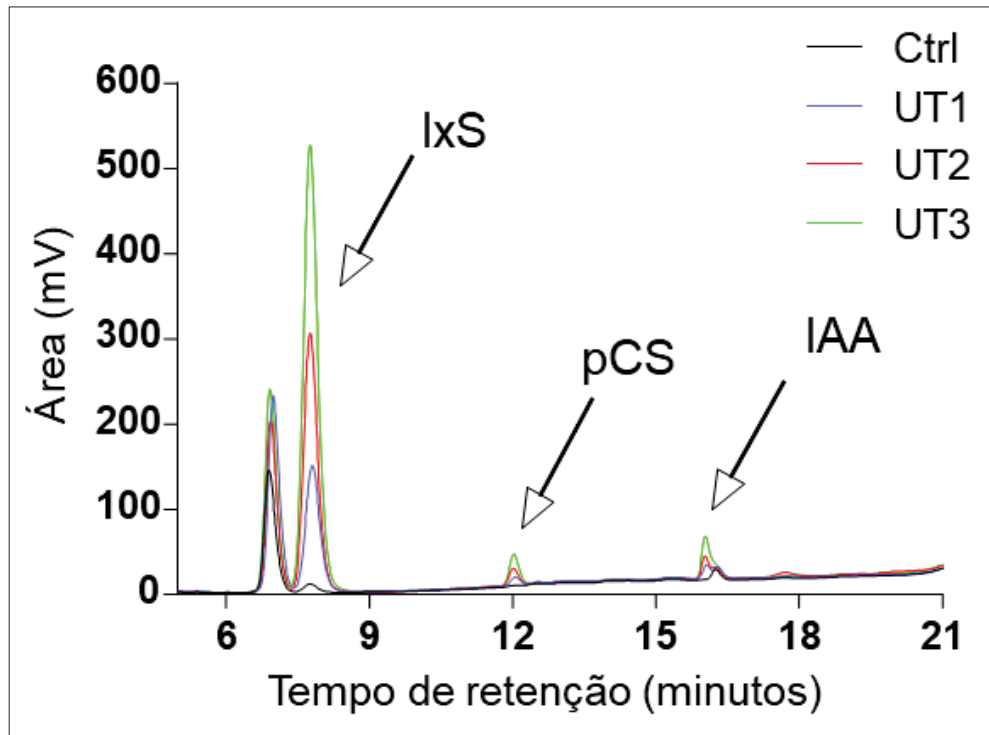


Figure 9. Cromatograma representativo.

Nota: Detecção das toxinas urêmicas mistas em extrato celular de HeLa, tratadas por 4 horas e separadas por cromatografia líquida de alta performance e detector.

Fonte: A autora, 2019.

#### 4.2 Caracterização da perturbação da via de autofagia nos estágios finais em células HeLa.

Para determinar o papel intracelular das toxinas urêmicas no contexto da autofagia, nós analisamos o efeito de cada toxina separadamente e a mistura delas através da análise de 2 marcadores de autofagia (p62 e LC3). Como controles utilizamos bafilomicina (BafA1), cloroquina (HCQ) ou rapamicina (Rap) para diferenciar se as alterações observadas eram um efeito de bloqueio ou ativação da autofagia em etapas iniciais ou resolutivas da via. Consideramos para o estudo concentrações patológicas baixas (100  $\mu$ M IxS, 100  $\mu$ M pCS e 10  $\mu$ M IAA), médias (IxS 200  $\mu$ M, pCS 200  $\mu$ M e IAA 20  $\mu$ M) e altas (400  $\mu$ M IxS, 400  $\mu$ M pCS e 40  $\mu$ M IAA) ou as misturas, como citado no início da sessão resultados.

Empregamos como controle positivo o inibidor da atividade autofágica BafA1. Após 4 horas de tratamento, avaliamos a expressão dos níveis proteicos dos marcadores p62 e LC3II por *Western blotting*. Os resultados obtidos confirmaram que Baf A1 aumenta a expressão tanto de p62 quanto de LC3II quando comparado ao controle negativo (células não tratadas), ver figura 10. O aumento de LC3II isoladamente indica um aumento na produção de autofagossomos sugerindo alta atividade de degradação, contudo, quando há o acúmulo desses

dois marcadores são combinados é indício de supressão do fluxo autofágico (Mizushima, Yoshimori e Levine, 2010).

Curiosamente, o padrão de resposta das toxinas variou entre elas, IxS induziu o bloqueio da autofagia de modo concentração-dependente na expressão dos níveis de p62 (Figura 10A) mas foi estatisticamente diferente apenas na concentração considerada mais alta para esse estudo (400  $\mu$ M IxS). No entanto, na análise de densitometria das bandas de LC3II não houve grandes alterações na expressão desse marcador quando comparado ao controle negativo. Quando os níveis de expressão de p62 foram analisados referentes ao tratamento com pCS, observamos um aumento global em todas as concentrações, mas não de maneira concentração-dependente como observado no tratamento com IxS e, houve diferença significativa somente na expressão dos níveis de LC3II nas concentrações 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M (Figura 10B). Da mesma forma que pCS, as amostras tratadas com IAA também aumentaram os níveis totais de expressão de p62 mas somente o tratamento com 20  $\mu$ M apresentou diferença significativa nos níveis de LC3II (Figura 10C). Utilizando a mesma metodologia, quando as toxinas foram combinadas, novamente observamos um aumento na expressão global nos níveis de p62 em todas as concentrações empregadas, enquanto LC3II aumentou significativamente apenas com UT3 (Figura 10D).

É interessante ressaltar que essas variações na análise de LC3II são comuns no estudo da autofagia, uma vez que a quantidade de LC3II pode variar bastante até em uma mesma linhagem de células. Além disso, outros substratos autofágicos podem ser usados para monitorar o fluxo autofágico, sendo que o mais estudado e escolhido nesse trabalho é p62, pois essa proteína é seletivamente incorporada nos autofagossomos através da ligação direta com LC3II e quando a atividade autofágica está funcional p62 é eficientemente degradada; ou seja podemos dizer que os níveis de expressão celular total de p62 estão correlacionados inversamente com a atividade autofágica (Mizushima e Yoshimori 2007). Dessa forma, nossos dados indicaram fortemente supressão da autofagia mediada pela ação das toxinas urêmicas utilizadas.

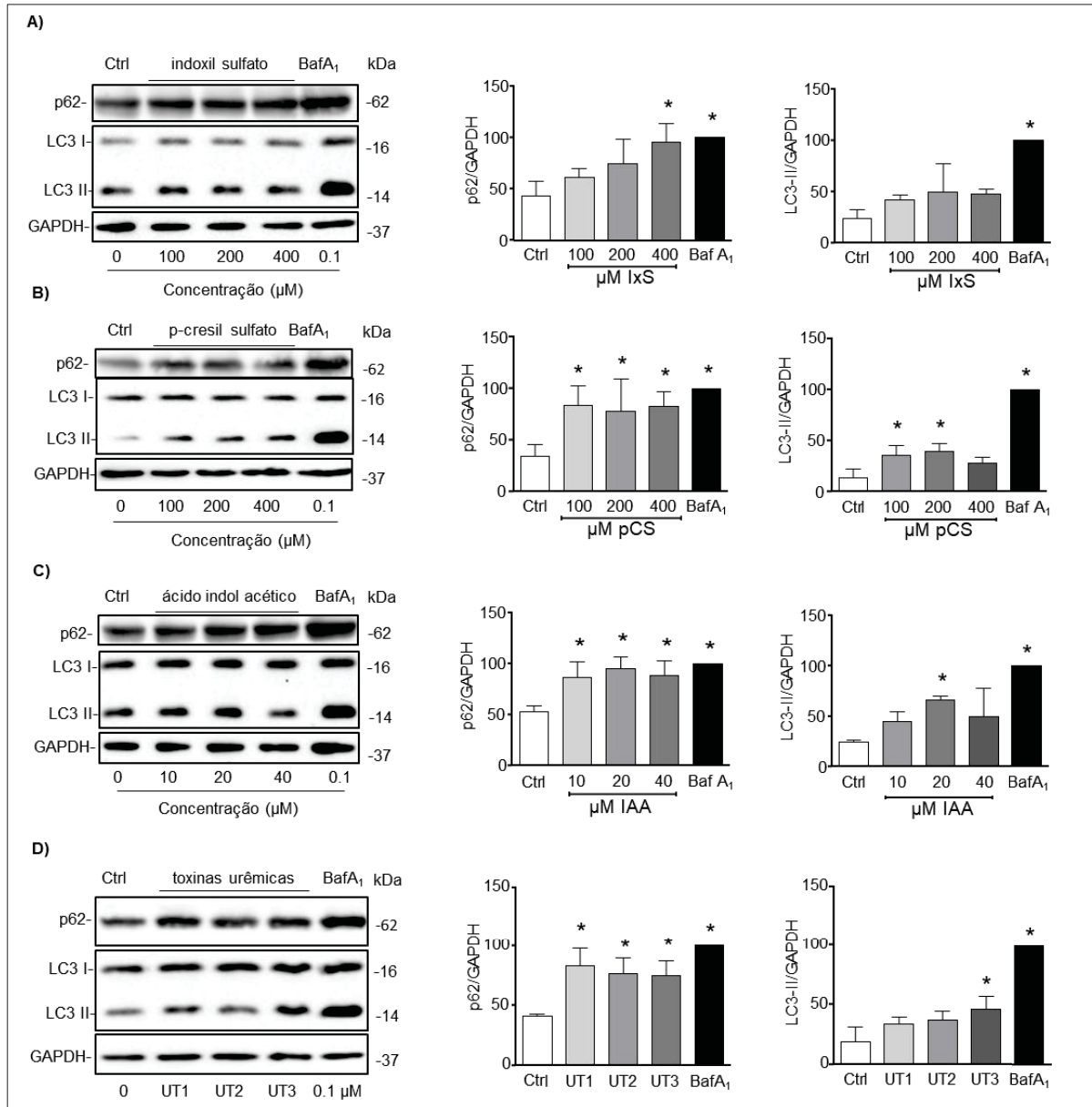


Figure 10. Disfunção da autofagia por toxinas urêmicas.

Nota: *Western blots* representativos (painéis à esquerda) de extratos proteicos de células HeLa tratadas, ou não, com concentrações crescentes de indoxil sulfato (A), p-cresil sulfato (B), ácido indol acético (C) ou com misturas dos mesmos (D) por 4 h. BafA<sub>1</sub> (0,1 µM) foi usada como um inibidor da autofagia. A análise da expressão de p62 (painéis ao meio) e LC3II (painéis à direita) foi realizada com one-way ANOVA e pós teste de Tukey. Os dados são média ± desvio padrão de três experimentos independentes. \* P < 0,05 em relação ao controle.

Fonte: A autora, 2019.

A modulação do fluxo autofágico foi analisada na presença e na ausência de BafA<sub>1</sub>. Esse ensaio utiliza a proteína LC3II como substrato para análise do fluxo autofágico, ou seja, determina a degradação que é dependente do lisossomo, por esse motivo é necessário adicionar ao tratamento um inibidor potente da V-ATPase ou algum inibidor das enzimas lisossomais. Se o fluxo autofágico estiver ocorrendo, a quantidade de LC3II será aumentada na presença de um inibidor de degradação lisossomal porque o fluxo de LC3II será bloqueado. Logo, a diferença

na quantidade de LC3II entre as amostras na presença ou ausência do inibidor representa a taxa do fluxo autofágico.

Para essa análise além da BafA1, incluímos também uma concentração urêmica baixa, referida aqui como UT normal (25  $\mu$ M IxS, 25  $\mu$ M pCS e 2.5  $\mu$ M IAA) que foram submetidas ao co-tratamento com bafilomicina. Como esperado, 0.1  $\mu$ M BafA<sub>1</sub> aumentou a expressão de p62 e LC3II, assim como as células tratadas com UT1 (Figura 11).

As amostras incubadas apenas com as toxinas em concentrações mais baixas mantiveram o perfil dos marcadores autofágicos semelhantes ao controle negativo (Figura 11A). Entretanto, quando foram submetidas ao co-tratamento com BafA<sub>1</sub>, verificou-se um aumento dos níveis de expressão proteica tanto em LC3II quanto em p62.

Quando as células foram incubadas com UT1 na presença de BafA<sub>1</sub> não houve alteração significativa na quantidade de LC3II, como observado pela análise das diferenças expressas pelos deltas de LC3II na figura, quanto maior o valor de delta entre as amostras maior também será a atividade do fluxo autofágico. (Controle  $\Delta$ = 69.9, UT normal  $\Delta$ =26,2 e UT1  $\Delta$ =11,4). Esse dado reafirma o que havíamos observado, que o distúrbio da autofagia pela ação das toxinas urêmicas ocorre devido ao bloqueio do fluxo autofágico. Esse ensaio foi realizado também na presença de soro humano saudável (SN) e soro urêmico de pacientes em hemodiálise (SU) (Figura 11B) porém o número de replicatas biológicas realizadas (2n) foi insuficiente para gerar a análise estatística. Embora tenhamos observado acúmulo das proteínas p62 e LC3II no ensaio do fluxo autofágico não podemos concluir, por esse ensaio, se de fato ocorre uma inibição do fluxo semelhante ao resultado observado em UT1. Outros ensaios precisam ser concluídos para finalizar essa análise.

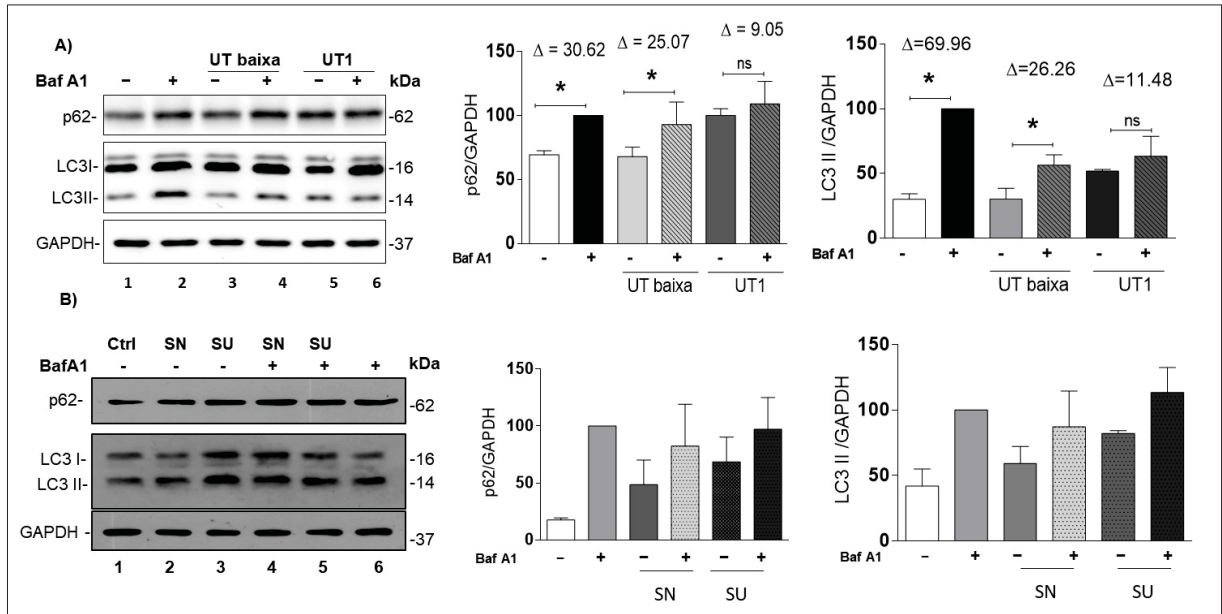


Figura 11. Ensaio de fluxo de autofagia.

Nota: **(A)** Células HeLa tratadas por 4 horas com concentrações baixas de toxinas urêmicas (sulfato de indoxil 25  $\mu$ M, sulfato de p-cresil 25  $\mu$ M e ácido indol acético 2.5  $\mu$ M) ou com a menor concentração de toxinas urêmicas mista (UT1) na presença ou na ausência de 0.1  $\mu$ M de BafA1 (adicionada nas últimas duas horas). Os dados são média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle. **(B)** Para avaliar o fluxo autofágico com amostras de soro humano as células foram tratadas com meio contendo 10% de soro não urêmico (voluntários saudáveis) ou 10% de soro urêmico (pacientes em hemodiálise) na presença ou ausência de 0.1  $\mu$ M de BafA1 (adicionada nas últimas duas horas).

Fonte: A autora, 2019.

