



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Elisa Bernardes Monteiro

**Compostos fenólicos do Açaí: uma estratégia para minimizar a inflamação
e o estresse oxidativo associados às toxinas urêmicas**

Rio de Janeiro

2018

Elisa Bernardes Monteiro

Compostos fenólicos do açaí: uma estratégia para minimizar a inflamação e o estresse oxidativo associados às toxinas urêmicas

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Magna Maria Cottini da Fonseca Passos

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

M775 Monteiro, Elisa Bernardes.
Compostos fenólicos do Açaí: uma estratégia para minimizar a inflamação e o estresse oxidativo associados às toxinas urêmicas / Elisa Bernardes Monteiro. – 2018.
82 f.

Orientador: Julio Beltrame Daleprane
Co-orientadora: Magna Maria Cottini da Fonseca Passos
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Açaí – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. I. Daleprane, Julio Beltrame. II. Passos, Magna Maria Cottini da Fonseca. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es

CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Elisa Bernardes Monteiro

Compostos fenólicos do açaí: uma estratégia para minimizar a inflamação e o estresse oxidativo associados às toxinas urêmicas

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada em: 22 de Agosto de 2018.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo
Curso de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco - CAV

Prof^a. Dr^a. Denise Mafra
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dr^a. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Ângela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)
Instituto de Nutrição
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Julio Beltrame Daleprane, por esses quatro anos de intensa convivência, pela paciência infinita, pela amizade, pelas risadas e bom-humor contagiantes, e principalmente por ser um grande exemplo de persistência, dedicação e competência. Sou muito feliz e grata pela oportunidade de aprender com você!

À Professora Magna Cottini, pela parceria e oportunidade a mim concedida;

Às Professoras Alice Valença, Ângela Resende, Denise Mafra, Elaine de Oliveira, Cristiane Aguiar e Milena Barcza, pelo aceite em compor a banca examinadora e contribuir com o amadurecimento deste trabalho;

Aos Professores Ângela de Castro Resende e Roberto Soares de Moura, pela sempre calorosa acolhida no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais. À querida amiga Professora Cristiane Aguiar, pela revisão deste trabalho;

À Professora Mariana Monteiro (INJC/UFRJ), pela recepção em seu laboratório e pela parceria valiosa;

Aos queridos amigos do Laboratório para Estudos de Interação entre Nutrição e Genética (LEING), Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais (LFCPM) e Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição (LFBN), pelo companheirismo, amizade e por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre. Vocês fizeram a jornada ser mais colorida! Às Professoras Danielly Ferraz e Nathalia Moura, por trazerem ainda mais cor e alegria ao nosso LEING;

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde do Instituto de Nutrição da UERJ, por toda a assistência nesses quatro anos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios financeiros;

Às queridas Ronimara Santos e Carlyne Pimentel, pelas conversas, cafés na prensa francesa e aquela mãozinha amiga nas passagens de células. Flores, vocês são as melhores!

Às amadas Elaine Soares, Grazielle de Bem, Izabelle Barcellos e Patrícia Trindade, grandes companheiras nessa intensa jornada e amigas para todas as horas, perto e longe da bancada. Obrigada por todo o apoio, carinho e amizades tão valiosas. O caminho não teria a mesma graça sem vocês! Ao querido amigo Ricardo Andrade, parceiro nas longas horas de laboratório;

Aos meus amores Paula Normando e Gabriela Vianna, por dividirem comigo uma das melhores e maiores experiências de vida;

Au Professeur Christophe Soulage, pour l'accueil chaleureux, le soutien partenaire et les directions précises qui m'ont ouvert les portes du Laboratoire CarMeN (Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition) de l'Université de Lyon - et les yeux pour une nouvelle compréhension de la connaissance et de la recherche scientifique. À tout mes amis Mathilde Luce, Dan Yi, Elsa Hobian, Stéphane Chambert, Arnauld Trollé, Laurent Soulere, Fabien Chaudier et Cyril Fayard;

Aos meus incontáveis e maravilhosos amigos. Agradecimentos especiais ao meu trio preferido Maria Didier, Fernanda Ferraris e Luciana Bello (sempre presentes, mesmo quando longe) e à Clara Rodrigues, suporte constante nos momentos mais críticos;

À minha família musical do Dá o Tom e do Boca que Usa, por darem vida aos meus melhores momentos;

Às minhas duas famílias, mais do que maravilhosas: a Bernardes Monteiro (equipe soberana) e a Sampaio Fernandes. Muita gratidão e sorte em tê-los por perto!

A Mário Sampaio Fernandes, cúmplice nessa e nas outras jornadas da vida.

RESUMO

MONTEIRO, E. B. **Compostos fenólicos do açaí**: uma estratégia para minimizar a inflamação e o estresse oxidativo associados às toxinas urêmicas. 2018. 82 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) - Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí (*açaí seed extract*; ASE) tem demonstrado efeito protetor na gênese da disfunção endotelial e alterações renais em modelo murino de hipertensão renovascular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório do extrato do caroço do açaí em presença das toxinas urêmicas indoxil sulfato (IS) e *p*-cresil sulfato (pCS) em células endoteliais humanas e em modelo murino de doença renal crônica (DRC). Células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) receberam diferentes tratamentos com ASE (10 µg/mL) e com as toxinas IS (61 µg/mL) e pCS (40 µg/mL). Foram avaliados os parâmetros de viabilidade e morte celular, a capacidade migratória, a expressão gênica de marcadores inflamatórios e a avaliação do dano oxidativo e da resposta antioxidante celular. Adicionalmente, utilizamos modelo *in vivo* de DRC induzida por adenina (0,25%), tratado ou não com o ASE, sendo avaliados os parâmetros de função renal, marcadores do dano oxidativo e teor de colágeno em tecido renal, além da determinação de metabólitos em plasma e urina. As toxinas IS e pCS promoveram a redução na viabilidade de células endoteliais e o aumento do percentual de morte celular, bem como a diminuição da capacidade migratória celular ($p < 0,05$). O ASE foi capaz de prevenir a morte celular e a redução da capacidade migratória em células tratadas com IS. Ambas as toxinas promoveram o aumento da produção e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tendo o ASE ação preventiva desse efeito. As toxinas também promoveram o aumento da secreção de TNF- α , e o ASE reverteu esse fenômeno em células tratadas com ambas as toxinas em concomitância ($p < 0,05$). A expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase foi diminuída em células tratadas com as toxinas, e o ASE foi capaz de prevenir esse efeito ($p < 0,05$). Nos animais experimentais, os parâmetros de função renal avaliados apontaram para a instauração da DRC, e para a ação benéfica do ASE na atenuação do aumento da concentração de uréia plasmática e da proteinúria ($p < 0,05$). Os marcadores de dano oxidativo avaliados em tecido renal dos animais sugerem o quadro de estresse oxidativo na DRC, sendo o ASE capaz de reverter esse fenômeno observado. Os animais com DRC apresentaram maior deposição de colágeno em tecido renal, quadro esse que foi revertido pelo ASE ($p < 0,05$). Observamos que o ácido hipúrico foi o principal metabólito na urina dos animais experimentais dos grupos Controle + ASE e DRC + ASE, seguido do ácido 3,4-dihidroxifenilacético e da catequina. A excreção urinária desses compostos apresentou-se de forma diferente entre os grupos Controle e DRC. Em plasma de animais com DRC, o ácido hipúrico encontrou-se duas vezes mais concentrado. Os resultados apontam para os efeitos benéficos do ASE nos danos causados pelas toxinas urêmicas, particularmente pelos IS, em modelo *in vitro* de células endoteliais. *In vivo*, observamos a atenuação de danos ocasionados na doença renal crônica promovida pelo ASE. O presente trabalho retrata o efeito protetor do extrato do caroço do açaí rico em compostos fenólicos sobre os agravos provocados por toxinas urêmicas em diferentes modelos experimentais.

