

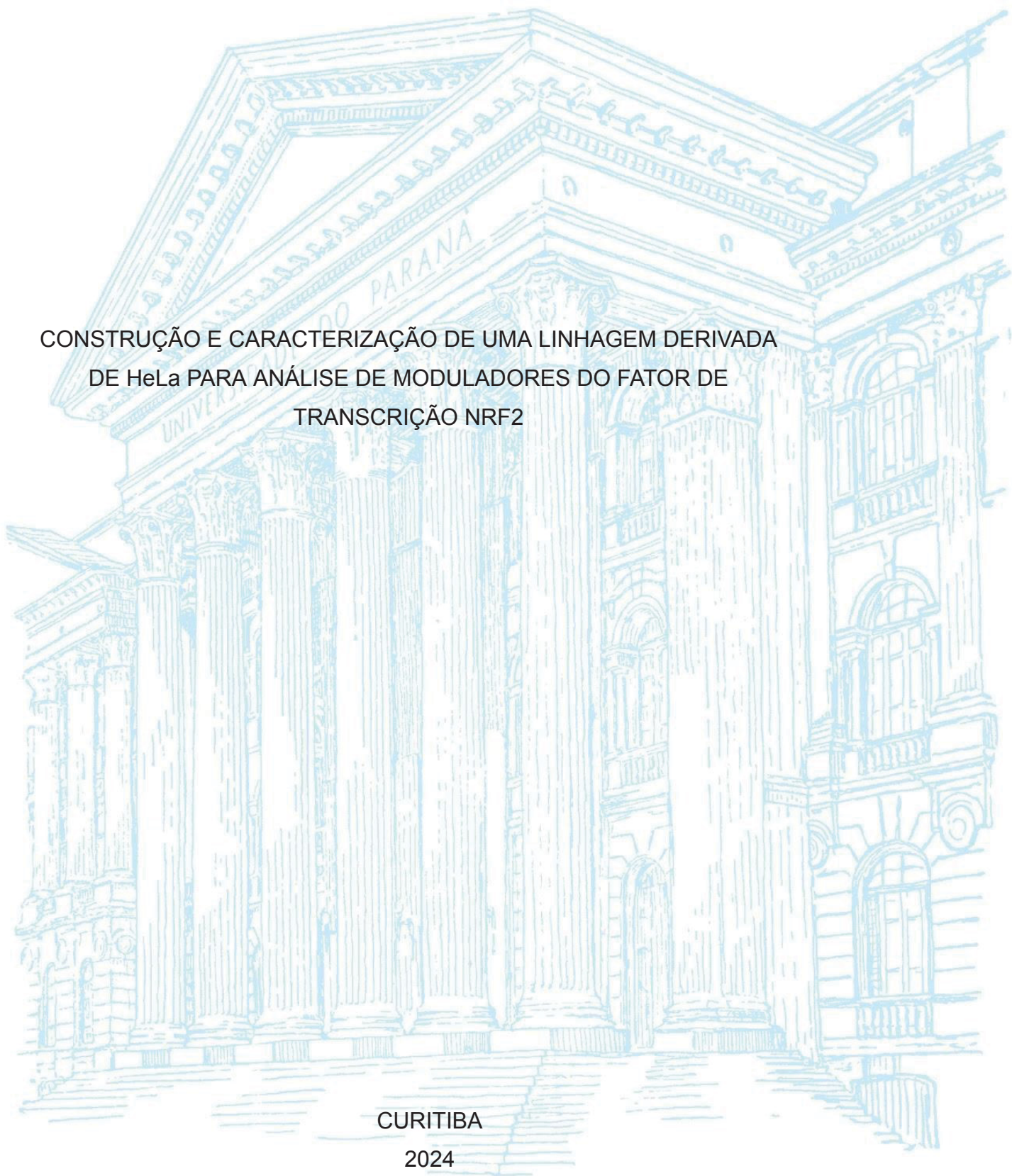
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATÁLIA JAROUIJ SCHMIDT

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LINHAGEM DERIVADA
DE HeLa PARA ANÁLISE DE MODULADORES DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NRF2

CURITIBA

2024



NATÁLIA JAROUI SCHMIDT

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LINHAGEM DERIVADA DE
HeLa PARA ANÁLISE DE MODULADORES DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
NRF2

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Lia Sumie Nakao

Curitiba

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Schmidt, Natália Jarouj

Construção e caracterização de uma linhagem derivada de HeLa para análise de moduladores do fator de transcrição NRF2 / Natália Jaroui Schmidt. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Lia Sumie Nakao.

1. Estresse oxidativo. 2. NRF2. 3. Células HeLa. 4. Luciferasas. I. Nakao, Lia Sumie. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATÁLIA JAROUJ SCHMIDT** intitulada: **Construção e caracterização de uma linhagem derivada de células HeLa para análise de moduladores do fator de transcrição Nrf2.**, sob orientação da Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 09 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

09/12/2024 15:31:27.0

LIA SUMIE NAKAO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

09/12/2024 15:22:22.0

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/12/2024 15:33:53.0

ALESSANDRA BECKER FINCO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 417084

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 417084

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para o meu crescimento, minha educação e a construção do meu caráter. Em especial a meus pais e a meu marido, vocês são a base de tudo e sem vocês, eu não teria alcançado mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Lia Sumie Nakao, por ter confiado e acreditado em mim, quando cheguei até você, com menos de um ano de prazo para finalizar o mestrado e aceitado me orientar neste trabalho maravilhoso, me fazendo aprender e ter experiências na área que eu tanto queria. Obrigada também por ter me ensinado tanto quanto pôde no laboratório e por ter se preocupado e me aconselhado, mesmo quando meus problemas eram pessoais. Obrigada por sempre se dispor a sentar e conversar, me ouvir e auxiliar, seja nas mudanças de planos pelo curto prazo de tempo, seja para trocar experiências como mães de coelhos. Você se tornou uma amiga, antes de qualquer outra coisa. Obrigada.

Agradeço também meus pais Márcia Jarouj Schmidt e Jaime Luiz Schmidt, os quais abdicaram de tanto para se dedicar a minha criação, sem medir esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade e sempre me ajudaram em cada passo, seja me aconselhando, me apoiando ou me dando o empurrão que faltava. Ao meu avô Nestor Schmidt, onde estiver, saiba que todos os momentos dedicados a mim, me levar nas aulas de balé e capoeira, no dentista e a passeios, cada um deles está em minha memória. Você sempre foi um grande exemplo de carinho, amor e caráter. Aos meus outros avós Ivanilde Schroeder Schmidt, Dahd Dergame e Mickael Jarouj, obrigada por todos os momentos, por me aconselharem, por permitirem minhas travessuras quando criança e por terem me dado tantos exemplos bons.

Ao meu marido, Gilmar W. de Lima Schmidt, agradeço por tudo, pelos momentos de consolo, quando eu não acreditei que seria capaz de tudo isso e por sempre acreditar mais em mim do que eu mesma. Por me amar tanto, me respeitar, apoiar em qualquer loucura que eu invente fazer, por me divertir todos os dias com esse bom humor que nunca acaba, por aconselhar, puxar minha orelha quando necessário, me fazer relaxar nos momentos de tensão e por ser tão incrível. Obrigada por todos os cafés da manhã deliciosos e por sempre ser meu combustível, uma das coisas mais sensacionais na vida é encontrar um amor que te faça querer mais, o tempo todo.

Por fim a todos os familiares que me apoiaram, que me oferecem auxílio, que se preocupam e que torcem por mim, sintam-se abraçados, amo vocês.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Ao CTAF pela disponibilização do microscópio e a CAPES que contribuiu no desenvolvimento deste trabalho e minha formação acadêmica.

O mundo nos oprime, de modo que, não mais acreditamos que podemos ser o que quisermos e, nosso único objetivo passa a ser o que menos desejávamos. O sucesso talvez esteja em fazermos o caminho inverso.

Natália Jarouj Schmidt

RESUMO

O estresse oxidativo, resultado do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e os sistemas antioxidantes, pode levar a danos celulares e contribuir para diversas patologias, como câncer e doença renal crônica. O fator de transcrição NRF2 é um regulador central da resposta antioxidante, ligando-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE) nos genes-alvo e modulando suas expressões, contribuindo para a homeostase redox. A ativação canônica do NRF2 ocorre por modificações em resíduos de cisteínas na proteína Keap1. Esta e outras vias de ativação podem ser exploradas no tratamento de doenças e vem se mostrando eficaz em experimentos com animais e ensaios clínicos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar uma linhagem estável derivada da linhagem HeLa (carcinoma de colo uterino humano) para ser usada em análise do gene repórter luciferase para o *screening* de compostos moduladores de NRF2 e em RT-qPCR para validação dos compostos candidatos. A linhagem foi produzida pela transfecção do vetor pGL4.22-ARE-mGST [luc2CP/Puro] com a sequência ARE do gene glutationa S-transferase de camundongo (mGST), seguida da seleção por puromicina. A linhagem foi denominada POLI e foi avaliada quanto a resposta à modulação de NRF2. Para isso, foram utilizados sulforafano (SFN) como ativador e trigonelina (TGN) como inibidor de NRF2. A expressão de NRF2 foi analisada por Western blotting, a expressão da luciferase foi analisada por imunofluorescência indireta e a atividade da luciferase foi avaliada por luminescência. Utilizamos também RT-qPCR para avaliar a expressão de genes alvo de NRF2. Os resultados mostraram que a linhagem estável POLI se mostrou bastante responsiva ao SFN e ao TGN em todos os ensaios realizados. Assim, a plataforma pode ser empregada para buscarmos novos moduladores de NRF2.

Palavras-chave: NRF2; estresse oxidativo; moduladores; gene repórter luciferase.

ABSTRACT

Oxidative stress, resulting from the imbalance between reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and antioxidant systems, can lead to cellular damage and contribute to several pathogenesis, such as cancer and chronic kidney disease. The transcription factor NRF2 is a central regulator of the antioxidant response, binding to the antioxidant response element (ARE) in target genes and modulating their expression, contributing to redox homeostasis. Canonical NRF2 activation occurs by modifications in cysteine residues in the Keap1 protein. This and other activation pathways can be explored in the treatment of diseases and have been shown to be effective in animal experiments and clinical trials. This work aimed to characterize a stable cell line derived from the HeLa (human cervical carcinoma) lineage to be used in luciferase reporter gene analysis for the screening of NRF2-modulating compounds and in RT-qPCR for validation of candidate compounds. The strain was produced by transfection of the pGL4.22-ARE-mGST [luc2CP/Puro] vector with the ARE sequence of the mouse glutathione S-transferase (mGST) gene, followed by puromycin selection. The strain was named POLI and was evaluated for its response to NRF2 modulation. For this purpose, sulforaphane (SFN) was used as an activator and trigonelline (TGN) as an inhibitor of NRF2. NRF2 expression was analyzed by Western blotting, luciferase expression was analyzed by indirect immunofluorescence, and luciferase activity was evaluated by luminescence. We also used RT-qPCR to evaluate the expression of NRF2 target genes. The results showed that the stable strain POLI was highly responsive to SFN and TGN in all assays performed. Thus, the platform can be used to search for new NRF2 modulators.

Keywords: NRF2; oxidative stress; modulators; luciferase reporter gene.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA NRF2 E SEUS DOMÍNIOS..	15
FIGURA 2. O MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE NRF2 POR ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA NRF2.....	21
FIGURA 4 - GENES ALVOS E VIAS CELULARES REGULADAS POR NRF2.....	24
FIGURA 5 - MAPA DO VETOR pGL4.22-ARE-mGST [luc2CP/Puro].....	33
FIGURA 6 - PLAQUEAMENTO COM MAPA DE TRATAMENTO PARA LINHAGEM ESTÁVEL.....	36
FIGURA 7 - PLAQUEAMENTO COM MAPA DE TRATAMENTO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	40
FIGURA 8 - REGISTROS FOTOGRÁFICOS DA CURVA DE MORTALIDADE, UTILIZANDO CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ANTIBIÓTICO EM HeLa...	43
FIGURA 9 - RESULTADO FOTOGRÁFICO APÓS 11 DIAS DE TRANSFEÇÃO.....	44
FIGURA 10 - EXPRESSÃO DE NRF2 POR WESTER BLOTTING.....	50
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE LUCIFERASE DO VETOR EM HeLa PARENTAL, POLI 1 E POLI 2.....	52-53

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - MÉDIA NORMALIZADA DE LUMINESCÊNCIA.....	46
GRÁFICO 2- ANÁLISE ONE-WAY ANOVA DE DADOS RESULTANTES DE LUMINESCÊNCIA.....	48
GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DE NQO1, HMOX E GCLM EM RELAÇÃO AO CONTROLE.....	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE qPCR.....	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AEM1 - Modulador de expressão ARE 1
ARE - Elemento de resposta antioxidante
AMP cíclico - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
BG-12 - Fumarato dimetila
CAT - Catalase
CBP - Proteína de ligação a CREB
COX-2 - Ciclooxygenase-2
DA - Doença de Alzheimer
DRC - Doença renal crônica
GSH - Glutathiona
GSH-Px - Glutathiona Peroxidase
GST - Glutathiona S-transferase
HO-1 - heme oxygenase-1
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL - 4 - Interleucina-4
KEAP1 - Proteína 1 associada à epiclorigrina citoplasmática, semelhante a kelch
MAFG - Fator de transcrição MAF Bzip G
NRF2 - Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NEH - Domínios da NRF2 com homologia de epiclorigrina
NO - Óxido nítrico
NQO1 - NADP(H) quinona desidrogenase 1
p38 MAPK - P38 proteína quinase ativada por mitógeno
PGE2 - Prostaglandina E2
PKC delta - Proteína quinase C delta
RAR α - Receptor alfa do ácido retinoico
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RXR α - Receptor de retinoide X alfa
SMAF - Proteína de fibrossarcoma músculo-aponeurótico pequeno
SOD - Superóxido dismutase
SOD1 - Superóxido dismutase 1
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. OBJETIVOS	17
1.1.1. Objetivo geral	17
1.1.2. Objetivos específicos	17
1.2. JUSTIFICATIVA	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. ESTRESSE OXIDATIVO	18
2.2. NRF2	20
2.2.1. Genes-alvo e funções	22
2.3. PAPEL DA NRF2 EM DOENÇAS E DESTOXIFICAÇÃO DE DROGAS	26
2.3.1. Tratamentos usando moduladores de NRF2	29
2.4. PLATAFORMAS PARA BUSCAR MODULADORES DE NRF2	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. REAGENTES	32
3.2. CULTIVO CELULAR	34
3.3. LINHAGEM ESTÁVEL	35
3.3.1. Curva de antibiótico	35
3.3.2. Transfecção	35
3.3.3. Seleção	36
3.3.4. Expansão	36
3.4. TRATAMENTO COM MODULADORES COMERCIAIS	37
3.5. ENSAIO DE GENE REPÓRTER	37
3.5.1. Obtenção dos lisados de poli 1 e poli 2	37
3.5.2. Luminescência	37
3.5.2.1. Análise estatística	38
3.6. BRADFORD	38
3.7. WESTERN BLOTTING	38
3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA	39
3.9. RT-qPCR	40
3.9.1. Extração de RNA	40
3.9.2. Quantificação e controle de qualidade das amostras	41
3.9.3. Obtenção de cDNA por transcrição reversa (RT)	41
3.9.4. qPCR	41
3.9.5. Análise estatística	42
4. RESULTADOS	42
4.1. OBTENÇÃO DE LINHAGEM ESTAVELMENTE TRANSFECTADA	42
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS POLI 2	45
4.2.1. Expressão de Luciferase	45
4.2.2. Western Blotting	49

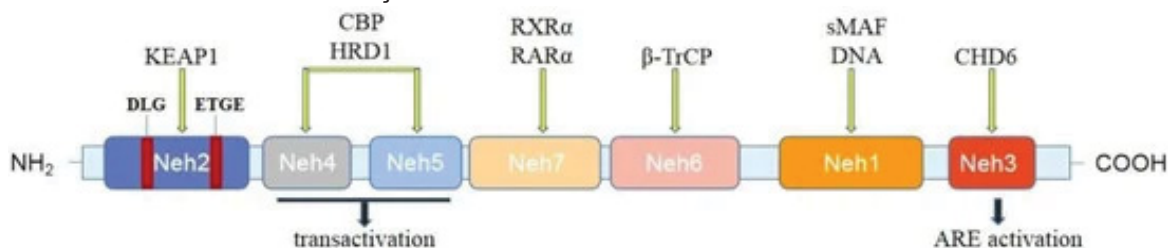
4.2.3. Imunofluorescência	50
4.2.4. RT-qPCR	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
5.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	60
5.1.1. Biblioteca metagenômica disponível para testes futuros	60
5.1.2. Outras moléculas disponíveis	62
6. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) são indispensáveis para todos os organismos aeróbicos. Elas desempenham um papel fundamental no processo bioquímico essencial para manter o estado redox estável de tecidos e células, crucial para a saúde do organismo. Atualmente, compreende-se que a ação de ROS/RNS é dependente da concentração, ou seja, embora em concentrações fisiológicas normais, ROS seja benéfico para o corpo, em concentrações acima de certo limiar, tornam-se prejudiciais (BANO et al., 2012). Esse desequilíbrio entre o sistema oxidativo e o sistema antioxidante, definido como estresse oxidativo, leva à destruição de macromoléculas biológicas, como açúcares, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (CAPUTO et al., 2012), culminando em danos a órgãos, tecidos e funções (LEE et al., 2016).

A proteína NRF2 é um fator de transcrição regulado pela proteína 1 associada à ECH semelhante a Kelch ou Keap1 (Figura 1). Sob condições de estresse oxidativo, NRF2 pode ativar a resposta antioxidante e citoprotetora (THANAS et al., 2020). Mais de 600 genes, incluindo mais de 200 proteínas associadas à proteção contra inflamação, câncer, distúrbios neurológicos, envelhecimento, doenças cardiovasculares e outras condições graves, são regulados pela via de sinalização NRF2 (KHODAKARAMI et al., 2022).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA NRF2 E SEUS DOMÍNIOS



FONTE: Adaptado de WANG et al., 2022.

Especificamente contra estresse oxidativo e inflamação (CUADRADO et al., 2019). NRF2 regula positivamente a expressão de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD), bem como enzimas de detoxificação de fase II, incluindo NADP(H) quinona desidrogenase 1 (NQO1), heme oxigenase-1 (HO-1) e glutatona S-transferase (GST) (TOSI et al., 2011; LI et al., 2011).

Além disso, há uma quantidade crescente de evidências que indicam que as características metabólicas e os fenótipos inflamatórios notavelmente distintos entre os macrófagos M1 e M2 são fortemente influenciados pelo NRF2. A regulação negativa das

sinalizações associadas ao NRF2 em relação a outros fatores de transcrição, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), pode fornecer insights sobre a conexão entre a defesa contra o estresse oxidativo e a mitigação da inflamação por meio da sinalização do NRF2 (GALVÁN-PEÑA et al., 2014; SAHA et al., 2020).

A atividade/expressão da NRF2 está diminuída em diversos contextos patológicos como na senescência celular (LUO et al., 2020), na síndrome de Hutchinson-Gilford, uma síndrome rara de envelhecimento prematuro (KUBBEN et al., 2016), bem como na doença renal crônica (DCR) e de outras doenças associadas ao envelhecimento prematuro (STENVINKEL et al., 2020).

A ativação comprometida de NRF2 também está associada à fibrose renal e à progressão da doença em um modelo de glomeruloesclerose focal em camundongos (TSAI et al., 2011). No caso da doença de Alzheimer (DA), mesmo com o aumento do estresse oxidativo, foi constatado que a expressão nuclear do NRF2 está reduzida nos neurônios da DA, e muitos genes alvos da NRF2 são negativamente modulados (RAMSEY et al., 2007). Em todos esses casos, o uso de ativadores da NRF2 poderia promover efeitos benéficos.

No caso do câncer, a perturbação no equilíbrio do estado redox é uma ocorrência comum (YANG et al., 2013). As células cancerígenas apresentam níveis elevados e persistentes de ROS levando à ativação de oncogenes, aumento nas taxas metabólicas, hipóxia, disfunção mitocondrial e/ou peroxissomal, bem como crescimento independente de ancoragem (DE LA VEGA et al., 2018). Dentro desse contexto, o NRF2 desempenha um papel crucial como regulador significativo da resposta antioxidante. No entanto, suas funções podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais na tumorigênese, dependendo do estágio do câncer. Nos estágios iniciais da tumorigênese, a atividade do NRF2 parece desempenhar um papel importante na prevenção da carcinogênese pré-maligna, danos ao DNA e mutações iniciais do câncer (SPORN et al., 2012, DEBLASI et al., 2020). Contudo, em estágios avançados, algumas ações do NRF2 podem favorecer a carcinogênese (SPORN et al., 2012). A ativação da via NRF2, nestes casos, pode ser benéfica para as células tumorais, ao protegê-las contra o estresse oxidativo (DEBLASI et al., 2020).