#### 4.3 Observação por imagem da inibição do fluxo autofágico

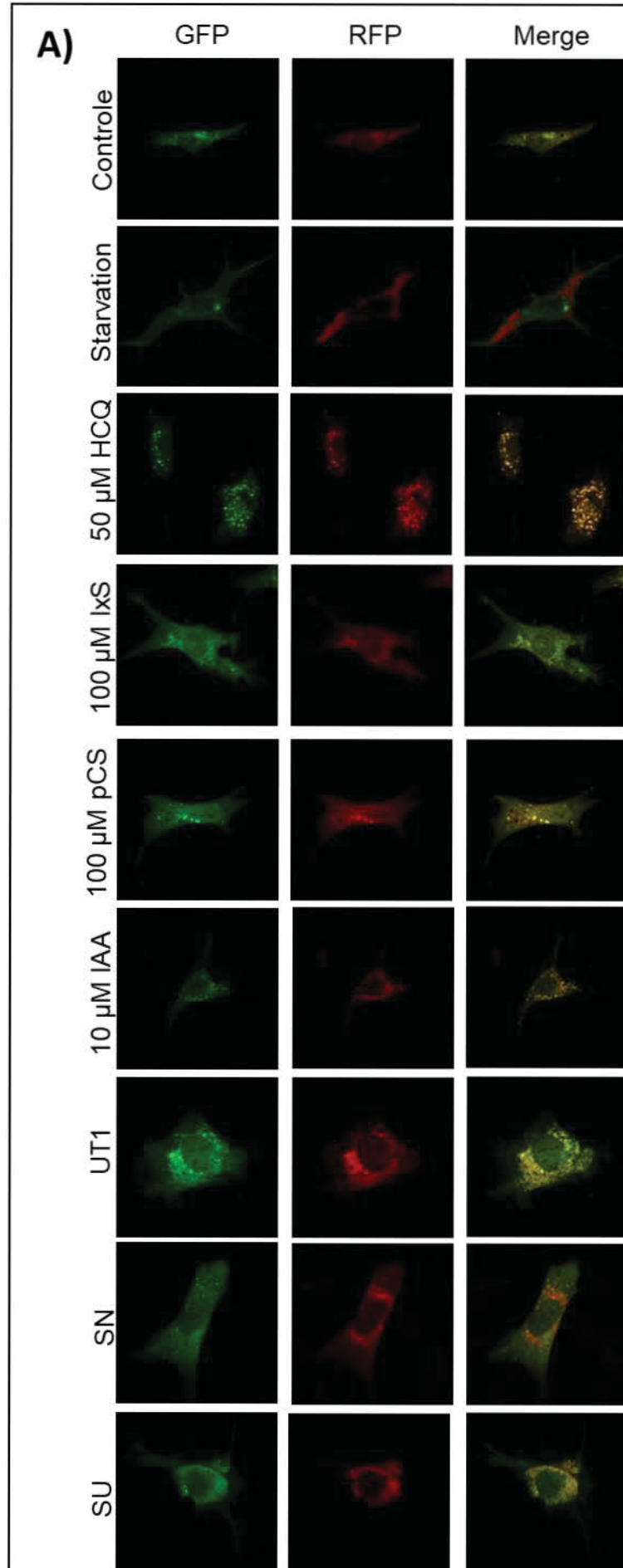
Para analisar o fluxo celular autofágico, nós utilizamos uma ferramenta baseada na colocalização de fluorescências verde e vermelha, produzidas pelo tandem fluorescente conjugado com LC3 (construto mRFP-GFP-LC3), o qual fornece informações sobre formação e clearance de autofagossomo (Kimura, Noda, e Yoshimori 2007; Zhou *et al.* 2012)

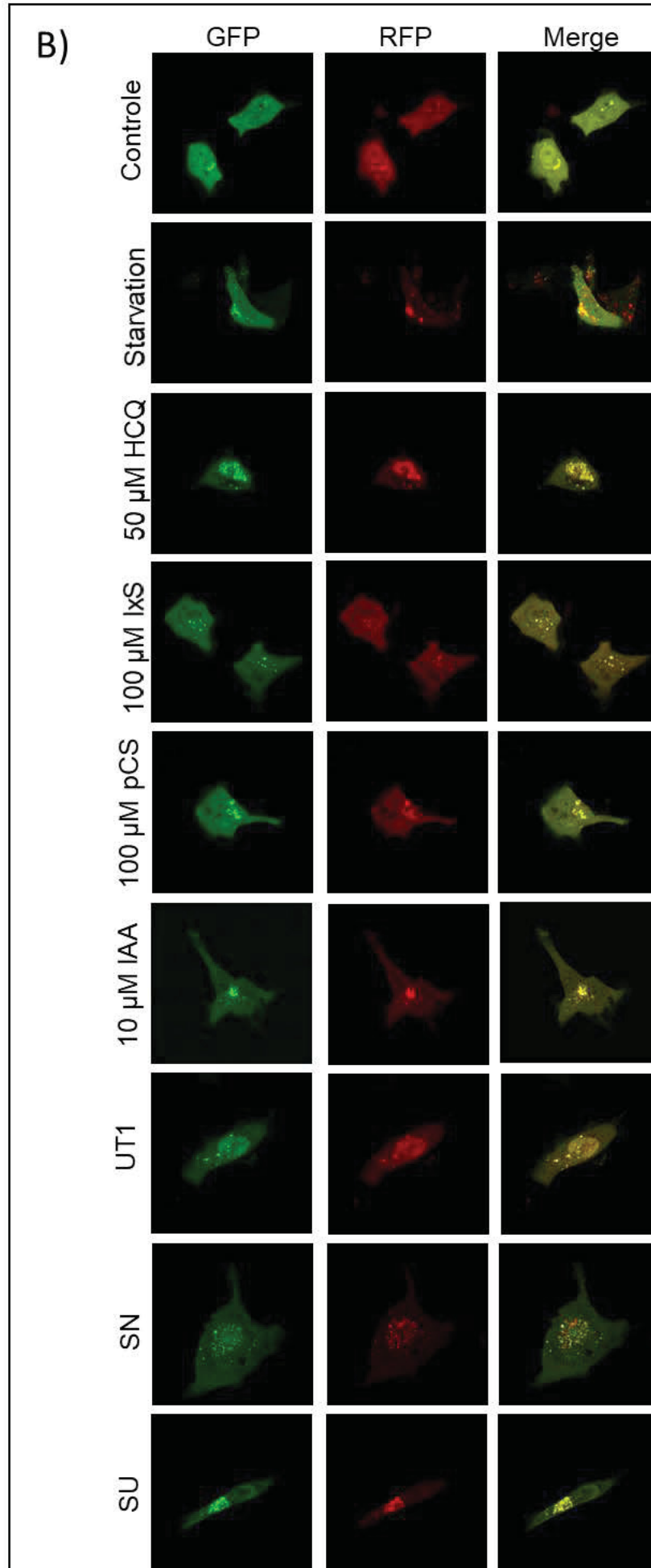
A deprivação de nutrientes “starvation” aumenta o fluxo autofágico. LC3 é então recrutado para a membrana autofagossomal. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo a fluorescência do GFP é mitigada pelo pH lisossomal ácido, permitindo a visualização de pontos vermelhos predominantemente. Assim, starvation produz um aumento na quantidade de pontos vermelhos (Figura 12). Em contraste, a hidroxicloroquina (HCQ) ou a BafA1 aumentam o número de autofagossomo inibindo a fusão entre autofagossomo e lisossomo ou inibindo a acidificação de autolisossomo. Dessa forma, mais pontos amarelos são observados.

De forma resumida, o aumento na quantidade de pontos fluorescentes vermelhos indica aumento no fluxo autofágico enquanto o aumento na quantidade de pontos amarelos indica inibição do fluxo autofágico no estágio final.

Células NIH-3T3 (Figura 12A e 12C) e EA.hy926 (Figura 12B) foram transfectadas com o construto mRFP-GFP-LC3 e foram então tratadas com inibidores ou bloqueadores de autofagia. Em células não tratadas, LC3 se apresenta como uma proteína citoplasmática solúvel. Portanto, a fluorescência vermelha colocaliza com a fluorescência verde fornecendo uma fluorescência amarela difusa (Figura 12).

Usando essa abordagem, células tratadas com toxinas urêmicas mistas em baixas concentrações patológicas (UT1) exibiram aumento na formação de pontos amarelos, similarmente ao estímulo de HCQ (Figura 12). Esses dados indicam que UT1 bloqueia a maturação autofagossomal e a conclusão da via da autofagia. Toxinas isoladas induzem diferentes padrões de formação autofagossomal: enquanto IxS induz um aumento no número de pontos, pCS e IAA induzem menos. Sabe-se que toxinas urêmicas circulam principalmente ligadas a proteínas séricas (Ito e Yoshida 2014; Lekawanvijit *et al.* 2012; Liabeuf, Drüeke, e Massy 2011; Lin *et al.* 2010; Sirich *et al.* 2014) e como 10% de SFB no meio de cultura celular proporcionam uma menor concentração de proteína do que no soro humano, esses ensaios também foram realizados em meio contendo 4% de BSA, e os resultados foram essencialmente os mesmos que os obtidos em 10% de SFB (Figura 12C). Assim, a concentração de proteína não interferiu na inibição de autofagia induzida por toxinas urêmicas. Para demonstrar o impacto de um pool de soro urêmico no processo de autofagia, realizamos esse mesmo ensaio incubando células transfectadas com meio contendo 10% de soro não-urêmico humano ou 10% de soro urêmico humano por 4 horas. Os resultados mostraram que o soro urêmico induziu um aumento significativo de pontos amarelos, confirmando que toxinas urêmicas e soro urêmico inibem o fluxo de autofagia.





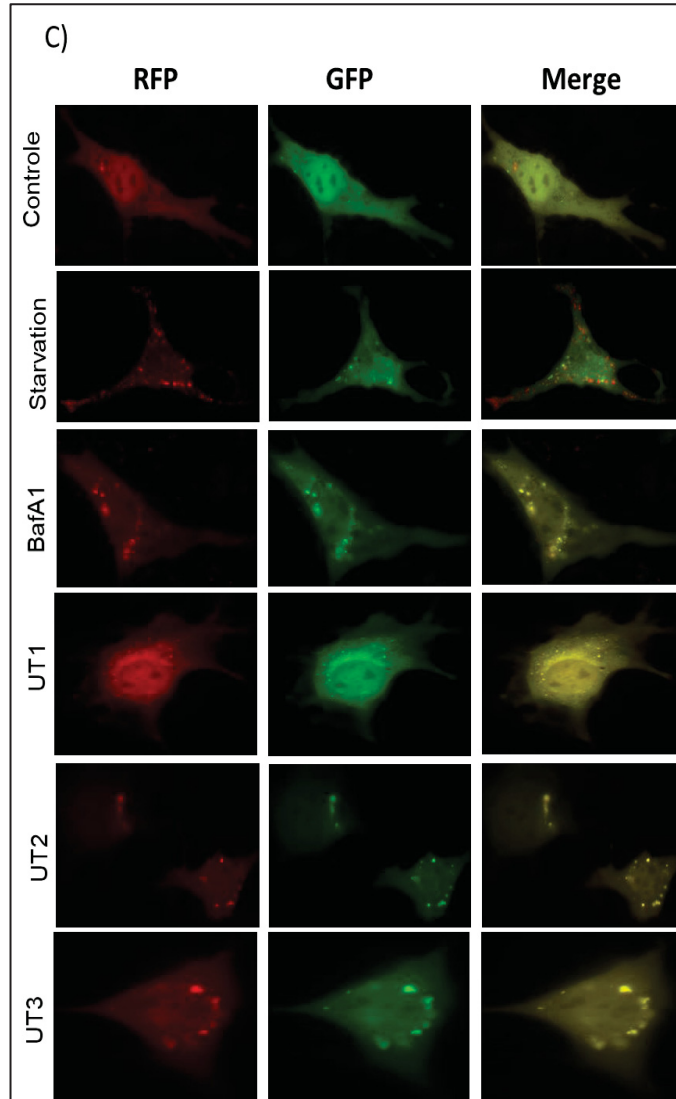


Figura 12. Toxinas urêmicas inibem o estágio tardio da autofagia.

Nota Imagens de células vivas de células NIH-3T3 (A) e EA.hy926 (B) transfectadas com uma construção mRFP-GFP-LC3 tandem. Dezesesseis horas após a transfecção, as células foram tratadas com 50  $\mu\text{M}$  de hidroxicloroquina (HCQ) ou foram privadas de soro (em HBSS), ou tratadas com toxinas urêmicas isoladas 100  $\mu\text{M}$  de IxS, 100  $\mu\text{M}$  de pCS, 10  $\mu\text{M}$  de IAA, ou com a mistura UT1 DMEM livre de vermelho de fenol em 10% SFB, ou com DMEM contendo 10% de soros urêmicos ou 10% saudáveis, por 4 h. (C) Imagens de células vivas NIH-3T3 transfectadas com uma construção mRFP-GFP-LC3 tandem, incubadas com as toxinas urêmicas mistas UT1, UT2 e UT3 na presença de 4% de BSA por 4 h, como controle positivo foi utilizado a deprivação de soro (starvation) e como controle de bloqueio da via de autofagia foi utilizado 0.1  $\mu\text{M}$  BafA1. As imagens A e B foram capturadas com um microscópio de fluorescência confocal Nikon A1 objetiva 60x NA 1,4  $\lambda\text{s}$  com óleo de imersão e software de elementos NIS. A imagem C foi capturada com microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 usando o software Slidebook 4.2.0.11.

Fonte: A autora, 2019.

#### 4.4 Indução da autofagia pode prevenir danos oxidativos e aumentar a resistência a estresse oxidativo

Considerando que os dados obtidos indicavam a perturbação da autofagia e, sabendo que a insuficiência autofágica pode comprometer a homeostase celular, entre outros fatores, através da não remoção de agregados proteicos e proteínas mal dobradas, nós avaliamos a restauração

da atividade autofágica no contexto da toxicidade urêmica através da ação da rapamicina, ativador clássico da autofagia.

Nas células controle (sem toxinas urêmicas) tratadas com 1  $\mu$ M de rapamicina por 4 horas não houve grande alteração nos níveis de expressão dos marcadores autofágicos, como mostra a Figura 13A. Isso possivelmente ocorreu porque células HeLas possuem níveis basais de autofagia bastante elevados (Mizushima, Yoshimori, e Levine 2010), por se tratar de uma célula de origem tumoral. E para a avaliação das células tratadas com UT1 utilizamos duas abordagens, uma empregando um pré-tratamento de 12 horas com 1  $\mu$ M de rapamicina seguidas 4 horas de tratamento com as toxinas coincubadas (totalizando 16 horas) e a outra fazendo apenas o cotratamento de UT1 e a rapamicina por 4 horas.

O resultado desse ensaio foi muito interessante, pois o pré-tratamento conduziu à redução significativa na expressão de p62 e diminuiu a expressão de LC3II (Figura 13A: comparar colunas 4 e 6). Contudo, quando fizemos apenas o cotratamento (UT1 + rapamicina) observamos que o bloqueio da autofagia foi mantido, como demonstrado pelos níveis inalterados de p62 e LC3II, similar ao que aconteceu quando tratamos HeLas com UT1 (Figura 13A: comparar colunas 5 e 6). Embora, os resultados indiquem que as toxinas bloqueiam a autofagia de maneira menos intensa quando comparadas ao tratamento com BafA1, esse resultado nos permite afirmar que a disfunção autofágica causada por elas não é normalizada pela coincubação de rapamicina em períodos curtos.

Esse dado nos estimulou a investigar se o pré-tratamento com rapamicina além de restaurar o fluxo autofágico também preveniria o aumento de proteínas carboniladas promovido pelas toxinas urêmicas, uma vez que um possível impacto da inibição da atividade autofágica poderia ser o acúmulo de biomoléculas oxidadas (Domagala *et al.* 2018).

Para elucidar essa questão, expusemos células EA.hy926 por 60 minutos a 500  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio, o que promoveu um aumento significativo nos níveis de proteínas carboniladas totais, como esperado. Esse resultado foi semelhante ao obtido quando tratamos células EA.hy926 com UT1 por 48 horas. Mas quando pré-tratamos 16 horas as células com rapamicina antes da incubação com UT1 por 48 horas, os níveis de proteínas carboniladas observados foram significativamente menores que aqueles obtidos apenas com a incubação de UT1 por 48 horas. Esse resultado implica em duas possíveis condições: resgatando a autofagia previne-se a produção de danos oxidativos ou inibe-se o acúmulo de proteínas oxidadas (Figura 13B).

Os ensaios acima nos instigaram a avaliar um possível dano mitocondrial causado pelas toxinas urêmicas através do bloqueio da autofagia. Como mencionado anteriormente, não

observamos perdas significativas na viabilidade celular em nenhum tratamento com concentrações crescentes das toxinas isoladas (Figura 8), mas seria possível que a disfunção autofágica pelas UTs pudesse sensibilizar às células ao estresse oxidativo? Outros estudos já demonstraram que o bloqueio da autofagia pode sensibilizar células ao estresse oxidativo (He *et al.* 2017)

Para responder essa pergunta, pré-tratamos as células endoteliais com rapamicina por 16 horas, em seguida incubamos UT1 por 48 horas, acabado esse período expusemos as células por 60 minutos a 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Foi observado uma diminuição significativa na viabilidade celular após a adição de peróxido de hidrogênio em células que foram incubadas por 48 horas somente com UT1 (Figura 13C, coluna 7), resultado semelhante obtido com as células incubadas por 48 horas em 50  $\mu\text{M}$  HCQ juntamente com 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 60 minutos (Figura 13B, coluna 6). Contudo, o pré-tratamento com rapamicina mostrou-se eficiente pois impediu significativamente a perda da viabilidade celular na presença de peróxido (Figura 13C: comparar colunas 7 e 8).

Uma vez que foi observado que as toxinas urêmicas aumentavam a produção de proteínas carboniladas e sensibilizavam as células a danos oxidativos, ficou claro que precisávamos investigar, além da autofagia, a via que é responsável pela resposta celular antioxidante.

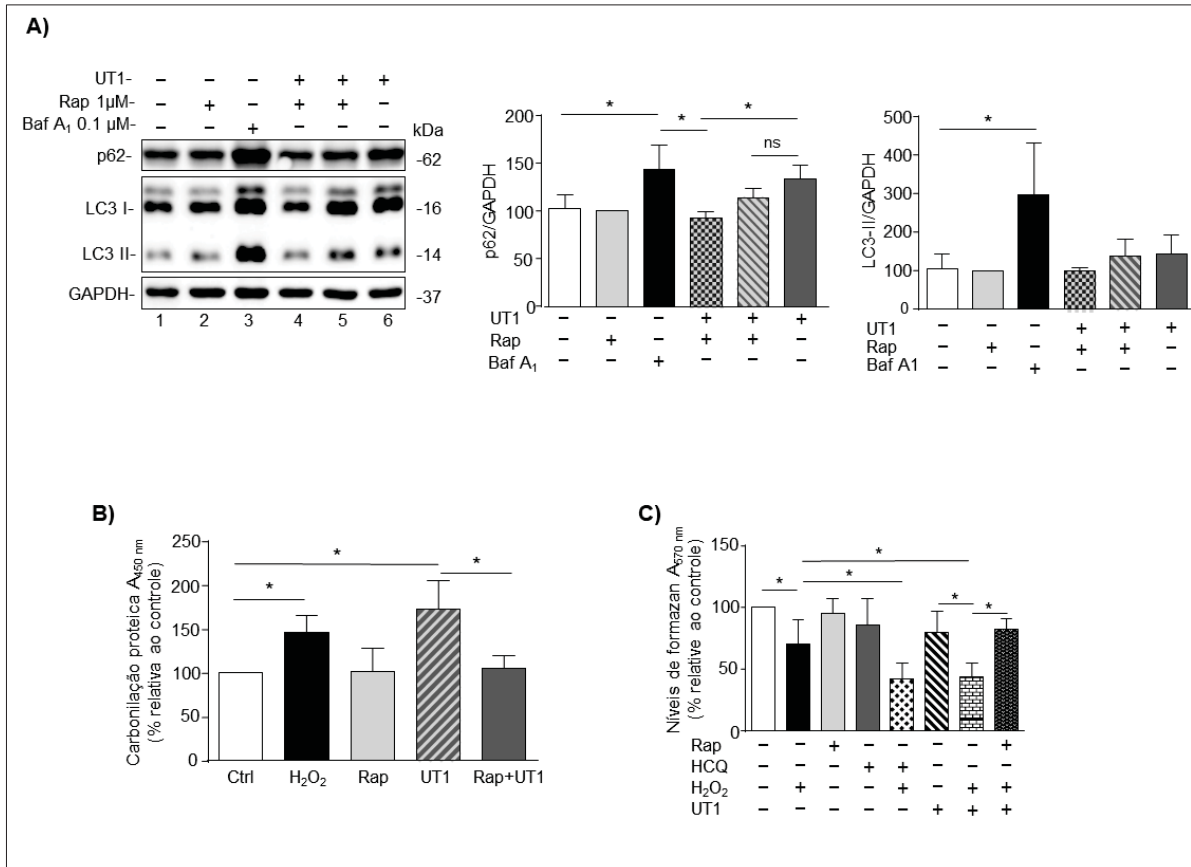


Figura 13. Inibição da autofagia provoca acúmulo de proteínas carboniladas e aumenta a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio nas células endoteliais.