Palavras-chave: Açaí. Toxinas urêmicas. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

MONTEIRO, E. B. **Açaí phenolic content**: a potent strategy to minimize inflammation and oxidative stress promoted by uremic toxins. 2018. 82 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) - Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Açaí seed extract (ASE) has shown a protective effect on endothelial dysfunction and renal alterations in a murine model of renovascular hypertension. The main goal of this work was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory potentials of *açaí* extract in the presence of uremic toxins indoxyl sulfate (IS) and *p*-cresyl sulfate (pCS) in human endothelial cells and in a murine model of chronic kidney disease (CKD). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) had received different treatments with ASE (10 µg/mL), IS (61 µg/mL) and pCS (40 µg/mL). We evaluated the parameters of cell viability, cell death, migration capacity, inflammatory cytokine production and expression and biomarkers of oxidative stress, as well as cellular antioxidant response. In addition, in an *in vivo* model of CKD fed with adenine (0.25%), we evaluated biomarkers of renal function and oxidative damage, collagen content in renal tissue, as well as phenolic metabolites profile in plasma and urine of animals, whether treated or not with ASE. IS and pCS reduced endothelial cell viability and prevented cell death, and also decreased endothelial cell cellular migration capacity ($p < 0.05$). ASE was able to prevent cell death and reduction of migratory capacity in IS-treated cells. Both toxins promoted increased expression of proinflammatory cytokines, and ASE prevented this effect. The toxins also promoted increased secretion of TNF- α , and ASE reversed this phenomenon in cells treated with both toxins in concomitance ($p < 0.05$). Antioxidant enzyme expression of superoxide dismutase was decreased in cells treated with both toxins, and ASE was able to prevent this effect ($p < 0.05$). In experimental animals, renal function parameters indicated the onset of CKD, and ASE attenuated the increased plasma urea concentrations and proteinuria ($p < 0.05$). Oxidative damage biomarkers evaluated in renal tissue suggested the presence of oxidative stress in CKD animals. ASE was able to ameliorate this hazard effect. In addition, ASE prevented collagen deposition in renal tissue observed in CKD animals ($p < 0.05$). Hippuric acid was the main metabolite found in urine of Control + ASE and CKD + ASE groups, followed by 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and catechin. The urinary excretion of these compounds differed between Control and CKD groups. In plasma from CKD animals, hippuric acid was found to be twice as concentrated in comparison to Control group. Results pointed out to the beneficial effects of ASE on uremic toxin deleterious effects, particularly on IS, in endothelial cells. *In vivo*, we observed that ASE ameliorated oxidative damage and renal function in chronic kidney disease. The present work shows the protective effect of *açaí* seed extract, rich in phenolic compounds, on uremic toxins deleterious effects in different experimental models of uremic toxicity.

Keywords: *Açaí*. Uremic toxins. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação das toxinas Indoxil sulfato e <i>p</i> -cresil sulfato.	16
Figura 2 - Imagens ilustrativas do fruto do açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	24
Figura 3 - Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí.....	30
Figura 4 - Viabilidade de células endoteliais tratadas com ASE.....	44
Figura 5 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas e/ou ASE na viabilidade celular.....	45
Figura 6 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na morte celular.	46
Figura 7 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na migração celular.....	47
Figura 8 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na expressão de citocinas inflamatórias por RT-qPCR.....	48
Figura 9 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na secreção de TNF- α pelas células endoteliais.....	49
Figura 10 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na expressão de enzimas antioxidantes e do fator de transcrição NF- κ B pelas células endoteliais.....	51
Figura 11 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na atividade das enzimas antioxidantes.....	53
Figura 12 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na carbonilação de proteínas <i>in vitro</i>	54
Figura 13 - Curva de ganho de peso dos animais experimentais.	54
Figura 14 - Fotos ilustrativas de rim retirado de animal dos grupos Controle e DRC	56
Figura 15 - Indicadores da função renal dos animais experimentais.....	58
Figura 16 - Carbonilação de proteínas em tecidos hepático e renal dos animais experimentais.....	59
Figura 17 - Concentração de Malondialdeído em tecido renal dos animais experimentais	59
Figura 18 - Teor de colágeno em tecido renal dos animais experimentais	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema gradiente de eluição utilizado nas análises de compostos fenólicos em plasma e urina dos animais experimentais	42
Tabela 2 - Dados biométricos dos animais experimentais	56
Tabela 3 - Dados bioquímicos dos animais experimentais.	56
Tabela 4 - Metabólitos dos compostos fenólicos em plasma e urina dos animais experimentais	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

•O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
•OH	Radical Hidroxila
ASE	<i>Acai Seed Extract</i> (Extrato hidroalcolico do caroço do açaí)
CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRC	Doença renal crônica
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (células endoteliais do cordão umbilical humano)
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (molécula de adesão intercelular 1)
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH Oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear <i>kappa B</i>)
NO	Óxido Nítrico
Nrf2	<i>Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2</i>
OAT	Organic anion transporter (transportador de ânion orgânico)
ONOO•	Peroxinitrito
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tampão fosfato)
PCR	Proteína C reativa
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	<i>Tumoral Nuclear Factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão 1 da célula vascular)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1	Doença renal crônica	13
1.2	Toxinas urêmicas	14
1.3	As toxinas urêmicas Indoxil sulfato e <i>p</i>-cresil sulfato	15
1.4	Toxinas urêmicas e disfunção endotelial	17
1.5	Toxinas urêmicas e estresse oxidativo	18
1.6	Toxinas urêmicas e inflamação	20
1.7	O efeito protetor dos compostos fenólicos	21
1.8	O extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MÉTODOS	29
4.1	Confeção do extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	29
4.2	Culturas de células	31
4.2.1	<u>Condições de cultura celular</u>	31
4.3	Ensaio de viabilidade celular com o ASE e com toxinas urêmicas	31
4.4	Avaliação de morte celular por azul de Trypan	32
4.5	Ensaio de migração celular	32
4.6	Expressão gênica de citocinas inflamatórias pelo método de RT-qPCR	33
4.7	Quantificação de TNF-α no sobrenadante de células endoteliais	33
4.8	Avaliação da expressão de proteínas pela técnica de <i>Western blot</i>	34
4.9	Atividade das enzimas antioxidantes	35
4.9.1	<u>Atividade da catalase</u>	35
4.9.2	<u>Atividade da glutationala peroxidase (GPx)</u>	35
4.9.3	<u>Atividade da superóxido dismutase (SOD)</u>	36
4.10	Carbonilação de proteínas	36
4.11	Ensaio <i>in vivo</i>	37
4.11.1	<u>Delineamento experimental</u>	37