Diversos ativadores de NRF2 naturais e provenientes de plantas, enquanto outros são compostos sintéticos, têm avançado para experimentos em animais e até ensaios clínicos em humanos. Um exemplo notável é a bardoxolona metil para DRC. Resultados de um ensaio clínico com esse composto em pacientes com doença renal moderada mostraram melhorias significativas na taxa de filtração glomerular estimada e em outras medidas da função renal ao longo de 52 semanas (PERGOLA et al., 2011). O BG-12 (fumarato de dimetila) está sendo usado para tratar esclerose múltipla remitente-recorrente (KAPPOS et al., 2011). Protandim® é um suplemento dietético, ativador de NRF2, patentado, composto por cinco ingredientes à base de plantas, silimarina de cardo leiteiro

(*Silibum marianum*), extrato de bacopa (*Bacopa monniera*), ashwagandha (*Withania somnifera*), extrato de chá verde (*Camellia sinesis*) e curcumina de açafrão (*Curcuma longa*), cujo efeito sinérgico é nove vezes maior quando todos os componentes estão presentes juntos (VELMURUGAN et al., 2009).

Contudo, a quantidade de inibidores descritos de NRF2 ainda é bem inferior que os de ativadores. O brusatol sensibiliza células cancerígenas à quimioterapia ao reduzir os níveis de NRF2 e seus genes-alvo. Embora o brusatol atue globalmente na tradução, ele tem sido usado para o estudo da inibição de NRF2 na quimiossensibilização (VARTANIAN et al., 2016; HARDER et al., 2017). Outros inibidores são o modulador de expressão ARE 1 AEM1, cujo qual possui mecanismo de ação desconhecido (BOLLONG et al., 2015) e o ML385, que bloqueia a dimerização de NRF2 com MAFG (Fator de transcrição MAF Bzip G), impedindo sua ligação ao ARE (SINGH et al., 2016). Além disso, produtos naturais como trigonelina (ARLT et al., 2013), malabaricone A (MANNA et al., 2015) e wogonina (ZHONG et al., 2013) também têm potencial como inibidores de NRF2, mas com mecanismos ainda pouco definidos.

Devido ao papel central regulador da atividade da NRF2 em vários processos biológicos ubíquos, a descoberta de moléculas com alto poder modulador desta via é desejável. Neste contexto, produzimos uma linhagem celular com capacidade de detectar a modulação da atividade de NRF2, para que novas moléculas possam ser testadas.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Construir uma plataforma padronizada em linhagem estável, com o intuito de identificar compostos moduladores de NRF2.

1.1.2. Objetivos específicos

- Construção de linhagem estável com plasmídeo;
- Caracterização de linhagem estável
- Validação plataforma por dois métodos analíticos: análise do gene repórter luciferase para o screening de compostos moduladores da via e RT-qPCR para validação dos compostos candidatos.

1.2. JUSTIFICATIVA

NRF2 é um fator de transcrição que desempenha um papel central em situações de estresse celular, promovendo a expressão de proteínas citoprotetoras. Essas proteínas incluem antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de detoxificação e transporte

de drogas, bem como aquelas relacionadas ao reparo e degradação de biomoléculas danificadas e ao metabolismo celular (Hayes et al., 2010). A ativação coordenada dessas proteínas é essencial para garantir a sobrevivência celular em ambientes adversos. Entretanto, em condições patológicas como doenças crônicas não transmissíveis e envelhecimento, a via NRF2 frequentemente apresenta disfunção, o que prejudica a adaptação celular (Schmidlin et al., 2019).

Na doença renal crônica (DRC), especialmente nos estágios avançados associados à uremia, a via NRF2 encontra-se reprimida (Pedruzzi et al., 2015; Shen et al., 2017), o que está correlacionado com altos níveis de estresse oxidativo característicos desses estágios (Himmelfarb et al., 2000; Rodrigues et al., 2012). Por outro lado, em células tumorais, há uma ativação constitutiva de NRF2, favorecendo a sobrevivência das células malignas e aumentando sua resistência a quimioterápicos e radioterápicos (Lau et al., 2008; Hammad et al., 2019).

Esses dados observacionais e experimentais ressaltam a importância de identificar compostos capazes de modular a via NRF2, seja ativando-a ou inibindo-a, dependendo do contexto clínico. Embora diversos compostos ativadores de NRF2 estejam em fases de testes clínicos (Robledinos-Antón et al., 2019), apenas o fumarato de dimetila foi aprovado para uso clínico, no tratamento de esclerose múltipla (Rojo de la Vega et al., 2016). Por outro lado, os inibidores de NRF2 ainda são pouco descritos, o que evidencia a necessidade de explorar novos compostos, especialmente para tratar tumores com alta atividade de NRF2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESTRESSE OXIDATIVO

Em 1955, Denham Harman discutiu pela primeira vez sobre os efeitos colaterais deletérios de radicais livres produzidos durante o metabolismo e sua influência no processo de envelhecimento e tumorigênese (HARMAN, 1955). Os radicais livres são definidos como átomos, moléculas ou íons que possuem elétrons desemparelhados em uma configuração de camada aberta, podendo apresentar carga positiva, negativa ou neutra. Eles desempenham um papel significativo em diversos processos químicos, como combustão, polimerização e reações atmosféricas. No corpo humano, os radicais livres geram reações químicas e biológicas (BANO et al., 2012) e, quando em altas concentrações, devido à sua reatividade com lipídios, proteínas e DNA, podem comprometer a sobrevivência celular (IMLAY et al., 1988), além de estarem associados ao desenvolvimento de várias doenças degenerativas como inflamação, aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (BANO et al., 2012), doenças cardíacas e condições relacionadas à

idade (JONES, 2008).

As ROS são agentes geralmente oxidantes, ou seja, moléculas que retiram elétrons de outras moléculas, sendo principalmente geradas como subprodutos do metabolismo celular e dos processos bioquímicos dentro da célula. As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, produzidos durante a respiração aeróbica (MULLER, 2000; ADAM-VIZI E CHINOPOULOS, 2006), seguidas dos peroxissomos, descritos em 1966 por Christian de Duve (DE DUVE et al., 1966). Há também a produção de ROS por neutrófilos e macrófagos fagocíticos, durante a eliminação de patógenos invasores (ROOS et al., 2003). Além disso, existem fontes exógenas de ROS, as quais incluem poluição, fumaça de tabaco, álcool, ozônio, toxinas ambientais e industriais e radiação (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015).

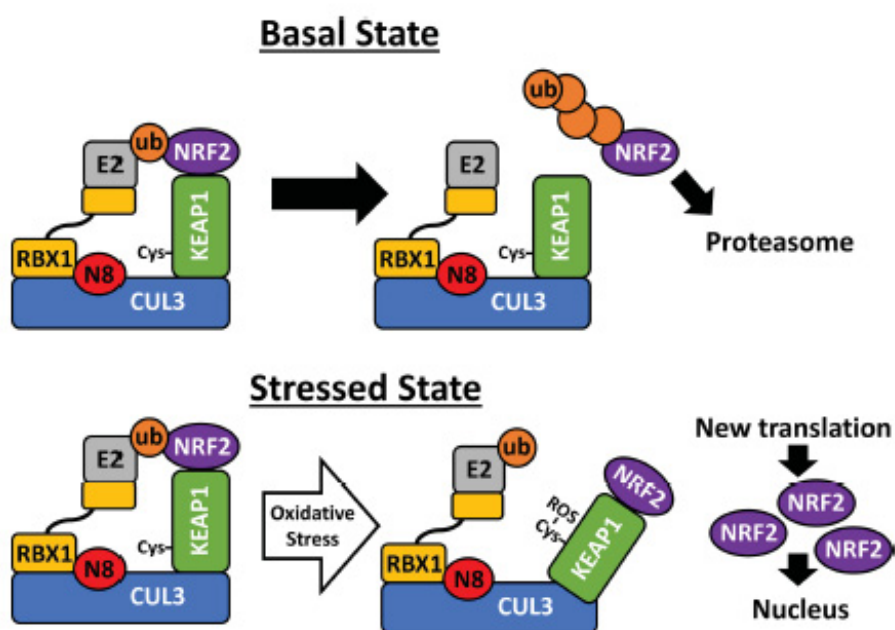
O metabolismo do oxigênio molecular a ROS é uma parte natural da vida aeróbica. De fato, os níveis basais de ROS são essenciais para a manifestação de várias funções celulares, como vias de transdução de sinal, expressão gênica e promoção de crescimento ou morte celular (FINKEL, 2011). No entanto, a exposição extensa ou prolongada a ROS, ou ROS em concentrações suprafisiológicas resultam em estresse oxidativo, um processo deletério que danifica lipídios, proteínas e ácidos nucleicos na célula, inibindo assim sua função normal (APEL E HIRT, 2004). Nesse cenário, há um desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesa celular antioxidante. O estresse oxidativo crônico e o dano oxidativo resultante têm sido implicados em muitas doenças humanas (ASMAT et al., 2016. , LIGUORI et al., 2018). Para preservar o delicado equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais dos ROS, os organismos vivos desenvolveram mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo para manter a homeostase redox. Alterações no estado redox podem levar à ativação transcricional de vias e enzimas envolvidas na desintoxicação, transporte e eliminação de ROS (SIES et al., 2017).

A definição moderna de estresse oxidativo foi ampliada para abordar, além do dano macromolecular mencionado acima, a interrupção dos circuitos redox do tiol, que resultam em sinalização celular anormal e desregulação do controle redox (JONES, 2008). A interrupção dos circuitos redox ocorre quando ROS oxidam resíduos de cisteína específicos presentes em proteínas e outras moléculas sinalizadoras. Uma das consequências da oxidação dos grupos tiol é a formação de dímeros dissulfeto (-S-S-), afetando vias sinalizadoras, a homeostase celular e a resposta ao estresse, comprometendo o equilíbrio redox. Sendo assim, tais moléculas que contêm esses grupos tiol, funcionam como sensores e reguladores do estado redox (FILOMENI et al., 2015; BANO et al., 2012; JONES, 2008).

2.2. NRF2

Uma proteína reguladora essencial para a resposta ao estresse oxidativo e detoxificação celular é a NRF2, também conhecida como fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2, codificada pelo gene NFE2L2. Ela pertence à subfamília Cap'n'Collar (CNC) dos fatores de transcrição de zíper de leucina (bZIP) e possui sete domínios (Neh1–7), cada um com funções específicas que garantem a estabilidade e a atividade transcricional de NRF2 (FIGURA 3). Em condições normais, NRF2 é mantida em baixos níveis pela ação do complexo Keap1-CUL3-RBX1, que se liga ao domínio N-terminal, Neh2, através dos motivos ETGE e DLG para mediar sua ubiquitinação e degradação proteossomal, assegurando que a NRF2 seja rapidamente eliminada quando não há necessidade de resposta antioxidante (CANNING et al., 2015; JARAMILLO et al., 2013; TAGUCHI e YAMAMOTO, 2017; LEE et al., 2009) (FIGURA 2).

FIGURA 2. O MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE NRF2 POR ESTRESSE OXIDATIVO



NOTA: No estado basal não estressado, NRF2 é alvo de ubiquitinação e degradação dependente de proteossoma pela ubiquitina ligase E3 dependente de Keap1. Em resposta ao estresse oxidativo, a ligação direta de estressores a resíduos de cisteína reativos resulta em uma mudança de conformação em Keap1, que inibe a ubiquitinação de NRF2. Como NRF2 não é liberado por Keap1, ele satura todos os sítios de ligação de Keap1, permitindo que NRF2 recém-traduzido ignore Keap1, transloque para o núcleo e regule positivamente a expressão do gene citoprotetor.
 FONTE: BAIRD e YAMAMOTO, 2020.

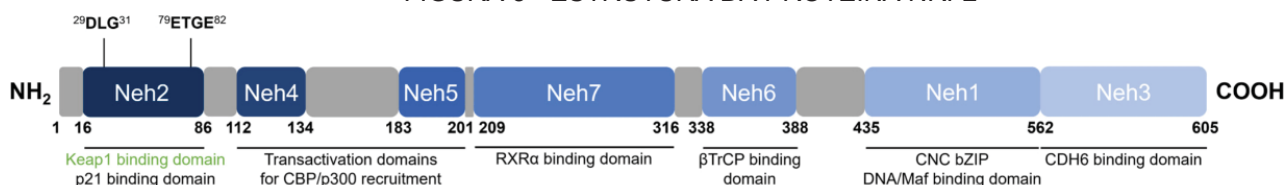
O domínio Neh1, que contém o motivo básico de zíper de leucina (bZIP), permite que NRF2 se ligue ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e forme heterodímeros com pequenas proteínas MAF (K, G e F), ativando a transcrição de genes-alvo antioxidantes e

de destoxificação. Esse domínio também interage com a enzima de conjugação de ubiquitina E2, UbcM2, que ajuda a regular a estabilidade de NRF2 (KEUM e CHOI, 2014; TAGUCHI e YAMAMOTO, 2017).

Além disso, os domínios Neh4 e Neh5 atuam na ativação transcricional, ligando-se à proteína de ligação, ao elemento responsivo, ao monofosfato de adenosina cíclico (CREB) e ao coativador CBP, uma histona acetiltransferase que facilita a transcrição dos genes regulados por NRF2. Esses domínios também podem se associar ao cofator nuclear RAC3/AIB1/SRC-3, intensificando ainda mais a transcrição de genes antioxidantes (NAMANI et al., 2014; MCMAHON et al., 2003; XIANG et al., 2014). O domínio Neh3, localizado no C-terminal de NRF2, interage com o coativador de transcrição CHD6, uma proteína que atua na remodelação da cromatina e auxilia na ativação de genes dependentes de ARE, fortalecendo a resposta antioxidante da célula (KRAJKA-KUŹNIAK et al., 2017; WANG et al., 2013).

O domínio Neh6 possui dois motivos, DSGIS e DSAPGS, que servem como plataformas de ligação para β -TrCP, uma proteína de repetição de β -transducina associada à ubiquitina E3 ligase. Esse mecanismo permite uma degradação independente de Keap1 em células expostas a estresse oxidativo intenso, garantindo uma resposta mais flexível da NRF2 conforme a necessidade celular (MCMAHON et al., 2003; MCMAHON et al., 2004; RADA et al., 2011; CHOWDHRY et al., 2013). Por último, o domínio Neh7 interage com o receptor retinoide X alfa (RXR α), o que inibe a ativação de NRF2 ao reprimir sua atividade citoprotetora e limitar a resposta ao estresse em condições específicas (WANG et al. 2013).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA NRF2



O NRF2 contém sete domínios conservados de homologia NRF2-ECH (Neh), Neh1–Neh7. O Neh1 tem um motivo bZip, onde a região básica é responsável pela ligação do DNA e o Zip dimeriza com pequenas proteínas MAF. O Neh2 contém motivos ETGE e DLG, que são necessários para a ligação ao Keap1 e subsequente poliubiquitinação dependente de Keap1 e degradação do NRF2. O Neh3-5 são domínios de transativação e os domínios Neh4 e Neh5 também interagem com o Hrd1. O Neh6 contém motivos DSGIS e DSAPGS responsáveis pela ubiquitinação e degradação mediadas por β -TrCP. O domínio Neh7 interage com o RXR α , que inibe a atividade do NRF2.

FONTE: Adaptado de NGO e DUENNWALD, 2022

Sob condições de estresse, como a exposição a ROS ou xenobióticos, resíduos específicos da proteína Keap1 são modificados, alterando sua conformação. Isso promove a interrupção da ubiquitinação de NRF2, inibindo a degradação proteossomal da NRF2. Como consequência, o NRF2 recém-sintetizado se acumula e se transloca para o núcleo, heterodimerizando com uma das pequenas proteínas Maf (homólogo do oncogene do

fibrossarcoma musculoponeurotico). Esses heterodímeros reconhecem os AREs, sequências amplificadoras nas regiões reguladoras dos genes-alvo de NRF2, essenciais para o recrutamento de fatores-chave para a transcrição ativando a expressão de genes citoprotetores (CANNING et al., 2015; ITOH et al., 2003; SUZUKI e YAMAMOTO, 2015). Essa ativação transcricional é controlada em múltiplos níveis, incluindo regulação transcricional e pós-transcricional, além de modificações pós-traducionais, como fosforilações mediadas por várias quinases (ERK, JNK, PKC, CK2) que aumentam sua atividade (KEUM e CHOI, 2014; CANNING et al., 2015; MCMAHON et al., 2004).

Além de o fator de transcrição NRF2 ligar-se ao ARE de genes alvo para ativar sua transcrição, ele é capaz de ativar sua própria transcrição já que o gene NFE2L2 também possui ARE em sua região promotora, permitindo que o NRF2, gere um mecanismo de feedback positivo para amplificar os seus efeitos (KWAK et al., 2002).

Proteínas de ligação ao RNA (RBPs), como HuR e AUF1, também regulam NRF2 ao se ligarem à 3'-UTR do mRNA NFE2L2, resultando na elevação da ativação de NRF2 (POGANIK et al., 2019). Além disso, splicing alternativo é um mecanismo que também regula NRF2. Variantes aberrantes do NFE2L2 sem exons 2 ou 3, observadas em cânceres, resultam em isoformas de NRF2 estabilizadas que ativam o NRF2 (GOLDSTEIN et al., 2016).

Existem ainda os microRNAs (miRNAs), que são RNAs endógenos de fita simples que reprimem a expressão genética por ligação específica de sequência com o mRNA, resultando em inibição da tradução de proteínas e desestabilização do mRNA (O'BRIEN et al., 2018). Vários miRNAs, como miR-144 (SANGOKOYA et al., 2010), miR-28 (YANG et al., 2011), miR-34 (LI et al., 2011), miR-93 (SINGH et al., 2013) e miR-153 (WANG et al., 2016), regulam o NRF2, sendo o aumento de miR-144 associado à redução da atividade transcricional do NRF2 e à menor tolerância ao estresse oxidativo em células eritroides, associada à anemia falciforme (SANGOKOYA et al., 2010). Em células de neuroblastoma, miR-153, miR-27a, miR-142-5p e miR-144 também atuam diretamente na 3'-UTR do NFE2L2, resultando em transativação ineficiente do NRF2 (NARASIMHAN et al., 2012).

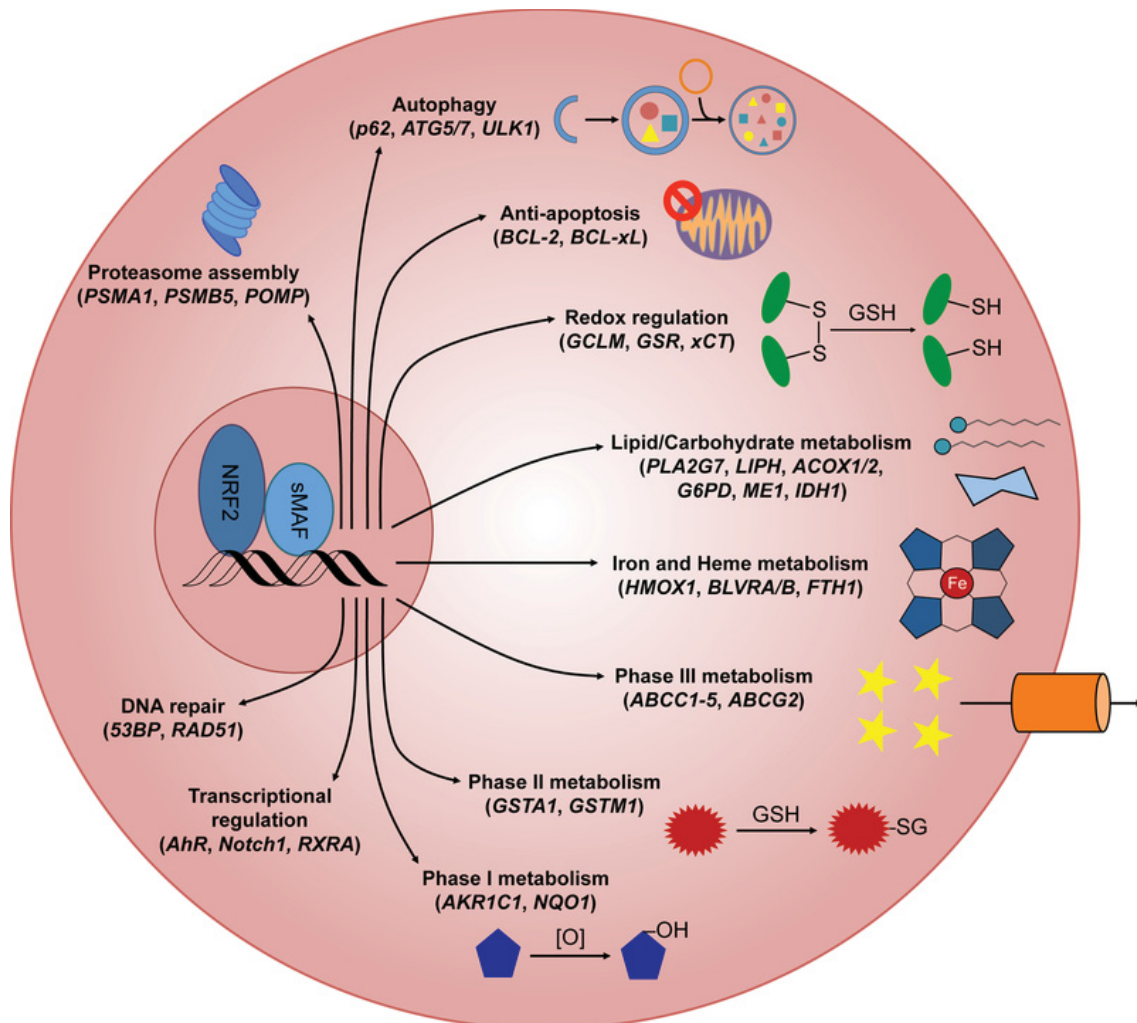
2.2.1. Genes-alvo e funções

Como dito anteriormente, o fator de transcrição NRF2, amplamente conhecido como regulador mestre da resposta antioxidante, desempenha um papel crucial na regulação de uma rede de genes envolvidos na citoproteção celular. Inicialmente identificado por sua capacidade de induzir a expressão de genes antioxidantes, o NRF2 regula uma série de processos celulares que vão desde a manutenção da homeostase redox até o metabolismo

de xenobióticos, com destaque para as enzimas de detoxificação de fases I, II e III (WU et al., 2012, WANG et al., 2017, SHAW e CHATTOPADHYAY, 2020).