Nota: A) Análise de Western Blotting de extrato celular de células HeLa (coluna 1), 1 µM de rapamicina durante 4 h (coluna 2), 0.1 µM de Baf A1 durante 4 h (coluna 3), 12 h de pré-tratamento com 1 µM de rapamicina seguido por 4 h de incubação com UT1 (coluna 4), coincubação de 1 µM de rapamicina e UT1 durante 4 horas (coluna 5) e UT1 durante 4 h (coluna 6) (painel da esquerda). Os painéis central e direito mostram a análise das expressões p62 e LC3-II, respectivamente. B) Níveis de carbonilação de proteínas em células EA.hy926 tratadas com meio e soro fetal bovino (Ctrl), 1 µM de rapamicina por 16 h (Rap), UT1 por 48 h, 1 µM de rapamicina por 16h, seguida de 48h de incubação com UT1 ou 0.5 mM peróxido de hidrogênio por 1 h (como controle positivo da oxidação). A oxidação de proteínas foi determinada com anti-DNP, por um ensaio ELISA. C) Efeito da inibição da autofagia (promovido por uma incubação de 48 h com mistura de UT1) sobre a sensibilidade de EA.hy926 a 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, conforme medido por um ensaio de MTT. A rapamicina foi usada para resgatar o comprometimento da autofagia. Todos os tratamentos foram realizados em DMEM contendo 10% de FBS. Os dados são média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA com teste post hoc de Tukey. \* P < 0,05.

Fonte: A autora, 2019.

## PERTURBAÇÃO DA VIA KEAP1-NRF2 PELAS TOXINAS URÊMICAS

### 4.5 Toxinas urêmicas ativam a via de Keap1-Nrf2 em exposição curta de tempo

Para analisar a ativação ou inibição da via Keap1-Nrf2, no contexto da toxicidade urêmica, analisamos a expressão proteica de Nrf2 e das proteínas ativadas pela Nrf2. Para isso, células HeLa foram incubadas com as toxinas isoladas ou com as toxinas combinadas (mix) durante 4 horas (para análise de Nrf2) ou 16 horas (para análise dos genes alvos de Nrf2). Utilizamos como controle de ativação o reagente sulforafano (SF), um fitoquímico ativador da proteína Nrf2 e como controle negativo apenas as células sem tratamento. De fato, o tratamento com 5  $\mu$ M SF aumentou a expressão de Nrf2 em comparação com as células não tratadas (Figura 14). As toxinas isoladas (Figura 14 A a C) ou combinadas (Figura 14D) aumentaram a expressão dos níveis totais de Nrf2, e essa elevação na expressão das proteínas, assim como observado na avaliação dos marcadores para autofagia, também não respondeu de maneira concentração dependente. No tratamento com pCS apesar de observarmos o aumento da expressão de Nrf2, na análise da densitometria, não houve diferença estatística entre as amostras, nem mesmo com o controle positivo SF. Isso pode ter ocorrido devido à grande variação de expressão da proteína Nrf2 entre os ensaios.

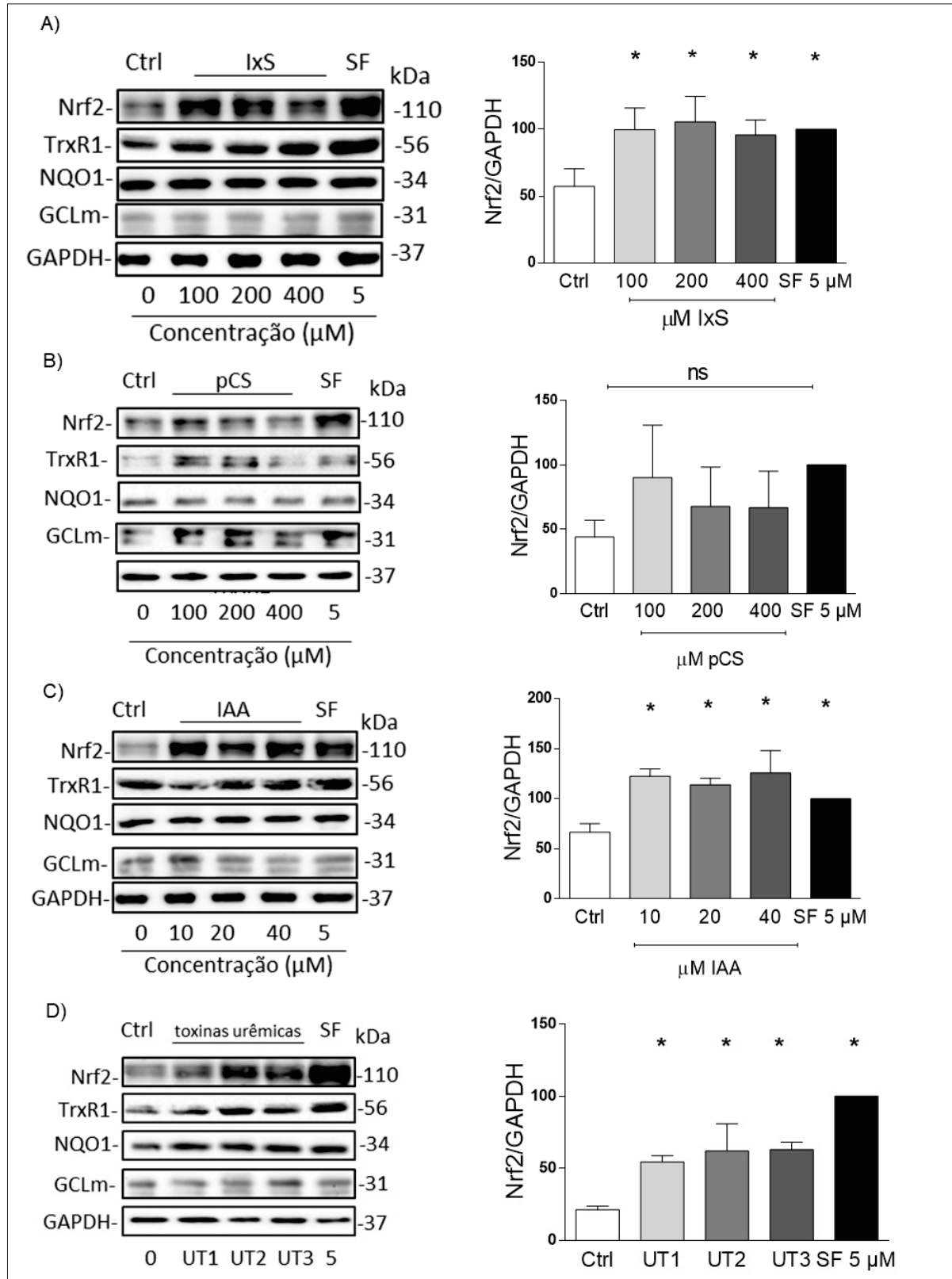


Figura 14. Toxinas urêmicas ativam a via de Keap1-Nrf2 em células de HeLa após 4h de tratamento. Nota: Análise representativa de Western blotting (painel direito) e análise densitométrica dos níveis proteicos totais de Nrf2 (painel esquerdo). (A) indoxil sulfato, (B) ácido indol acético, (C) sulfato de p-cresil, (D) toxinas urêmicas mistas. 5  $\mu\text{M}$  de sulforafano como um controle positivo da ativação e controle NRF2 não tratados. Medimos os níveis de expressão de NRF2 (após o tratamento com 4h) e seus genes alvo (após 16h de tratamento). TRXR1 (tioredoxina redutase 1), NQO1 (NAD (P) H quinona desidrogenase 1, GCLM (glutamato cisteína ligase). Fonte: A autora, 2019.

É interessante verificar que com essa abordagem (exposição curta) os compostos urêmicos, aqui estudados, são capazes de aumentar a expressão de Nrf2. Relatos na literatura apontam que pacientes em estágios mais avançados da DRC (Pedruzzi *et al.* 2012; Stockler-Pinto *et al.* 2014; Stockler-Pinto *et al.* 2018), ou em animais experimentais nefrectomizados (Kim e Vaziri 2010), a sinalização de Nrf2 parece estar inativada ou com sua ativação reduzida, o que nos leva a acreditar que o aumento na expressão de Nrf2 observado nos nossos ensaios pode ser uma resposta primária ao estresse celular causado pelas toxinas, ou consequência do bloqueio autofágico promovido por elas ativando Nrf2 de maneira não canônica.

A modulação de Nrf2 através do bloqueio da autofagia é bem conhecida, essa é uma ativação indireta que ocorre através da interação de p62 com Keap1. Tal mecanismo é observado e descrito quando células são expostas a toxicidade do arsênico (um carcinogênico humano), que ativa a via Nrf2 através do bloqueio da autofagia (Lau *et al.* 2010; Dodson *et al.* 2018).

#### 4.6 Toxinas urêmicas também ativam a via nrf2 por uma via não canônica

Mostramos na primeira parte deste trabalho a inibição do fluxo autofágico. Além disso, já foi demonstrado que um fluxo autofágico deficiente (Copple *et al.* 2010; Y. Liu *et al.* 2007; Jain *et al.* 2010; Fan *et al.* 2010), como aquele promovido por arsênico (Lau *et al.* 2010), pode induzir uma ativação da via Nrf2. Portanto, questionamo-nos se havia a possibilidade das toxinas urêmicas estarem ativando de forma não-canônica a Nrf2. Para elucidar essa questão, testamos o papel da cisteína 151 (C151S) de Keap1, na regulação de Nrf2 e sua resposta antioxidante, no contexto urêmico.

Para isso, medimos a ativação de ARE presente na região promotora de NQO1 (Tao *et al.* 2015), clonado com o gene reporter da luciferase de vagalume em HEK293T com deficiência de Keap1 endógeno (obtido por nocaute de KEAP1) e superexpressando ou Keap1 selvagem (wt) ou Keap1 C151S (Figura 15A). Como ativadores da via canônica utilizamos 5  $\mu$ M SF e 50  $\mu$ M de tert-butil hidroquinona (tBHQ) e como ativador não canônica utilizamos 5  $\mu$ M de arsênico (As). Para esse ensaio, utilizamos a mistura de toxinas mais concentrada, referida aqui apenas como UT3.

O Nocaute da proteína Keap1 endógena e a superexpressão com Keap1 wt ou Keap1 C151S foi eficiente, como pode ser observado na (Figura 15A). Neste ensaio, foi realizada a transfecção do construto de ARE com luciferase de vagalume e do construto renilla luciferase.

Quando avaliamos a ativação de ARE, observamos que SF e tBHQ ativaram ARE nas células superexpressando Keap1 WT, mas não nas células superexpressando Keap1 C151S. Este resultado confirma que estes compostos ativam a via de Nrf2 através da oxidação da cisteína 151, ou seja, pela via canônica. Já o arsênico levou a ativação de ARE tanto nas células superexpressando Keap1 selvagem ou mutado (Figura 15B), indicando que de fato, a ativação de Nrf2 pelo As não depende da oxidação da cisteína 151 de Keap1, como já demonstrado (Lau *et al.* 2010). O resultado obtido com UT3 foi semelhante ao resultado obtido com arsênico, mostrando que as toxinas ativam a resposta ARE tanto na presença de Keap1 selvagem quanto na presença de Keap1 mutado. Estes resultados apontam para uma ativação não canônica, embora não excluam a possibilidade de que outros resíduos de cisteína possam atuar como um sensor redox.

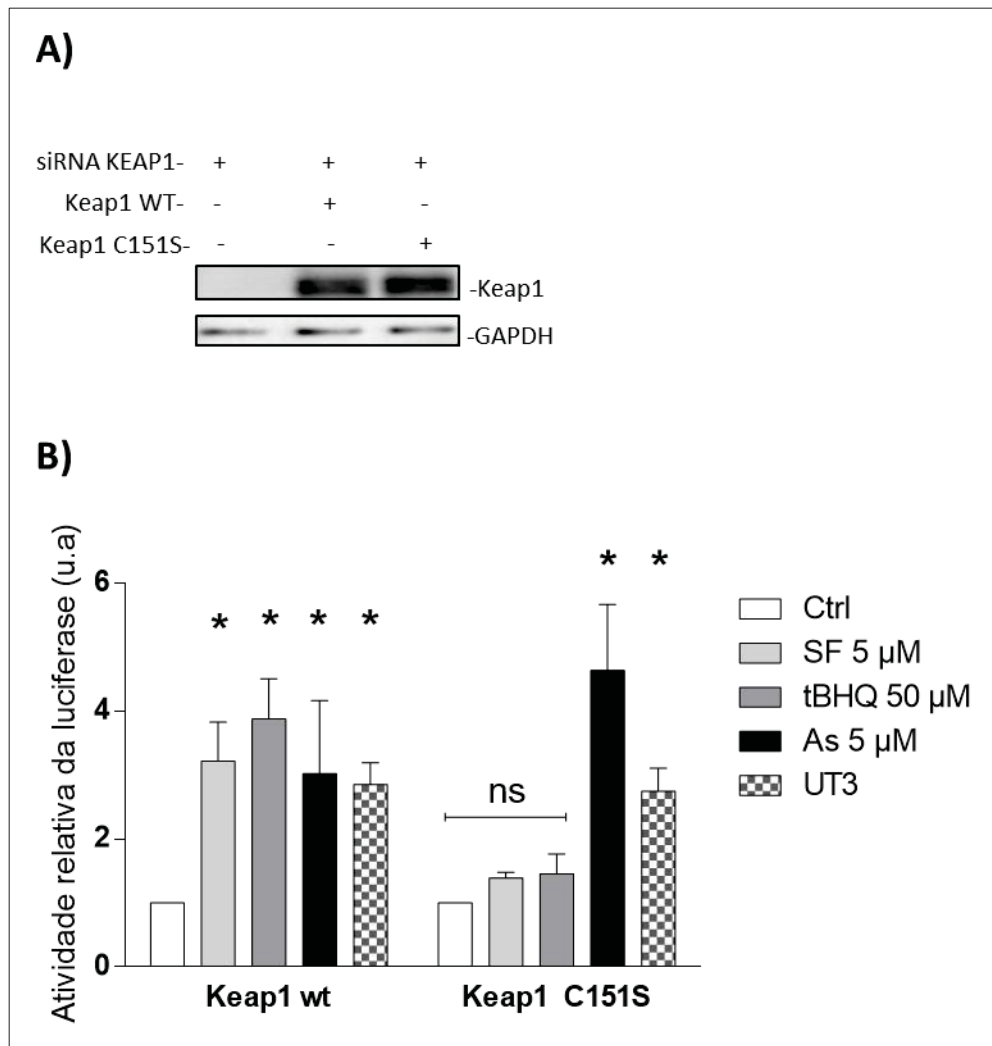


Figura 15. Toxinas urêmicas são indutor Nrf2 Keap1 C151S de maneira independente.

Nota: A) Western blotting representativo do nocaute de Keap1. B) Células HEK-293T foram transfectadas com siRNA Keap1. Após 24 h, co-transfectadas com vetores de expressão para o tipo selvagem Keap1 (KEAP1-WT)

ou Keap1 em que a cisteína 151 foi mutada em serina (KEAP1-C151S). Após 24 h, as células foram tratadas por 16 h com 5  $\mu$ M SF, 50  $\mu$ M tBHQ, 5  $\mu$ M As e UT3. Os dados são média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com Two-way ANOVA com teste post hoc de Sidak's multiple comparisons test. \* P <0.05

Fonte: A autora, 2019.

Esse resultado de certa forma, confirma os dados que havíamos obtido com a avaliação dos marcadores da via de Nrf2, onde as toxinas ativaram a resposta antioxidante, tanto em níveis totais quanto de genes alvos. E, principalmente, que existe uma interação entre a via de autofagia como reguladora da ativação de Nrf2 (nesse contexto urêmico).

No entanto, ainda não sabíamos se uma exposição longa das células às toxinas poderia causar uma inativação ou diminuição da atividade antioxidante de Nrf2 ou se as células conseguiriam manter o perfil de ativação contínuo.

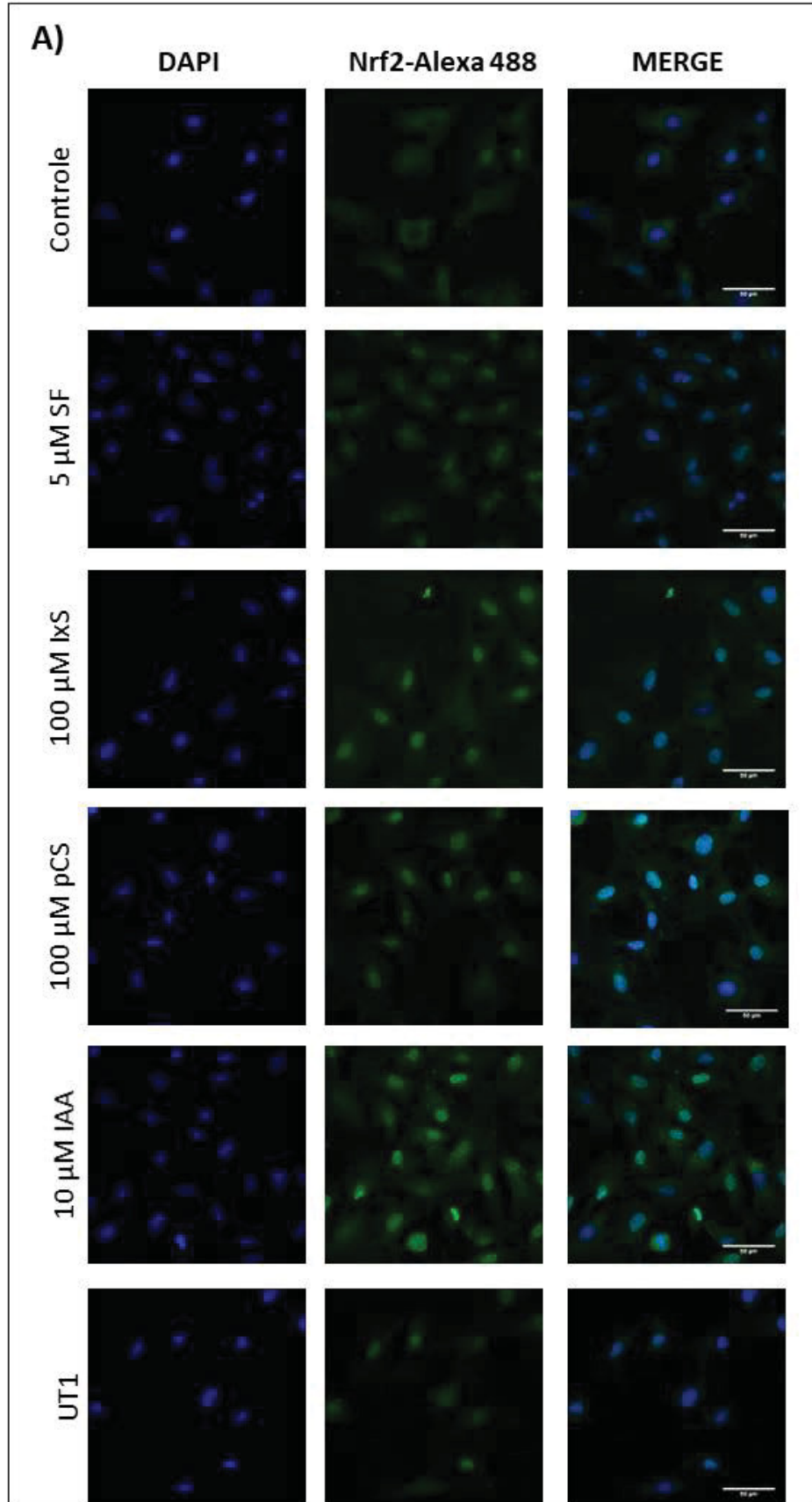
Para essa avaliação, fizemos um ensaio de translocação nuclear de Nrf2. Uma vez que, nossos ensaios demonstraram aumento nos níveis totais de Nrf2, mas não diferenciaram se os níveis aumentaram no citosol ou na porção nuclear.