4.11.2	<u>Análises bioquímicas</u>	38
4.11.3	<u>Carbonilação de proteínas em fígado e rim dos animais</u>	39
4.11.4	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u>	40
4.11.5	<u>Dosagem de colágeno em tecido renal</u>	40
4.11.6	<u>Análise dos compostos fenólicos em plasma e metabólitos na urina dos animais</u>	41
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6	RESULTADOS	44
6.1	Viabilidade celular com ASE	44
6.2	Ensaio de viabilidade celular	44
6.3	Avaliação de morte celular por azul de Trypan	46
6.4	Migração celular	47
6.5	Expressão de marcadores inflamatórios	48
6.6	Produção de TNF-alfa pelas células endoteliais	49
6.7	Expressão de proteínas envolvidas na atividade antioxidante e na inflamação em células endoteliais	50
6.8	Efeito do ASE e das toxinas urêmicas na atividade antioxidante	52
6.9	Efeito do ASE e das toxinas urêmicas na carbonilação de proteínas <i>in vitro</i>	53
6.10	Ensaio <i>in vivo</i>	54
6.10.1	<u>Dados bioquímicos</u>	56
6.10.2	<u>Indicadores de função renal</u>	57
6.10.3	<u>Efeito do ASE em marcadores de estresse oxidativo <i>in vivo</i></u>	58
6.10.3.1	Carbonilação de proteínas em tecidos hepático e renal.....	58
6.10.3.2	TBARS em tecido renal	59
6.10.4	<u>Efeito do ASE na concentração de colágeno em tecido renal</u>	60
6.10.5	<u>Perfil de compostos fenólicos em plasma e urina dos animais experimentais</u>	60
7	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	71
	RERERÊNCIAS	72
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa.....	81
	ANEXO B – Artigo publicado na Revista <i>Biochimie</i>	82

INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela ocorrência de lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins, constituindo um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Com o comprometimento da função renal, diversos compostos tóxicos se acumulam na corrente sanguínea e podem causar efeitos deletérios aos sistemas biológicos, sendo assim chamados de toxinas urêmicas. Duas importantes toxinas urêmicas estudadas são o *p*-Cresil sulfato (pCS) e o Indoxil sulfato (IS), as quais apresentam grande potencial danoso ao organismo uma vez que não são eficientemente removidas pelas técnicas dialíticas comumente empregadas e estão associadas à instauração do estresse oxidativo e da inflamação. As elevadas concentrações séricas dessas toxinas constituem fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e estão associadas positivamente com as altas taxas de mortalidade na DRC (ITO; YOSHIDA, 2014; VANHOLDER et al., 2014).

Dentre as estratégias para atenuação dos danos oxidativo e inflamatório ocasionados por essas substâncias, compostos bioativos presentes em alimentos (em particular os compostos fenólicos) vem ganhando destaque. O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é um fruto típico da região Norte do Brasil amplamente consumido no país e rico em compostos fenólicos, tais como epicatequinas, catequinas e antocianinas (SCHAUSS et al., 2006a). Estudos recentes utilizando o extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (ASE, da sigla em inglês *açaí seed extract*) demonstraram efeitos benéficos em parâmetros cardiometabólicos, dentre eles a ação protetora contra a disfunção endotelial e alterações vasculares e renais em modelo animal de hipertensão renovascular (ROCHA et al. 2007; ROCHA et al., 2008; DE MOURA et al., 2011; DA COSTA et al., 2012; DA COSTA et al., 2017).

A adoção de medidas preventivas e/ou terapêuticas com o uso de alimentos funcionais (em particular o açaí), bem como o entendimento de seus mecanismos de ação, são de grande importância para minimizar a atuação de compostos deletérios à saúde e melhorar assim a qualidade de vida de pacientes com DRC. Logo, o presente trabalho visou avaliar os potenciais efeitos antioxidante e anti-inflamatório do extrato do caroço de açaí na modulação dos marcadores de disfunção endotelial induzida por IS e pCS em células endoteliais humanas, assim como a capacidade do extrato do açaí em modular marcadores do estresse oxidativo e do processo inflamatório em modelo murino de DRC associado à uremia.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela ocorrência de lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins, constituindo um importante problema de saúde pública. Estima-se que a prevalência da DRC seja de 10-16% da população adulta em países da Ásia e da Europa, bem como em países desenvolvidos como Austrália e Estados Unidos (WEBSTER et al., 2016; SOHEL et al, 2016). No Brasil, estima-se que 91.314 pacientes apresentam DRC em fase terminal, sendo que a cada ano 28.000 novos pacientes iniciam a terapia renal substitutiva (BRASIL, 2014).

O rim é um órgão de múltiplas funções importantes no organismo, tais como a excreção de produtos finais de diversos metabolismos, o controle do equilíbrio ácido-básico, hidroeletrólítico e da pressão arterial, e a produção de hormônios. A função excretora é frequentemente utilizada como parâmetro de avaliação da função renal, por ter maior correlação com os desfechos clínicos e por declinar paralelamente ao decréscimo das demais funções (ROMÃO JÚNIOR, 2004). A função excretora renal pode ser mensurada através da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), que representa a quantidade de fluido filtrado pela totalidade de néfrons funcionantes, por unidade de tempo. Atualmente, é considerado portador da DRC o indivíduo que apresenta TFG inferior a $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ por ao menos três meses consecutivos, e/ou a presença de dano renal parenquimatoso e alterações em exames de imagem (LEVEY et al., 2015).

Diversos estudos epidemiológicos demonstram a associação inversa entre a TFG e o risco de mortalidade geral e de morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) (GO et al., 2004; FOLEY, 2010). A mortalidade por DCV em pacientes renais com TFG menor que $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ é estimada ser 57% maior do que em indivíduos não portadores da DRC (MASSON et al., 2015). Assim sendo, torna-se importante a prevenção de DCV nesses pacientes, bem como o seu diagnóstico precoce e tratamento adequado.