Nos últimos anos, a pesquisa sobre o NRF2 ampliou-se com a identificação de novos genes-alvo e novas funções que vão além de sua capacidade de regulação redox (Figura 4). NRF2 é um regulador chave de diversos processos metabólicos e mitocondriais, desempenhando um papel crucial em aspectos fundamentais do metabolismo, como a absorção de nutrientes, o metabolismo anabólico e energético, e a biossíntese de macromoléculas, processos que são vitais para o crescimento e a proliferação celular (HANAHAN e WEINBERG, 2011), além da regulação da inflamação e autofagia, processos que são particularmente relevantes na carcinogênese e na progressão de doenças (MALHOTRA et al., 2010; CHORLEY et al., 2012; REICHARD et al., 2007). A capacidade do NRF2 de regular o metabolismo anabólico e a reprogramação metabólica no câncer é especialmente notável, pois sua ativação promove adaptações celulares favoráveis sob condições de estresse (MITSUISHI et al., 2012; PAEK et al., 2012). Além disso, o papel do NRF2 na regulação inflamatória é evidenciado por sua interação com outras vias de sinalização, como NF- κ B e mTOR, o que revela uma complexa rede de interações que modulam a resposta inflamatória e de sobrevivência celular (BENDAVID et al., 2016).

FIGURA 4 - GENES ALVOS E VIAS CELULARES REGULADAS POR NRF2.



NOTA: NRF2 heterodimeriza com proteínas sMAF para iniciar a transcrição de genes alvo contendo ARE. Genes alvo NRF2 verificados estão envolvidos na montagem do proteossoma, autofagia, prevenção de apoptose, manutenção do equilíbrio redox, metabolismo de lipídios e carboidratos, metabolismo do heme, homeostase do ferro, todas as três fases do metabolismo de fármacos/xenobióticos, regulação transcricional de outros fatores de transcrição e reparo de DNA. Genes alvo representativos são incluídos entre parênteses abaixo de cada resposta transcricional.

Fonte: Dodson et al., 2019

Essa multifuncionalidade do NRF2 destaca o desafio de compreender os mecanismos de sua ativação e as consequências da interação com diversos fatores de transcrição e cofatores, como sMAF, BACH1 e CBP, os quais podem atuar tanto na promoção quanto na repressão de sua atividade em diferentes contextos celulares (MALHOTRA et al., 2010; CHORLEY et al., 2012). Tal regulação estrita garante que o NRF2 apenas ative seus genes-alvo quando necessário, minimizando riscos de ativação desregulada que poderiam favorecer a sobrevivência de células tumorais. Dessa forma, as novas descobertas sobre o NRF2 ampliam as perspectivas terapêuticas, sobretudo em

estratégias que visam modular seletivamente sua atividade para o tratamento de doenças inflamatórias e câncer, ao mesmo tempo em que propõem novas direções para o estudo de seus efeitos contexto-dependentes na biologia tumoral (REICHARD et al., 2007; DHAKSHINAMOORTHY et al., 2005).

O impacto do NRF2 na reprogramação do metabolismo do câncer é um tema amplamente estudado, com evidências provenientes de experimentos de sequenciamento de cromatina (ChIP-Seq) que revelaram a ativação ou deleção do NRF2 em modelos celulares e animais, identificando uma série de genes alvo que regulam vias metabólicas essenciais, como a glicólise, a via das pentoses fosfato (PPP), o metabolismo dos ácidos graxos, da glutamina e da glutatona (HE et al., 2020; MITSUISHI et al., 2012; CHORLEY et al., 2012; FU et al., 2019; DE LA VEGA et al., 2018).

As mitocôndrias, organelas responsáveis pela produção de energia celular por meio da fosforilação oxidativa, estão intimamente associadas à geração de ROS e o desequilíbrio nessa produção é uma característica marcante em várias doenças, incluindo distúrbios neurodegenerativos, metabólicos, cardiovasculares e câncer (CUADRADO et al., 2019). O NRF2 regula a resposta antioxidante e o metabolismo intermediário através da modulação de genes metabólicos essenciais e da interação com outros fatores de transcrição. Sua ativação resulta em um aumento no fluxo glicolítico, no metabolismo da glutamina e na glutamatólise, além de intensificar a entrada de substratos no ciclo do ácido cítrico (TCA) e na cadeia respiratória mitocondrial, o que reflete na maior demanda por oxigênio e na produção de ATP (HOLMSTROM et al., 2013). Estudos também demonstram que células com ativação genética do NRF2 apresentam maior potencial de membrana mitocondrial e níveis elevados de ATP, contrastando com células deficientes em NFE2L2, que apresentam fenótipos opostos (LUDTMANN et al., 2014).

Além disso, o NRF2 desempenha um papel protetor na regulação da biogênese mitocondrial, ativando o fator respiratório nuclear-1 (NRF-1), o qual regula a expressão de fatores chave para a biogênese mitocondrial, como o TFAM e o TFAM2 (PIANTADOSI et al., 2008). Esse processo é essencial para a manutenção da função mitocondrial e para a proteção celular contra o estresse oxidativo. O aumento da fosforilação oxidativa, embora fundamental para o metabolismo energético, pode induzir o vazamento de elétrons na mitocôndria e gerar ROS em excesso, o que resulta em danos celulares. Nesse contexto, a ativação do NRF2 se mostra crucial para controlar a produção de ROS, regulando proteínas como a desacopladora 3 (UCP3), que desacopla a fosforilação oxidativa da respiração mitocondrial, permitindo que a energia seja dissipada como calor e, assim, diminuindo a formação de superóxido (ANEDDA et al., 2013).

Em termos de modulação imunológica, o NRF2 também exerce efeitos significativos. Sua expressão é detectada em diversas células do sistema imunológico, incluindo

monócitos, neutrófilos, células T e B, com níveis particularmente elevados em monócitos e microglia no cérebro (BAGGER et al., 2016; ZHANG et al., 2014). O NRF2 tem um papel importante na regulação da inflamação, um processo fundamental para a resposta imunológica e para a defesa contra infecções e lesões. A inflamação descontrolada, mediada pela produção excessiva de ROS, pode levar a condições patológicas crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (CUADRADO et al., 2019). Nesse contexto, o NRF2 se destaca como um regulador anti-inflamatório, inibindo a transcrição de genes pró-inflamatórios e a atividade da via de sinalização NF- κ B (HE et al., 2020).

Estudos também sugerem que a ativação do NRF2 pode ser benéfica no combate ao câncer, já que em células tumorais, a ativação do NRF2 induz a expressão de IL-17D, que recruta células NK, promovendo uma resposta imunológica antitumoral. No entanto, a ativação de NRF2 em células T pode inibir a ativação e diferenciação dessas células, o que implica em um efeito regulador que pode ser benéfico ou prejudicial, dependendo do contexto imunológico (SADDAWI-KONEFKA et al., 2016).

Por fim, é importante destacar que o estresse oxidativo, gerado por atividades como o exercício físico, pode ativar a via do NRF2 e promover adaptações celulares. Estudos indicam que o exercício físico agudo aumenta os níveis de proteína NRF2, embora essa resposta seja atenuada com o envelhecimento, o que pode contribuir para a maior suscetibilidade a doenças e a fraqueza muscular observada na velhice. Portanto, o NRF2 desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo celular e na resposta ao estresse, sendo uma chave potencial para terapias que visem controlar a inflamação, o metabolismo e as doenças relacionadas ao envelhecimento (CAMERA et al., 2016; POWERS e JACKSON, 2008; DONE et al., 2016).

2.3. PAPEL DA NRF2 EM DOENÇAS E DESTOXIFICAÇÃO DE DROGAS

A via de sinalização NRF2-Keap1 desempenha um papel fundamental na defesa celular contra o estresse oxidativo, sendo crucial para a manutenção da homeostase e proteção contra uma variedade de doenças (VOLONTE et al., 2013). No entanto, o comportamento dessa via em diferentes contextos patológicos, como envelhecimento, câncer e doenças crônicas, é paradoxal e complexa, exigindo uma análise cuidadosa de seus efeitos terapêuticos e potencialmente prejudiciais (KOMBAIRAJU et al., 2014; HE et al., 2020; WANG et al., 2008). No contexto do envelhecimento, a inibição da via NRF2 tem sido associada à sarcopenia, uma condição caracterizada pela perda de massa e função muscular, comum em idosos.

A via NRF2 também tem um papel crucial na regeneração muscular após lesões. Estudos em camundongos, deficientes em disferlina, uma proteína associada à distrofia

muscular, demonstraram que a deleção do gene de NRF2 resulta em um aumento significativo de ROS e em distúrbios funcionais e histopatológicos no tecido muscular (KOMBAIRAJU et al., 2014). Esses achados reforçam que a ativação de NRF2 é essencial para a resposta celular ao estresse oxidativo e para a regeneração do músculo esquelético (KOMBAIRAJU et al., 2014). Por outro lado, em células tumorais, a ativação constitutiva de NRF2 está associada à resistência a quimioterápicos e à promoção do crescimento tumoral. Mutações no gene Keap1, que regula a interação entre NRF2 e Keap1, é uma característica comum em vários tipos de câncer, como o carcinoma de pulmão, resultando em ativação descontrolada de NRF2. Esse processo proporciona uma vantagem competitiva para as células tumorais, permitindo-lhes tolerar níveis elevados de ROS, além de promover um metabolismo favorável ao crescimento celular, conhecido como efeito Warburg (HE et al., 2020; WANG et al., 2008). A ativação da glicólise aeróbica e a indução do transportador de glicose GLUT1 são características desse fenômeno, que permitem às células tumorais crescerem com menos eficiência, mas de forma mais sustentada (HE et al., 2020). Esse fenômeno, denominado "lado negro" da via NRF2 (KOMATSU et al., 2010; LAU et al., 2010), combinado com a ativação do metabolismo anaeróbico, torna os tumores mais agressivos e menos responsivos ao tratamento, reforçando a necessidade de estratégias terapêuticas que modulem cuidadosamente a via NRF2 para evitar efeitos adversos (HE et al., 2020; KOMATSU et al., 2010).

Mutações ativadoras no gene de NRF2, juntamente com mutações de perda de função em Keap1 e Cul3, ocorrem frequentemente em câncer de pulmão (PADMANABHAN et al., 2006), fígado (EICHENMÜLLER et al., 2014), ovário (KONSTANTINOPOULOS et al., 2011), cabeça e pescoço, rim (OOI et al., 2013), mama (NIOI e NGUYEN., 2007) e esôfago (TAGUCHI e YAMAMOTO, 2017). Cerca de 600 mutações somáticas no gene NFE2L2 foram relatadas em diversos tipos de câncer (GAO et al., 2017). A maioria dessas mutações afeta os motivos DLG e ETGE e abole a interação de NRF2 com Keap1, resultando na estabilização de NRF2 e ativação constitutiva. Em geral, a ativação de NRF2 é um indicador prognóstico adverso (ZEHIR et al., 2017).

Além do câncer, a via NRF2 também tem sido investigada em várias doenças crônicas, como o diabetes tipo I e II, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. No diabetes, o aumento do estresse oxidativo é uma característica comum, contribuindo para a disfunção celular e alterações metabólicas. A ativação de NRF2 por compostos como SF (isotiocianato) e CDDO-Me (triterpenoide sintético) demonstrou reduzir o dano oxidativo e melhorar a função renal em modelos experimentais de diabetes tipo I induzido por estreptozotocina (SCHULZE-TOPPHOFF et al., 2016; ZHENG et al., 2011). Além disso, compostos como o CDDO-Im, CDDO-Me e curcumina melhoraram a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose em modelos de diabetes induzido por dieta rica em gordura

(URUNO et al., 2013; YU et al., 2011; SAHA et al., 2010). No entanto, assim como em outras condições, a ativação crônica de NRF2 pode ser prejudicial, promovendo estresse redutor e alterando o metabolismo celular de maneira adversa, o que pode agravar a progressão de doenças cardiovasculares e renais (ZHANG et al., 2013).

Em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, a via NRF2 também apresenta um papel duplo. A ativação de NRF2 nas fases iniciais dessas doenças pode ajudar a proteger as células do dano causado pelo estresse oxidativo, enquanto, em estágios mais avançados, a capacidade de resposta dessa via diminui. Por exemplo, a expressão de NRF2 e seus genes alvo, como NQO1 e HMOX1, é frequentemente reduzida em cérebros de pacientes com Alzheimer (NAMANI et al., 2014; CORENBLUM et al., 2016), enquanto em pacientes com Parkinson, esses genes são frequentemente elevados, indicando uma resposta de defesa contra o estresse oxidativo nas células da substância negra (ZHANG et al., 2015). Esses dados sugerem que a modulação de NRF2 pode ser benéfica nas fases iniciais, mas sua eficácia pode diminuir com a progressão das doenças neurodegenerativas.

Em doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca, a ativação farmacológica de NRF2 demonstrou efeitos protetores contra o estresse oxidativo e a inflamação. Compostos como o resveratrol, ácido α -lipoico e CDDO-Me mostraram benefícios em modelos experimentais de insuficiência cardíaca, ajudando a melhorar a função cardíaca e a proteger contra danos celulares (ZHANG et al., 2013). Contudo, a ativação prolongada de NRF2 pode resultar em estresse redutor, o que pode agravar a progressão de doenças cardiovasculares, especialmente quando a via é ativada de forma desregulada e crônica (ZHOU et al., 2014).

Similarmente, em doenças hepáticas crônicas, como a doença hepática gordurosa não alcoólica, a ativação de NRF2 demonstrou efeitos protetores. Compostos como o CDDO-Me foram capazes de proteger contra a lesão hepática induzida por drogas e reduzir o acúmulo de lipídios no fígado, enquanto o CDDO-Im demonstrou benefícios em modelos de lesões hepáticas (NEZU et al., 2017). Esses achados reforçam o papel de NRF2 na proteção contra o estresse oxidativo e na redução da inflamação crônica, características dessas condições. No entanto, a ativação excessiva da via pode resultar em efeitos metabólicos adversos, levando ao agravamento das condições hepáticas a longo prazo (RAJASEKARAN et al., 2011).

Em resumo, a via NRF2 é um regulador essencial na resposta ao estresse oxidativo e na proteção celular, com efeitos fundamentais na manutenção da homeostase e no controle de várias condições patológicas. No entanto, seu papel é ambivalente, com implicações tanto benéficas quanto prejudiciais, dependendo do contexto e do estágio da doença. Embora a ativação de NRF2 tenha mostrado grande potencial terapêutico em

doenças crônicas e na quimioprevenção, sua modulação deve ser cuidadosamente controlada, especialmente no câncer, onde a ativação desregulada da via pode impulsionar a progressão tumoral. Portanto, uma abordagem terapêutica que leve em consideração a temporalidade e o contexto da ativação de NRF2 será crucial para o sucesso no tratamento de diversas doenças (HE et al., 2020; KOMATSU et al., 2010).

2.3.1. Tratamentos usando moduladores de NRF2

O papel do NRF2 na modulação do estresse oxidativo e inflamação posiciona este fator de transcrição como um alvo terapêutico relevante para diversas condições, como distrofias musculares, doenças neurodegenerativas e câncer. Pesquisas revelam que a ativação do NRF2 com doses terapêuticas de sulforafano melhora o desempenho muscular e atenua a inflamação nos músculos de camundongos mdx ao inibir a via NF- κ B de forma dependente de NRF2, o que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , interleucina-1 β e interleucina-6 (SUN et al., 2015). Este efeito é particularmente significativo para distúrbios musculares, onde o controle da inflamação pode amenizar o processo degenerativo.

Na esfera das doenças neurodegenerativas, ativadores farmacológicos de NRF2, como a bardoxolona-metilamida (CDDO-MA), mostraram-se promissores na melhoria de déficits de memória e na diminuição da formação de placas amiloides- β em camundongos com doença de Alzheimer (SARLETTE et al., 2008). Outros compostos naturais, como puerarina, orientina e baicalina, também foram efetivos na redução de fenótipos neurodegenerativos em modelos de doença de Alzheimer (ZHOU et al., 2014; ZHANG et al., 2015; YU et al., 2015). Além disso, o composto D3T e os triterpenoides CDDO-EA e TFEA protegeram camundongos selvagens contra a doença de Parkinson induzida por MPTP, efeito ausente em camundongos NRF2-/- (CHEN et al., 2015; BURTON et al., 2006). Entre esses ativadores, o dimetil fumarato (DMF) é o único que avançou para ensaios clínicos de fase III para tratamento de esclerose múltipla (EM), embora compostos como sulforafano e CDDO-TFEA tenham reduzido os fenótipos de EM em modelos murinos (KAIDERY et al., 2013; LI et al., 2013). Curiosamente, o DMF recebeu aprovação da FDA para tratar EM, apesar de não ser o ativador mais potente de NRF2, possivelmente por apresentar efeitos imunomoduladores independentes de NRF2 (LIU et al., 2014).

Para o câncer, o NRF2 apresenta um dilema terapêutico, pois sua ativação crônica pode sustentar a resistência tumoral e o crescimento celular. Entretanto, ativadores de NRF2 são investigados como agentes preventivos contra carcinogênese, uma vez que sua ativação modula a destoxificação de carcinógenos e protege tecidos saudáveis, especialmente o fígado. Compostos redox-ativos, como o sulforafano (encontrado em

vegetais crucíferos), protegem contra vários tipos de câncer em camundongos, incluindo câncer de pulmão, pancreático e de pele (JARAMILLO et al., 2013). Oltipraz, um ativador sintético, também demonstrou inibir a formação de tumores em modelos de roedores, e o DMF apresenta potencial na prevenção de cânceres, embora sua atividade específica seja controversa devido à falta de seletividade exclusiva para NRF2 (CUADRADO et al., 2019; ZARO et al., 2019).

Na tentativa de inibir NRF2 para o tratamento de tumores dependentes deste fator, foram identificados diversos compostos. O brusatol, um quassinóide natural, foi o primeiro inibidor de NRF2 descoberto e sensibiliza células cancerígenas para agentes quimioterápicos ao reduzir os níveis de NRF2 e de genes-alvo relacionados (REN et al., 2011). Embora brusatol atue como um inibidor global de tradução, ele se mantém como uma ferramenta valiosa para estudar os efeitos da inibição de NRF2 na quimiossensibilização (VARTANIAN et al., 2016; HARDER et al., 2017). Outros inibidores incluem o AEM1, de mecanismo de ação desconhecido, e o ML385, que bloqueia a dimerização de NRF2 com MAFG e, conseqüentemente, sua ligação ao ARE (TSUCHIDA et al., 2017; BOLLONG et al., 2015). Este último se destaca por inibir tanto a transcrição quanto a tradução de NRF2, embora o modo preciso desta regulação exija mais investigações. Produtos naturais como trigonelina, malabaricone A e wogonina também são inibidores potenciais de NRF2, embora com mecanismos de ação pouco definidos (SINGH et al., 2016; MANNA et al., 2015; LIMONCIEL et al., 2014).

A inibição do NRF2 através de outros alvos moleculares também tem se mostrado eficaz em modelos pré-clínicos. Por exemplo, agonistas do receptor de ácido retinóico, como o ácido all-trans-retinoico (ATRA), inibem NRF2 ao formar complexos inativos com o receptor nuclear RAR α (ZHONG et al., 2013). Outro exemplo é o flavonóide luteolina, que sensibiliza células cancerígenas para quimioterapia ao aumentar a degradação do mRNA de NRF2, embora também ative a via NRF2-HO-1 em certos tipos celulares (ZUO et al., 2018; SONG e PARK, 2014). A halofuginona, um alcaloide da medicina tradicional chinesa, também atua como um inibidor não específico do NRF2, aumentando a eficácia de agentes anticâncer como cisplatina e doxorrubicina (TSUCHIDA et al., 2017).

Considerando efeitos duais de NRF2, que pode tanto proteger contra doenças degenerativas quanto promover resistência em células cancerígenas, as estratégias terapêuticas devem ser meticulosamente adaptadas ao contexto.