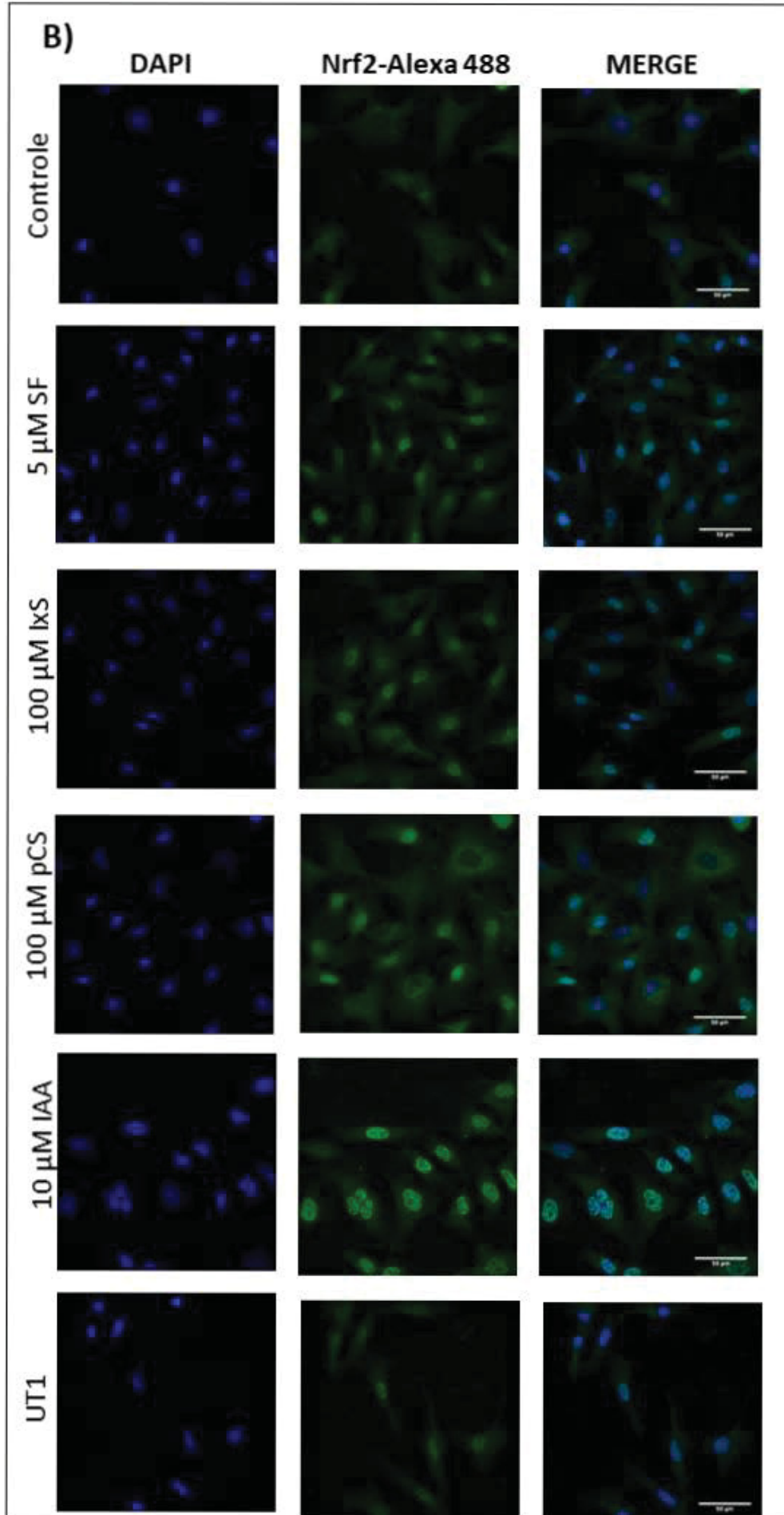
#### 4.7 Translocação nuclear de Nrf2 em células endoteliais tratadas com toxinas urêmicas

Em situação basal, a imunomarcação de Nrf2 mostra que esta proteína é encontrada predominantemente no citosol celular. A incubação de células com 5  $\mu$ M SF por 4 h induziu a translocação de Nrf2 do citosol para o núcleo celular (Figura 16A), como esperado. De forma similar, o tratamento com as toxinas urêmicas isoladas ou combinadas por este tempo levou a translocação nuclear de Nrf2, consistente com os dados de ativação observados na figura 14.

Após 24 horas, podemos observar que pCS começa a desativar a translocação nuclear, e a imunomarcação aparece de forma um pouco mais intensa no citosol (Figura 13B), ao compararmos esse mesmo tratamento em 4 horas (Figura 13A). Contudo, células incubadas com IxS, IAA e UT1, assim como com SF, mantêm a ativação em 24 horas (Figura 13B). Essa ativação pode estar relacionada com o sequestro de Keap1 por p62 dentro dos autofagossomos ou ainda à uma resposta adaptativa da célula ao estresse oxidativo causado por essas toxinas isoladas ou combinadas.

Porém é interessante notar que em 48 horas de tratamento há uma redução drástica na ativação de Nrf2 nos tratamentos com os compostos urêmicos (Figura 13C). Esse dado sugere que após um período de exposição longo às toxinas urêmicas, a célula diminui sua atividade antioxidante e, Nrf2 volta a sua forma inativa no citoplasma.





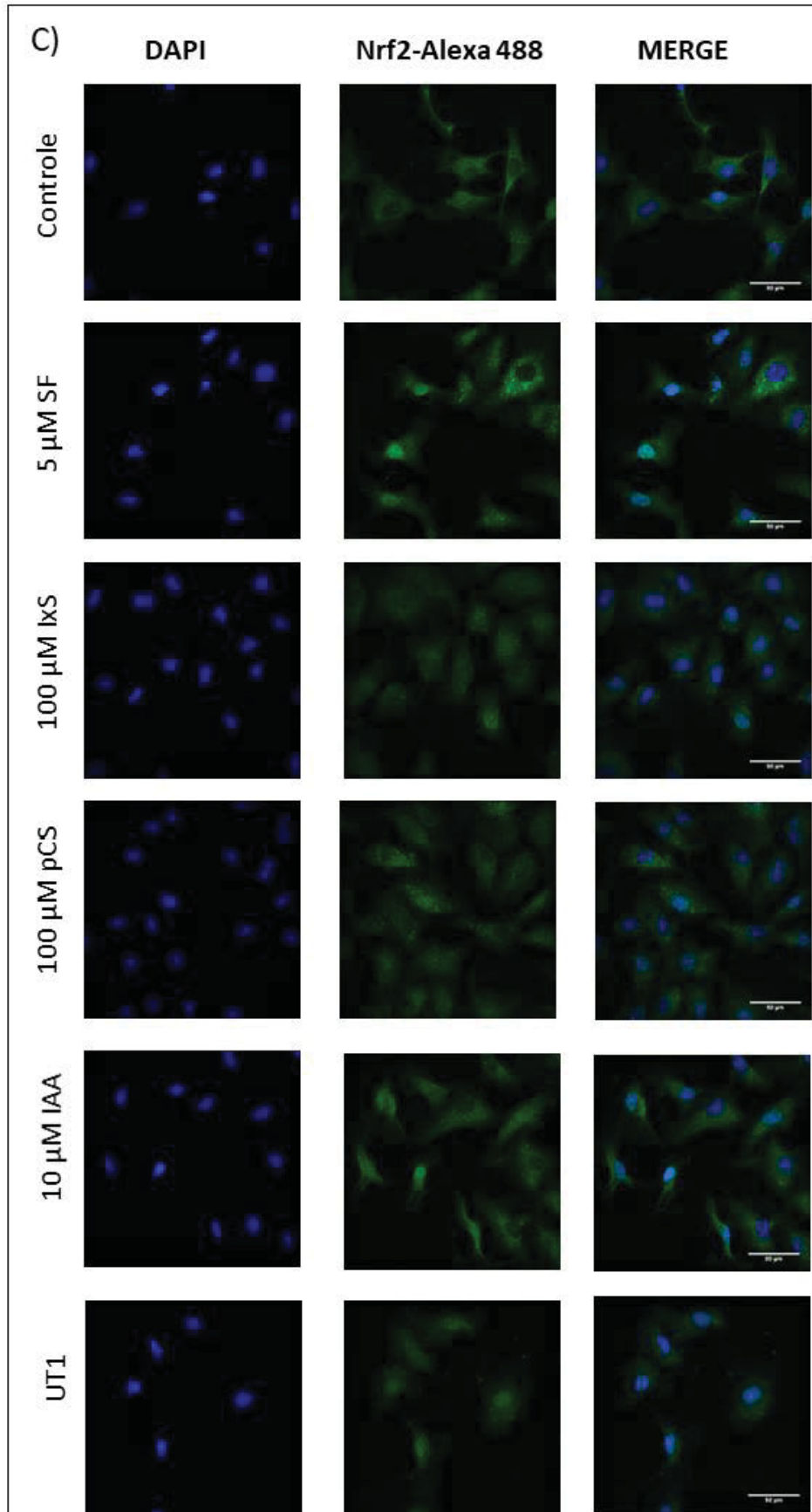


Figura 16. Translocação nuclear de Nrf2 em células endoteliais.

Nota: Imunofluorescência de células EA.hy926, utilizando anti-Nrf2 (1:50) como anticorpo primário e anti-Alexafluor 488 (1:1000) como anticorpo secundário. 5  $\mu$ M de sulforafano (SF) foi utilizado como controle positivo de ativação nuclear de Nrf2. As células foram incubadas com toxinas urêmicas isoladas 100  $\mu$ M de IxS, 100  $\mu$ M

de pCS, 10  $\mu$ M de IAA, ou com a mistura UT1 em 10% SFB, ou com DMEM contendo 10% de SFB para o controle não tratado. A) Células EA.hy926 tratadas por 4 horas B) Células EA.hy926 tratadas por 24 horas e C) Células EA.hy926 tratadas por 48 horas. As imagens foram capturadas com um microscópio de fluorescência confocal Nikon A1 objetiva 60x NA 1,4  $\lambda$ s com óleo de imersão e software de elementos NIS. Barra de escala indica 50  $\mu$ m.

Fonte: A autora, 2019.

Considerando que expondo as células endoteliais às toxinas urêmicas por tempos mais longos observamos a diminuição da atividade da via Keap1-Nrf2 e que isso não causou a morte celular de maneira significativa (Figura 8), nos questionamos se a inativação da atividade de Nrf2 pelas toxinas urêmicas poderia acarretar na perda da viabilidade celular.

Para isso, linhagens de MEF Nrf2 nocaute (Nrf2<sup>-/-</sup>) e MEF Nrf2 selvagem (Nrf2<sup>+/+</sup>) foram utilizadas para demonstrar a importância funcional da ativação da via Keap1-Nrf2 na toxicidade induzida por compostos urêmicos. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT 48 h após o tratamento com UTs. Nossos dados indicaram que o nocaute de Nrf2 leva a perda da viabilidade celular, de maneira dependente da concentração (Figura 17). Portanto, podemos dizer que as toxinas urêmicas ao causarem a diminuição da atividade funcional de Nrf2 em exposições crônicas comprometem a atividade de proteção celular ao estresse oxidativo induzido pelas próprias toxinas.

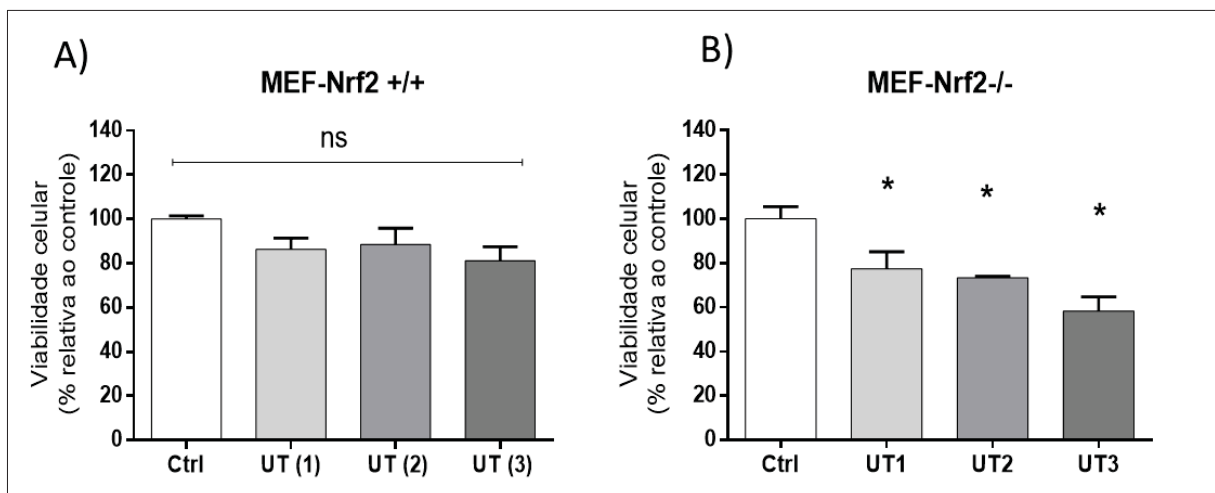


Figura 17. Ausência de Nrf2 aumenta a toxicidade das toxinas urêmicas.

Nota: MEFs Nrf2 selvagem (Nrf2<sup>-/-</sup>) e MEF nocaute (Nrf2<sup>+/+</sup>) foram cultivadas e tratadas com concentrações crescentes de toxinas urêmicas combinadas (UT1, UT2, UT3) durante 48 horas e depois tratados com MTT por 1 h. A viabilidade celular foi determinada medindo a absorbância a 570 nm. Os dados foram analisados por one-way ANOVA e significância estatística determinada pelo método de Holm-Sidak e expressa como  $\pm$  SEM de 3 experimentos independentes ( $P < 0.001$ ).

Fonte: A autora, 2019.

## 5 Discussão

No presente trabalho nós analisamos o efeito da toxicidade urêmica na perturbação de duas vias celulares importantes para a homeostase celular sistêmica.

As toxinas utilizadas nesse estudo são encontradas em abundância em pacientes que estão em hemodiálise e sabe-se que essas toxinas desempenham um papel importante na biogênese de danos vasculares cardíacos e renais em pacientes que estão em estágios mais avançados da doença renal crônica, sendo que complicações cardiovasculares são as principais causas de morte em pacientes urêmicos (Barreto *et al.*, 2009; Liabeuf *et al.*, 2010; Dou *et al.*, 2014; Vanholder, 2018).

Contudo, sabe-se que o soro urêmico contém além das toxinas ligadas a proteínas utilizadas nesse trabalho (IxS, pCS e IAA), uma variedade de outros compostos urêmicos, que também poderiam desempenhar um papel importante no desenvolvimento de DCV (Vanholder *et al.* 2012; Vanholder 2018).

Assim, para avaliar os efeitos dessas toxinas urêmicas ligadas à proteína, foram realizados estudos com toxinas urêmicas isoladas (Laetitia Dou *et al.* 2007, 2014; Muteliefu, Enomoto, e Niwa 2009; Lekawanvijit *et al.* 2012; Shimizu *et al.* 2012; Six *et al.* 2015; Azevedo *et al.* 2016; Lin *et al.* 2016; Pieniazek *et al.* 2018) e eles confirmaram que essas toxinas estimulam fenótipos pró-inflamatório, pró-oxidativos e pró-fibróticos (Vanholder, 2018). Além disso, mais recentemente, efeitos adicionais sobre a disfunção mitocondrial (Sun *et al.* 2017; Huang *et al.* 2018) foram descritos.

Dado que a aterosclerose tem sido associada à autofagia defeituosa nas células vasculares (Grootaert *et al.* 2018), nos perguntamos se as toxinas urêmicas poderiam desregular a autofagia. Portanto, no presente estudo, demonstramos através da análise de cromatografia líquida de alto desempenho que IxS, pCS e IAA são incorporados por células HeLa de maneira dependente de concentração, e que essas toxinas urêmicas isoladas ou combinadas inibem o fluxo autofágico celular em HeLa e nas células endoteliais. As faixas de concentração das toxinas usadas aqui compreendem as concentrações normais a altamente urêmicas observadas em nosso laboratório anteriormente e por outros pesquisadores (Vanholder *et al.* 2014; Dolenga, 2015).

A concentração de UT1, a mistura usada na maioria dos experimentos, representa as concentrações encontradas nos estágios 4-5 da DRC (Boelaert *et al.* 2013). Assim, nossos dados demonstraram que as concentrações biologicamente relevantes de IxS, pCS e IAA são capazes de prejudicar a autofagia. Um achado interessante relatado aqui é que a incubação de células NIH-3T3, e menos proeminente das células endoteliais, com 10% de soro humano não urêmico

exibiu ativação de autofagia após 4 horas, quando comparado com células incubadas com SFB a 10% em meio de cultura de rotina. Este resultado pode ser devido à presença de outros compostos no soro não urêmico que podem regular a autofagia. No contexto da DRC, a autofagia demonstrou ser ativada em resposta à acidose metabólica (Namba *et al.* 2014), hiperfosfatemia (Liu *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2018), AGEs (Xie *et al.* 2011) e LDL carbamilado (Bose *et al.* 2016).

Recentemente, Sun e colaboradores demonstraram que o IxS e o pCS ativam a autofagia em células tubulares após 24 horas de tratamento, o resultado desse grupo sugere que IxS e pCS induzem alterações dinâmicas mitocôndrias, causando estresse metabólico principalmente pela diminuição do número de mitocôndrias causados pela indução da autofagia (mitofagia) (Sun *et al.* 2017).

A alteração funcional da autofagia está presente em células tubulares expostas a acumulação de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs), esses produtos de oxidação possuem participação direta na progressão da DRC, foi demonstrado que AOPPs inibem a autofagia, pois inibem a taxa de conversão de LC3-I a LC3-II promovem o acúmulo de autofagossomos totais e de p62 (Jun Zhang *et al.* 2018), ou altas concentrações de albumina (Nolin *et al.*, 2016) e em leucócitos de pacientes em hemodiálise (Chen *et al.* 2013b). Curiosamente, o fato do bloqueio da autofagia não poder ser revertido pela hemodiálise (Chen *et al.* 2013a) é consistente pelo fato dessas toxinas urêmicas estarem ligadas a proteínas.