A DRC é classificada em cinco estágios, de acordo com o grau de função renal do paciente. Na Fase 5 ou fase terminal de insuficiência renal crônica, os rins não conseguem manter a homeostase do meio interno, sendo comumente observados os sintomas de acidose metabólica, anemia e alterações no metabolismo mineral ósseo. Nessa etapa, a TFG é inferior a $15\text{ mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ e as opções terapêuticas são os métodos de depuração artificial do sangue (diálise peritoneal ou hemodiálise) ou o transplante renal (WEBSTER et al., 2016).

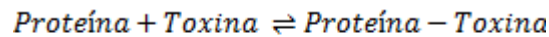
No entanto, a partir da Fase 4 (TFG entre 15 a 29 ml/min/1,73m²) já podem ser observados os sinais e sintomas característicos da uremia. Os sintomas mais precoces e comuns são a hipertensão arterial, a anemia, o edema, a fraqueza, o mal-estar e os sintomas digestivos (tais como náuseas, vômitos e sabor metálico na boca). A uremia ou síndrome urêmica é caracterizada pela retenção progressiva de substâncias que normalmente seriam excretadas pelos rins de um indivíduo saudável. Ao menos oitenta e oito compostos são descritos como solutos urêmicos que se acumulam no organismo de pacientes em estágios finais da doença renal; são também denominados toxinas urêmicas, uma vez que causam danos aos sistemas biológicos (VANHOLDER, 2003).

1.2 Toxinas urêmicas

De acordo com o *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox), as toxinas urêmicas podem ser classificadas em três grupos baseando-se em seu peso molecular e propriedades de ligação com proteínas plasmáticas, características essas que influenciam sua remoção durante os processos dialíticos. São eles: (1) compostos hidrossolúveis e de baixo peso molecular (<0,5 kDa) não ligados à proteínas; fazem parte desse grupo 40 solutos urêmicos, incluindo a uréia; (2) compostos de peso molecular intermediário (0,5-6 KDa), como a β_2 -microglobulina. Nesse grupo são inclusos 25 componentes; e (3) compostos de baixo peso molecular (<0,5 kDa; 23 compostos) que circulam na corrente sanguínea ligados às proteínas plasmáticas, sendo as toxinas *p*-cresil sulfato (pCS) e indoxil sulfato (IS) os principais representantes. Além das duas substâncias mencionadas, outros ânions orgânicos tais como os ácidos 3-carboxi-4-metil-5-propil-2-furanpropanóico (CMPF), indolacético e hipúrico compõe esse grupo (DURANTON et al., 2012; VANHOLDER et al., 2012; 2014).

As toxinas urêmicas ligadas às proteínas são uma classe de 23 compostos que apresentam fortes interações com proteínas plasmáticas em sistemas biológicos, em especial a albumina. Por essa razão, são substâncias de difícil remoção por técnicas dialíticas comumente empregadas no tratamento de pacientes em estágio 5 da DRC (VANHOLDER et al., 2005; DURANTON et al., 2012). Tais toxinas se apresentam na circulação sanguínea de duas formas: a fração ligada (não passível de sofrer difusão) e não ligada (ou livre), dependendo da afinidade da toxina com a proteína plasmática. Em sua maioria, essa ligação é reversível e envolve interações não covalentes tais como interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, pontes de hidrogênio ou forças de *Van der Waals*. Por obedecer a “Lei de ação

das massas”, o equilíbrio químico entre as formas ligada e livre é conseguido através da equação abaixo:



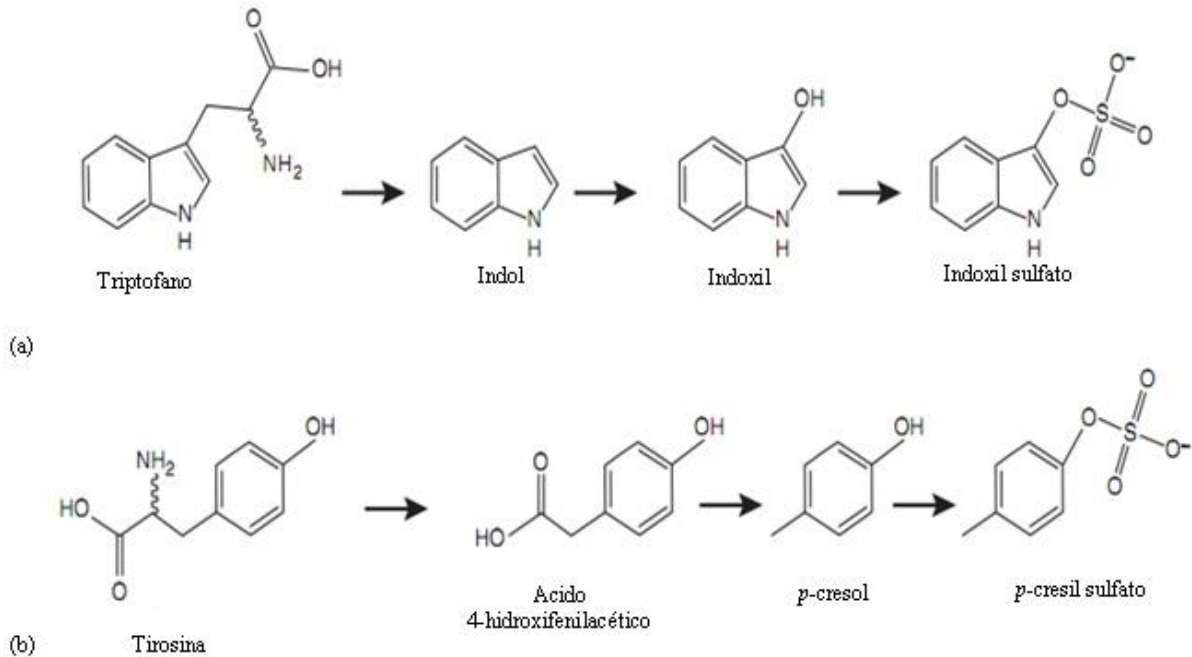
A ação biológica dessa classe de toxinas urêmicas é exercida através de sua fração livre e passível de difusão; essa fração biologicamente ativa é capaz de ser metabolizada e excretada. Em contrapartida, a fração ligada atua como uma espécie de reservatório que libera a toxina na forma livre a fim de manter o equilíbrio, quando a mesma for metabolizada e/ou excretada. Como resultado do acúmulo dessas substâncias, há competição com outros compostos endógenos e exógenos por sítios de ligação da albumina, reduzindo a taxa de ligação dos mesmos com a proteína carreadora (LIABEUF et al., 2011; WATANABE et al., 2011). As toxinas IS e pCS possivelmente competem pelo mesmo sítio de ligação com a albumina (sítio II), uma vez que a adição de IS ao soro de pacientes em hemodiálise aumentou a concentração de pCS livre, e vice-versa (MEIJERS et al., 2009).