2.4. PLATAFORMAS PARA BUSCAR MODULADORES DE NRF2

A via NRF2 é um alvo terapêutico crucial para o tratamento de doenças como câncer e condições associadas ao estresse oxidativo, mas as plataformas atualmente disponíveis para a triagem de moduladores da via apresentam limitações significativas. Algumas abordagens emergentes incluem:

- **Triagem Virtual e Modelagem Baseada em Farmacóforo:** Essa estratégia envolve a criação de modelos baseados nas interações entre Keap1 e NRF2. Usando grandes bancos de dados moleculares, compostos com alta afinidade para o domínio Kelch do Keap1 podem ser identificados. Estudos demonstram a eficácia de ferramentas computacionais, como docking molecular e simulações de dinâmica molecular, na triagem de moduladores potenciais (ALZAIN et al., 2023 e LEUNG et al., 2019) . Usando esta abordagem, foram analisados 270.540 compostos do banco de dados de produtos naturais ZINC, tendo como resultado 3 compostos, denominados: ZINC000002123788, ZINC000002111341 e ZINC000002125904, potencialmente inibidores da ligação Keap1-NRF2 (ALZAIN et al., 2023); Sulforafano também foi caracterizado através dessa abordagem.
- **Plataformas de High-Throughput Screening (HTS):** Ensaios automatizados que permitem a análise de milhares de compostos simultaneamente. Esses métodos podem identificar moléculas que modulam a interação Keap1-NRF2, utilizando sinais fluorescentes ou luminescentes para monitorar a atividade do NRF2 em tempo real. Bardoxolona Metila e Fumarato de dimetila foram identificados a partir desta abordagem (ABED et al., 2015).
- **Ensaios Baseados em Biossensores:** Tecnologias como sensores ópticos são úteis para avaliar interações de proteínas, como Keap1-NRF2, em tempo real. Essas ferramentas fornecem uma leitura quantitativa da afinidade entre moduladores e o complexo alvo. Usando esta abordagem, foram caracterizados os seguintes ativadores e inibidores de NRF2: Usando esta abordagem, foram caracterizados os seguintes ativadores e inibidores de NRF2: Trigonelina e Apigenina (BAIRD et al., 2013).
- **Abordagens Baseadas em Células:** Sistemas celulares geneticamente modificados que reportam a ativação do NRF2 permitem o monitoramento direto da indução de genes dependentes de NRF2, como HO-1 e NQO1. Esses métodos têm sido combinados com tecnologias de edição gênica, como CRISPR, para melhorar a precisão dos ensaios. Usando esta abordagem, foram caracterizados os seguintes ativadores e inibidores de NRF2: Tert-butil-hidroquinona (tBHQ) e Curcumina (WANG et al., 2021).

Métodos computacionais, como triagens virtuais e modelagem molecular, são úteis para prever interações teóricas, mas falham em fornecer dados funcionais *in vitro* ou *in vivo*, resultando em candidatos que muitas vezes não se traduzem em eficácia biológica prática. Esses sistemas dependem fortemente da precisão de modelos estruturais, tornando-os vulneráveis a erros nos parâmetros preditivos.

As plataformas de triagem de alta capacidade (HTS), embora possibilitem o processamento em larga escala, geralmente enfrentam desafios como altos custos operacionais e taxas significativas de falsos positivos ou negativos, devido à falta de validação funcional robusta. Biossensores, que fornecem dados em tempo real, frequentemente carecem de especificidade para a via NRF2, limitando sua utilidade para identificar moduladores específicos dessa cascata sinalizadora.

Por outro lado, ensaios com células geneticamente modificadas podem sofrer problemas de adaptabilidade a diferentes tipos celulares.

Apesar das abordagens existentes, a criação de novas plataformas analíticas oferece vantagens significativas. Uma plataforma que combine dois métodos complementares, como a análise de gene repórter luciferase para triagem inicial de compostos moduladores e qPCR para validação de candidatos, representaria um avanço significativo na precisão e confiabilidade dos testes. Essa combinação permite uma triagem de alto rendimento aliada à validação robusta de compostos promissores, acelerando a identificação de moduladores eficazes da via NRF2, tanto ativadores quanto inibidores, para aplicações terapêuticas.

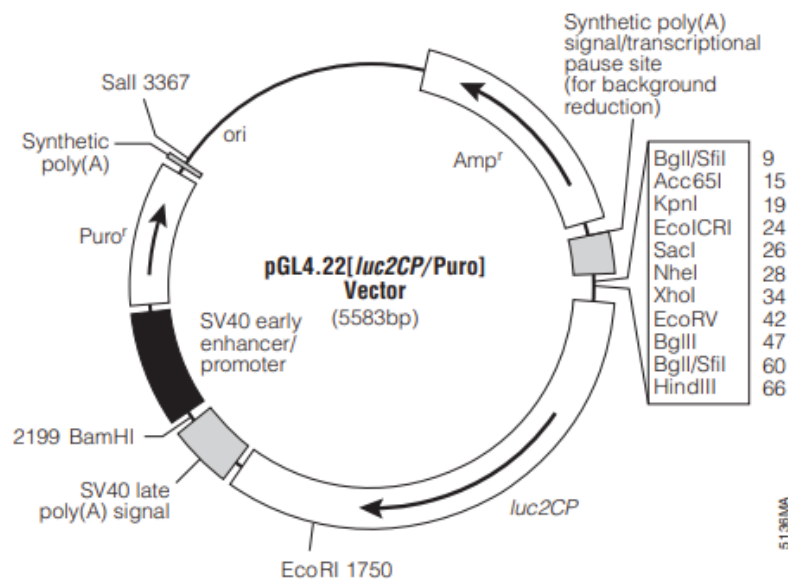
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

Para cultura celular, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alta glucose, tripsina-EDTA 0.05%, soro fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomicina foram adquiridos da empresa Gibco Life Technologies.

Para transfecção, opti-MEM e puromicina, foram adquiridos da empresa Gibco Life Technologies. O plasmídeo pGL4.22-ARE-mGST [Luc2CP/Puro] (Figura 5), que codifica a sequência ARE da enzima glutathione S-transferase de camundongo (mGST) AGCTTGGAATGACATTGCTAATGGTGACAA *upstream* ao gene da luciferase de *Photinus pyralis* (Wondrak et al., 2008) foi doado pela Dra. Donna Zhang (Universidade do Arizona, Tucson, EUA). O plasmídeo em questão também contém um marcador selecionável em células de mamíferos para resistência à puromicina.

FIGURA 5 - MAPA DO VETOR pGL4.22-ARE-mGST [luc2CP/Puro]



FONTE: Catálogo Promega

Antes de iniciar o projeto, foi avaliada a sequência do vetor. Após reação de sequenciamento, foi verificado que a sequência ARE está corretamente localizada no sítio de policlonagem, entre os sítios de SacI e BglIII. Contudo, sequências não identificadas foram detectadas imediatamente antes da sequência ARE e após o sítio de BglIII. Toda esta sequência, incluída a ARE está localizada upstream da sequência do gene da luciferase de Vaga-lume (*Photinus pyralis*):

ACATTTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCAGAGCTCTTACGCGT TAGCTTGGAAATGACAT
 TGCTAATGGTGACAAAGCAACTTTAGATCTGATATCATCGATGAATTCGGGCTATAAAAGG
 GGGTGGGGGAGCTCGGCCCTCATTCTGGAGACGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAG
 GCATGCAAGCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAA GCCACCATGG AAGATGCCAAAAC
 ATTAAGAAGGGCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGCGAGCAGC
 TGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTACCGACGC
 ACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTCCGGCTGGCAG
 AAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAAT
 AGCTTGCAGTTCTTCATGCCCGTGTGGGTGCCCTGTTTCATCGGTGTGGCTGTGGCCC
 CAGCTAACGACATCTACAACGAGCGGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCC
 CACCGTCGTATTTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAGATCCTCAACGTGCAAAGAAG
 CTACCGATCATAAAAAGATCATCATCATGGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAA
 AGCATGTACACCTTCGTGACTTCCCATTTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGT
 GCCCGA

Nota: Em laranja, sequência Pnl; Em azul, sequência BgIII; Em vermelho, início do gene da Luciferase, cuja qual está inserida dentro da sequência Kozak (grifado em amarelo). Por fim, sequência grifada em rosa, a sequência ARE de mGST e em cinza, uma sequência não identificada.

Para tratamentos com moduladores comerciais foram utilizados sulforafano da empresa CAYMAN Chemical Company e trigonelina da Sigma-Aldrich.

Para o ensaio de luminescência foi utilizado o kit Dual-Luciferase Reporter Assay System E1910 da Promega.

Os anticorpos utilizados para imunofluorescência e western blotting foram anti-rabbit Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, #A11078), anti-mouse HRP (Sigma, #4416), anti-rabbit HRP (Sigma #A0545), anti- β -tubulina (SANTA CRUZ, #SC-55529), anti-NRF2 (MA5-42371, Thermo Fisher scientific), anti-luciferase (Promega, #G745A).

Para análise por RT-qPCR, etanol, isopropanol e clorofórmio foram obtidos da empresa Neon Comercial. Trizol, kit SuperScript IV First – Strand cDNA Synthesis Reaction e SYBRGreen da empresa Qiagen.

Para os demais ensaios, foram usados: Marcador de massa molecular pré-corado (Thermo Scientific - PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#26616), substrato altamente sensível (SuperSignal West Dura, Pierce), membrana de nitrocelulose (Cytiva), reagente de Bradford, leite em pó desnatado da empresa Bio-Rad, formaldeído da empresa Neo, albumina de soro bovino (BSA) adquirida da empresa Inlab, saponina, 4', -6 diamidino-2-fenil indol (DAPI) e glicina foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich.

3.2. CULTIVO CELULAR

Em todos os experimentos descritos neste relatório, foram utilizadas células da linhagem de carcinoma cervical humano HeLa, cultivadas em condições controladas de 37°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultivo utilizado foi DMEM de alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina para garantir a manutenção das condições ideais de crescimento celular.

Para as linhagens estáveis, o antibiótico puromicina foi adicionado ao meio de cultura como agente seletivo, assegurando a manutenção de células transfectadas e eliminando aquelas não transfectadas.

3.3. LINHAGEM ESTÁVEL

3.3.1. Curva de antibiótico

O primeiro passo para estabelecer uma linhagem celular estavelmente transfectada é determinar a concentração ideal do antibiótico a ser utilizado para selecionar os clones celulares transfectados com o vetor de interesse. Essa concentração varia conforme o tipo de célula utilizado. Para isso, realiza-se uma curva de mortalidade, um experimento de dose-resposta no qual as células são expostas a concentrações crescentes do antibiótico. O objetivo é identificar a menor concentração necessária para eliminar completamente as células em um período de uma semana.

No experimento, células foram plaqueadas em densidades de 7×10^3 e 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços, em duplicata. Após aproximadamente 24 horas de adesão, momento em que atingiram cerca de 70% de confluência, o meio foi trocado por meio fresco contendo diferentes concentrações de puromicina: 0, 0,01, 0,05, 0,08, 0,10, 0,15, 0,18, 0,20 e 0,30 $\mu\text{g/mL}$. O tratamento foi mantido por 7 dias, com troca do meio contendo antibiótico a cada 72 horas.

A análise visual das células foi realizada diariamente, com registro fotográfico. A determinação das doses foi baseada nos seguintes critérios (Mirus Bio, 2023):

- Baixa dose: menor concentração de antibiótico que resulta em toxicidade mínima visível mesmo após 7 dias de tratamento.
- Dose ideal: menor concentração de antibiótico capaz de eliminar todas as células em uma semana.
- Alta dose: concentração em que a toxicidade visível é evidente dentro dos primeiros 2 a 3 dias de tratamento.

Esse procedimento é essencial para garantir a eficácia e a reprodutibilidade no estabelecimento de linhagens celulares estáveis.

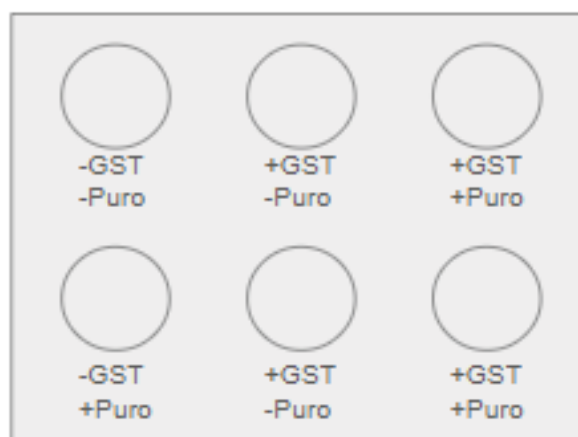
3.3.2. Transfecção

Células HeLa foram plaqueadas (4×10^5) em placa de 6 poços um dia antes do ensaio. Após aderência de 24 horas, foi realizada a transfecção em 4 dos poços, usando um mix contendo 2 μg de plasmídeo com polietilenimina (PEI), polímero que condensa o DNA em pequenas partículas que serão endocitadas, seguindo a proporção 1 μg de plasmídeo:3 μg de PEI e 500 μL de opti-MEM. O mix foi vortexado e deixado sob repouso por 15 minutos. Após este tempo, foi gotejado sobre a placa contendo 1,5ml de meio completo. No dia seguinte o meio foi aspirado, as células lavadas 2 vezes com PBS a 37°C e novo meio completo adicionado às placas.

3.3.3. Seleção

No experimento, os poços foram organizados de forma a permitir a comparação entre condições transfectadas e não transfectadas. Dois poços com HeLa não transfectada foram designados como controles: o primeiro foi incubado apenas com meio completo, enquanto o segundo recebeu meio suplementado com o antibiótico seletivo puromicina. Os outros quatro poços, contendo células transfectadas, foram organizados em duplicatas. A primeira duplicata foi mantida apenas em meio completo, enquanto a segunda duplicata foi tratada com o antibiótico seletivo na concentração determinada pela curva de mortalidade para promover a seleção das células transfectadas (Figura 6).

FIGURA 6 - PLAQUEAMENTO COM MAPA DE TRATAMENTO PARA LINHAGEM ESTÁVEL



Nota: Ausência de plasmídeo (-GST), presença de plasmídeo (+GST), ausência de antibiótico puromicina (- Puro), presença de puromicina (+ Puro).

FONTE: A autora (2024)

Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram incubadas em meio DMEM de alta glicose, suplementado ou não com puromicina na concentração ideal de 0,1 µg/mL. As células foram lavadas regularmente, e o meio contendo antibiótico foi renovado a cada 72 horas durante os primeiros 9 dias pós-transfecção. Após esse período inicial, o meio foi trocado duas vezes por semana, até que as placas de interesse apresentassem alta confluência celular.

3.3.4. Expansão

Após alcançarem alta confluência, os poços contendo células transfectadas e selecionadas foram denominados POLI 1 e POLI 2, em referência à natureza policlonal dessas populações celulares. As linhagens resultantes passaram por sucessivas etapas de expansão, sempre com meio de cultura suplementado com 0,1 µg/mL de puromicina. Inicialmente elas foram transferidas para placas de 60 mm e, em seguida, para placas de

100 mm. Esse processo de expansão teve como objetivo gerar uma quantidade suficiente de células para o armazenamento. Por fim, foram obtidos 14 criotubos (vials) de cada linhagem (POLI), as quais foram devidamente congelados em nitrogênio líquido para assegurar sua preservação a longo prazo.

3.4. TRATAMENTO COM MODULADORES COMERCIAIS

Os moduladores comerciais utilizados nos experimentos foram o sulforafano e a trigonelina. O sulforafano foi empregado em uma concentração de 5 μM , com dois tempos de incubação estabelecidos para o tratamento: 8 e 16 horas, baseados em estudos prévios realizados pelo grupo. Por sua vez, a trigonelina foi testada em concentrações crescentes de 0, 50, 100, 150 e 200 μM , faixa de concentrações descrita em trabalhos anteriores (Fouzder et al., 2021; Qin et al., 2017). Após os testes iniciais, foi determinada a concentração de 150 μM como padrão para os ensaios subsequentes.

A trigonelina demonstrou um tempo de resposta aproximado de 36 horas. Por essa razão, os experimentos posteriores com sulforafano empregaram o intervalo de 36 horas, a fim de padronizar o tempo de exposição entre os dois moduladores e garantir consistência nos ensaios realizados com a plataforma.

3.5. ENSAIO DE GENE REPÓRTER

3.5.1. Obtenção dos lisados de poli 1 e poli 2

As células POLI foram plaqueadas (5×10^5) em placas de 35 mm. No dia seguinte, foram tratadas como descrito em 3.4. Após os tratamentos, elas foram lavadas 2 vezes com PBS e lisadas com o tampão “passive lysis buffer” do kit da Promega (Dual-Luciferase Reporter Assay System. E1910), previamente diluído 1:4 em água miliQ. Foram adicionados em cada placa de 35mm, 250 μL da solução diluída do tampão de lise e utilizou-se cell scraper para raspar as células. As células coletadas foram transferidas para um microtubo e deixadas em gelo por 30 minutos. Foram então centrifugadas a 12.000g, por 12 minutos a 4°C. O lisado (sobrenadante) foi transferido para outro microtubo e o pellet descartado.

3.5.2. Luminescência

Os lisados celulares em tampão de lise passiva (Promega) foram analisados quanto a atividade da enzima luciferase por luminescência em leitor de microplacas (Tecan RChisto Infinite M200). Para esta determinação, foram utilizados 100 μL de Luciferase Assay Reagente II (LAR II) do kit Dual-Luciferase Reporter Assay System E1910) e 20 μL de amostra. Após o preparo da mistura reacional, a luminescência foi determinada imediatamente nas seguintes condições: intervalos de 0, 30 e 60 seg, a 25°C. O resultado

da luminescência foi ainda dividido pela concentração proteica obtida através do resultado da absorvância da amostra.

3.5.2.1. Análise estatística

As médias \pm D.P. de valores experimentais de 3-5 experimentos independentes serão utilizadas. As análises estatísticas foram realizadas usando testes one-way ANOVA, feitos no software GraphPad, com base nas médias de luminescência normalizadas pela concentração proteica para cada grupo de tratamento.

3.6. BRADFORD

A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o método de Bradford. O reagente de Bradford foi preparado em uma diluição de 1:4 com água ultrapura (Milli-Q). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 120 μ L do reagente diluído e 1 μ L do extrato celular para cada amostra, em duplicata. Para a construção da curva padrão, foram utilizados 0-5 μ L de albumina bovina (BSA), pipetados de uma solução 0,94 μ g/ μ L. A absorvância das amostras foi medida em 595 nm em leitor de microplacas, permitindo a determinação da concentração proteica com base na comparação com a curva padrão.

3.7. WESTERN BLOTTING

Após a quantificação das proteínas, alíquotas de 30 μ g de proteína foram misturadas com tampão de amostra redutor, aquecidas a 90°C por 10 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando o sistema semidry (Pharmacia Biotech Nova Blot) em tampão de transferência (39 mM de glicina, 48 mM de Tris, 0,04% de SDS e 20% de metanol), sob corrente constante de 1 mA/cm² durante 1 hora.

As membranas foram lavadas cinco vezes com tampão TBST (Tris-buffered saline com 0,02% Tween 20), cada lavagem durando 5 minutos. As membranas foram bloqueadas com uma solução de 3% de leite desnatado por 20 minutos à temperatura ambiente em gangorra à velocidade média. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 5 vezes novamente, por 5 minutos cada e incubadas com anticorpos primários anti-NRF2 (1:1000) ou anti- β -tubulina (1:1000), diluídos em 3% de leite desnatado, overnight a 4°C sob agitação constante. Após a incubação, realizaram-se cinco lavagens subsequentes com TBST, e as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-rabbit IgG (1:10000) ou anti-mouse IgG (1:5000), diluídos em leite desnatado a 3%, durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram novamente lavadas cinco vezes com TBST, com 5 minutos para cada lavagem, e submetidas ao processo de revelação. As reações foram desenvolvidas utilizando substrato ECL, altamente sensível (SuperSignal West Dura). As bandas de proteínas foram detectadas em equipamento fotodocumentador GE.

3.8. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células HeLa, POLI 1 e POLI 2 foram semeadas em lamínulas de 13 mm de diâmetro, posicionadas em placas de 24 poços, utilizando uma densidade de 4×10^4 células por poço, em meio completo. As células foram incubadas overnight para adesão. O experimento foi dividido em três grupos: o primeiro consistiu de um poço contendo células HeLa parentais, o segundo grupo incluiu quatro poços com células POLI 1 e o último incluiu 4 poços de células POLI 2. No dia seguinte foram lavadas duas vezes com PBS e 4 poços (2 poços de POLI 1 e 2 poços de POLI 2) foram incubados com $5 \mu\text{M}$ de sulforafano por 16 horas em 37°C em meio completo, enquanto os demais poços foram incubados somente com meio completo. Após 3 lavagens com PBS, foram fixadas com 2% formaldeído por 20 minutos e os grupos aldeídos bloqueados com 125 mM glicina por 10 minutos. O bloqueio e permeabilização foi feito com 1% BSA e 0.1% de saponina, respectivamente, ambos em PBS, por 20 minutos. Após o bloqueio, foi realizada incubação overnight com anticorpo primário anti-luciferase (#G745A) 1:50 na solução de bloqueio a 4°C . Esse bloqueio ocorreu no poço de HeLa parental em um dos poços de POLI 1 sem tratamento e em um poço de POLI 1 tratado anteriormente com sulforafano. O mesmo foi feito na POLI 2 (Figura 7). As células foram lavadas 3 vezes de 5 minutos cada lavagem, com 0.1% de saponina em PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488, acoplado a um fluoróforo (1:300), por 50 minutos na solução de bloqueio. Finalmente se realizaram 3 lavagens de 5 minutos, com PBS e a lamínula foi mergulhada em água milli Q e montada com solução de DAPI – glicerol (1:1000 – 50% glicerol) para marcação de núcleo.

FIGURA 7 - PLAQUEAMENTO COM MAPA DE TRATAMENTO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA



FONTE: A autora (2024)

3.9. RT-qPCR

Para o ensaio de qPCR, células parentais foram plaqueadas em densidade de 5×10^5 células em três placas de 35 mm de diâmetro. No dia seguinte, duas das placas receberam tratamento: uma foi exposta a sulforafano e a outra a trigonelina. Após 36 horas de incubação, RNA total foi isolado para análise dos efeitos dos tratamentos nos níveis de expressão gênica de NRF2 e genes alvo da NRF2.