No entanto, para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo mostrando que as toxinas urêmicas ou soro urêmico inibem o fluxo autofágico nas células endoteliais. Além disso, nossos resultados mostraram que o bloqueio da autofagia leva ao aumento dos níveis de proteínas oxidadas e ao aumento da sensibilidade ao peróxido de hidrogênio nas células endoteliais. Outros pesquisadores já demonstraram que a inibição da autofagia compromete a degradação de proteínas e organelas oxidadas levando à sua acumulação (Xiong *et al.* 2006; Domagala *et al.* 2018), esse defeito na reciclagem celular torna as células mais sensíveis ao estresse oxidativo (He *et al.* 2017). De fato, a autofagia funcional é requerida pelas células endoteliais para prevenir danos induzidos por diversos estressores, como oxLDL (Nowicki *et al.* 2007) e AGEs (Xie *et al.* 2011).

Consistente com nossos dados, o “shear stress” induzido pelo fluxo laminar ativa a autofagia nas células endoteliais, tornando-as mais resistentes à morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio (Liu *et al.* 2015), e um artigo recente mostrou que a autofagia defeituosa previne o alinhamento das células endoteliais com direção do fluxo e promove a inflamação das células endoteliais, apoptose e senescência (Vion *et al.* 2017). Vale notar que as toxinas

urêmicas têm sido descritas para promover a senescência vascular (Adelibieke *et al.* 2012), levantando a possibilidade de que o comprometimento da autofagia também possa ter um papel no envelhecimento vascular acelerado observado em pacientes com DRC.

Nossos dados sugeriram que a toxicidade urêmica poderia estar causando a perda do controle da homeostase celular e da sinalização redox. Zhang e outros, demonstraram uma forte conexão entre as vias de autofagia e Keap1-Nrf2, ocorrendo por meio da interação de p62 com Keap1 - inibidor de Nrf2 – levando assim a uma ativação não canônica (Lu *et al.* 2016; Gjyshi *et al.* 2015; Copple *et al.* 2010; Kageyama *et al.* 2014a; Ichimura *et al.* 2013; Komatsu *et al.* 2010; Lau *et al.* 2013; Hayashi *et al.* 2015; Jiang, Harder, Vega, *et al.* 2015; Dodson *et al.* 2015; Stepkowski e Kruszewski 2011; Kageyama *et al.* 2014b).

Vale destacar que nossos dados também demonstraram que no contexto urêmico ocorre a ativação da via de Nrf2 de maneira não canônica. Em períodos curtos de incubação das células HeLa com as toxinas urêmicas isoladas ou combinadas foi possível observar a regulação positiva de Nrf2 e dos seus genes alvos. Porém ao analisarmos a translocação nuclear de Nrf2 em células endoteliais que estiveram expostas a períodos mais longos as toxinas urêmicas (48 horas), nossos dados indicaram inativação da via Nrf2 endoteliais, o que a longo prazo poderia resultar em perda da viabilidade celular. O grupo de Vaziri mostrou que ratos nefrectomizados em 5/6 apresentam uma inativação de NRF2, associada a uma expressão aumentada da proteína Keap1, nos tecidos de rim (Kim e Vaziri, 2010) e aorta (Aminzadeh *et al.*, 2013). Também foi observada uma regulação negativa de algumas proteínas alvo NRF2, tais como: catalase, superóxido dismutase, GPX, HO-1, NQO1 e glutamato-cisteína ligase (Aminzadeh *et al.* 2013). Além disso, os níveis de mRNA de NRF2 parecem estar diminuídos em leucócitos de HD (Pedruzzi *et al.* 2012).

A atividade de Nrf2 é benéfica durante situações patológicas, exceto em condições neoplásicas. No contexto do câncer, estudos indicam que a ativação de Nrf2 confere resistência de células cancerosas a radioterapia (Singh *et al.* 2010; Marampon *et al.* 2019), estimula a proliferação celular e resistência a drogas quimioterápicas (Homma *et al.* 2009; Wang *et al.* 2016) e nesse sentido há uma grande pesquisa envolvendo a busca por inibidores da ativação de Nrf2.

De fato, nossos dados mostram que Nrf2 funcional é importante para garantir a viabilidade celular após o estímulo urêmico. Em células MEFs Nrf2 nocaute a exposição das células as toxinas urêmicas por 48 horas demonstrou uma perda significativa na viabilidade celular de maneira concentração dependente. Nosso grupo demonstrou anteriormente, que células vasculares expostas ao soro urêmico por 24 horas apresentaram diminuição progressiva

na razão glutatona reduzida/glutaciona oxidada (tGSH/GSSG) (Rodrigues *et al.* 2015). Essa razão é usada como medida para estimar o status redox intracelular e Nrf2 também é responsável pela regulação da via antioxidante (GSH), sua inativação afeta diretamente a síntese “*de novo*” (Harvey *et al.* 2009; Tebay *et al.* 2015a).

Embora nossos dados sugiram que a via de autofagia é particularmente importante na proteção celular contra a proteotoxicidade induzida pelo acúmulo de proteínas carboniladas ou pelo aumento da sensibilidade celular a estímulos oxidativos, e que a exposição das células endoteliais a toxicidade urêmica a longo prazo diminui a ativação de Nrf2 o mecanismo pelo qual essas toxinas desregulam o metabolismo ou sinalização redox ainda precisa ser elucidado.

Em um cenário mais geral, podemos propor que o acúmulo de toxinas urêmicas no sangue de pacientes com DRC é absorvido pelas células endoteliais. Dentro da célula, eles inibem os estágios finais da maquinaria autofágica logo após 4h. Se as toxinas urêmicas persistirem em tais concentrações, a autofagia defeituosa promoverá o acúmulo de proteínas e organelas danificadas, levando a uma célula disfuncional, que tende a ser mais sensível ao estresse oxidativo, uma condição exacerbada pela uremia (Aveles *et al.* 2010; Rodrigues *et al.* 2012; Rodrigues *et al.* 2015). O estresse oxidativo tem se mostrado um dos maiores agravantes da progressão da DRC. Portanto, é possível imaginar que a exposição endotelial crônica as toxinas urêmicas causa além de uma perturbação na via autofágica um desequilíbrio no estado redox global do doente renal. Importantes sistemas antioxidantes são regulados através da atividade de Nrf2. Portanto, a inabilidade da defesa celular em responder a estímulos oxidativos causada pela sua inativação possivelmente contribui para amplificação dos danos vasculares causados pela toxicidade urêmica. Dado que a uremia está associada à disfunção vascular (Brunet *et al.* 2011), nossos achados indicam que as toxinas urêmicas podem contribuir para o aumento do risco de DCV pela inibição de duas vias citoprotetoras essenciais.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, nós relatamos que as toxinas urêmicas isoladas ou combinadas comprometem a atividade autofágica ao bloquearem a finalização do processo de degradação interrompendo o fluxo autofágico.

Como consequência dessa perturbação, as células tratadas com as toxinas urêmicas apresentaram um perfil de oxidação de proteínas elevado, quando comparados ao controle.

Também foi possível avaliar a redução da viabilidade celular frente a estímulos oxidantes. Interessantemente, ao induzirmos a atividade da autofagia com rapamicina, observamos uma diminuição nos efeitos deletérios causados pelo bloqueio do fluxo autofágico.

Outro dado importante obtido nesse estudo foi de que as toxinas aumentam a expressão de Nrf2 possivelmente pela interação de Keap1 com p62. Além disso em exposições de células endoteliais com as toxinas por períodos mais longos levou a inativação da via Keap1-Nrf2.

No geral, esses resultados indicam que as toxinas urêmicas podem contribuir para a disfunção das células endoteliais por prejudicar a autofagia e inibir a ativação da via de Keap1-Nrf2.

## REFERÊNCIAS

- Adelibieke, Yelixiati, Hidehisa Shimizu, Gulinuer Muteliefu, Dilinaer Bolati, and Toshimitsu Niwa. 2012. "Indoxyl Sulfate Induces Endothelial Cell Species Production and P53 Activity." *Journal of Renal Nutrition* 22 (1): 86–89.  
<https://doi.org/10.1053/j.jrn.2011.10.027>.
- Ahmed, Mohamed Siyabeldin E., Majed Abed, Jakob Voelkl, and Florian Lang. 2013. "Triggering of Suicidal Erythrocyte Death by Uremic Toxin Indoxyl Sulfate." *BMC Nephrology* 14 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-244>.
- Alamdari, Daryoush Hamidi, Elena Kostidou, Konstantinos Paletas, Maria Sarigianni, Anastasios G.P. Konstas, Alexia Karapiperidou, and George Koliakos. 2005. "High Sensitivity Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Method for Measuring Protein Carbonyl in Samples with Low Amounts of Protein." *Free Radical Biology and Medicine* 39 (10): 1362–67. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.023>.
- Aminzadeh, Mohammad A., Susanne B. Nicholas, Keith C. Norris, and Nosratola D. Vaziri. 2013. "Role of Impaired Nrf2 Activation in the Pathogenesis of Oxidative Stress and Inflammation in Chronic Tubulo-Interstitial Nephropathy." *Nephrology Dialysis Transplantation* 28 (8): 2038–45. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft022>.
- Aminzadeh, Mohammad a., Scott a. Reisman, Nosratola D. Vaziri, Stan Shelkovnikov, Seyed H. Farzaneh, Mahyar Khazaeli, and Colin J. Meyer. 2013. "The Synthetic Triterpenoid RTA Dh404 (CDDO-DhTFEA) Restores Endothelial Function Impaired by Reduced Nrf2 Activity in Chronic Kidney Disease." *Redox Biology* 1 (1): 527–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.10.007>.
- Ando, Minoru, Mats Gåfvæls, Jonas Bergström, Bengt Lindholm, and Inger Lundkvist. 1997. "Uremic Serum Enhances Scavenger Receptor Expression and Activity in the Human Monocytic Cell Line U937." *Kidney International* 51 (3): 785–92.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1997.110>.
- Assis, Renata P, Juliana Fa Castro, Vânia O Gutierrez, Carlos a Arcaro, Renata S Brotto, Olga Mmf Oliveira, Amanda M Baviera, and Iguatemy L Brunetti. 2015. "Effects of Uremic Solutes on Reactive Oxygen Species in Vitro Model Systems as a Possibility of Support the Renal Function Management." *BMC Nephrology* 16 (1): 50.  
<https://doi.org/10.1186/s12882-015-0029-1>.
- Avels, Paulo R., Ciro R. Crimin??cio, Simone Gon??alves, Alexandre T. Bignelli, Ligia Maria Claro, S??rgio S. Siqueira, Lia S. Nakao, and Roberto Pecoits-Filho. 2010. "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* 116 (4).
- Azevedo, M L V, N B Bonan, G Dias, F Brehm, T M Steiner, W M Souza, A E M Stinghen, F C Barreto, and Selene Elifio-esposito. 2016. “P-Cresyl Sulfate Affects the Oxidative Burst, Phagocytosis Process, and Antigen Presentation of Monocyte-Derived Macrophages.” *Toxicology Letters*. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.10.006>.
- Bahmed, Karim, Elise M Messier, Wenbo Zhou, Rubin M Tuder, and Curt R Freed. 2016. *DJ-1 Modulates Nrf2-Mediated Protection in Human Primary Alveolar Type II Cells in Smokers*.
- Bai, Yang, Xiaolu Wang, Song Zhao, Chunye Ma, Jiuwei Cui, and Yang Zheng. 2015. “Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/407580>.
- Barreto, Felype Carvalho, Andréa Emilia Marques Stinghen, Rodrigo Bueno De Oliveira, Ana Tereza Barufi Franco, Andréa Novais Moreno, Daniela Veit Barreto, Roberto Pecoits-Filho, Tilman B. Drüeke, and Ziad a. Massy. 2014. “The Quest for a Better Understanding of Chronic Kidney Disease Complications: An Update on Uremic Toxins.” *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 36 (2): 221–35. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20140033>.
- Bastos, Marcus Gomes, Rachel Bregman, and Gianna Mastroianni Kirsztajn. 2010. “Doença Renal Crônica: Frequente e Grave, Mas Também Prevenível e Tratável.” *Revista Da Associação Médica Brasileira* 56 (2): 248–53. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000200028>.
- Boelaert, Jente, Frédéric Lynen, Griet Glorieux, Sunny Eloot, Maria Van Landschoot, Marie Anne Waterloos, Pat Sandra, and Raymond Vanholder. 2013. “A Novel UPLC-MS-MS Method for Simultaneous Determination of Seven Uremic Retention Toxins with Cardiovascular Relevance in Chronic Kidney Disease Patients.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405: 1937–47. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6636-9>.
- Bolati, Dilinaer, Hidehisa Shimizu, Maimaiti Yisireyili, Fuyuhiko Nishijima, and Toshimitsu Niwa. 2013. “Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Downregulates Renal Expression of Nrf2 through Activation of NF-KB.” *BMC Nephrology* 14 (1): 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-56>.
- Bonan, Natalia Borges, Thiago M Steiner, Viktoriya Kuntsevich, Grazia Maria Virzì, Marina Azevedo, Lia Sumie Nakao, Felype Carvalho Barreto, *et al.* 2016. “Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel

- Pathway to Renal Anemia.” *Blood Purification* 41 (4): 317–23.  
<https://doi.org/10.1159/000443784>.
- Bose, Chhanda, Sudhir V Shah, Oleg K Karaduta, and Gur P Kaushal. 2016. “Carbamylated Low-Density Lipoprotein (CLDL)-Mediated Induction of Autophagy and Its Role in Endothelial Cell Injury.” *PLoS ONE* 11 (12): 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165576>.
- Brady, H R, and G G Singer. 1995. “Acute Renal Failure.” *Lancet* 346 (8989): 1533–40.  
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1287872>.
- Bruce, Marino A., Bettina M. Beech, Mario Sims, Tony N. Brown, Sharon B. Wyatt, Herman A. Taylor, David R. Williams, and Errol Crook. 2009. “Social Environmental Stressors, Psychological Factors, and Kidney Disease.” *Journal of Investigative Medicine* 57 (4): 583–89. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31819dbb91>.
- Bruchfeld, Annette, Juan J Carrero, Abdul R Qureshi, Bengt Lindholm, Peter Barany, Olof Heimbürger, Maowen Hu, Xinchun Lin, Peter Stenvinkel, and Edmund J Miller. 2009. “Elevated Serum Macrophage Migration Inhibitory Factor ( MIF ) Concentrations in Chronic Kidney Disease ( CKD ) Are Associated with Markers of Oxidative Stress and Endothelial Activation” 15 (April): 70–75. <https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00109>.
- Brunet, Philippe, Bertrand Gondouin, Ariane Duval-Sabatier, Laetitia Dou, Claire Cerini, Françoise Dignat-George, Noémie Jourde-Chiche, Angel Argiles, and Stéphane Burtey. 2011. “Does Uremia Cause Vascular Dysfunction?” In *Kidney and Blood Pressure Research*, 34:284–90.
- Buss, Hendrikje, Timothy P. Chan, Karl B. Sluis, Neil M. Domigan, and Christine C. Winterbourn. 1997. “Protein Carbonyl Measurement by a Sensitive ELISA Method.” *Free Radical Biology and Medicine* 23 (3): 361–66. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00104-4).
- Chao, Chia-Ter, and Chih-Kang Chiang. 2015. “Uremic Toxins, Oxidative Stress, and Renal Fibrosis: An Intertwined Complex.” *Journal of Renal Nutrition* 25 (2): 155–59.  
<https://doi.org/10.1053/j.jrn.2014.10.010>.
- Chen, Bo, Yanrong Lu, Younan Chen, and Jingqiu Cheng. 2015. “The Role of Nrf2 in Oxidative Stress-Induced Endothelial Injuries.” *Journal of Endocrinology* 225 (3): R83–99. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0662>.
- Chen, Hua, Gang Cao, Dan Qian Chen, Ming Wang, Nosratola D. Vaziri, Zhi Hao Zhang, Jia Rong Mao, Xu Bai, and Ying Yong Zhao. 2016. “Metabolomics Insights into Activated Redox Signaling and Lipid Metabolism Dysfunction in Chronic Kidney Disease

- Progression.” *Redox Biology* 10 (July): 168–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.014>.
- Chen, Wei Ting, Kuo Chun Hung, Ming Shien Wen, Po Yaur Hsu, Tien Hsing Chen, Horng Dar Wang, Ji Tseng Fang, Shian Sen Shie, and Chao Yung Wang. 2013a. “Impaired Leukocytes Autophagy in Chronic Kidney Disease Patients.” *CardioRenal Medicine* 3 (4): 254–64. <https://doi.org/10.1159/000356212>.
- . 2013b. “Impaired Leukocytes Autophagy in Chronic Kidney Disease Patients.” *CardioRenal Medicine* 3 (4): 254–64. <https://doi.org/10.1159/000356212>.
- Chen, Weimin, Zheng Sun, Xiao-Jun Wang, Tao Jiang, Zheping Huang, Deyu Fang, and Donna. Zhang. 2009. “Direct Interaction between Nrf2 and P21 Upregulates Nrf-2-Mediated Antioxidant Response.” *Molecular Cell* 34 (6): 663–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.029>.Direct.
- Chiang, Chih Kang, Tetsuhiro Tanaka, Reiko Inagi, Toshiro Fujita, and Masaomi Nangaku. 2011. “Indoxyl Sulfate, a Representative Uremic Toxin, Suppresses Erythropoietin Production in a HIF-Dependent Manner.” *Laboratory Investigation* 91 (11): 1564–71.  
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.114>.
- Choi, Bo Hyun, Kyung Shin Kang, and Mi Kyoung Kwak. 2014. “Effect of Redox Modulating NRF2 Activators on Chronic Kidney Disease.” *Molecules* 19 (8): 12727–59.  
<https://doi.org/10.3390/molecules190812727>.
- Cohen, Barry A., Ziva Amsellem, Rudy Maor, Amir Sharon, and Jonathan Gressel. 2002. “Transgenically Enhanced Expression of Indole-3-Acetic Acid Confers Hypervirulence to Plant Pathogens.” *Phytopathology* 92 (6): 590–96.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.6.590>.
- Copple, Ian M., Adam Lister, Akua D. Obeng, Neil R. Kitteringham, Rosalind E. Jenkins, Robert Layfield, Brian J. Foster, Christopher E. Goldring, and B. Kevin Park. 2010. “Physical and Functional Interaction of Sequestosome 1 with Keap1 Regulates the Keap1-Nrf2 Cell Defense Pathway.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (22): 16782–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096545>.
- Cuervo, Ana Maria. 2004. “Autophagy: In Sickness and in Health.” *Trends in Cell Biology* 14 (2): 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.12.002>.
- Cuervo, Ana Maria, and Esther Wong. 2014. “Chaperone-Mediated Autophagy: Roles in Disease and Aging.” *Cell Research* 24 (1): 92–104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>.
- Dai, Lu, Edyta Golembiewska, Bengt Lindholm, and Peter Stenvinkel. 2017. “End-Stage Renal Disease, Inflammation and Cardiovascular Outcomes.” *Contributions to*