1.3 As toxinas urêmicas Indoxil sulfato e *p*-cresil sulfato

O metabolismo fermentativo da microbiota intestinal sobre proteínas não digeridas no trato gastrointestinal pode originar uma variedade de fenóis e indóis, que são conjugados anteriormente à sua excreção pelos rins. O pCS é formado a partir da molécula de *p*-cresol, que por sua vez é produzida através do metabolismo dos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina, principalmente em porções distais do cólon. A fenilalanina é convertida em tirosina através da ação da enzima fenilalanina hidroxilase; a tirosina é convertida ao ácido 4-hidroxifenilacético, que posteriormente é descarboxilado a *p*-cresol. O composto atravessa a mucosa colônica e é conjugado com íons sulfato por sulfotransferases citoplasmáticas a pCS, sendo essa a principal forma circulante na corrente sanguínea (GRYP et al., 2017).

O IS é produzido no lúmen intestinal através do metabolismo de bactérias colônicas que, através da ação da enzima triptofanase, metabolizam o aminoácido triptofano oriundo de proteínas dietéticas a moléculas de Indol. Tais moléculas perpassam a mucosa colônica e, através da veia porta, chegam ao fígado e são hidroxiladas a Indoxil pela enzima citocromo P4502E1 (CYP2E1). Após, são sulfatadas pela ação de sulfotransferases hepáticas, formando assim o íon indoxil sulfato. Assim como em moléculas de pCS, a forma sulfatada é a forma predominantemente circulante na corrente sanguínea (ITO; YOSHIDA, 2014).

Figura 1 - Formação das toxinas Indoxil sulfato e *p*-cresil sulfato.



Legenda: (a) Produção de Indoxil sulfato a partir do aminoácido triptofano. A molécula de Indol é produzida pela ação de bactérias da microbiota colônica no lúmen intestinal. O indol perpassa a mucosa colônica e chega ao fígado, sendo hidroxilado e sulfatado a Indoxil sulfato no citoplasma de hepatócitos; (b) Produção de *p*-cresil sulfato a partir do aminoácido tirosina. O ácido 4- hidroxifenilacético é produzido pela ação de bactérias da microbiota colônica no lúmen intestinal, e este por sua vez é descarboxilado a *p*-cresol. O *p*-cresol perpassa a mucosa colônica e, no citoplasma dos enterócitos, é sulfatado a *p*-cresil sulfato. Adaptado de MEYER & HOSTETTER (2012).

Em um indivíduo saudável, a fração livre de ambas as toxinas é filtrada no glomérulo renal, enquanto que a fração ligada à proteína é secretada na região tubular por transporte ativo. Na DRC, a remoção da toxina por diálise é limitada à sua forma livre. Para mediar a excreção urinária desses solutos, as células tubulares proximais são equipadas com transportadores na membrana basolateral, os transportadores de ânions orgânicos (*organic anion transporter*; OAT). Além deles, essas células contam com outros transportadores atuantes na excreção luminal tais como o MRP-4 (*multidrug resistance protein 4*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*). Com a progressão da falência renal, há perda de função desses transportadores e a excreção das toxinas é prejudicada, resultando em seu acúmulo (MEYER & HOSTETTER, 2014; MUTSAERS et al., 2015).

Estudos demonstram a correlação positiva entre as elevadas concentrações séricas das toxinas e estágios avançados da DRC, bem como com a menor taxa de filtração glomerular nesses pacientes (WU et al., 2011; POESEN et al., 2013). Em estudo de Barreto et al. (2009), as elevadas concentrações de IS em pacientes em diferentes estágios da doença renal foram correlacionadas com o aumento na *causa-mortis* geral e por distúrbios cardiovasculares; os

autores relatam que esse efeito independe de fatores de risco tradicionais (como por exemplo a presença de hipertensão arterial, do diabetes *mellitus* e de dislipidemias), da calcificação da aorta e de espessamento arterial. Em relação ao pCS, a retenção dessa toxina no plasma de pacientes pré-diálise e em hemodiálise foi associada ao aumento do risco de mortalidade geral (WU et al., 2011; LIN et al., 2013). Liabeuf et al. (2010) relataram que as concentrações de pCS livre foram relacionadas ao aumento da mortalidade em pacientes renais, independente de outros fatores de risco.

Em recente meta-análise, Lin et al. (2015) igualmente relataram que as elevadas concentrações de ambas as toxinas estão relacionadas ao aumento na mortalidade de pacientes com DRC, porém apenas o pCS foi associado ao aumento do risco de eventos cardiovasculares. De maneira geral, os pesquisadores têm mostrado que ambas as toxinas podem impactar de forma distinta na predição da mortalidade e do risco cardiovascular, principalmente ao avaliarmos as formas livre e total das toxinas. Em elevadas concentrações da forma livre de pCS, o percentual da fração ligada diminui, ao contrário da toxina IS. Tal fato pode influenciar na diferença de toxicidade desses compostos (LIABEU et al., 2011).

Dentre os possíveis efeitos tóxicos ocasionados por IS e pCS em células do sistema cardíaco, encontram-se o aumento da síntese de colágeno em fibroblastos cardíacos e da síntese protéica em cardiomiócitos *in vitro*, e ainda o aumento do estresse oxidativo local e da fibrose cardíaca *in vivo* (LEKAWANVIJIT et al., 2012). As toxinas podem também exercer efeitos deletérios significantes em células do músculo liso vascular (VSMC) (MEIJERS et al., 2009; LIN et al., 2013). Além disso, ambas as toxinas IS e pCS parecem exercer papel importante no processo de disfunção endotelial, através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da indução da senescência vascular (DOU et al., 2007; YU et al., 2011; WATANABE et al., 2014).

1.4 Toxinas urêmicas e disfunção endotelial

O endotélio consiste em uma monocamada de células localizada na interface entre o lúmen vascular e as camadas mais externas da parede do vaso sanguíneo; é atualmente considerado um órgão dinâmico que responde a diversos estímulos físicos e humorais e que apresenta papel importante na homeostase vascular. Ele é responsável pela síntese e liberação de diversos fatores envolvidos em processos fisiológicos, tais como na manutenção do tônus vascular e na resposta à isquemia, na função plaquetária, nos processos de coagulação e

fibrinólise, na angiogênese, na inflamação, na resposta imune e no metabolismo de células do músculo liso vascular (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004).