3.9.1. Extração de RNA

Para extração de RNA foi adicionado 1mL de Trizol em cada placa e estas foram incubadas por 5 minutos. Após a incubação, o lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL. Após adição de 250 μ L de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 3 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após separação de fases, a fase superficial (aquosa) foi cuidadosamente transferida para outros microtubos, nos quais também foram adicionados 500 μ L de isopropanol e novamente homogeneizado por inversão. Após 10 minutos de incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C para formar pellet. O sobrenadante então foi removido e foi adicionado 1mL de etanol 75% aos tubos, sem desmanchar o pellet. Os tubos foram novamente centrifugados, agora a 6.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet foi deixado secar em temperatura ambiente. O pellet seco foi dissolvido em 50 μ L de água DPEC e armazenado em freezer -80°C.

3.9.2. Quantificação e controle de qualidade das amostras

As amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop, empregando o software nativo do dispositivo para realizar as medições. A integridade do RNA isolado foi avaliada em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio como corante fluorescente. Em cada poço do gel, foram pipetados 2000 ng de RNA, e a eletroforese foi conduzida a uma voltagem de 75 V por 1 hora. Após a corrida, as bandas resultantes foram visualizadas e analisadas utilizando um sistema de fotodocumentação específico para este tipo de ensaio.

3.9.3. Obtenção de cDNA por transcrição reversa (RT)

O RNA (cerca de 1 µg) foi convertido em cDNA em reação da transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen). Para isso, 1 µg de RNA foi adicionado na mistura do kit, contendo 2 µL de RT Buffer 10x, 0,8 µL de dNTP mix 25x, 2 µL de Random Primers, 1 µL de Transcriptase e Água DPEC para completar para 10 µL de reação. Após isso, a reação foi colocada em termociclador. O protocolo segue 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C e hold a 4°C.

3.9.4. qPCR

Os primers para o ensaio do PCR quantitativo (qPCR) foram desenhados manualmente de forma que os amplicons tenham cerca de 100 bp (Quadro 1). Usou-se o programa Oligoanalyzer da IDT para excluir primers que possam dimerizar ou formar hairpin. A validação de cada par de primers foi realizada como descrito (ALARTA, 2023). Serão avaliadas as expressões dos genes alvo de NRF2: heme oxigenase 1 (HMOX1), gama glutamil cisteína ligase (GCLM) e NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) (Quadro 1).

QUADRO 1 - PRIMERS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE qPCR

GENE	FORWARD	REVERSE	AMPLICON
HMOX	5'-CCAGCAACAAAGTGCAAGATTC-3'	5'-CCACCAGAAAGCTGAGTGTAAG-3'	117 pb
NQO1	5'-CAGCGGCTTTGAAGAAGAAAG-3'	5'-GGTCCTTCAGTTTACCTGTGAT-3'	108 pb
GCLM	5'-GGGCACAGGTAACCAA-3'	5'-CAGAAAGCAGTTCTTTGG-3'	135 pb

FONTE: A autora (2024)

O cDNA foi analisado quanto a expressão relativa dos genes, em relação a expressão de dois genes de expressão constitutiva (HPRT e GAPDH), utilizando um termociclador StepOne (Applied Biosystem) e o reagente SYBR Green (Invitrogen).

Nesta reação foi utilizado 1,5 μ L de cDNA + 3 μ L de master mix do próprio kit e 5 μ M de cada primer (5 μ M Forward + 5 μ M Reverse) para cada reação. Nas reações controle, onde o primer ou a amostra não foram utilizados, água, também do kit, foi utilizada no lugar. As reações foram feitas em duplicatas.

A análise dos dados obtidos pela RT-qPCR foi realizada por meio do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, pelo Excel, por planilha previamente estruturada pela professora Sheila Maria Brochado Winnischofer do departamento de Bioquímica da UFPR.

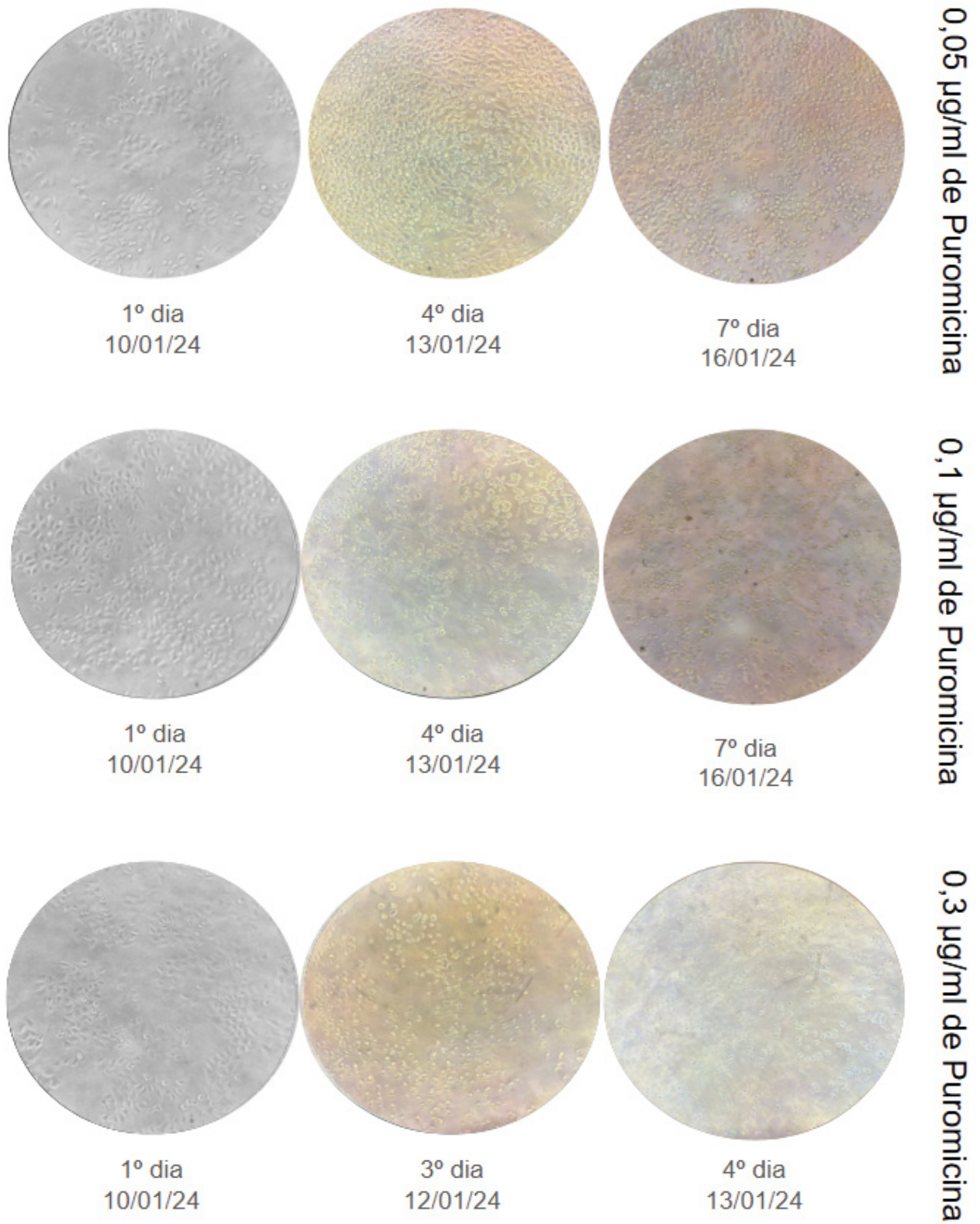
4. RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DE LINHAGEM ESTAVELMENTE TRANSFECTADA

Com o vetor confirmado, a próxima etapa foi a determinação da concentração adequada do antibiótico utilizado para a seleção de clones celulares. O objetivo principal desse procedimento é determinar a menor concentração do antibiótico necessária para eliminar completamente as células não resistentes em um período de sete dias. Este ensaio foi realizado com a células parental HeLa.

Foram feitos registros fotográficos diários das células Hela tratadas com diferentes concentrações de puromicina (Figura 8).

FIGURA 8 - REGISTROS FOTOGRÁFICOS DA CURVA DE MORTALIDADE, UTILIZANDO CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ANTIBIÓTICO EM HeLa



Nota: Na concentração de 0,05 µg/mL (primeira linha), houve um aumento progressivo na densidade celular, com confluência total no 7º dia, indicando que essa concentração não foi suficiente para eliminar as células. Na concentração intermediária de 0,1 µg/mL (segunda linha), observou-se um declínio gradual das células, culminando na ausência de células no 7º dia, representando a dose ideal para a seleção. Por fim, na concentração de 0,3 µg/mL (terceira linha), os efeitos de toxicidade foram evidentes já no 3º dia, com a completa eliminação das células no 4º dia, indicando que essa dose é excessivamente elevada para o experimento. Objetiva de 20x.

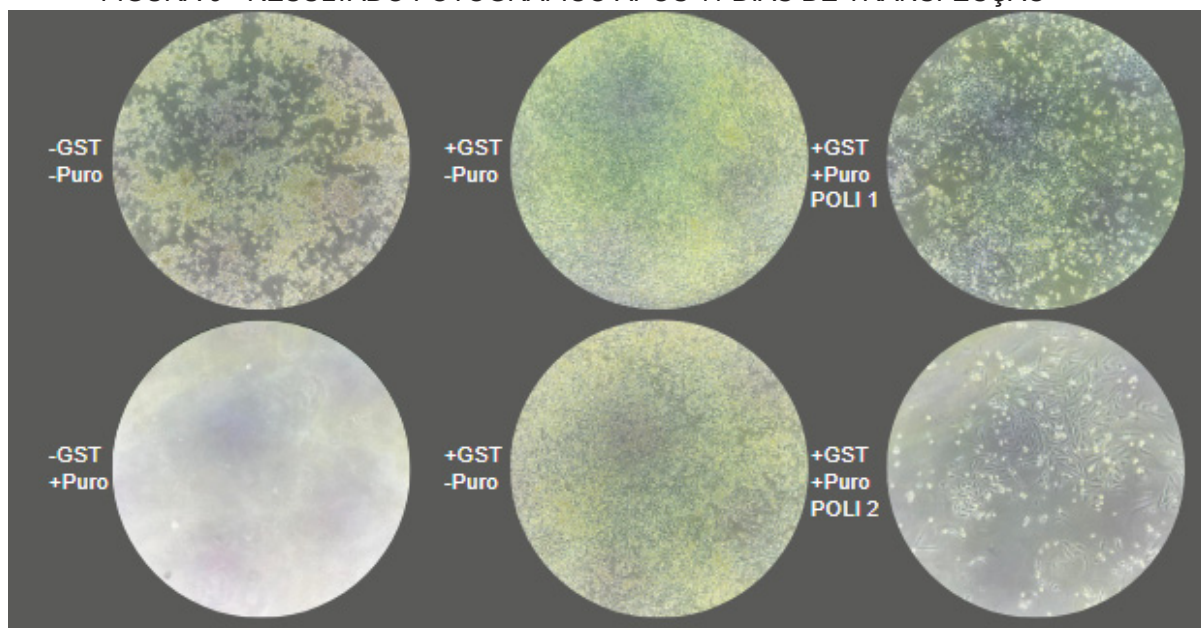
FONTE: A autora (2024)

Após análise visual e do registro fotográfico diário, chegou-se a conclusão abaixo de determinação de doses:

- Dose baixa - 0,05 µg/ml de puromicina
- Dose ideal - 0,1 µg/ml de puromicina
- Dose alta - 0,3 µg/ml de puromicina

Após determinação de dose ideal, foi realizada a transfecção nas células HeLa. Após 48 horas da transfecção, o antibiótico na concentração ideal foi adicionado ao meio de dois poços transfectados e 1 não transfectado. Onze dias após a transfecção (9 dias de puromicina) obtivemos a seleção conforme Figura 9.

FIGURA 9 - RESULTADO FOTOGRÁFICO APÓS 11 DIAS DE TRANSFECÇÃO



Nota: Resultado da transfecção e seleção com puromicina em células HeLa após 11 dias. O poço sem plasmídeo e sem puromicina apresentou crescimento excessivo, com perda de células devido à falta de espaço e ausência de pressão seletiva. No poço sem plasmídeo e com puromicina, todas as células foram eliminadas.

Os poços com plasmídeo, mas sem puromicina, demonstraram recuperação após perda inicial de células, alcançando confluência total. Nos poços com plasmídeo e puromicina, houve perda significativa de células pela pressão seletiva, mas ambos os poços atingiram boa confluência; a POLI 2 apresentou menor densidade celular em comparação à POLI 1.

FONTE: A autora, 2024

A análise das imagens revela o impacto do antibiótico seletivo, a eficiência da transfecção, bem como a seletividade do antibiótico na eliminação de células não transfectadas. O crescimento exagerado no poço sem plasmídeo e sem puromicina destaca a ausência de pressão seletiva para manter populações celulares homogêneas. A eliminação completa no poço sem plasmídeo e com puromicina confirma a eficácia do antibiótico na seleção, reforçando que células não transfectadas não possuem resistência à puromicina. Nos poços com plasmídeo e sem puromicina, o retorno à confluência sugere que, apesar da perda inicial devido à transfecção, as células mantêm viabilidade. Por fim, nos poços com plasmídeo e com puromicina, a pressão seletiva eliminou células não transfectadas, resultando em populações resistentes a puromicina, que seriam então, células transfectadas com o plasmídeo. A diferença de confluência entre POLI 1 e POLI 2 pode estar relacionada a variabilidades na eficiência da integração do plasmídeo ou na resposta ao antibiótico. Esses resultados reforçam a importância da seleção com antibióticos para garantir a obtenção de linhagens celulares estáveis e geneticamente modificadas.

Após seleção, as linhagens POLI 1 e POLI 2 foram expandidas, mantendo a puromicina (0,1 µg/mL) como agente seletor, demonstrando que obtivemos duas linhagens viáveis contendo o plasmídeo de interesse.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS POLI 2

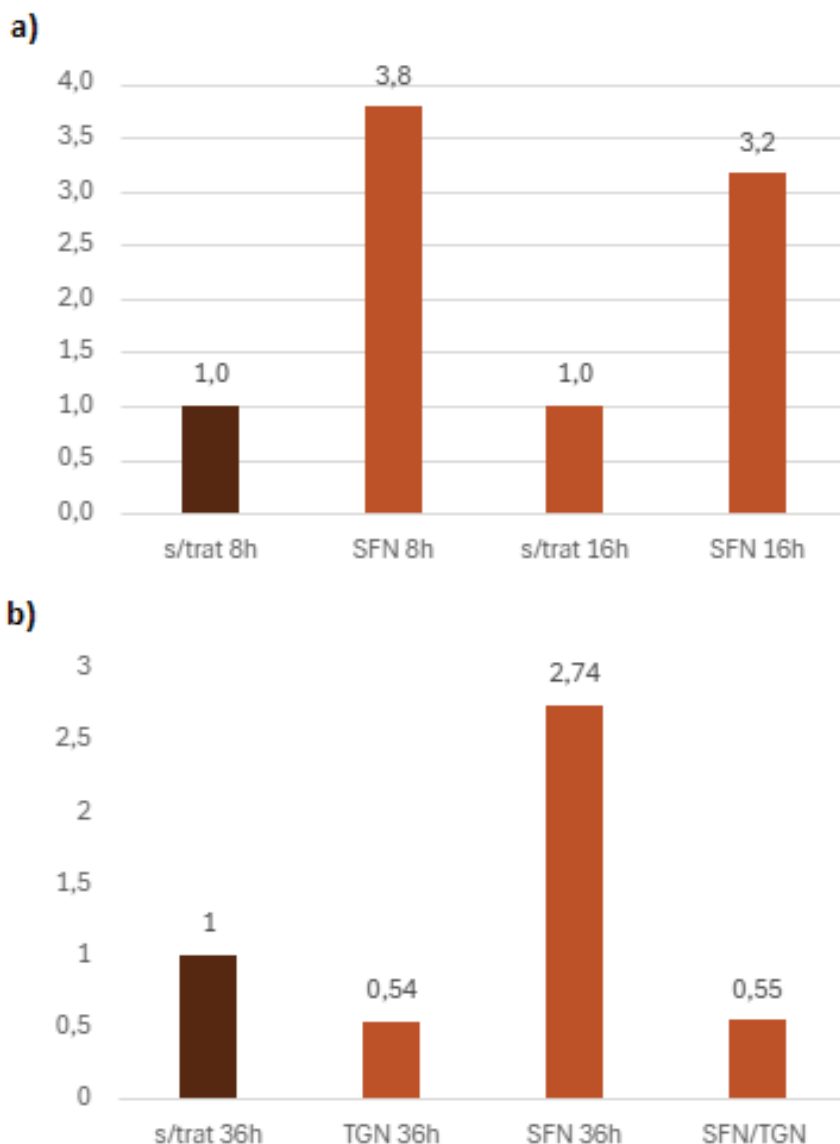
4.2.1. Expressão de Luciferase

O ensaio de luminescência em células estavelmente transfectadas com plasmídeo contendo ARE-luc (elemento de resposta ao antioxidante ligado à luciferase) é uma abordagem eficaz para avaliar moduladores de NRF2, pois permite medir de forma sensível, rápida e quantitativa a ativação desta via de sinalização. O elemento ARE, que é reconhecido por NRF2 translocada ao núcleo celular, induz a expressão do gene luciferase, gerando luminescência proporcional à ativação de NRF2. A luciferase só é expressa quando NRF2 se liga ao ARE, garantindo alta especificidade do ensaio para a avaliação dessa via, o que a torna uma ferramenta poderosa para estudar a modulação de NRF2 em diferentes condições experimentais. Sabendo disso, tratamos a linhagem POLI 2, que contém o ARE *upstream* à sequência da luciferase, para avaliar a luminescência pós tratamento com inibidor e ativador de NRF2, em comparação com controle sem tratamento. O resultado da luminescência foi ainda dividido pela concentração proteica obtida através do resultado da absorbância da amostra. Esse cálculo é utilizado para normalizar a quantidade de proteínas, ajustando os valores de luminescência com base na quantidade de proteína presente, o que ajuda a compensar variações na concentração de proteínas entre as amostras. Esse tipo de normalização é essencial para garantir que as diferenças observadas na

luminescência sejam devidas à modulação da via de interesse (como NRF2) e não a variações na quantidade de proteína total.

Foram realizados 5 ensaios independentes com tempos de 8 e 16h e 3 ensaios independentes com tempo de 36h, dos quais a média foi calculada e normalizada de acordo com o controle das amostras de interesse (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - MÉDIA NORMALIZADA DE LUMINESCÊNCIA.



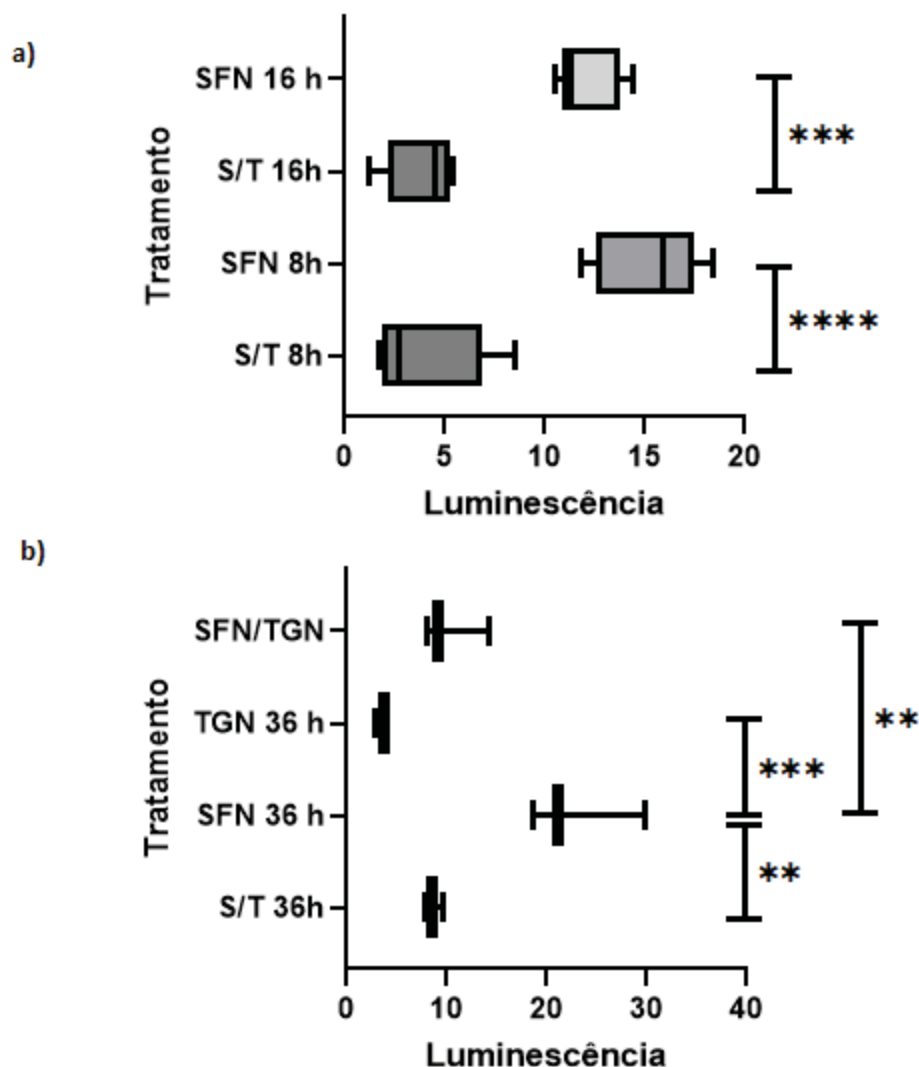
NOTA: Gráfico 1-a) Média normalizada de 5 ensaios independentes, onde cada tempo (8 e 16h) possui seu controle sem tratamento (s/trat) e o grupo de interesse tratada com 5 μ M sulforafano (SFN). Nesta normalização os grupos controles foram padronizados com valor de 1,0 e os grupos tratados, normalizados com base no valor do grupo controle, o cálculo se deu por I/C , onde I = média dos quocientes de lum/abs dos 5 ensaios do grupo de interesse, e C = média dos quocientes de lum/abs dos 5 ensaios do grupo controle. Gráfico 1-b) Média normalizada de 3 ensaios independentes, com tempo de 36h para os 3 primeiros grupos e 52h para o último grupo (SFN/TGN), o qual foi tratado com sulforafano para superexpressão de NRF2 e após 16h foi tratado com trigonelina por mais 36h. Os grupos foram normalizados pelo controle sem tratamento (s/trat). 150

μ MTGN, refere-se ao grupo tratado com trigonelina e SFN ao grupo que recebeu tratamento com sulforafano. Nesta normalização o grupo controle foi padronizado com valor de 1,0 e os grupos tratados, normalizados com base no valor do grupo controle, o cálculo se deu por I/C , onde I = média dos quocientes de lum/abs do grupo de interesse, e C = média dos quocientes de lum/abs do grupo controle.