- Nephrology* 191: 32–43. <https://doi.org/10.1159/000479254>.
- Devine, Eric, Detlef H. Krieter, Marieke R??th, Joachim Jankovski, and Horst Dieter Lemke. 2014. “Binding Affinity and Capacity for the Uremic Toxin Indoxyl Sulfate.” *Toxins* 6 (2): 416–30. <https://doi.org/10.3390/toxins6020416>.
- Dias, G.F., N.B. Bonan, T.M. Steiner, S.S. Tozoni, S. Rodrigues, L.S. Nakao, V. Kuntsevich, R.P. Filho, P. Kotanko, and A.N. Moreno-Amaral. 2018. “Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways.” *Toxins* 10 (7). <https://doi.org/10.3390/toxins10070280>.
- Dias, Gabriela Ferreira, Natalia Borges Bonan, Thiago Maass Steiner, Sara Soares Tozoni, Silvia Rodrigues, Lia Sumie Nakao, Viktoriya Kuntsevich, Roberto Pecoits Filho, Peter Kotanko, and Andréa N Moreno-Amaral. 2018. “Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways.” *Toxins* 10 (7). <https://doi.org/10.3390/toxins10070280>.
- Dinkova-Kostova, Albena T., and Andrey Y. Abramov. 2015. “The Emerging Role of Nrf2 in Mitochondrial Function.” *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036>.
- Dinkova-Kostova, Albena T., Rumen V. Kostov, and Peter Canning. 2016. “Keap1, the Cysteine-Based Mammalian Intracellular Sensor for Electrophiles and Oxidants.” *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.08.005>.
- Dodson, M., M.R. de la Vega, B. Harder, R. Castro-Portuguez, S.D. Rodrigues, P.K. Wong, E. Chapman, and D.D. Zhang. 2018. “Low-Level Arsenic Causes Proteotoxic Stress and Not Oxidative Stress.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 341. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.014>.
- Dodson, Matthew, Matthew Redmann, Namakkal S Rajasekaran, Victor Darley-Usmar, and Jianhua Zhang. 2015. “KEAP1-NRF2 Signalling and Autophagy in Protection against Oxidative and Reductive Proteotoxicity.” *The Biochemical Journal* 469 (3): 347–55. <https://doi.org/10.1042/BJ20150568>.
- Dodson, Matthew, and Donna D Zhang. 2017. “Non-Canonical Activation of NRF2: New Insights and Its Relevance to Disease.” *Current Pathobiology Reports* 5 (2): 171–76. <https://doi.org/10.1007/s40139-017-0131-0>.
- Domagala, Antoni, Joanna Stachura, Magdalena Gabrysiak, Angelika Muchowicz, Radoslaw Zagozdzon, Jakub Golab, and Malgorzata Firczuk. 2018. “Inhibition of Autophagy

- Sensitizes Cancer Cells to Photofrin-Based Photodynamic Therapy.” *BMC Cancer* 18 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4126-y>.
- Dou, L, P Brunet, F Dignat-George, J Sampol, and Y Berland. 1998. “Effect of Uremia and Hemodialysis on Soluble L-Selectin and Leukocyte Surface CD11b and L-Selectin.” *American Journal of Kidney Diseases* 31 (1): 67–73. <https://doi.org/10.1053/ajkd.1998.v31.pm9428454>.
- Dou, Laetitia, N. Jourde-Chiche, V. Faure, C. Cerini, Y. Berland, F. Dignat-George, and P. Brunet. 2007. “The Uremic Solute Indoxyl Sulfate Induces Oxidative Stress in Endothelial Cells.” *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (6): 1302–8.
- Dou, Laetitia, Marion Sallée, Claire Cerini, Stéphane Poitevin, Bertrand Gondouin, Noemie Jourde-Chiche, Karim Fallague, *et al.* 2014. “The Cardiovascular Effect of the Uremic Solute Indole-3 Acetic Acid.” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 1–12. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121283>.
- Duranton, F., G. Cohen, R. De Smet, M. Rodriguez, J. Jankowski, R. Vanholder, and a. Argiles. 2012. “Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins.” *Journal of the American Society of Nephrology* 23 (7): 1258–70. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011121175>.
- Evenepoel, Pieter, Bjorn K I Meijers, Bert R M Bammens, and Kristin Verbeke. 2009. “Uremic Toxins Originating from Colonic Microbial Metabolism.” *Kidney International. Supplement* 14 (114): S12–19. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.402>.
- Fan, Weiliang, Zaiming Tang, Dandan Chen, Diana Moughon, Xiaojun Ding, She Chen, Muyuan Zhu, and Qing Zhong. 2010. “Keap1 Facilitates P62-Mediated Ubiquitin Aggregate Clearance via Autophagy.” *Autophagy* 6 (5): 614–21. <https://doi.org/10.4161/auto.6.5.12189>.
- Fasoli, Gianluca, Ciro Esposito, Flavia Cornacchia, Andreana De Mauri, Fabrizio Grosjean, Filippo Mangione, Anna Rita Plati, Luigi Villa, and Antonio Dal Canton. 2006. “Uremic Serum Induces Proatherogenic Changes in Human Endothelial Cells.” *Journal of Nephrology*.
- Feng, Yuchen, Ding He, Zhiyuan Yao, and Daniel J Klionsky. 2014. “The Machinery of Macroautophagy.” *Cell Research* 24 (1): 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>.
- Fishman, Sarah Louise, Halis Sonmez, Craig Basman, Varinder Singh, and Leonid Poretsky. 2018. “The Role of Advanced Glycation End-Products in the Development of Coronary Artery Disease in Patients with and without Diabetes Mellitus: A Review.” *Molecular Medicine* 24 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0060-3>.

- Friguet, Bertrand. 2006. "Oxidized Protein Degradation and Repair in Ageing and Oxidative Stress." *FEBS Letters* 580 (12): 2910–16. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.028>.
- Galli, Francesco, Lina Ghibelli, Umberto Buoncristiani, Valeria Bordoni, Vincenzo D'Intini, Serena Benedetti, Franco Canestrari, Claudio Ronco, and Ardesio Floridi. 2003. "Mononuclear Leukocyte Apoptosis in Haemodialysis Patients: The Role of Cell Thiols and Vitamin E." *Nephrology Dialysis Transplantation* 18 (8): 1592–1600.
- Gansevoort, Ron T., Ricardo Correa-Rotter, Brenda R. Hemmelgarn, Tazeen H. Jafar, Hiddo J. Lambers Heerspink, Johannes F. Mann, Kunihiro Matsushita, and Chi Pang Wen. 2013. "Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Risk: Epidemiology, Mechanisms, and Prevention." *The Lancet* 382 (9889): 339–52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60595-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60595-4).
- Gao, Chunyan, Shuting Ji, Weijun Dong, Yushan Qi, Wen Song, Debin Cui, and Jialan Shi. 2015. "Indolic Uremic Solutes Enhance Procoagulant Activity of Red Blood Cells through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release." *Toxins* 7 (11): 4390–4403. <https://doi.org/10.3390/toxins7114390>.
- Gjyshi, Olsi, Stephanie Flaherty, Mohanan Valiya Veetil, Karen E. Johnson, Bala Chandran, and Virginie Bottero. 2015. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces Nrf2 Activation in Latently Infected Endothelial Cells through SQSTM1 Phosphorylation and Interaction with Polyubiquitinated Keap1." *Journal of Virology* 89 (4): 2268–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.02742-14>.
- Groot, Kirsten De, Ferdinand Hermann Bahlmann, Johanna Sowa, Jana Koenig, Jan Menne, Hermann Haller, and Danilo Fliser. 2004. "Uremia Causes Endothelial Progenitor Cell Deficiency." *Kidney International* 66 (2): 641–46. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00784.x>.
- Grootaert, Mandy O.J., Lynn Roth, Dorien M. Schrijvers, Guido R.Y. De Meyer, and Wim Martinet. 2018. "Defective Autophagy in Atherosclerosis: To Die or to Senesce?" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7687083>.
- Hansen, Tom Egil, and Terje Johansen. 2011. "Following Autophagy Step by Step." *BMC Biology* 9: 39. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-39>.
- Harvey, C. J., R. K. Thimmulappa, A. Singh, D. J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers, and S. Biswal. 2009. "Nrf2-Regulated Glutathione Recycling Independent of Biosynthesis Is Critical for Cell Survival during Oxidative Stress." *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>.
- Hayashi, Ken, Katsuaki Dan, Fumiyuki Goto, Nana Tshuchihashi, Yasuyuki Nomura, Masato

- Fujioka, Sho Kanzaki, and Kaoru Ogawa. 2015. "The Autophagy Pathway Maintained Signaling Crosstalk with the Keap1–Nrf2 System through P62 in Auditory Cells under Oxidative Stress." *Cellular Signalling* 27 (2): 382–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.024>.
- Hayes, John D., and Albena T. Dinkova-Kostova. 2014. "The Nrf2 Regulatory Network Provides an Interface between Redox and Intermediary Metabolism." *Trends in Biochemical Sciences* 39 (4): 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>.
- He, Yuanmin, Shuli Li, Weigang Zhang, Wei Dai, Tingting Cui, Gang Wang, and Tianwen Gao. 2017. "Dysregulated Autophagy Increased Melanocyte Sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Vitiligo." *Nature Publishing Group*, no. February: 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/srep42394>.
- Hershkos, Avram, Hannah Heller, Sarah Elias, Aaron Ciechanover, Avram Hershko, Hannah Heller, Sarah Elias, and Aaron Ciechanover. 1983. "Components of Ubiquitin-Protein Ligase System." *The Journal of Biological Chemistry* 258 (13): 8206–14.  
<https://doi.org/papers2://publication/uuid/C82E58FF-33C7-42BF-BC20-CDD10219EC6E>.
- Himmelfarb, Jonathan. 2009. "Uremic Toxicity, Oxidative Stress, and Hemodialysis as Renal Replacement Therapy." *Seminars in Dialysis* 22 (6): 636–43.  
<https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00659.x>.
- Himmelfarb, Jonathan, Peter Stenvinkel, T. Alp Ikizler, and Raymond M. Hakim. 2002. "Perspectives in Renal Medicine: The Elephant in Uremia: Oxidant Stress as a Unifying Concept of Cardiovascular Disease in Uremia." *Kidney International*.
- Hirata, Junya, Kazuya Hirai, Hirobumi Asai, Chiho Matsumoto, Masaki Inada, Chisato Miyaura, Hideyuki Yamato, and Mie Watanabe-Akanuma. 2015. "Indoxyl Sulfate Exacerbates Low Bone Turnover Induced by Parathyroidectomy in Young Adult Rats." *Bone* 79: 252–58. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.06.010>.
- Homma, Shinsuke, Yukio Ishii, Yuko Morishima, Tadahiro Yamadori, Yosuke Matsuno, Norihiro Haraguchi, Norihiro Kikuchi, *et al.* 2009. "Nrf2 Enhances Cell Proliferation and Resistance to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer." *Clinical Cancer Research* 15 (10): 3423–32. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2822>.
- Huang, Mengjie, Ribao Wei, Yang Wang, Tingyu Su, Ping Li, and Xiangmei Chen. 2018. "The Uremic Toxin Hippurate Promotes Endothelial Dysfunction via the Activation of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission." *Redox Biology* 16 (March): 303–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.010>.

- Huo, Longfei, Chia-Wei Li, Tzu-Hsuan Huang, Yung Carmen Lam, Weiya Xia, Chun Tu, Wei-Chao Chang, *et al.* 2014. “Activation of Keap1/Nrf2 Signaling Pathway by Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Cells.” *Am J Transl Res* 6 (6): 649–63. [www.ajtr.org](http://www.ajtr.org).
- Hutchins, Andrew Paul, Shaq Liu, Diego Diez, and Diego Miranda-Saavedra. 2013. “The Repertoires of Ubiquitinating and Deubiquitinating Enzymes in Eukaryotic Genomes.” *Molecular Biology and Evolution* 30 (5): 1172–87. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst022>.
- Hyun, Hye Sun, Kyung Hoon Paik, and Hee Yeon Cho. 2013. “P-Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate in Pediatric Patients on Chronic Dialysis.” *Korean Journal of Pediatrics* 56 (4): 159–64. <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.4.159>.
- Ichimura, Yoshinobu, Satoshi Waguri, Yu Shin Sou, Shun Kageyama, Jun Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Tetsuya Saito, *et al.* 2013. “Phosphorylation of P62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy.” *Molecular Cell* 51 (5): 618–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>.
- Inami, Yuko, Chieko Hamada, Takuya Seto, Yoko Hotta, Seiki Aruga, Jiro Inuma, Kosuke Azuma, *et al.* 2014. “Effect of AST-120 on Endothelial Dysfunction in Adenine-Induced Uremic Rats.” *International Journal of Nephrology* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/164125>.
- Ito, Shunsuke, Mizuko Osaka, Yusuke Higuchi, Fuyuhiko Nishijima, Hideto Ishii, and Masayuki Yoshida. 2010. “Indoxyl Sulfate Induces Leukocyte-Endothelial Interactions through up-Regulation of E-Selectin.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (50): 38869–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166686>.
- Ito, Shunsuke, and Masayuki Yoshida. 2014. “Protein-Bound Uremic Toxins: New Culprits of Cardiovascular Events in Chronic Kidney Disease Patients.” *Toxins* 6 (2): 665–78. <https://doi.org/10.3390/toxins6020665>.
- Itoh, Ken, Nobunao Wakabayashi, Yasutake Katoh, Tetsuro Ishii, Kazuhiko Igarashi, James Douglas Engel, and Masayuki Yamamoto. 1999. “Keap1 Represses Nuclear Activation of Antioxidant Responsive Elements by Nrf2 through Binding to the Amino-Terminal Neh2 Domain.” *Genes and Development* 13 (1): 76–86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>.
- Jain, Ashish, Trond Lamark, Eva Sjøttem, Kenneth Bowitz Larsen, Jane Atesoh Awuh, Aud Øvervatn, Michael McMahon, John D. Hayes, and Terje Johansen. 2010. “P62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop

- by Inducing Antioxidant Response Element-Driven Gene Transcription.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (29): 22576–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>.
- Jaramillo, Melba C, and Donna D Zhang. 2013. “The Emerging Role of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway in Cancer.” *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.225680.113>.
- Jiang, Peidu, and Noboru Mizushima. 2013. “Autophagy and Human Diseases.” *Nature Publishing Group* 24 (1): 69–79. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.161>.
- . 2014. “LC3- and P62-Based Biochemical Methods for the Analysis of Autophagy Progression in Mammalian Cells.” *Methods*, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.021>.
- Jiang, Tao, Bryan Harder, Montserrat Rojo de la Vega, Pak K Wong, Eli Chapman, and Donna D Zhang. 2015. “P62 Links Autophagy and Nrf2 Signaling.” *Free Radical Biology & Medicine* 88: 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014>.
- Jiang, Tao, Bryan Harder, Montserrat Rojo De La Vega, Pak K. Wong, Eli Chapman, and Donna D. Zhang. 2015. “P62 Links Autophagy and Nrf2 Signaling.” *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014>.
- Jiang, Tao, Zheping Huang, Yifeng Lin, and Z Zhang. 2010. “The Protective Role of Nrf2 in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy.” *Diabetes* 59 (April): 850–60. <https://doi.org/10.2337/db09-1342>.
- Kageyama, Shun, Yu-Shin Sou, Takefumi Uemura, Satoshi Kametaka, Tetsuya Saito, Ryosuke Ishimura, Tsuguka Kouno, *et al.* 2014a. “Proteasome Dysfunction Activates Autophagy and the Keap1-Nrf2 Pathway.” *The Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580357>.
- . 2014b. “Proteasome Dysfunction Activates Autophagy and the Keap1-Nrf2 Pathway.” *The Journal of Biological Chemistry* 289 (36): 24944–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580357>.
- Kansanen, Emilia, Suvi M. Kuosmanen, Hanna Leinonen, and Anna Liisa Levonenn. 2013. “The Keap1-Nrf2 Pathway: Mechanisms of Activation and Dysregulation in Cancer.” *Redox Biology* 1 (1): 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>.
- Kensler, Thomas W, Nobunao Wakabayashi, and Shyam Biswal. 2007. “Cell Survival Responses to Environmental Stresses via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>.
- Kim, Hyun Ju, and Nosratola D Vaziri. 2010. “Contribution of Impaired Nrf2-Keap1 Pathway

- to Oxidative Stress and Inflammation in Chronic Renal Failure.” *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 298 (3): F662–71.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00421.2009>.
- Kimura, Shunsuke, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori. 2007. “Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3.” *Autophagy* 3 (5): 452–60. <https://doi.org/4451> [pii].
- Kobayashi, Akira, Moon-il Kang, Hiromi Okawa, Yukari Zenke, Tomoki Chiba, Kazuhiko Igarashi, and Makiko Ohtsuji. 2004. “Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2.” *Molecular and Cellular Biology* 24 (16): 7130–39. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7130>.
- Komatsu, Masaaki, Hirofumi Kurokawa, Satoshi Waguri, Keiko Taguchi, Akira Kobayashi, Yu-shin Sou, Izumi Ueno, *et al.* 2010. “The Selective Autophagy Substrate P62 Activates the Stress Responsive Transcription Factor Nrf2 through Inactivation of Keap1.” *Nature Publishing Group* 12 (3): 213–23. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>.
- Lau, Alexandria, Xiao-Jun Wang, Fei Zhao, Nicole F Villeneuve, Tongde Wu, Tao Jiang, Zheng Sun, Eileen White, and Donna D Zhang. 2010. “A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and P62.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (13): 3275–85. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10>.
- Lau, Alexandria, Yi Zheng, Shasha Tao, Huihui Wang, Samantha a Whitman, Eileen White, and Donna D Zhang. 2013. “Arsenic Inhibits Autophagic Flux, Activating the Nrf2-Keap1 Pathway in a P62-Dependent Manner.” *Molecular and Cellular Biology* 33 (12): 2436–46. <https://doi.org/10.1128/MCB.01748-12>.
- Leal, Viviane O., Juliana F. Saldanha, Milena B. Stockler-Pinto, Ludmila F.M.F. Cardozo, Felipe R. Santos, Alex S.D. Albuquerque, Maurilo Leite, and Denise Mafra. 2015. “NRF2 and NF-KB MRNA Expression in Chronic Kidney Disease: A Focus on Nondialysis Patients.” *International Urology and Nephrology* 47 (12): 1985–91. <https://doi.org/10.1007/s11255-015-1135-5>.
- Leestemaker, Yves, and Huib Ova. 2017. “Tools to Investigate the Ubiquitin Proteasome System.” *Drug Discovery Today: Technologies* 26: 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.11.006>.
- Lekawanvijit, Suree, Andrew R. Kompa, Bing H. Wang, Darren J. Kelly, and Henry Krum.