As células endoteliais são responsáveis pela produção de diversos fatores que participam da regulação do tônus vascular. Dentre os fatores vasoconstritores liberados pelo endotélio, destacam-se os derivados do ácido araquidônico, ânion superóxido, endotelina-1 (ET-1) e angiotensina-II; na relação das substâncias vasodilatadoras, encontram-se a prostaciclina (PGI_2), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), o peptídeo natriurético tipo C e o óxido nítrico (NO). A interação desses fatores desencadeia a resposta vascular e, como resultado, a obtenção do tônus basal fisiológico; a interrupção do equilíbrio na produção e liberação desses fatores caracteriza a disfunção endotelial. A disfunção endotelial é um evento que geralmente precede o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e também está presente em diversas situações patológicas, dentre elas a DRC (DAVIGNON; GANZ, 2004; MALYSZKO, 2010; JOURDE-CHICHE et al., 2011). O endotélio de pacientes portadores da DRC é altamente propenso ao dano devido à contínua exposição a fatores de risco tais quais as toxinas urêmicas. Nesse caso, a célula endotelial tem seu fenótipo modificado e apresenta propriedades pró-coagulante, pró-adesividade, pró-inflamatória e vasoconstritora. O estresse oxidativo parece estar envolvido na gênese desses efeitos e da síndrome cardiorrenal (RUIZ et al., 2013; GARCÍA-JÉREZ et al., 2015).

1.5 Toxinas urêmicas e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o dano tissular resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidante. Os principais radicais livres oxigenados são o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH\bullet$); outras espécies, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o dióxido de nitrogênio (N_2O) e o ácido hipocloroso (HOCl), muito embora não sejam espécies radiculares, têm poder oxidante e contribuem assim para o surgimento do quadro (HIMMELFARB et al., 2002).

As reações oxidativas ocorrem predominantemente na mitocôndria através da enzima mitocondrial citocromo oxidase, que atua na transferência de dois pares de elétrons ao oxigênio molecular (O_2) e tem como produto final duas moléculas de água (H_2O). Esse complexo enzimático possui quatro centros redox, cada qual armazenando um elétron. Na medida em que os quatro centros estão reduzidos, os elétrons são transferidos ao O_2 sem etapas intermediárias, limitando a formação de radicais livres. Uma pequena fração da reação,

no entanto, ocorre via etapas intermediárias e favorece a formação dessas espécies. O organismo conta com inúmeros sistemas antioxidantes intracelulares, dentre os quais complexos enzimáticos e componentes hidro e lipossolúveis que neutralizam as espécies reativas, antes que ocorra dano oxidativo celular. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células fagocitárias ocorre em maior escala, para fins de defesa do organismo contra patógenos (HIMMELFARB et al., 2002; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003).

Diversos processos biológicos parecem estar envolvidos na produção de EROs. Além da respiração mitocondrial, há a atividade de enzimas pró-oxidantes como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), xantina oxidase, óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada e mieloperoxidase. A enzima NADPH oxidase é provavelmente a mais importante fonte de EROs na vasculatura, pela produção do ânion superóxido (O_2^-) (CAI; HARRISON, 2000; SCHULZ et al., 2011).

No que concerne aos sistemas de defesa antioxidante, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase (CAT) são componentes do sistema antioxidante enzimático e podem ter sua expressão e/ou atividade diminuída na DRC (KUCHTA et al., 2011; SAITO, 2013). Dentre os componentes não enzimáticos atuantes na defesa antioxidante encontram-se os tióis, a glutathiona, o ácido ascórbico, o α -tocoferol e diversas classes de compostos fenólicos (STOCLET et al., 2004).

Dentre as consequências do estresse oxidativo, destacam-se as modificações químicas de biomoléculas, culminando em mudanças estruturais e/ou funcionais. O estresse oxidativo pode alterar diretamente a função e o tônus vasculares através da oxidação de proteínas ou de ácidos nucleicos, ou ainda no aumento da proliferação e migração de células vasculares, na inflamação, na apoptose e em alterações na matriz extracelular, resultando em hipertrofia e remodelamento vasculares. Todas essas modificações na vasculatura são associadas ao desenvolvimento e perpetuação das DCV na DRC (SCHIFFRIN et al., 2007; HALLIWEL, 2007).

Estudos relatam que as toxinas urêmicas IS e pCS são capazes de instaurar o quadro de estresse oxidativo através do aumento da produção de EROs e da expressão e da atividade da enzima NADPH oxidase (YU et al., 2011; WATANABE et al., 2014). Han e colaboradores (2015) observaram a indução da atividade da NADPH oxidase e o aumento na produção de EROs promovidos por pCS em cardiomiócitos, e ainda a disfunção diastólica e apoptose cardíaca em ratos nefrectomizados. Já Owada e colaboradores (2008) notaram que a retenção de IS promoveu o aumento na produção de EROs e a redução da atividade sequestrante do radical superóxido (por ação da enzima antioxidante superóxido dismutase) em animais

nefrectomizados. No trabalho de Yisireyili et al. (2013), a toxina IS foi associada à fibrose cardíaca e à hipertrofia de cardiomiócitos *in vivo*, acompanhadas do aumento do estresse oxidativo (avaliada pela expressão da NADPH oxidase e de marcador de dano oxidativo em lipídios celulares). Os autores ainda observaram um decréscimo na expressão de proteínas envolvidas na resposta antioxidante e o aumento da expressão de marcadores inflamatórios e pró-fibróticos, tais como o TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*), a α -actina do músculo liso e o colágeno tipo I.

1.6 Toxinas urêmicas e inflamação

O estresse oxidativo e a inflamação parecem estar associados e concomitantemente presentes na DRC. Entre 30 a 50% dos pacientes renais apresentam elevadas concentrações de marcadores inflamatórios como proteína C-reativa, fibrinogênio, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como das moléculas de adesão VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), e-selectina e p-selectina. As EROs atuam no aumento da expressão de moléculas de adesão e de moléculas quimiotáticas (tais como o *monocyte chemoattractant peptide-1*; MCP-1) via ativação de um importante fator de transcrição nuclear, o NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) (BRUNET et al., 2011; CHOI; KANG; KWAK, 2014; KAMINSKY et al., 2017). Com a indução da expressão das moléculas supracitadas, é promovida a infiltração de monócitos e linfócitos T ao endotélio ativado, caracterizando os primeiros estágios da aterosclerose. Os monócitos que migram para a camada subendotelial se diferenciam em macrófagos, que por sua vez fagocitam moléculas de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) modificadas, formando as chamadas células espumosas ou *foam cells*. Os macrófagos ativados atuam na produção de EROs e de citocinas, que perpetuam o processo inflamatório e a injúria local. Nas etapas subsequentes do processo aterosclerótico, ocorre a formação de capa fibrosa com a proliferação de VSMC e a indução da angiogênese, podendo culminar finalmente na ruptura da placa e trombose. Estudos apontam para o papel das toxinas urêmicas na modulação de um ou mais fatores envolvidos nas diversas etapas desse processo (RUDIJANTO, 2007; TUMUR et al., 2010; LEKAWANVIJIT et al., 2012; BOLATI et al., 2013).

A ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B está envolvida em diversas condições patológicas, dentre as quais a DRC. Conforme mencionado anteriormente, a ativação desse fator pode ser realizada por diversas espécies reativas e resulta na transcrição de diversos genes pró-inflamatórios, que decodificam citocinas e moléculas de adesão. No

trabalho de Yang e colaboradores (2012), foi observado o aumento da expressão desse fator de transcrição em células endoteliais tratadas com IS. A ativação do NF- κ B induzida por IS está associada à senescência celular, à inibição da proliferação de células tubulares proximais e ao aumento da expressão de genes pró-fibróticos (SHIMIZU et al., 2012; NIWA; SHIMIZU, 2012). Watanabe et al. (2013a) e Poveda et al. (2014) igualmente observaram o efeito pró-inflamatório exercido pelo pCS em células epiteliais do túbulo proximal, através do aumento da expressão de citocinas induzido pela ativação do NF- κ B. Além disso, Watanabe et al. (2013a) relataram que esse efeito foi associado à instauração do estresse oxidativo e à indução de genes envolvidos no processo de fibrose.

Em trabalho desenvolvido por Sun e colaboradores (2012), ambas as toxinas IS e pCS promoveram aumento na expressão de TGF- β 1 *in vitro* (em células do túbulo renal) e *in vivo* (em animais nefrectomizados), possivelmente via sistema renina-angiotensina-aldosterona. Os autores também observaram que as toxinas induziram a transição fenotípica de células tubulares, levando à produção de matriz extracelular excessiva, deposição de colágeno no interstício e progressão da fibrose. Com a evolução da fibrose, células epiteliais tubulares perdem sua capacidade regenerativa e são submetidas à apoptose, levando à atrofia tubular e à disfunção glomerular (WEBSTER et al., 2016). De fato, IS e pCS podem ser consideradas nefrotoxinas uma vez que são capazes de estimular a fibrose tubulointersticial e a esclerose glomerular, levando à perda funcional de néfrons e a consequente progressão da DRC (NIWA, 2012; GAO & LIU, 2017).

Em suma, as toxinas urêmicas IS e pCS têm papel fundamental na gênese do estresse oxidativo e da inflamação e contribuem assim com a progressão da DRC. Das possíveis terapias alternativas para minimizar os agravos promovidos por essas substâncias, o emprego de compostos bioativos presentes em alimentos merece atenção, dentre os quais os compostos fenólicos figuram entre os mais importantes (TEPEL et al., 2003; STOCLET et al., 2004).

1.7 O efeito protetor dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas encontrados em elevadas concentrações em algumas espécies vegetais. São estruturalmente diversos, sendo mais de 8000 espécies diferentes relatadas. Eles apresentam ao menos um anel aromático em sua estrutura química com um ou mais grupos hidroxila ligados e podem ser classificados em flavonóides e não flavonóides (DEL RIO et al., 2013). Cerca de 500 espécies diferentes de compostos fenólicos podem ser encontradas em alimentos de origem vegetal e o perfil e

conteúdo de compostos fenólicos dependem da variedade da planta, das condições de cultivo, do estágio de maturação na colheita, do armazenamento e da manipulação pós-colheita, além do processamento do alimento (MITJAVILA; MORENO, 2012).

Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de compostos fenólicos pode reduzir a incidência de algumas doenças crônicas não-transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, obesidade e alguns tipos de cânceres. Possivelmente, esses efeitos protetores se devem à bioatividade exercida por compostos fenólicos e/ou outros fitoquímicos que atuam sinergisticamente; como por exemplo, podemos citar as propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e anti-isquêmica de alguns compostos (NICHOLSON et al., 2010; BARBAGALLO et al., 2013; DEL RIO et al., 2013). Por conta do potencial antioxidante e anti-inflamatório desses compostos, sua inclusão na dieta pode conferir proteção contra danos oxidativos no sistema vascular e, portanto, habilidade em retardar a progressão de lesões iniciais de placas ateroscleróticas avançadas, com risco de ruptura e trombose (MEHENDALE et al., 2006; PASTEN et al., 2007; YAMADA, 2007).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos pode ser classificada em direta ou indireta. A atividade antioxidante direta é relativa à quelação de metais *in vitro*, quelação de espécies reativas (como, por exemplo, a ação de varredura de ânions superóxido), inibição da peroxidação lipídica (ação de varredura de peroxinitrito) e redução de formação de hidroperóxidos. Já a ação indireta é relacionada à modulação de vias de sinalização celular e expressão de genes envolvidos na regulação de enzimas de defesa antioxidante e mudanças no padrão de acetilação de histonas nucleares (STOCLET et al., 2004; MITJAVILA; MORENO, 2012; BARBAGALLO et al., 2013). Diversas enzimas antioxidantes tais como a glutamato-cisteína ligase, heme oxigenase-1 e glutathione-S-transferase contêm uma sequência específica de nucleotídeos na região promotora de seus genes, definidas como elementos de resposta antioxidante. Fatores de transcrição como o Nrf2 (*nuclear fator erythroid 2-related factor2*), regulado por compostos fenólicos, podem se ligar à essas sequências e ativar a expressão dessas enzimas (PEDRUZZI et al., 2012; CHOI, KANG, KWAK, 2014; STOCKLER-PINTO et al., 2014).

Diversos estudos apontam para o papel protetor no sistema cardiovascular exercido por compostos fenólicos. Nicholson et al. (2010) observaram que resveratrol e quercetina induziram o aumento na expressão de mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e preveniram o aumento na expressão de ET-1 provocada por H₂O₂. O fenólico epigallocatequina galato (EGCG) também apresentou os efeitos, mas em menor magnitude que em comparação aos demais compostos. Em outro estudo com EGCG

foi observada ativação da eNOS via fosforilação de resíduo de serina na posição 1177 (fosforilação ativadora) em células endoteliais da aorta de bovinos (LORENZ et al., 2004). Em dois modelos murinos de hipertensão, houve redução na pressão arterial sistólica, média e diastólica quando na administração oral de extrato hidro-alcoólico de casca de uva (DE MOURA et al., 2002).

Zapolska-Dolwaret al. (2012), em trabalho que avaliou a ação de um extrato rico em compostos fenólicos de *Aronia melanocarpa* (arônia ou *chokeberry*) em células endoteliais, observaram a redução no aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 induzida por TNF- α . O extrato ainda foi capaz de atenuar a ativação de NF- κ B e suprimiu a produção de EROs em cultura celular. Noll et al. (2013) avaliaram a expressão de biomarcadores de disfunção endotelial (dentre eles, e-selectina, VCAM-1 e ICAM-1) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em aorta de ratos hiperhomocisteinêmicos que receberam catequina e epicatequina na dieta. Como resultados, os autores relatam que ambos os compostos exerceram efeitos benéficos na redução da expressão dos marcadores de disfunção endotelial, mas somente a catequina reduziu a expressão das citocinas citadas.