FONTE: A autora, 2024.

No Gráfico 1-a, para cada um dos quatro grupos analisados foi considerado os dados dos 5 ensaios independentes e calculada a média de cada um dos resultados de luminescência normalizados pela concentração proteica. Os dois primeiros grupos foram tratados por 8 horas e os dois últimos por 16 horas. O grupo controle, sem tratamento, foi padronizado com valor 1,0 para ambos os tempos. Nos tratamentos com sulforafano, foi feita normalização usando a média da luminescência normalizada do grupo de interesse, dividida pela média da luminescência normalizada do grupo controle. Os valores obtidos foram de 3,8 para 8h e 3,2 para 16h. No Gráfico 1-b, que mostra os resultados de tratamentos com sulforafano e trigonelina por 36 horas, os dados foram derivados de três ensaios independentes e normalizados pelo grupo controle, assim como no Gráfico 1-a. Os valores obtidos foram: para o grupo controle sem tratamento (S/T) o valor padronizado, 1,0, para o grupo tratado com trigonelina (TGN) 0,54, para sulforafano (SFN) 2,74 e para o grupo tratado com sulforafano por 16h seguido de trigonelina por mais 36h (SFN/TGN) foi 0,55. Ao analisar os resultados do gráfico 1-a, podemos inferir que o sulforafano ativa a via de NRF2 de maneira robusta, especialmente após 8 horas de tratamento. Já no Gráfico 1-b, os tratamentos realizados por 36 horas mostram comportamentos distintos, mas de acordo com o esperado. O grupo tratado com sulforafano isoladamente (SFN) apresentou um valor de 2,74, indicando uma indução contínua de NRF2, enquanto o tratamento com trigonelina (TGN) resultou em uma expressão significativamente menor (0,54), sugerindo que a trigonelina inibe a ativação de NRF2. O grupo tratado com SFN seguido de TGN (SFN/TGN) teve um valor de 0,55, indicando que a trigonelina pode reduzir a superexpressão induzida pelo sulforafano. Esses resultados sugerem que o sulforafano é um potente ativador de NRF2, enquanto a trigonelina pode exercer um efeito inibidor, possivelmente modulando a resposta redox celular, o que abre novas possibilidades para o estudo de compostos que podem regular a atividade dessa via de sinalização.

GRÁFICO 2 - ANÁLISE ONE-WAY ANOVA DE DADOS RESULTANTES DE LUMINESCÊNCIA



NOTA: Foi realizada análises estatísticas usando testes one-way ANOVA com os dados de luminescência. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0,0001$. S/T, sem tratamento; SFN, tratado com sulforafano; TGN, tratado com trigonelina; SFN/TGN, tratado com sulforafano e após 16 horas, tratado com trigonelina, incubado por mais 36h.

FONTE: A autora, 2024.

No gráfico 2-a, que mostra os grupos tratados por 8h e 16h com ou sem sulforafano, os dados indicam uma ativação significativa de NRF2 em resposta ao sulforafano. Especificamente, a comparação entre o grupo sem tratamento de 8h e o grupo tratado com sulforafano por 8h mostrou um valor de $P < 0,0001$, enquanto a comparação entre o controle e o tratamento com sulforafano por 16h resultou em um valor de $P < 0,001$. Esses resultados demonstram uma indução robusta da via de NRF2 pelo sulforafano tanto a curto

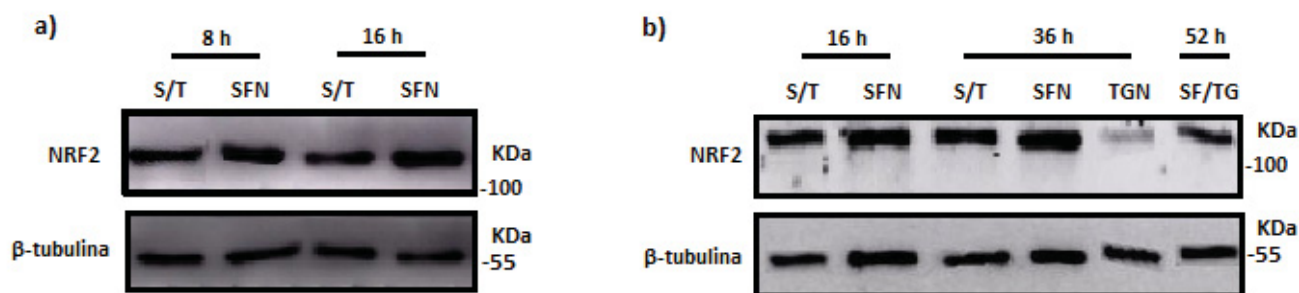
(8h) quanto a médio prazo (16h), evidenciando seu efeito ativador sobre essa via de sinalização.

Na Figura b, que apresenta dados de tratamentos realizados por 36h ou 52h, os resultados reforçam a indução do NRF2 pelo sulforafano e revelam o impacto da trigonelina. A comparação entre o grupo sem tratamento de 36h e o tratado com sulforafano por 36h mostrou uma diferença significativa ($P < 0,01$), indicando que o sulforafano continua a induzir a ativação de NRF2 ao longo de um período mais longo. Quando comparados o grupo tratado com sulforafano e o grupo tratado com trigonelina (36h), observou-se uma diferença ainda mais pronunciada, com $P < 0,001$, e $P < 0,01$ entre o sulforafano e a combinação sulforafano/trigonelina (52h).

4.2.2. Western Blotting

Para confirmar que a linhagem POLI 2 responde ao sulforafano (SFN) e à trigonelina (TGN), estimulando ou inibindo, respectivamente, a expressão de NRF2, foi analisada a expressão de NRF2 por Western Blotting (Figura 10). A β -tubulina foi utilizada como controle de proteína constitutiva. Na Figura 10-a, observou-se que, nas células POLI 2 tratadas com SFN, houve uma diferença estatística na expressão de NRF2, tanto após 8h quanto após 16h de tratamento, em comparação com o controle sem tratamento (S/T), nos mesmos tempos. Na Figura 10-b, foi realizada uma comparação entre os tempos de 16h e 36h para padronizar um único tempo de análise. Em ambos os tempos, as células tratadas com SFN apresentaram maior expressão de NRF2 em comparação com o grupo sem tratamento, demonstrando que, apesar da trigonelina necessitar de ao menos 36h para efeito de inibição, o sulforafano também apresentou alta atividade nesse tempo, possibilitando que o tempo padrão de tratamento fosse estabelecido em 36h. Além disso, o tratamento com TGN mostrou uma inibição na expressão de NRF2, enquanto a combinação de SFN seguido de TGN (16h + 36h) permitiu observar que a trigonelina foi capaz de inibir a superexpressão de NRF2 induzida pelo SFN. Embora para este segundo caso específico, o ideal seria um controle tratado com SFN por 16h seguido de 36h sem nenhum novo tratamento, os resultados adquiridos por esse tratado são bastante interessantes. Esses resultados indicam que a linhagem estável é responsiva a moduladores e que o sulforafano e a trigonelina têm efeitos opostos na expressão de NRF2 na linhagem POLI 2, sendo o SFN um ativador e a TGN um inibidor da expressão de NRF2.

FIGURA 10 - EXPRESSÃO DE NRF2 POR WESTERN BLOTTING



NOTA: Figura 10-a) Western blot (WB) de células POLI 2 tratadas ou não com 5 μ M sulforafano (SFN) por dois períodos de tempo: 8h e 16h. A β -tubulina foi utilizada como controle de proteína constitutiva, enquanto NRF2 foi a proteína de interesse. Observa-se um aumento significativo na expressão de NRF2 nos dois tempos de tratamento com SFN em comparação com o controle sem tratamento (S/T). Figura 10-b) Western blot de células POLI 2 tratadas com SFN e 150 μ M trigonelina (TGN) em três tempos diferentes. Inicialmente, foi realizada uma comparação entre os tempos de 16h e 36h para padronizar um único tempo de análise para os ativadores e inibidores. Em ambos os tempos, foi observado um aumento da expressão de NRF2 nas células tratadas com sulforafano (SFN) em comparação com o grupo não tratado (S/T). Além disso, foi incluído o tratamento com trigonelina (TGN), que demonstrou uma inibição da expressão de NRF2. Também foi analisado o efeito da trigonelina no cenário de superexpressão de NRF2, com o tratamento inicial com SFN por 16h seguido de trigonelina (+36h), para verificar se a trigonelina seria capaz de inibir uma superexpressão prévia.

FONTE: A autora, 2024.

4.2.3. Imunofluorescência

O experimento (Figura 11) foi estruturado em três grupos distintos: o primeiro compreendia um único poço com células HeLa parentais; o segundo grupo, quatro poços contendo células da linhagem POLI 1; e o terceiro grupo, quatro poços com células da linhagem POLI 2. Dois poços de cada uma das linhagens modificadas (POLI 1 e POLI 2) foram tratados com 5 μ M de sulforafano, incubados em meio completo a 37 °C por 16 horas. Os poços restantes continuaram a ser incubados nas mesmas condições, porém apenas com meio completo, sem a adição do composto.

A HeLa parental, durante o ensaio de imunofluorescência, foi incubada tanto com o anticorpo primário quanto com o secundário, esta é uma etapa crucial para estabelecer um controle negativo no experimento. Esse procedimento ajuda a determinar se há qualquer sinal de fluorescência de fundo causado por ligação inespecífica do anticorpo primário ou secundário, ou por autofluorescência intrínseca das células. Em outras palavras, serve para confirmar que a fluorescência observada nos grupos tratados com células geneticamente modificadas (POLI 1 e POLI 2) é específica para a interação do anticorpo primário com o antígeno-alvo, no caso, a proteína NRF2.

A inclusão dos quatro grupos de células POLI 1 e POLI 2 no ensaio é essencial para garantir a robustez, especificidade, e interpretação dos resultados, além disso, as POLIs

foram testadas da mesma maneira para analisar possíveis distinções entre elas. Cada grupo desempenha um papel crítico na análise dos efeitos do tratamento com sulforafano (SFN) e na validação do anticorpo primário contra NRF2.

O primeiro grupo (sem tratamento com SFN e sem anticorpo primário) funciona como um controle basal para a autofluorescência intrínseca das células geneticamente modificadas. Este grupo permite confirmar se há emissão de fluorescência independente de qualquer tratamento ou interação com anticorpos, eliminando a possibilidade de falsos positivos.

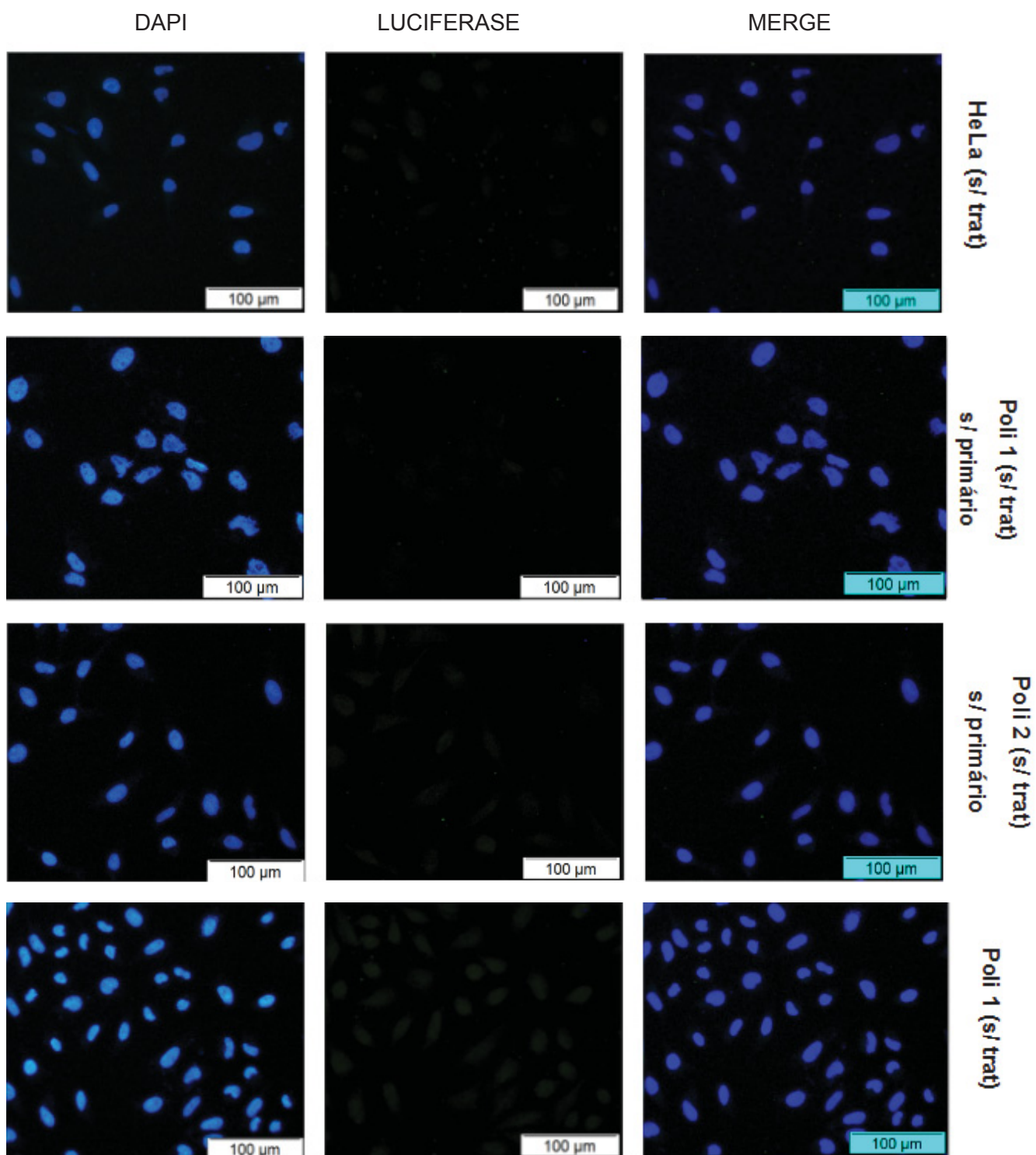
O segundo grupo (sem tratamento com SFN, mas com anticorpo primário) avalia o nível basal de expressão de NRF2 nas células modificadas. Ele permite identificar o sinal de fundo gerado pela interação entre o anticorpo primário e a NRF2 em condições sem estímulo. Este grupo é fundamental para verificar a especificidade da marcação basal e fornecer uma referência para comparação com os grupos tratados.

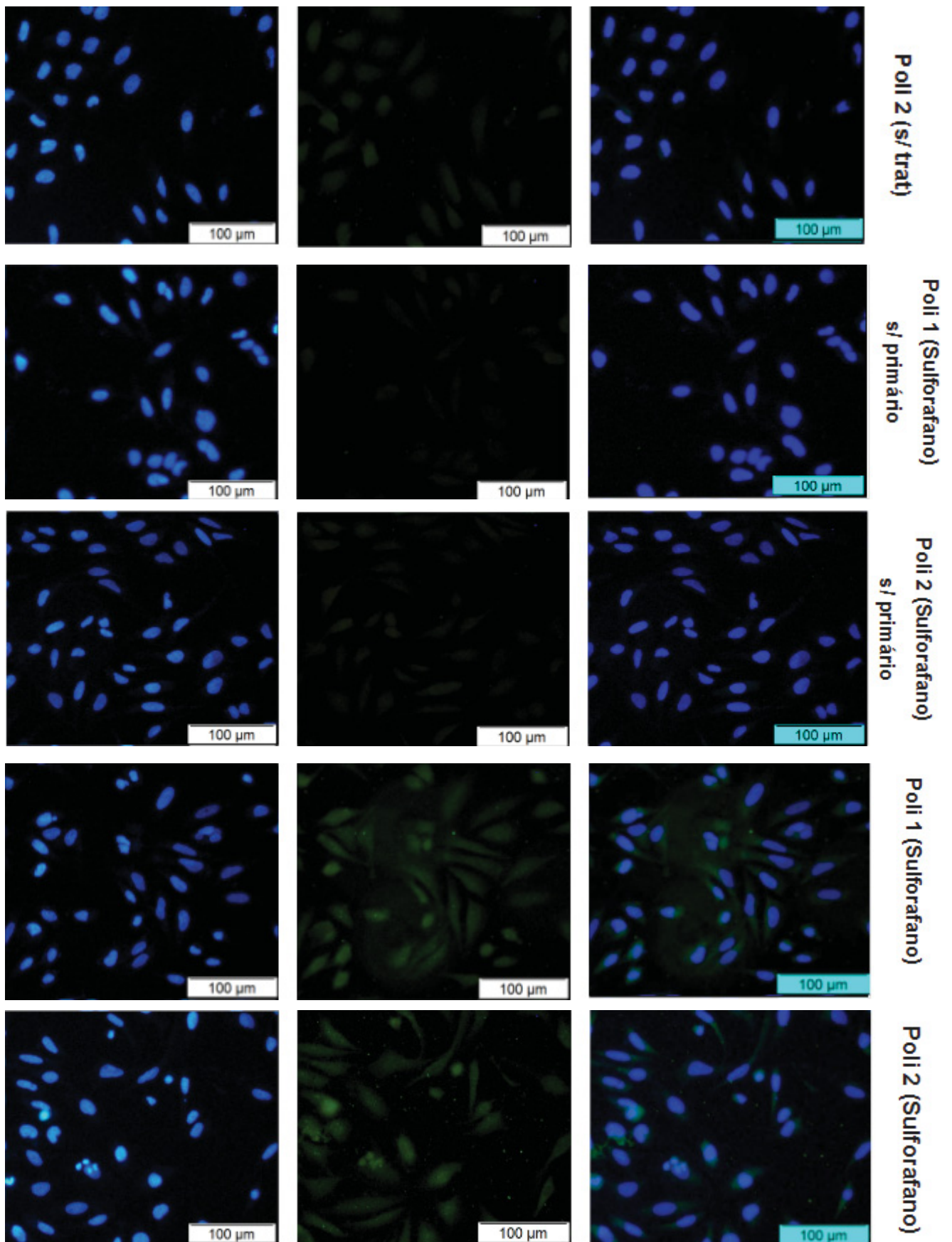
O terceiro grupo (tratado com SFN, mas sem anticorpo primário) é essencial para avaliar a possibilidade de fluorescência causada pelo tratamento químico em si ou por autofluorescência induzida. Sulforafano pode potencialmente alterar propriedades físicas das células, gerando emissões que precisam ser diferenciadas do sinal específico do anticorpo.

Finalmente, o quarto grupo (tratado com SFN e com anticorpo primário) é o grupo experimental chave que demonstra a interação entre o SFN, a indução de NRF2, e a detecção específica por anticorpos. Este grupo revela a eficácia do SFN como modulador da via NRF2 e é crucial para medir a resposta máxima do sistema experimental.

O uso desses quatro grupos é, portanto, indispensável para controlar variações experimentais e garantir que os resultados observados sejam específicos, reproduzíveis e interpretáveis, contribuindo para conclusões confiáveis sobre a ativação da via NRF2 e a validação do sistema de detecção.

FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE LUCIFERASE DO VETOR EM HeLa PARENTAL, POLI 1 E POLI 2.





Nota: Imunofluorescência de células HeLa parentais e com modificações genéticas (POLI 1 e POLI 2), utilizando anti-luciferase (1:50) como anticorpo primário e anti- Alexa fluor 488 (1:300)

como anticorpo secundário. 5 μ M de SFN foi utilizado como controle positivo de ativação de NRF2, promovendo a expressão da luciferase. Todas as células foram tratadas com anticorpo secundário, porém, apenas metade foi tratada com o primário, neste caso, aquelas não tratadas com o primário, foram utilizadas como controle. As imagens foram capturadas com um microscópio de fluorescência, objetiva 20x e software de elementos NIS. Fonte: A autora (2023).