2012. “Cardiorenal Syndrome: The Emerging Role of Protein-Bound Uremic Toxins.” *Circulation Research* 111 (11): 1470–83.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.278457>.
- Li, Jinqing, Cheng Zhang, Yifan Xing, Joseph S. Janicki, Masayuki Yamamoto, Xing Li Wang, Dong Qi Tang, and Taixing Cui. 2011. “Up-Regulation of P27kip1 Contributes to Nrf2-Mediated Protection against Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy.” *Cardiovascular Research* 90 (2): 315–24. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr010>.
- Li, Yun, Joseph D. Paonessa, and Yuesheng Zhang. 2012. “Mechanism of Chemical Activation of Nrf2.” *PloS One* 7 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035122>.
- Liabeuf, Sophie, Lucie Desjardins, Ziad A. Massy, François Brazier, Pierre François Westeel, Hakim Mazouz, Dimitri Titeca-Beauport, *et al.* 2016. “Levels of Indoxyl Sulfate in Kidney Transplant Patients, and the Relationship With Hard Outcomes.” *Circulation Journal*. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0949>.
- Liabeuf, Sophie, Tilman B. Drüeke, and Ziad a. Massy. 2011. “Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies.” *Toxins* 3 (7): 911–19.  
<https://doi.org/10.3390/toxins3070911>.
- Lin, Cheng-Jui, Vincent Wu, Pei-Chen Wu, and Chih-Jen Wu. 2015. “Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure.” *Plos One* 10 (7): e0132589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132589>.
- Lin, Cheng Jui, Chih Jen Wu, Chi Feng Pan, Yi Chou Chen, Fang Ju Sun, and Han Hsiang Chen. 2010. “Serum Protein-Bound Uraemic Toxins and Clinical Outcomes in Haemodialysis Patients.” *Nephrology Dialysis Transplantation* 25 (11): 3693–3700.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfq251>.
- Lin, Cheng Jui, Chih Jen Wu, Pei Chen Wu, Chi Feng Pan, Tuan Jen Wang, Fang Ju Sun, Hsuan Liang Liu, Han Hsiang Chen, and Hung I. Yeh. 2016. “Indoxyl Sulfate Impairs Endothelial Progenitor Cells and Might Contribute to Vascular Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease.” *Kidney and Blood Pressure Research* 41 (6): 1025–36.  
<https://doi.org/10.1159/000452604>.
- Lin, Xiaolong, Shuang Li, Yue Zhao, Xiaofeng Ma, Kai Zhang, Xinglan He, and Zuo Wang. 2013. “Interaction Domains of P62: A Bridge Between P62 and Selective Autophagy.” *DNA and Cell Biology* 32 (5): 220–27. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1915>.
- Lisowska-Myjak, Barbara. 2014. “Uremic Toxins and Their Effects on Multiple Organ Systems.” *Nephron - Clinical Practice* 128: 303–11. <https://doi.org/10.1159/000369817>.

- Liu, J., X Bi, T Chen, Q. Zhang, S. X. Wang, J. J. Chiu, G. S. Liu, Y Zhang, P Bu, and F Jiang. 2015. "Shear Stress Regulates Endothelial Cell Autophagy via Redox Regulation and Sirt1 Expression." *Cell Death and Disease* 6 (7).  
<https://doi.org/10.1038/cddis.2015.193>.
- Liu, Wei Jing, Mian-na Luo, Jin Tan, Wei Chen, Lei-zhao Huang, Chen Yang, Qingjun Pan, Benyi Li, and Hua-feng Liu. 2014. "Autophagy Activation Reduces Renal Tubular Injury Induced by Urinary Proteins," no. February: 243–56.
- Liu, Wen Chih, Yasuhiko Tomino, and Kuo Cheng Lu. 2018. "Impacts of Indoxyl Sulfate and P-Cresol Sulfate on Chronic Kidney Disease and Mitigating Effects of AST-120." *Toxins* 10 (9): 1–22. <https://doi.org/10.3390/toxins10090367>.
- Liu, Y., J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz, and H. Luesch. 2007. "A Genomic Screen for Activators of the Antioxidant Response Element." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (12): 5205–10.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0700898104>.
- Liu, Yao Lung, Kuan Ho Lin, Shanmugam Tamilselvi, Wei Kung Chen, Chia Yao Shen, Ray Jade Chen, Cecilia Hsuan Day, Hsi Chin Wu, Vijaya Padma Viswanadha, and Chih Yang Huang. 2017. "Elevated Phosphate Levels Trigger Autophagy-Mediated Cellular Apoptosis in H9c2 Cardiomyoblasts." *CardioRenal Medicine* 8 (1): 31–40.  
<https://doi.org/10.1159/000479010>.
- Locatelli, Francesco, Bernard Canaud, Kai-Uwe Eckardt, Peter Stenvinkel, Christoph Wanner, and Carmine Zoccali. 2003. "Oxidative Stress in End-Stage Renal Disease: An Emerging Threat to Patient Outcome." *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18 (7): 1272–80. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg074>.
- Long, Jed, Thomas P. Garner, Maya J. Pandya, C. Jeremy Craven, Ping Chen, Barry Shaw, Michael P. Williamson, Robert Layfield, and Mark S. Searle. 2010. "Dimerisation of the UBA Domain of P62 Inhibits Ubiquitin Binding and Regulates NF-KB Signalling." *Journal of Molecular Biology* 396 (1): 178–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.032>.
- Lu, Meng-Chen, Zhen-Wei Yuan, Yong-Lin Jiang, Zhi-Yun Chen, Qi-Dong You, and Zheng-Yu Jiang. 2016. "A Systematic Molecular Dynamics Approach to the Study of Peptide Keap1–Nrf2 Protein–Protein Interaction Inhibitors and Its Application to P62 Peptides." *Mol. BioSyst.* 12 (4): 1378–87. <https://doi.org/10.1039/C6MB00030D>.
- Maciel, Rayana A.P., Regiane S. Cunha, Valentina Busato, Célia R.C. Franco, Paulo C.

- Gregório, Carla J.R. Dolenga, Lia S. Nakao, *et al.* 2018. “Uremia Impacts Ve-Cadherin and Zo-1 Expression in Human Endothelial Cell-to-Cell Junctions.” *Toxins* 10 (10): 1–22. <https://doi.org/10.3390/toxins10100404>.
- Maggi, E, R Bellazzi, F Falaschi, A Frattoni, G Perani, G Finardi, A Gazo, M Nai, D Romanini, and G Bellomo. 1994. “Enhanced LDL Oxidation in Uremic Patients: An Additional Mechanism for Accelerated Atherosclerosis?” *Kidney International* 45 (3): 876–83. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.115>.
- Malyszko, Jolanta. 2010. “Clinica Chimica Acta Mechanism of Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease.” *Clinica Chimica Acta* 411 (19–20): 1412–20. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.019>.
- Marampon, Francesco, Silvia Codenotti, Francesca Megiorni, Andrea Del, Fattore Simona, Giovanni Luca, Gravina Claudio, Festuccia Daniela, Musio Francesca, and De Felice Valerio. 2019. “NRF2 Orchestrates the Redox Regulation Induced by Radiation Therapy , Sustaining Embryonal and Alveolar Rhabdomyosarcoma Cells Radioresistance.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02851-0>.
- McKnight, Nicole C., and Zhenyu Yue. 2013. “Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease.” *Current Pathobiology Reports* 1 (4): 231–38. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0028-5>.
- Meléndez, Alicia, and Beth Levine. 2009. “Autophagy in *C. Elegans*.” *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–26. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.147.1>.
- Mijaljica, Dalibor, Mark Prescott, and Rodney J. Devenish. 2011. “Microautophagy in Mammalian Cells: Revisiting a 40-Year-Old Conundrum.” *Autophagy* 7 (7): 673–82. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>.
- Mizushima, Noboru. 2007. “Autophagy: Process and Function.” *Genes & Development* 21 (22): 2861–73. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>.
- Mizushima, Noboru, and Masaaki Komatsu. 2011. “Autophagy: Renovation of Cells and Tissues.” *Cell* 147 (4): 728–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>.
- Mizushima, Noboru, and Tamotsu Yoshimori. 2007. “How to Interpret LC3 Immunoblotting ND RIB ND ES SC RIB.” *Autophagy* 3 (December): 4–7. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>.
- Mizushima, Noboru, Tamotsu Yoshimori, and Beth Levine. 2010. “Methods in Mammalian Autophagy Research.” *Cell* 140 (3): 313–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>.
- Moe, Sharon M., Danxia Duan, Brian P. Doehle, Kalisha D. O’Neill, and Neal X. Chen. 2003.

- “Uremia Induces the Osteoblast Differentiation Factor Cbfa1 in Human Blood Vessels.” *Kidney International* 63 (3): 1003–11. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00820.x>.
- Motohashi, Hozumi, and Masayuki Yamamoto. 2004. “Nrf2-Keap1 Defines a Physiologically Important Stress Response Mechanism.” *Trends in Molecular Medicine* 10 (11): 549–57. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>.
- Motojima, Masaru, Atsuko Hosokawa, Hideyuki Yamato, Takamura Muraki, and Toshimasa Yoshioka. 2003. “Uremic Toxins of Organic Anions Up-Regulate PAI-1 Expression by Induction of NF-KB and Free Radical in Proximal Tubular Cells.” *Kidney International* 63 (5): 1671–80. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00906.x>.
- Muteliefu, Gulinuer, Atsushi Enomoto, and Toshimitsu Niwa. 2009. “Indoxyl Sulfate Promotes Proliferation of Human Aortic Smooth Muscle Cells by Inducing Oxidative Stress.” *Journal of Renal Nutrition : The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 19 (1): 29–32. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2008.10.014>.
- Mutsaers, H A M, M J G Wilmer, D Reijnders, J Jansen, P H H Van Den Broek, M Forkink, E Schepers, *et al.* 2013. “Biochimica et Biophysica Acta Uremic Toxins Inhibit Renal Metabolic Capacity through Interference with Glucuronidation and Mitochondrial Respiration.” *BBA - Molecular Basis of Disease* 1832 (1): 142–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.09.006>.
- Mutsaers, Henricus A. M., Elisabeth G. D. Stribos, Griet Glorieux, Raymond Vanholder, and Peter Olinga. 2015. “Chronic Kidney Disease and Fibrosis: The Role of Uremic Retention Solutes.” *Frontiers in Medicine* 2 (August): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00060>.
- Muxfeldt, Elizabeth S, Claudia R L Cardoso, Vinicius B Dias, Ana C M Nascimento, and Gil F Salles. 2010. “Prognostic Impact of the Ambulatory Arterial Stiffness Index in Resistant Hypertension.” *Journal of Hypertension* 28 (7): 1547–53. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328339f9e5>.
- Nadeem, Ahmed, Nahid Siddiqui, Naif O. Al-Harbi, Mohammed M. Al-Harbi, and Sheikh F. Ahmad. 2016. “TLR-7 Agonist Attenuates Airway Reactivity and Inflammation through Nrf2-Mediated Antioxidant Protection in a Murine Model of Allergic Asthma.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 73: 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.004>.
- Nakatogawa, Hitoshi, Kuninori Suzuki, Yoshiaki Kamada, and Yoshinori Ohsumi. 2009.

- “Dynamics and Diversity in Autophagy Mechanisms: Lessons from Yeast.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (7): 458–67. <https://doi.org/10.1038/nrm2708>.
- Namba, T., Y. Takabatake, T. Kimura, A. Takahashi, T. Yamamoto, J. Matsuda, H. Kitamura, *et al.* 2014. “Autophagic Clearance of Mitochondria in the Kidney Copes with Metabolic Acidosis.” *Journal of the American Society of Nephrology*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090986>.
- Namba, Tomoko, Yoshitsugu Takabatake, T. Kimura, A. Takahashi, T. Yamamoto, J. Matsuda, H. Kitamura, *et al.* 2014. “Autophagic Clearance of Mitochondria in the Kidney Copes with Metabolic Acidosis.” *Journal of the American Society of Nephrology* 25 (10): 2254–66. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090986>.
- National Kidney Foundation. 2002. *K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. *American Journal of Kidney Diseases*. Vol. 39. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-S2-45>.
- Nezu, Masahiro, Tomokazu Souma, Lei Yu, Takafumi Suzuki, Daisuke Saigusa, Sadayoshi Ito, Norio Suzuki, and Masayuki Yamamoto. 2017. “Transcription Factor Nrf2 Hyperactivation in Early-Phase Renal Ischemia-Reperfusion Injury Prevents Tubular Damage Progression.” *Kidney International* 91 (2): 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.023>.
- Niwa, Toshimitsu, and Hidehisa Shimizu. 2012. “Indoxyl Sulfate Induces Nephrovascular Senescence.” *Journal of Renal Nutrition : The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 22 (1): 102–6. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2011.10.032>.
- Nolin, Angela C, Ryan M Mulhern, Maria V Panchenko, Anna Pisarek-Horowitz, Zhiyong Wang, Orian Shirihai, Steven C. Borkan, and Andrea Havasi. 2016. “Proteinuria Causes Dysfunctional Autophagy in the Proximal Tubule.” *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 311 (6): F1271–79. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00125.2016>.
- Nowicki, Marcin, Olga Zabirnyk, Nicole Duerschmidt, Jürgen Borlak, and Katharina Spanel-Borowski. 2007. “No Upregulation of Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 in Serum-Deprived EA.Hy926 Endothelial Cells under OxLDL Exposure, but Increase in Autophagy.” *European Journal of Cell Biology* 86 (10): 605–16. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2007.06.006>.
- Pajares, Marta, Natalia Jiménez-Moreno, Irundika H.K. Dias, Bilge Debelec, Milica Vucetic, Kari E. Fladmark, Huveyda Basaga, Samo Ribaric, Irina Milisav, and Antonio Cuadrado. 2015. “Redox Control of Protein Degradation.” *Redox Biology* 6: 409–20.

- <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.003>.
- Pedruzzi, Liliana Magnago, Milena Barcza Stockler-Pinto, Maurilo Leite, and Denise Mafra. 2012. “Nrf2-Keap1 System versus NF- $\kappa$ B: The Good and the Evil in Chronic Kidney Disease?” *Biochimie* 94 (12): 2461–66. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.015>.
- Periyasamy, Sankaridrug M., Jie Chen, Derek Cooney, Patricia Carter, Eiad Omran, Jiang Tian, Snigdha Priyadarshi, *et al.* 2001. “Effects of Uremic Serum on Isolated Cardiac Myocyte Calcium Cycling and Contractile Function.” *Kidney International* 60 (6): 2367–76. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00053.x>.
- Pieniazek, Anna, Lukasz Gwozdziński, Paweł Hikisz, and Krzysztof Gwozdziński. 2018. “Indoxyl Sulfate Generates Free Radicals, Decreases Antioxidant Defense, and Leads to Damage to Mononuclear Blood Cells.” *Chemical Research in Toxicology* 31 (9): 869–75. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00065>.
- Pretorius, Carel J, Brett C McWhinney, Bilyana Sipinkoski, Lambro A Johnson, Megan Rossi, Katrina L Campbell, and Jacobus P J Ungerer. 2013. “Reference Ranges and Biological Variation of Free and Total Serum Indoxyl- and p-Cresyl Sulphate Measured with a Rapid UPLC Fluorescence Detection Method.” *Clinica Chimica Acta* 419 (0): 122–26. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.008>.
- Ravarotto, Verdiana, Francesca Simioni, Elisa Pagnin, Paul A. Davis, and Lorenzo A. Calò. 2018. “Oxidative Stress – Chronic Kidney Disease – Cardiovascular Disease: A Vicious Circle.” *Life Sciences* 210: 125–31. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.067>.
- Reggiori, Fulvio, and Daniel J. Klionsky. 2013. “Autophagic Processes in Yeast: Mechanism, Machinery and Regulation.” *Genetics* 194 (2): 341–61. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149013>.
- Reyes-Turcu, Francisca E., Karen H. Ventii, and Keith D. Wilkinson. 2009. “Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes.” *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 363–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526>.
- Ribeiro, Rita De Cássia Helú Mendonça, Graziella Allana Serra Alves De Oliveira, Daniele Fávoro Ribeiro, Daniela Comelis Bertolin, Claudia Bernardi Cesarino, Lidimara Copoono Erdosi Quintino De Lima, and Sandra Mara De Oliveira. 2008. “Caracterização e Etiologia Da Insuficiência Renal Crônica Em Unidade de Nefrologia Do Interior Do Estado de São Paulo.” *ACTA Paulista de Enfermagem* 21 (SPEC.ISS.): 207–11. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002008000500013>.
- Rodrigues, S.D., K.C. França, F.T. Dallin, C.K. Fujihara, A.J. Nascimento, R. Pecoits-Filho,

- and L.S. Nakao. 2015. “N-Acetylcysteine as a Potential Strategy to Attenuate the Oxidative Stress Induced by Uremic Serum in the Vascular System.” *Life Sciences* 121. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.024>.
- Rodrigues, Silvia D., Karime C. França, Fernando T. Dallin, Clarice K. Fujihara, Aguinaldo J. Nascimento, Roberto Pecoits-Filho, and Lia S. Nakao. 2015. “N-Acetylcysteine as a Potential Strategy to Attenuate the Oxidative Stress Induced by Uremic Serum in the Vascular System.” *Life Sciences* 121: 110–16. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.024>.
- Rodrigues, Silvia D, Giuseppe B Batista, Max Ingberman, Roberto Pecoits-Filho, and Lia S Nakao. 2012. “Plasma Cysteine/Cystine Reduction Potential Correlates with Plasma Creatinine Levels in Chronic Kidney Disease.” *Blood Purification* 34 (3–4): 231–37. <https://doi.org/10.1159/000342627>.
- Rojo de la Vega, Montserrat, Matthew Dodson, Eli Chapman, and Donna D. Zhang. 2016. “NRF2-Targeted Therapeutics: New Targets and Modes of NRF2 Regulation.” *Current Opinion in Toxicology* 1: 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.005>.
- Rutkowski, Przemysław, Sylwia Malgorzewicz, Ewa Slominska, Marcin Renke, Wiesława Lysiak-Szydłowska, Julian Swierczynski, and Boleslaw Rutkowski. 2006. “Interrelationship between Uremic Toxicity and Oxidative Stress.” *Journal of Renal Nutrition : The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 16 (3): 190–93. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2006.04.008>.
- Sagripanti, A, M Morganti, A Carpi, A Cupisti, A Nicolini, M. Barsotti, M Camici, C Mittermayer, and G Barsotti. 1998. “Uremic Medium Increases Cytokine-Induced PAI-1 Secretion by Cultured Endothelial Cells.” In *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 52:298–302. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(98\)80024-3](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(98)80024-3).
- Saito, Hideyuki. 2013. “Toxico-Pharmacological Perspective of the Nrf2-Keap1 Defense System against Oxidative Stress in Kidney Diseases.” *Biochemical Pharmacology* 85 (7): 865–72. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.01.006>.
- Satoh, Masami, Hideo Hayashi, Maki Watanabe, Kyoko Ueda, Hideyuki Yamato, Toshimasa Yoshioka, and Masaru Motojima. 2003. “Uremic Toxins Overload Accelerates Renal Damage in a Rat Model of Chronic Renal Failure.” *Nephron. Experimental Nephrology* 95 (3): e111-8. <https://doi.org/10.1159/000074327>.
- Scholze, Alexandra, Joachim Jankowski, José Pedraza-Chaverri, and Pieter Evenepoel. 2016. “Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (3): 8375186. <https://doi.org/10.1155/2016/8375186>.
- Serradell, Mireia, Maribel Díaz-Ricart, Aleix Cases, M Jesús Zurbano, Jos López-Pedret,

- Oscar Arranz, Antonio Ordinas, and Ginés Escolar. 2002. "Uremic Medium Causes Expression, Redistribution and Shedding of Adhesion Molecules in Cultured Endothelial Cells." *Haematologica* 87 (10): 1053–61.
- Shenhe, J. I.N., W. E.I. Juying, Y. O.U. Liangshun, L. I.U. Hui, and Wenbin Qian. 2018. "Autophagy Regulation and Its Dual Role in Blood Cancers: A Novel Target for Therapeutic Development (Review)." *Oncology Reports* 39 (6): 2473–81. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6370>.
- Shimizu, Hidehisa, Yuichi Hirose, Sumie Goto, Fuyuhiko Nishijima, Houda Zrelli, Nahla Zghonda, Toshimitsu Niwa, and Hitoshi Miyazaki. 2012. "Indoxyl Sulfate Enhances Angiotensin II Signaling through Upregulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells." *Life Sciences* 91 (5–6): 172–77. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.06.033>.
- Silva-Islas, Carlos Alfredo, and Perla D. Maldonado. 2018. "Canonical and Non-Canonical Mechanisms of Nrf2 Activation." *Pharmacological Research* 134 (2): 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.013>.
- Sim, John J, Simran K Bhandari, Jiaxiao Shi, Kristi Reynolds, David a Calhoun, Kamyar Kalantar-Zadeh, and Steven J Jacobsen. 2015. "Comparative Risk of Renal, Cardiovascular, and Mortality Outcomes in Controlled, Uncontrolled Resistant, and Nonresistant Hypertension." *Kidney International*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.142>.
- Singh, Anju, Manish Bodas, Nobunao Wakabayashi, Fred Bunz, and Shyam Biswal. 2010. "Gain of Nrf2 Function in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Confers Radioresistance." *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (11): 1627–37. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3219>.
- Sirich, Tammy L., Timothy W. Meyer, Bertrand Gondouin, Philippe Brunet, and Toshimitsu Niwa. 2014. "Protein-Bound Molecules: A Large Family With a Bad Character." *Seminars in Nephrology* 34 (2): 106–17. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2014.02.004>.
- Six, Isabelle, Priscilla Gross, Mathieu C. Rémond, Jean Marc Chillon, Sabrina Poirot, Tilman B Drueke, and Ziad A Massy. 2015. "Deleterious Vascular Effects of Indoxyl Sulfate and Reversal by Oral Adsorbent AST-120." *Atherosclerosis* 243 (1): 248–56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.019>.
- Slee, Adrian D. 2012. "Exploring Metabolic Dysfunction in Chronic Kidney Disease." *Nutrition and Metabolism* 9: 1–16. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-36>.