Os resultados do ensaio de imunofluorescência trouxeram dados relevantes sobre o comportamento de células parentais HeLa e das linhagens geneticamente modificadas POLI 1 e POLI 2, que possuem o plasmídeo pGL4.22-ARE-luc-mGST, tanto em condições basais quanto após o tratamento com sulforafano. Esses resultados elucidam não apenas as diferenças na expressão de luciferase entre as células analisadas, mas também demonstram a funcionalidade do plasmídeo e a especificidade dos anticorpos utilizados.

Nas células HeLa parentais, a marcação nuclear com DAPI foi eficiente, confirmando a integridade estrutural dos núcleos e a eficácia do protocolo de coloração. No entanto, a ausência de fluorescência do Alexa Fluor 488, mesmo após o uso do anticorpo primário anti-luciferase, evidencia que a ativação basal de NRF2 em células não modificadas é insuficiente para gerar um sinal detectável no contexto experimental. Esses dados são coerentes com o entendimento de que, em condições normais, NRF2 permanece regulado pela interação com Keap1 e apresenta uma expressão limitada.

Nas células POLI 1 e POLI 2 não tratadas, observou-se um leve sinal fluorescente do Alexa Fluor 488 apenas nas amostras que receberam tanto o anticorpo primário quanto o secundário, indicando uma expressão basal de NRF2. Essa expressão limitada é esperada em células geneticamente modificadas, mesmo na ausência de estímulos externos, devido à presença do plasmídeo que amplifica a resposta à ativação da via ARE-NRF2. As amostras que receberam apenas o anticorpo secundário não apresentaram fluorescência, reforçando a especificidade do sinal para a detecção de NRF2.

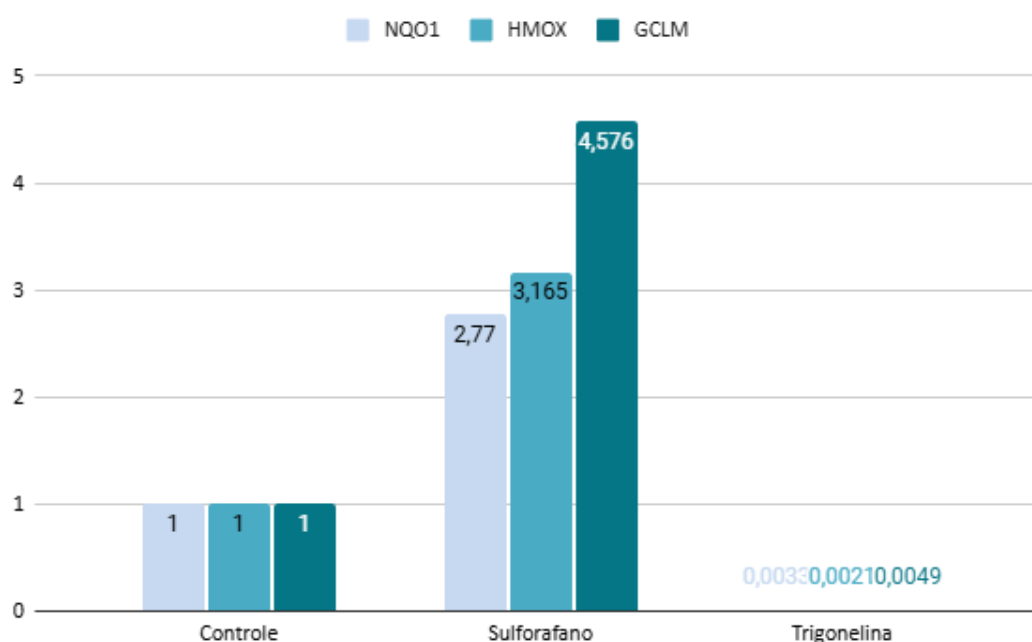
O comportamento mais expressivo foi observado nas células POLI 1 e POLI 2 tratadas com sulforafano, conhecido indutor da via NRF2. Nessas células, a fluorescência do Alexa Fluor 488 foi marcadamente intensa nas amostras que receberam ambos os anticorpos, indicando uma forte ativação de NRF2, que, por sua vez, induziu a expressão do gene repórter presente no plasmídeo. A ausência de fluorescência nas células tratadas que não receberam o anticorpo primário reforça a especificidade do protocolo e elimina a possibilidade de autofluorescência ou interferências não específicas.

Esses resultados são consistentes com o mecanismo de ação do sulforafano, que interrompe a interação entre Keap1 e NRF2, permitindo que este último transloque para o núcleo e ative genes regulados por ARE. O plasmídeo utilizado no estudo, que contém a sequência ARE-luc-mGST, foi projetado para amplificar essa resposta, gerando um sinal robusto e detectável em ensaios tanto de imunofluorescência quanto de luminescência.

4.2.4. RT-qPCR

Neste estudo, foi realizada uma análise de expressão gênica por RT-qPCR em células HeLa parentais para avaliar os efeitos de dois compostos — sulforafano e trigonelina — na regulação de genes alvo de NRF2: NQO1, HMOX1 e GCLM. O foco aqui foi a resposta endógena da via de NRF2 nas células, por este motivo utilizou-se células parentais sem plasmídeo. A normalização dos dados foi feita em relação ao controle, cuja expressão foi definida como igual a 1 (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DE NQO1, HMOX E GCLM EM RELAÇÃO AO CONTROLE



NOTA: Dados normalizados em relação ao controle (valor padrão 1,0). Azul claro representa dados de expressão do gene alvo NQO1, azul médio HMOX e azul escuro de GCLM. A técnica utilizada, demanda amostras em duplicata.

FONTE: A autora, 2024

Os resultados do gráfico 3 demonstraram que o sulforafano, em uma concentração de 5 μ M, foi altamente eficaz na indução da expressão dos genes avaliados. Especificamente, os níveis relativos de expressão alcançaram 2,77 para NQO1, 3,165 para HMOX1 e 4,576 para GCLM. Este perfil é consistente com o papel amplamente documentado do sulforafano como ativador da via NRF2, promovendo a desativação do complexo Keap1-NRF2 e permitindo a translocação nuclear do fator de transcrição para a ativação de genes antioxidantes e citoprotetores. A trigonelina, utilizada a uma concentração de 150 μ M como indutor de inibição, apresentou efeitos contrastantes. Os níveis de expressão dos genes alvo foram reduzidos, sendo 0,0033 para NQO1, 0,0021 para HMOX1 e 0,0049 para GCLM. Esses valores, próximos de zero, indicam que a trigonelina suprimiu a expressão dos genes regulados por NRF2 nas condições testadas.

Essa observação demonstra o efeito inibitório da trigonelina na via NRF2, possivelmente atuando no bloqueio de NRF2 ou interferindo em eventos a jusante, como a transcrição de genes regulados pelo elemento ARE.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A via de sinalização mediada por NRF2 tem sido amplamente investigada devido ao seu papel central na resposta ao estresse oxidativo e na manutenção da homeostase redox celular (BELLEZZA et al., 2018). Diante disso, o desenvolvimento de uma plataforma padronizada para a triagem de compostos moduladores dessa via se torna essencial para o avanço de estratégias terapêuticas direcionadas a doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Neste estudo, estabelecemos uma linhagem celular estável, derivada de células HeLa, contendo um plasmídeo com um gene repórter luciferase sob controle de elementos responsivos a NRF2, possibilitando a detecção sensível e quantitativa da atividade desta via.

Embora já existam plataformas para a triagem de moduladores de NRF2 (ALZAIN et al., 2023 e LEUNG et al., 2019; ALZAIN et al., 2023; ABED et al., 2015; BAIRD et al., 2013), o uso da linhagem HeLa geneticamente modificada oferece uma plataforma estável, permitindo a fácil replicação dos ensaios. Isso garante a reprodutibilidade e a confiabilidade dos experimentos, especialmente por se tratar de uma linhagem amplamente utilizada por grupos de pesquisa.

A plataforma utiliza ensaios de luminescência para avaliar a atividade funcional do gene repórter luciferase (MARTIN et al., 1996), cuja expressão é controlada por elementos promotores sensíveis à ativação de NRF2. No caso do plasmídeo pGL4.22-ARE-mGST, a sequência ARE está clonada a montante do gene repórter luciferase. Quando o NRF2 ativa o ARE, ocorre a transcrição do gene repórter, cujas expressão proteica e atividade enzimática é posteriormente quantificado, geralmente por meio da medição de blot, luminescência ou fluorescência. Essa abordagem proporciona alta sensibilidade na detecção de ativadores e inibidores da via (LEITÃO & DA SILVA, 2010), permitindo o rastreamento de grandes bibliotecas de compostos de maneira rápida e eficaz. Após a triagem inicial, os compostos selecionados são validados por qPCR, uma técnica que quantifica precisamente os níveis de expressão de genes-alvo (GINZINGER, 2002) de NRF2, como aqueles relacionados a respostas antioxidantes e destoxificação celular. Sendo assim, enquanto os ensaios de luminescência identificam alterações gerais na atividade de NRF2, a qPCR confirma e quantifica mudanças específicas na expressão de genes-alvo dessa via. Essa dupla abordagem reduz a probabilidade de falsos positivos e amplia a profundidade dos dados obtidos, algo que outras plataformas nem sempre oferecem. Essa combinação

de tecnologias é particularmente valiosa para o desenvolvimento de terapias contra o câncer, permitindo não apenas identificar inibidores eficazes de NRF2, mas também avaliar seu impacto em genes alvo específicos. Além disso, a plataforma pode ser usada para estudar ativadores de NRF2 em condições onde essa via tem um papel protetor, como doenças neurodegenerativas (NAMANI et al., 2014; CORENBLUM et al., 2016) e inflamações crônicas (NEZU et al., 2017). Essa versatilidade destaca a importância dessa abordagem no avanço de terapias direcionadas para múltiplas doenças.

A construção da linhagem celular estável foi confirmada pela seleção por antibiótico e pela expressão sustentada do gene repórter, assegurando que apenas células com a inserção plasmidial fossem mantidas na cultura, seguindo parâmetros de literatura (Mirus Bio, 2023). Ao realizar os ensaios de luminescência buscava-se detectar a expressão e atividade do gene repórter luciferase, cuja transcrição é iniciada após ligação de NRF2 à sequência ARE. A ativação dessa sequência ocorre em resposta à modulação positiva da atividade do NRF2. Sendo assim, ao analisar os dados de transcrição de luciferase, estamos também analisando a expressão de NRF2, indiretamente. Os dados de luminescência do Gráfico 1, correspondente às amostras tratadas com sulforafano, tiveram um aumento significativo de expressão de NRF2, se comparados com as amostras não tratadas, tanto a curto (8h) quanto médio prazo (16h). Esse efeito já foi amplamente descrito na literatura desde 1992, quando Zhang e colaboradores demonstraram que o sulforafano, derivado do precursor glucorafanina presente no brócolis, induz a expressão de enzimas de fase 2, um mecanismo atualmente reconhecido como mediado pela via NRF2-KEAP1. Em contrapartida, a trigonelina mostrou um efeito inibitório sobre a expressão de NRF2, como observado na redução significativa da luminescência nas células tratadas com este composto. Esse efeito inibitório da trigonelina também é corroborado por estudos anteriores (ALT et al., 2013). Um dos desafios enfrentados no estudo foi a otimização das condições experimentais para minimizar a variabilidade e assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Para superar esse obstáculo, realizamos além da padronização das concentrações dos compostos e das condições de cultura celular, a padronização dos tempos de incubação. A trigonelina necessita de um tempo maior para fazer efeito (36 horas). Buscando estabelecer esse padrão para a análise, submetemos as células tratadas com sulforafano a este mesmo tempo. A indução contínua observada no tratamento com sulforafano por 36 horas reforça seu papel como potente ativador dessa via, o que é de particular interesse, pois pudemos estabelecer 36 horas como sendo o tempo padrão de tratamento para este e posteriores estudos. A combinação de sulforafano e trigonelina resultou em uma diminuição na expressão de NRF2, sugerindo que a trigonelina pode atenuar a superexpressão prévia induzida pelo sulforafano, possivelmente através de uma modulação da resposta redox celular. Esse achado é interessante, pois implica em uma interação entre compostos que

pode ser explorada em terapias combinadas ou na regulação fina de vias antioxidantes. Nenhum trabalho anterior foi encontrado que abordasse a interação desses dois compostos, o que torna os dados ainda mais relevantes.

A análise estatística dos resultados de luminescência reforçou as conclusões observadas. As comparações entre os grupos de controle e os grupos tratados com sulforafano mostraram diferenças altamente significativas, confirmando que a linhagem produzida responde adequadamente ao sulforafano. A presença de diferenças significativas também entre os grupos tratados por 36h e 52h com sulforafano, trigonelina e suas combinações ($P < 0,01$ e $P < 0,001$) demonstrando a robustez dos dados e a clareza na diferenciação dos efeitos de cada composto.

Os resultados de Western blotting corroboram esses dados, indicando um aumento significativo na expressão de NRF2 nas células tratadas com sulforafano, além de uma diminuição na expressão de NRF2 daquelas tratadas com trigonelina. O Western blotting oferece a vantagem de fornecer informações sobre o peso molecular das proteínas detectadas, auxiliando na identificação precisa e na confirmação da integridade das proteínas alvo. Essa característica é especialmente útil para corroborar os achados de luminescência, garantindo que o sinal luminescente corresponda à proteína esperada e não a fragmentos ou proteínas não relacionadas.

Os ensaios de imunofluorescência forneceram informações complementares valiosas. A fluorescência observada nas células tratadas com sulforafano, que foi intensa nas linhagens POLI 1 e POLI 2, indicou uma alta transcrição do gene repórter luciferase, por meio da ativação de NRF2, corroborando os resultados de luminescência. A ausência de fluorescência nas células HeLa parentais e modificadas, em condições basais, reforçou a especificidade do sistema, pois evidenciou que as células não possuem níveis detectáveis de NRF2 ativado sem um estímulo externo. Além disso, o controle sem anticorpo primário, assegurou a validade dos dados, excluindo a possibilidade de autofluorescência ou sinais não específicos.

A técnica de RT-qPCR é essencial para validar resultados de luminescência, imunofluorescência e Western blotting, pois permite a quantificação precisa da expressão gênica em nível de mRNA. Enquanto métodos como imunofluorescência e Western blotting detectam a presença e a quantidade de proteínas específicas, o RT-qPCR complementa essas análises ao fornecer dados sobre a expressão dos genes correspondentes, garantindo uma correlação entre os níveis de mRNA e proteína. Essa abordagem integrada aumenta a confiabilidade dos dados experimentais e assegura a precisão na interpretação dos resultados (KEMMER et al., 2022). Os resultados de RT-qPCR, corroboram os resultados anteriores a nível molecular, de modo que consegue-se avaliar um aumento bastante significativo em genes alvo de NRF2 em células tratadas com sulforafano, bem

como demonstra efeito oposto em células tratadas com trigonelina, confirmando que o ensaio é bastante eficaz para confirmação de possíveis moduladores selecionados pela análise de gene repórter.

As análises integradas de luminescência, Western blotting, imunofluorescência e RT-qPCR evidenciam a capacidade do modelo em detectar alterações específicas na via de NRF2, inclusive validando o uso do plasmídeo como ferramenta para avaliar a atividade de NRF2 em resposta a moduladores químicos. Além de validar a funcionalidade da linhagem POLI 2, os ensaios ilustram a versatilidade do modelo em identificar compostos moduladores da via de NRF2. Este estudo também estabelece um arcabouço sólido para pesquisas futuras. A plataforma poderá ser expandida para a triagem de bibliotecas de compostos maiores e a incorporação de outras técnicas analíticas, como proteômica e metabolômica. A análise proteômica poderá fornecer informações detalhadas sobre as mudanças nos níveis de proteínas reguladas por NRF2, enquanto a metabolômica permitirá a identificação de vias metabólicas impactadas pelos compostos moduladores. Essas abordagens integrativas permitirão uma compreensão mais aprofundada da regulação da via NRF2 e suas interações com outras vias celulares, ampliando as possibilidades de intervenção terapêutica baseadas na modulação dessa importante via de sinalização.

Por fim, a proposta é economicamente vantajosa, pois o uso de uma única plataforma integrada otimiza os custos e o tempo necessários para identificar moduladores. Isso é particularmente relevante no desenvolvimento de medicamentos, onde o equilíbrio entre custo, eficiência e precisão é fundamental. Essa combinação de inovação técnica e abrangência funcional torna a nova plataforma uma ferramenta promissora, mesmo em um cenário já saturado por tecnologias concorrentes.

5.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1.1. Biblioteca metagenômica disponível para testes futuros

Teremos acesso a uma parte da biblioteca metagenômica de solo da Mata Atlântica (Faoro et al., 2010), em colaboração com o grupo do Prof. Marcelo Müller dos Santos (Depto. Bioquímica UFPR). Estão disponíveis 3 bibliotecas metagenômicas, totalizando cerca de 100.000 clones em bactérias armazenadas em placas de 96 poços.

A Mata Atlântica compõe um ambiente auto-sustentável, com alta deposição de material vegetal e metabolismo microbológico (GIRI et al., 2011). Ela se destaca como um dos biomas mais ricos em espécies e endemismos, alcançando taxas de 55% para espécies arbóreas e 40% para famílias de espécies não arbóreas (JOLY et al., 1991). A Mata Atlântica é considerada uma das regiões de maior biodiversidade do planeta e uma das mais ameaçadas do mundo (PEIXOTO, 1991). Caracterizados como ecossistemas

auto-sustentáveis, esses ambientes contam com a contribuição fundamental dos microrganismos. Eles desempenham papéis cruciais na decomposição da matéria orgânica, na mineralização de compostos orgânicos e na disponibilização de nutrientes essenciais para as plantas (MCGUIRE et al., 2012).

O solo representa um sistema altamente complexo, englobando uma diversidade de micro-habitats físicos caracterizados por diferentes gradientes e condições ambientais descontínuas. Pesquisas indicam que a estrutura do solo desempenha um papel crucial no armazenamento de água, nas trocas gasosas e no ancoramento das plantas, podendo influenciar a diversidade microbiana e até mesmo provocar alterações espaciais e estruturais na comunidade microbiana (RANJARD e RICHAUME, 2001; SESSITSCH et al., 2001). Esses micro-habitats proporcionam condições ideais para o crescimento microbiano, considerando a disponibilidade de água e substrato, além de oferecerem proteção contra predadores. Investigações revelam que o tipo e a quantidade de substratos orgânicos disponíveis exercem uma forte influência na abundância de grupos microbianos e em sua diversidade funcional nos ecossistemas do solo (DE FEDE e PANACCIONE, 2001; GRAYSTON et al., 2001). Estima-se que 1g de solo contenha mais de 10 bilhões de microrganismos, pertencentes a milhares de espécies ainda não identificadas devido à sua natureza não cultivável (AMANN et al., 1995). Recentemente, foram desenvolvidas bibliotecas metagenômicas do solo da Mata Atlântica (FAORO et al., 2010), que têm sido utilizadas para a busca de enzimas com potencial biotecnológico (FAORO et al., 2012; ALVES et al., 2012). Além disso, devido à presença de fragmentos de DNA de vias metabólicas completas, os produtos dessas vias podem ser prospectados como novas moléculas farmacológicas.

Considerando a imensa quantidade de novos possíveis metabólitos produzidos pelos organismos presentes no solo da Mata Atlântica, o potencial farmacológico destes compostos, e a disponibilidade de bibliotecas metagenômicas deste solo, torna-se muito interessante prospectar novos moduladores de NRF2.

5.1.2. Outras moléculas disponíveis

Além das bibliotecas metagenômicas previamente mencionadas, nossa pesquisa contará com a colaboração da Prof^a. Dra. Giovana Giopo Nunes, do Departamento de Química da UFPR, cuja expertise em polioxovanadatos oferece um conjunto promissor de compostos com potencial para modular a proteína NRF2, alvo principal deste estudo. Além disso, outros pesquisadores, que possuem bibliotecas de compostos químicos diversificados, demonstraram interesse em colaborar, disponibilizando seus acervos para investigações nesta pesquisa.

Dessa forma, a integração de diferentes fontes e colaborações interdisciplinares amplia consideravelmente as possibilidades de análise e descoberta de moduladores de NRF2. Essa abordagem colaborativa e o acesso a compostos inéditos em múltiplas instituições reforçam o caráter inovador e promissor da pesquisa, potencializando o impacto científico e translacional do estudo.

Sendo assim, para trabalhos futuros, recomenda-se a prospecção de moduladores da via NRF2 utilizando tanto bibliotecas metagenômicas quanto bibliotecas de compostos químicos, aproveitando as oportunidades de parceria com outros pesquisadores e a ampla diversidade molecular que essas fontes oferecem. A plataforma proposta, composta por dois métodos analíticos complementares, apresenta grande potencial para esse objetivo. A análise do gene repórter luciferase possibilita o screening eficiente de possíveis moduladores da via, enquanto a validação dos compostos candidatos por qPCR garante a confiabilidade e precisão na confirmação dos efeitos moleculares observados.

Esse enfoque permitirá a identificação de novos moduladores, abrangendo tanto ativadores quanto inibidores da via NRF2, abrindo caminho para o desenvolvimento de tratamentos inovadores para uma variedade de condições patológicas. Essa abordagem interdisciplinar oferece uma base robusta para explorar novas estratégias terapêuticas em áreas como oncologia, neurodegeneração, doenças metabólicas e inflamatórias, contribuindo para o avanço da ciência e da medicina.

6. REFERÊNCIAS

1. ABED, Dhulfiqar Ali et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1–Nrf2 protein–protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 4, p. 285-299, 2015.
2. ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends in pharmacological sciences**, v. 27, n. 12, p. 639-645, 2006.
3. ALARTA, C. L. S. Estudo in vitro sobre o efeito do sulforafano em células endoteliais expostas a toxinas urêmicas. **UFPR**. 2023.
4. ALVES, L.F.; MELEIRO, L.P.; SILVA, R.N.; WESTMANN, C.A.; GUAZZARONI, M.E. Novel Ethanol- and 5-Hydroxymethyl Furfural-Stimulated β -Glucosidase Retrieved From a Brazilian Secondary Atlantic Forest Soil Metagenome. **Front Microbiol.** 9:2556, 2018.
5. ALZAIN, A. A. et al. Modulation of NRF2/KEAP1-mediated oxidative stress for cancer treatment by natural products using pharmacophore-based screening, molecular docking, and molecular dynamics studies. **Molecules**, v. 28, n. 16, p. 6003, 2023.
6. AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** 59 (1): 143-169, 1995.
7. ANEDDA, A. et al. The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress. **Free radical biology and medicine**, v. 61, p. 395-407, 2013.
8. APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.
9. ARLT, A. et al. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. **Oncogene**, v. 32, n. 40, p. 4825-4835, 2013.
10. ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K.. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.
11. BAIRD, L. et al. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 38, p. 15259-15264, 2013.
12. BAIRD, L., & YAMAMOTO, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, 40(13). 2020.
13. BAGGER, F. O. et al. BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D917-D924, 2016.
14. BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **cell**, v. 120, n. 4, p. 483-495, 2005.
15. BANO, T.; KUMAR, N.; DUDHE, R. Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. **Organic and medicinal chemistry letters**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2012.
16. BELLEZZA, I. et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 5, p. 721-733, 2018.
17. BENDAVIT, G. et al. Nrf2 transcription factor can directly regulate mTOR: linking cytoprotective gene expression to a major metabolic regulator that generates redox activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 49, p. 25476-25488, 2016.
18. BOLLONG, M. J. et al. A small molecule inhibits deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer. **ACS chemical biology**, v. 10, n. 10, p. 2193-2198, 2015.
19. BURTON, N. C.; KENSLER, T. W.; GUILARTE, T. R. In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 1094-1100, 2006.
20. CANNING, P.; SORRELL, F. J.; BULLOCK, A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 101-107, 2015.
21. CAMERA, D. M.; SMILES, William J.; HAWLEY, John A. Exercise-induced skeletal muscle signaling pathways and human athletic performance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 131-143, 2016.
22. CAPUTO, F.; VEGLIANTE, R.; GHIBELLI, L. Redox modulation of the DNA damage response. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1292-1306, 2012.

23. CHEN, C. et al. Baicalin attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by amyloid β 1–42 protein. **Metabolic brain disease**, v. 30, p. 537-544, 2015.
24. CHORLEY, B. N. et al. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. 7416-7429, 2012.
25. CHOWDHRY, S. et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3765-3781, 2013.
26. CORENBUM, M. J. et al. Reduced Nrf2 expression mediates the decline in neural stem cell function during a critical middle-age period. **Aging cell**, v. 15, n. 4, p. 725-736, 2016.
27. CUADRADO, A. et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 4, p. 295-317, 2019.
28. DE DUVE, C. A. B. P.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). **Physiological reviews**, v. 46, n. 2, p. 323-357, 1966.
29. DE LA VEGA, M. R.; CHAPMAN, Eli; ZHANG, Donna D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. **Cancer cell**, v. 34, n. 1, p. 21-43, 2018.
30. DEBLASI, J. M.; DENICOLA, G. M. Dissecting the crosstalk between NRF2 signaling and metabolic processes in cancer. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 3023, 2020.
31. DE FEDE, Krista L.; PANACCIONE, Daniel G.; SEXSTONE, Alan J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG® community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 1555-1562, 2001.
32. DHAKSHINAMOORTHY, S. et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16891-16900, 2005.
33. DONE, A. J. et al. Exercise-induced Nrf2-signaling is impaired in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 96, p. 130-138, 2016.
34. EICHENMÜLLER, M. et al. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. **Journal of hepatology**, v. 61, n. 6, p. 1312-1320, 2014.
35. FAORO, H. et al. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Appl Environ Microbiol.** 76(14):4744-9, 2010.
36. FAORO, H, et al. Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS Microbiol Ecol.** 81(2):386-94, 2012.
37. FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377-388, 2015.
38. FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 1, p. 7-15, 2011.
39. FOUZDER, C. et al. Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 70, p. 105038, 2021.
40. FU, J. et al. Hyperactivity of the transcription factor Nrf2 causes metabolic reprogramming in mouse esophagus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 1, p. 327-340, 2019.
41. GALVÁN-PENÑA, S.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 420, 2014.
42. GAO, J. et al. 3D clusters of somatic mutations in cancer reveal numerous rare mutations as functional targets. **Genome medicine**, v. 9, p. 1-13, 2017.
43. GIRI, C. et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154-159, 2011.
44. GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits mainstream. **Experimental hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.
45. GOLDSTEIN, L. D. et al. Recurrent loss of NFE2L2 exon 2 is a mechanism for Nrf2 pathway activation in human cancers. **Cell reports**, v. 16, n. 10, p. 2605-2617, 2016.
46. GRAYSTON, S. J. et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4-5, p. 533-551, 2001.
47. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford university press**, USA, 2015.
48. HAMMAD, A.; NAMANI, A.; ELSHAER, M.; WANG, X.J.; TANG, X. "NRF2 addiction" in lung cancer cells and its impact on cancer therapy. **Cancer Lett.** 467:40-49, 2019.

49. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
50. HARDER, B. et al. Brusatol overcomes chemoresistance through inhibition of protein translation. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 5, p. 1493-1500, 2017.
51. HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. 1955.
52. HAYES, J.D.; MCMAHON, M.; CHOWDHRY, S.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. **Antioxid Redox Signal**. 13(11):1713-48, 2010.
53. HE, F.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 4, p. 405-416, 2020.
54. HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E.; MCMENAMIN, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney Int**. 58(6):2571-8, 2000.
55. HOLMSTROM, K. M. et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. **Biol Open** 2: 761-770 [em linha]. 2013.
56. IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1302-1309, 1988.
57. ITOH, K. et al. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes to cells**, v. 8, n. 4, p. 379-391, 2003.
58. JARAMILLO, M. C.; ZHANG, D. D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes & development**, v. 27, n. 20, p. 2179-2191, 2013.
59. JOLY, C.A., LEITÃO Filho, H.F. & SILVA, S.M. O Patrimônio Florístico. Pp. 96-128. In: Câmara, I.G., Cecchi, J.C. & Soares, M.S.M. (Coord.). **Mata Atlântica Rio de Janeiro, Editora Index e Fundação S.O.S. Mata Atlântica**. 1991
60. JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 4, p. C849-C868, 2008.
61. KAIDERY, N. A. et al. Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuate dopaminergic neurotoxicity in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 2, p. 139-157, 2013.
62. KAPPOS, L. et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. **The Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1463-1472, 2008.
63. KEMMER, S. et al. BlotIt—Optimal alignment of Western blot and qPCR experiments. **Plos one**, v. 17, n. 8, p. e0264295, 2022.
64. KEUM, Y-S; CHOI, B. Y. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10074-10089, 2014.
65. KHODAKARAMI, A. et al. The molecular biology and therapeutic potential of Nrf2 in leukemia. **Cancer Cell International**. v. 22, n. 1, p. 1-24, 2022.
66. KOMATSU, M. et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nature cell biology**, v. 12, n. 3, p. 213-223, 2010.
67. KOMBAIRAJU, P. et al. Genetic silencing of Nrf2 enhances X-ROS in dysferlin-deficient muscle. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 57, 2014.
68. KONSTANTINOPOULOS, P. A. et al. Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. **Cancer research**, v. 71, n. 15, p. 5081-5089, 2011.
69. KRAJKA-KUŹNIAK, V.; PALUSZCZAK, J.; BAER-DUBOWSKA, W. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. **Pharmacological reports**, v. 69, n. 3, p. 393-402, 2017.
70. KUBBEN, N. et al. Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1361-1374, 2016.
71. KWAK, M-K. et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. **Molecular and cellular biology**, 2002.
72. LAU, A.; VILLENEUVE, N.F.; SUN, Z.; WONG, P.K.; ZHANG, D.D. Dual roles of Nrf2 in cancer. **Pharmacol Res**. 58(5-6):262-70, 2008.
73. LAU, A. et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 13, p. 3275-3285, 2010.
74. LEE, D-F et al. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-κB signaling by targeting IKKβ. **Molecular cell**, v. 36, n. 1, p. 131-140, 2009.

75. LEE, C-H; YU, H-S. Role of mitochondria, ROS, and DNA damage in arsenic induced carcinogenesis. **Front Biosci** (Schol Ed), v. 8, n. 2, p. 312-320, 2016.
76. LEITÃO, J. MM; DA SILVA, J. CG Esteves. Firefly luciferase inhibition. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, n. 1, p. 1-8, 2010.
77. LEUNG, C-H et al. Emerging Screening Approaches in the development of Nrf2–Keap1 protein–protein interaction inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4445, 2019.
78. LI, B. et al. Sulforaphane ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by antagonizing oxidative stress and Th17-related inflammation in mice. **Experimental neurology**, v. 250, p. 239-249, 2013.
79. LI, H. et al. Nrf2/HO-1 pathway activation by manganese is associated with reactive oxygen species and ubiquitin–proteasome pathway, not MAPKs signaling. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 7, p. 690-697, 2011.
80. LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, p. 757-772, 2018.
81. LIU, N. et al. Upregulation of immunomodulatory molecules by matrine treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Experimental and molecular pathology**, v. 97, n. 3, p. 470-476, 2014.
82. LIMONCIEL, A.; JENNINGS, P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. **Toxins**, v. 6, n. 1, p. 371-379, 2014.
83. LUDTMANN, M. HR et al. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. **Biochemical Journal**, v. 457, n. 3, p. 415-424, 2014.
84. LUO, X. et al. An inhibitor role of Nrf2 in the regulation of myocardial senescence and dysfunction after myocardial infarction. **Life Sciences**, v. 259, p. 118199, 2020.
85. MALHOTRA, D. et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 17, p. 5718-5734, 2010.
86. MANN, P. J.; QUASTEL, J. H. Toxic effects of oxygen and of hydrogen peroxide on brain metabolism. **The Biochemical Journal**, v. 40, n. 1, p. 139-144, 1946.
87. MANNA, A. et al. The variable chemotherapeutic response of Malabaricone-A in leukemic and solid tumor cell lines depends on the degree of redox imbalance. **Phytomedicine**, v. 22, n. 7-8, p. 713-723, 2015.
88. MARTIN, C. S. et al. Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and β -galactosidase. **Biotechniques**, v. 21, n. 3, p. 520-524, 1996.
89. MCGUIRE, K. L. et al. Fungal community composition in neotropical rain forests: the influence of tree diversity and precipitation. **Microbial ecology**, v. 63, p. 804-812, 2012.
90. MCMAHON, M. et al. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21592-21600, 2003.
91. MCMAHON, M. et al. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31556-31567, 2004.
92. MIRUS BIO, “Applications | Stable Cell Line Generation | Mirus Bio” 19 Oct. 2023, www.mirusbio.com/applications-stable-cell-line-generation/. Accessed 29 Nov. 2024.
93. MITSUISHI, Y. et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 66-79, 2012.
94. MULLER, F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging. **Journal of the American Aging Association**, v. 23, n. 4, p. 227-253, 2000.
95. NAMANI, A. et al. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 9, p. 1875-1885, 2014.
96. NELSON, S. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radic. Biol. Med.**, 40, pp. 341-347, 2006.
97. NEZU, M.; SUZUKI, N.; YAMAMOTO, M. Targeting the KEAP1-NRF2 system to prevent kidney disease progression. **American journal of nephrology**, v. 45, n. 6, p. 473-483, 2017.
98. NGO, V.; DUENNWALD, M. L. Nrf2 and oxidative stress: A general overview of mechanisms and implications in human disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2345, 2022.

99. NIOI, P.; NGUYEN, T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 362, n. 4, p. 816-821, 2007.
100. OOI, A. et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. **Cancer research**, v. 73, n. 7, p. 2044-2051, 2013.
101. PADMANABHAN, B. et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. **Molecular cell**, v. 21, n. 5, p. 689-700, 2006.
102. PAEK, J. et al. Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response. **Cell metabolism**, v. 16, n. 4, p. 526-537, 2012.
103. PEDRUZZI, L.M.; CARDOZO, L.F.; DALEPRANE, J.B., et al. Systemic inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients are associated with down-regulation of Nrf2. **J Nephrol**. 28(4):495-501, 2015.
104. PEIXOTO, A. L. Vegetação da costa atlântica in Floresta Atlântica. **Alumbramento**, p. 33-42, 1991.
105. PERGOLA, P. E. et al. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 4, p. 327-336, 2011.
106. PIANTADOSI, C. A. et al. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. **Circulation research**, v. 103, n. 11, p. 1232-1240, 2008.
107. POWERS, S. K.; JACKSON, Malcolm J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.
108. QIN, W. et al. Effects of trigonelline inhibition of the Nrf2 transcription factor in vitro on *Echinococcus granulosus*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 8, p. 696-705, 2017.
109. RADA, P. et al. SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. **Molecular and cellular biology**, 2011.
110. RAJASEKARAN, N. S. et al. Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 6, p. 957-971, 2011.
111. RAMSEY, C. P. et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 66, n. 1, p. 75-85, 2007.
112. RANJARD, Lionel; RICHAUME, Agnès. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. **Research in microbiology**, v. 152, n. 8, p. 707-716, 2001.
113. REICHARD, J. F.; MOTZ, G. T.; PUGA, A. Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 21, p. 7074-7086, 2007.
114. REN, D. et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1433-1438, 2011.
115. ROBLEDINOS-ANTÓN, N.; FERNÁNDEZ-GINÉS, R.; MANDA, G.; CUADRADO, A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. **Oxid Med Cell Longev**. 2019: 9372182, 2019.
116. RODRIGUES, S.D.; BATISTA, G.B.; INGBERMAN, M.; PECOITS-FILHO, R.; NAKAO, L.S. Plasma cysteine/cystine reduction potential correlates with plasma creatinine levels in chronic kidney disease. **Blood Purif**. 34(3-4):231-7, 2012.
117. ROJO DE LA VEGA, M.; DODSON, M.; CHAPMAN, E.; ZHANG, D.D. NRF2-targeted therapeutics: New targets and modes of NRF2 regulation. **Curr Opin Toxicol**. 1:62-70, 2016.
118. SADDAWI-KONEFKA, R. et al. Nrf2 induces IL-17D to mediate tumor and virus surveillance. **Cell reports**, v. 16, n. 9, p. 2348-2358, 2016.
119. SAHA, P. K. et al. The triterpenoid 2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oic-acid methyl ester has potent anti-diabetic effects in diet-induced diabetic mice and *Lepr^{db/db}* mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 52, p. 40581-40592, 2010.
120. SAHA, S. et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5474, 2020.

121. SANGOKOYA, C.; TELEN, Marilyn J.; CHI, Jen-Tsan. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 20, p. 4338-4348, 2010.
122. SARLETTE, A. et al. Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 67, n. 11, p. 1055-1062, 2008.
123. SESSITSCH, A. et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4215-4224, 2001.
124. SCHMIDLIN C.J, DODSON M.B, MADHAVAN L, ZHANG DD. Redox regulation by NRF2 in aging and disease. **Free Radic Biol Med**. 2019 Apr;134:702-707.
125. SCHULZE-TOPPHOFF, U. et al. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 17, p. 4777-4782, 2016.
126. SHAW, P.; CHATTOPADHYAY, A. Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 4, p. 3119-3130, 2020.
127. SHEN, J.; RASMUSSEN, M.; DONG, Q.R.; TEPEL, M.; SCHOLZE A. Expression of the NRF2 Target Gene NQO1 Is Enhanced in Mononuclear Cells in Human Chronic Kidney Disease. **Oxid Med Cell Longev**. 2017: 9091879, 2017.
128. SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715-748, 2017.
129. SINGH, B. et al. MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 5, p. 1165-1172, 2013.
130. SINGH, A. et al. Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors. **ACS chemical biology**, v. 11, n. 11, p. 3214-3225, 2016.
131. SONG, Y. S.; PARK, C. M.. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 70-75, 2014.
132. SPORN, M. B.; LIBY, K. T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 8, p. 564-571, 2012.
133. STENVINKEL, P. et al. Understanding the role of the cytoprotective transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2—lessons from evolution, the animal kingdom and rare progeroid syndromes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. 12, p. 2036-2045, 2020.
134. SUN, C-C et al. Sulforaphane attenuates muscle inflammation in dystrophin-deficient mdx mice via NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated inhibition of NF-κB signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 29, p. 17784-17795, 2015.
135. SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 93-100, 2015.
136. TAGUCHI, K.; YAMAMOTO, M. The KEAP1–NRF2 system in cancer. **Frontiers in oncology**, v. 7, p. 85, 2017.
137. THANAS, C. et al. The Keap1/Nrf2 signaling pathway in the thyroid—2020 update. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1082, 2020.
138. TOSI, M. E. R. et al. The Nrf2–Keap1 cellular defense pathway and heat shock protein 70 (Hsp70) response. Role in protection against oxidative stress in early neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO). **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, n. 1, p. 57-68, 2011.
139. TSAI, P-Y et al. Antroquinonol reduces oxidative stress by enhancing the Nrf2 signaling pathway and inhibits inflammation and sclerosis in focal segmental glomerulosclerosis mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 11, p. 1503-1516, 2011.
140. TSUCHIDA, K. et al. Halofuginone enhances the chemo-sensitivity of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 103, p. 236-247, 2017.
141. URUNO, A. et al. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. **Molecular and cellular biology**, v. 33, n. 15, p. 2996-3010, 2013.
142. VARTANIAN, S. et al. Application of mass spectrometry profiling to establish brusatol as an inhibitor of global protein synthesis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 4, p. 1220-1231, 2016.

143. VELMURUGAN, K. et al. Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the antioxidant supplement Protandim. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 3, p. 430-440, 2009.
144. VOLONTE, D. et al. Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 12, p. 1852-1862, 2013.
145. WANG, H. et al. RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. **Cancer research**, v. 73, n. 10, p. 3097-3108, 2013.
146. WANG, Y. et al. Pharmacological modulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway as a therapeutic target of Parkinson's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 757161, 2021.
147. WANG, B.; TENG, Y.; LIU, Q. MicroRNA-153 Regulates NRF2 Expression and is Associated with Breast Carcinogenesis. **Clinical Laboratory**, v. 62, n. 1-2, p. 39-47, 2016.
148. WANG, L. et al. Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2377, 2022.
149. WANG, X-H et al. High fat diet-induced hepatic 18-carbon fatty acids accumulation up-regulates CYP2A5/CYP2A6 via NF-E2-related factor 2. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 233, 2017.
150. WANG, X-J et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1235-1243, 2008.
151. WU, K. C.; CUI, Julia Yue; KLAASSEN, Curtis D. Effect of graded Nrf2 activation on phase-I and-II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. e39006, 2012.
152. XIANG, M. et al. Nrf2: bane or blessing in cancer?. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, p. 1251-1259, 2014.
153. YANG, Y. et al. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 30, p. 3677-3692, 2013.
154. YU, Z. et al. Oltipraz upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [corrected](NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice. **Diabetologia**, v. 54, n. 4, p. 922-934, 2010.
155. YU, L. et al. Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease. **Life sciences**, v. 121, p. 104-109, 2015.
156. ZARO, B. W. et al. Dimethyl fumarate disrupts human innate immune signaling by targeting the IRAK4-MyD88 complex. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 9, p. 2737-2746, 2019.
157. ZEHIR, A. et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. **Nature medicine**, v. 23, n. 6, p. 703-713, 2017.
158. ZHANG, Y. et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 89, n. 6, p. 2399-2403, 1992.
159. ZHANG, D. D. Bardoxolone brings Nrf2-based therapies to light. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 5, p. 517-518, 2013.
160. ZHANG, Y. et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. **Journal of neuroscience**, v. 34, n. 36, p. 11929-11947, 2014.
161. ZHANG, H.; DAVIES, K. JA; FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 314-336, 2015.
162. ZHANG, R. et al. Sulforaphane ameliorates neurobehavioral deficits and protects the brain from amyloid β deposits and peroxidation in mice with Alzheimer-like lesions. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 30, n. 2, p. 183-191, 2015.
163. ZHENG, H. et al. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 3055-3066, 2011.
164. ZHOU, S. et al. The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, n. 1, p. 260429, 2014.
165. ZHONG, Y. et al. Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7/DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response. **Molecular carcinogenesis**, v. 52, n. 10, p. 824-834, 2013.

166. ZUO, Q. et al. The dietary flavone luteolin epigenetically activates the Nrf2 pathway and blocks cell transformation in human colorectal cancer HCT116 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 11, p. 9573-9582, 2018.