- Smet, Rita De, Jacqueline Van Kaer, Bruno Van Vlem, Antoine De Cubber, Philippe Brunet, Norbert Lameire, and Raymond Vanholder. 2003. "Toxicity of Free P-Cresol: A Prospective and Cross-Sectional Analysis." *Clinical Chemistry* 49 (3): 470–78. <https://doi.org/10.1373/49.3.470>.
- Smyth, L. J., S. Duffy, A. P. Maxwell, and A. J. McKnight. 2014. "Genetic and Epigenetic Factors Influencing Chronic Kidney Disease." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 307 (7): F757–76. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00306.2014>.
- Song, Jae-Sook, Eun-Kyung Kim, Yong-Won Choi, Won Keun Oh, and Young-Mi Kim. 2016. "Hepatocyte-Protective Effect of Nectandrin B, a Nutmeg Lignan, against Oxidative Stress: Role of Nrf2 Activation through ERK Phosphorylation and AMPK-Dependent Inhibition of GSK-3 $\beta$ ." *Toxicology and Applied Pharmacology* 307: 138–49. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.003>.
- Stam, F. 2006. "Endothelial Dysfunction Contributes to Renal Function-Associated Cardiovascular Mortality in a Population with Mild Renal Insufficiency: The Hoorn Study." *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (2): 537–45. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005080834>.
- Stepkowski, Tomasz M, and Marcin K Kruszewski. 2011. "Molecular Cross-Talk between the NRF2/KEAP1 Signaling Pathway, Autophagy, and Apoptosis." *Free Radical Biology & Medicine* 50 (9): 1186–95. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.033>.
- Stinghen, A. E M, S. M. Gonçalves, E. G. Martines, L. S. Nakao, M. C. Riella, C. A. Aita, and R. Pecoits-Filho. 2009. "Increased Plasma and Endothelial Cell Expression of Chemokines and Adhesion Molecules in Chronic Kidney Disease." *Nephron - Clinical Practice* 111 (2).
- Stinghen, Andréa E M, Ziad A Massy, Helen Vlassara, Gary E Striker, and Agnès Boullier. 2016. "Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD." *Journal of the American Society of Nephrology* 27 (2): 354–70. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014101047>.
- Stockler-Pinto, Milena B., Christophe O. Soulage, Natália A. Borges, Ludmila F.M.F. Cardozo, Carla J. Dolenga, Lia S. Nakao, Roberto Pecoits-Filho, Denis Fouque, and Denise Mafra. 2018. "From Bench to the Hemodialysis Clinic: Protein-Bound Uremic Toxins Modulate NF-KB/Nrf2 Expression." *International Urology and Nephrology* 50 (2): 347–54. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1748-y>.
- Stockler-Pinto, Milena Barcza, Denis Fouque, Christophe O Soulage, Marine Croze, and

- Denise Mafra. 2014. "Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease. Could These Toxins Modulate the Antioxidant Nrf2-Keap1 Pathway?" *Journal of Renal Nutrition : The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 24 (5): 286–91. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2013.11.006>.
- Sun, Chiao-yin, Mei-ling Cheng, Heng-chih Pan, Jia-Hung Lee, Chin-Chan Lee, Chiao-yin Sun, Mei-ling Cheng, Heng-chih Pan, Jia-Hung Lee, and Chin-Chan Lee. 2017. "Protein-Bound Uremic Toxins Impaired Mitochondrial Dynamics and Functions." *Oncotarget* 8 (44): 77722–33. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20773>.
- Sun, Z., T. Wu, F. Zhao, A. Lau, C. M. Birch, and D. D. Zhang. 2011. "KPNA6 (Importin 7)-Mediated Nuclear Import of Keap1 Represses the Nrf2-Dependent Antioxidant Response." *Molecular and Cellular Biology* 31 (9): 1800–1811. <https://doi.org/10.1128/MCB.05036-11>.
- Tan, K. C.B., W.-S. Chow, V. H.G. Ai, C. Metz, R. Bucala, and K. S.L. Lam. 2002. "Advanced Glycation End Products and Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 25 (6): 1055–59. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.6.1055>.
- Tao, Shasha, Sophia L. Park, Montserrat Rojo De La Vega, Donna D. Zhang, and Georg T. Wondrak. 2015. "Systemic Administration of the Apocarotenoid Bixin Protects Skin against Solar UV-Induced Damage through Activation of NRF2." *Free Radical Biology and Medicine* 89: 690–700. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.028>.
- Tao, Shasha, De Vega, Hector Quijada, Georg T Wondrak, Ting Wang, Joe G N Garcia, and Donna D Zhang. 2016. "Bixin Protects Mice against Ventilation-Induced Lung Injury in an NRF2-Dependent Manner." *Nature Publishing Group*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep18760>.
- Tao, Shasha, Yi Zheng, Alexandria Lau, Melba C. Jaramillo, Binh T. Chau, R. Clark Lantz, Pak K. Wong, Georg T. Wondrak, and Donna D. Zhang. 2013. "Tanshinone I Activates the Nrf2-Dependent Antioxidant Response and Protects Against As(III)-Induced Lung Inflammation *In Vitro* and *In Vivo*." *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (14): 1647–61. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5117>.
- Tebay, Lauren E., Holly Robertson, Stephen T. Durant, Steven R. Vitale, Trevor M. Penning, Albena T. Dinkova-Kostova, and John D. Hayes. 2015a. "Mechanisms of Activation of the Transcription Factor Nrf2 by Redox Stressors, Nutrient Cues, and Energy Status and the Pathways through Which It Attenuates Degenerative Disease." *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021>.
- Tebay, Lauren E, Holly Robertson, Stephen T Durant, Steven R Vitale, Trevor M Penning,

- Albena T Dinkova-Kostova, and John D Hayes. 2015b. “Mechanisms of Activation of the Transcription Factor Nrf2 by Redox Stressors, Nutrient Cues, and Energy Status and the Pathways through Which It Attenuates Degenerative Disease.” *Free Radical Biology & Medicine* 88 (Pt B): 108–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021>.
- Tonelli, Marcello, S. Ananth Karumanchi, and Ravi Thadhani. 2016. “Epidemiology and Mechanisms of Uremia-Related Cardiovascular Disease.” *Circulation* 133 (5): 518–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018713>.
- Tsakiri, Eleni N., and Ioannis P. Trougakos. 2015. *The Amazing Ubiquitin-Proteasome System: Structural Components and Implication Inaging. International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol. 314. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2014.09.002>.
- Tumur, Zohra, and Toshimitsu Niwa. 2009. “Indoxyl Sulfate Inhibits Nitric Oxide Production and Cell Viability by Inducing Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells.” *American Journal of Nephrology* 29 (6): 551–57. <https://doi.org/10.1159/000191468>.
- Vanholder, R, and R De Smet. 1999. “Pathophysiologic Effects of Uremic Retention Solutes.” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 (8): 1815–23.
- Vanholder, Raymond. 2018. “Introduction to the Toxins Special Issue on ‘Novel Issues in Uremic Toxicity.’” *Toxins* 10 (10): 388. <https://doi.org/10.3390/toxins10100388>.
- Vanholder, Raymond, Bert Bammens, Henriette De Loor, Griet Glorieux, Bjorn Meijers, Eva Schepers, Ziad Massy, and Pieter Evenepoel. 2011. “Warning: The Unfortunate End of p-Cresol as a Uraemic Toxin.” *Nephrology Dialysis Transplantation* 26 (5): 1464–67. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr056>.
- Vanholder, Raymond, Steven Laecke, and Griet Glorieux. 2008. “What Is New in Uremic Toxicity?” *Pediatric Nephrology* 23 (8): 1211–21. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0762-9>.
- Vanholder, Raymond, Eva Schepers, Anneleen Pletinck, Evi V Nagler, and Griet Glorieux. 2014. “The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate: A Systematic Review.” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 1–11. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101062>.
- Vanholder, Raymond, Eva Schepers, Anneleen Pletinck, Nathalie Neiryneck, and Griet Glorieux. 2012. “An Update on Protein-Bound Uremic Retention Solutes.” *Journal of Renal Nutrition* 22 (1): 90–94.
- Vanholder, Raymond, Rita De Smet, Griet Glorieux, Angel Argilés, Ulrich Baurmeister, Philippe Brunet, William Clark, *et al.* 2003. “Review on Uremic Toxins: Classification,

- Concentration, and Interindividual Variability.” *Kidney International* 63 (5): 1934–43. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x>.
- Vaziri, Nosratola D. 2004. “Oxidative Stress in Uremia: Nature, Mechanisms, and Potential Consequences.” *Seminars in Nephrology* 24 (5): 469–73. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2004.06.026>.
- Vion, Anne-clemence, Marouane Kheloufi, Adel Hammoutene, Johanne Poisson, Juliette Lasselin, Cecile Devue, Isabelle Pic, *et al.* 2017. “Autophagy Is Required for Endothelial Cell Alignment and Atheroprotection under Physiological Blood Flow.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201702223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702223114>.
- Wang, Yue, Yue Wang, Zhenbo Zhang, J.-Y. Park, Donghui Guo, H. Liao, X. Yi, *et al.* 2016. “Mechanism of Progesterin Resistance in Endometrial Precancer/Cancer through Nrf2-AKR1C1 Pathway.” *Oncotarget* 7 (9). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7004>.
- Watanabe, Hiroshi, Yohei Miyamoto, Yuki Enoki, Yu Ishima, Daisuke Kadowaki, Shunsuke Kotani, Makoto Nakajima, *et al.* 2015. “P-Cresyl Sulfate, a Uremic Toxin, Causes Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cell Damages by Inducing Oxidative Stress.” *Pharmacology Research & Perspectives* 3 (1): n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/prp2.92>.
- Watanabe, Hiroshi, Yohei Miyamoto, Daisuke Honda, Hisae Tanaka, Qiong Wu, Masayuki Endo, Tsuyoshi Noguchi, *et al.* 2013. “P-Cresyl Sulfate Causes Renal Tubular Cell Damage by Inducing Oxidative Stress by Activation of NADPH Oxidase.” *Kidney International* 83 (4): 582–92. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.448>.
- Watanabe, Hiroshi, Tsuyoshi Noguchi, Yohei Miyamoto, Daisuke Kadowaki, Shunsuke Kotani, Makoto Nakajima, Shigeyuki Miyamura, Yu Ishima, Masaki Otagiri, and Toru Maruyama. 2012. “Interaction between Two Sulfate-Conjugated Uremic Toxins, p-Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate, during Binding with Human Serum Albumin.” *Drug Metabolism and Disposition* 40 (7): 1423–28. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.045617>.
- Wible, Daric J., and Shawn B. Bratton. 2018. “Reciprocity in ROS and Autophagic Signaling.” *Current Opinion in Toxicology* 7: 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.006>.
- Wirawan, Ellen, Saskia Lippens, Tom Vanden Berghe, Alessandra Romagnoli, Gian Maria Fimia, Mauro Piacentini, and Peter Vandenabeele. 2012. “Beclin 1: A Role in Membrane Dynamics and Beyond.” *Autophagy* 8 (1): 6–17. <https://doi.org/10.4161/auto.8.1.16645>.
- Wright, Julian, and Alastair Hutchison. 2009. “Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Kidney Disease.” *Vascular Health and Risk Management* 5 (2): 713–22.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756163>.
- Wu, I. Wen, Kuang Hung Hsu, Heng Jung Hsu, Chin Chan Lee, Chiao Yin Sun, Chi Jen Tsai, and Mai Szu Wu. 2012. “Serum Free P-Cresyl Sulfate Levels Predict Cardiovascular and All-Cause Mortality in Elderly Hemodialysis Patients-A Prospective Cohort Study.” *Nephrology Dialysis Transplantation* 27 (3): 1169–75. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr453>.
- Wu, V C, G H Young, P H Huang, S C Lo, K C Wang, C Y Sun, C J Liang, *et al.* 2013. “In Acute Kidney Injury, Indoxyl Sulfate Impairs Human Endothelial Progenitor Cells: Modulation by Statin.” *Angiogenesis* 16 (3): 609–24. <https://doi.org/DOI.10.1007/s10456-013-9339-8>.
- Xie, Ying, Shou Jiang You, Yan Lin Zhang, Qiao Han, Yong Jun Cao, Xing Shun Xu, Ya Ping Yang, Jun Li, and Chun Feng Liu. 2011. “Protective Role of Autophagy in AGE-Induced Early Injury of Human Vascular Endothelial Cells.” *Molecular Medicine Reports* 4 (3): 459–64. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.460>.
- Xiong, Y., A. L. Contento, P. Q. Nguyen, and D. C. Bassham. 2006. “Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in Arabidopsis.” *PLANT PHYSIOLOGY* 143 (1): 291–99. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092106>.
- Yang, Zhifen, and Daniel J Klionsky. 2010. “Eaten Alive: A History of Macroautophagy.” *Nature Cell Biology* 12 (9): 814–22. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>.
- Yi-min, W U, L I Shuo, and L I Chun-yi. 2016. “Influence of Li Loading on the Catalytic Performance of Li / MgO in the Oxidative Dehydrogenation of Propane to Olefins.” *Journal of Fuel Chemistry and Technology* 44 (11): 1334–40. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8477>.
- Yisireyili, Maimaiti, Shinichi Saito, Shaniya Abudureyimu, Yelixiati Adelibieke, Hwee Yeong Ng, Fuyuhiko Nishijima, Kyosuke Takeshita, Toyoaki Murohara, and Toshimitsu Niwa. 2014. “Indoxyl Sulfate-Induced Activation of (pro)Renin Receptor Promotes Cell Proliferation and Tissue Factor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells.” *PLoS ONE* 9 (10): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109268>.
- Yoon, J W, M V Pahl, and N D Vaziri. 2007. “Spontaneous Leukocyte Activation and Oxygen-Free Radical Generation in End-Stage Renal Disease.” *Kidney International* 71 (2): 167–72. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002019>.
- Yu, Li, Yang Chen, and Sharon A. Tooze. 2018. “Autophagy Pathway: Cellular and Molecular Mechanisms.” *Autophagy* 14 (2): 207–15. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>.

- Yu, Mina, Young Ju Kim, and Duk-Hee Kang. 2011. "Indoxyl Sulfate-Induced Endothelial Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease via an Induction of Oxidative Stress." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 6 (1): 30–39. <https://doi.org/10.2215/CJN.05340610>.
- Zhang, Donna D., Shih Ching Lo, Zheng Sun, Geetha M. Habib, Michael W. Lieberman, and Mark Hannink. 2005. "Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch Substrate Adaptor Protein for Cul3, Targets Keap1 for Degradation by a Proteasome-Independent Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 280 (34): 30091–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501279200>.
- Zhang, Donna D, and Mark Hannink. 2003. "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* 23 (22): 8137–51. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003>.
- Zhang, Jianhua. 2013. "Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control." *Redox Biology* 1 (1): 616–30. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.008>.
- Zhang, Jun, Xiaohong Xiang, Shuangshuang Shu, Cuiling Zhang, Yuling Liang, Tingting Jiang, Wenying Zhang, Tingting Guo, Xiuji Liang, and Xun Tang. 2018. "Advanced Oxidation Protein Products Inhibit the Autophagy of Renal Tubular Epithelial Cells." *Experimental and Therapeutic Medicine* 15 (4): 3908–16. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5875>.
- Zhang, Yue Yue, Man Yang, Jin Fang Bao, Li Jie Gu, Hong Lei Yu, and Wei Jie Yuan. 2018. "Phosphate Stimulates Myotube Atrophy through Autophagy Activation: Evidence of Hyperphosphatemia Contributing to Skeletal Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease." *BMC Nephrology* 19 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0836-2>.
- Zheng, Hongting, Samantha A. Whitman, Wei Wu, Georg T. Wondrak, Pak K. Wong, Deyu Fang, and Donna D. Zhang. 2011. "Therapeutic Potential of Nrf2 Activators in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy." *Diabetes* 60 (11): 3055–66. <https://doi.org/10.2337/db11-0807>.
- Zhou, Cuihong, Wu Zhong, Jun Zhou, Fugeng Sheng, Ziyuan Fang, Yue Wei, Yingyu Chen, Xiaoyan Deng, Bin Xia, and Jian Lin. 2012. "Monitoring Autophagic Flux by an Improved Tandem Fluorescent-Tagged LC3 (MTagRFP-MWasabi-LC3) Reveals That High-Dose Rapamycin Impairs Autophagic Flux in Cancer Cells." *Autophagy* 8 (8): 1215–26. <https://doi.org/10.4161/auto.20284>.