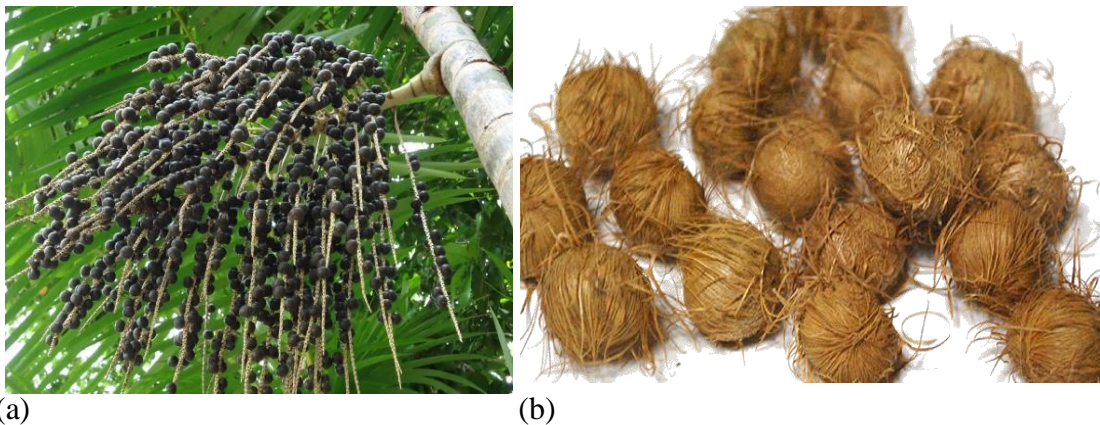
Negrão et al. (2013), também utilizando a catequina em seus experimentos, observaram o aumento da viabilidade de células endoteliais e da taxa de migração celular em concentrações de 100 μ M; já em concentrações abaixo de 1 μ M, os efeitos não foram observados. Em VSMC de aorta humana, houve inibição da migração celular na concentração de 100 μ M de catequina. Houve ainda a inibição na secreção de TNF- α no sobrenadante dos dois tipos celulares, porém não houve alteração significativa na atividade do fator de transcrição NF- κ B em células endoteliais. Por fim, Kleemann et al. (2011) observaram o efeito protetor da quercetina na peroxidação lipídica induzida por H₂O₂ em células endoteliais humanas, e ainda a indução na expressão de e-selectina e VCAM-1. Foram aferidos ainda os efeitos anti-proliferativo e anti-inflamatório do composto fenólico em modelo murino de aterosclerose.

Por conta da bioatividade exercida *in vitro* e *in vivo*, os compostos fenólicos presentes em alimentos têm sido considerados possibilidades terapêuticas na prevenção e no tratamento de uma série de doenças crônicas não-transmissíveis. Nesse sentido, o açaí vem ganhando destaque devido à sua elevada capacidade antioxidante e anti-inflamatória, sendo o seu uso como alimento funcional promissor.

1.8 O extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)

O açaí (*Euterpe oleracea* Martius) é um fruto originário da Amazônia e consumido em regiões do Brasil, Suriname e Colômbia. A espécie vegetal pertence à família botânica *Arecaceae* e consiste em uma palmeira de múltiplos caules, com até 25 caules em cada moita. Os troncos das árvores possuem alturas entre 3 e 20 metros, e diâmetros de 7 a 18 centímetros. O fruto apresenta cor violeta, diâmetro de cerca de 13,5 milímetros e peso de cerca de 2g, e tem sua maturação completa em até 175 dias. Seu caroço apresenta cor bege e representa até 83% do peso do fruto. O consumo do açaí é amplamente difundido no Brasil sob a forma de sucos, sorvetes e bebidas. Além do uso como alimento, o açaí tem sido utilizado no tratamento de diversos sintomas (tais como febre e dores) por comunidades amazônicas e populações indígenas (HEINRICH et al., 2011; YAMAGUCHI, PEREIRA, LAMARÃO, 2015; MOURA; RESENDE, 2016).

Figura 2 - Imagens ilustrativas do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)



Legenda: (a) Inflorescência de um açaizeiro; (b) Membrana fibrosa que reveste o caroço.

Recentemente, seu papel como alimento funcional vem ganhando destaque e é atribuído primordialmente ao seu conteúdo de compostos fenólicos. Estudos demonstram que a polpa do açaí é rica em epicatequinas, catequinas, homoorientina, orientina, isovitexina e antocianinas, sendo as mais abundantes cianidina 3-*O*-glicosídeo e cianidina 3-*O*-rutinosídeo (GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a). É importante destacar sua elevada capacidade antioxidante *in vitro*, em especial contra radicais superóxido e peróxido (SCHAUSS et al., 2006b). O extrato hidro-alcoólico do caroço do açaí, por sua vez, é rico em epicatequinas, catequinas e proantocianidinas, sendo o conteúdo de fenólicos totais na polpa e

no caroço cerca de 18 e 25%, respectivamente (RODRIGUES et al., 2006; ROCHA et al., 2007; DE MOURA et al., 2012).

Estudos recentes demonstraram efeitos benéficos no sistema cardiovascular exercidos pelo extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (*açaí seed extract*; ASE). Rocha et al. (2007) observaram que o ASE promove efeito vasodilatador dependente do endotélio em leito arterial mesentérico (LAM) de ratos *Wistar*; esse efeito deve ocorrer via indução do NO e possivelmente via liberação de EDHF. Em trabalho posterior (Rocha et al., 2008), os autores relatam que o ASE reverteu a hipertensão instaurada em 4 diferentes modelos de hipertensão experimental, provavelmente por ação antioxidante e vasodilatadora. Em modelo SHR (*spontaneously hypertensive rats*), ratos recém-desmamados que receberam ASE tiveram a instauração do quadro hipertensivo prevenida. A expressão de eNOS aumentada em LAM de ratos SHR em comparação aos animais normotensos foi diminuída com ASE. Além disso, o ASE foi capaz de reduzir um importante marcador de dano oxidativo celular em lavado bronco-alveolar de ratos saudáveis submetidos a inalação de fumaça de cigarro. Também em Moura et al. (2011) e Moura et al. (2012), o ASE atuou de forma benéfica na redução dos danos oxidativo e inflamatório induzidos por fumaça de cigarro em modelo murino de inflamação pulmonar aguda e crônica.

No estudo de Oliveira et al. (2010), os autores avaliaram a resposta vasodilatadora dependente do endotélio em LAM de camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura (dieta *high fat*, indutora da síndrome metabólica). Essa resposta era menor em animais do grupo *high fat* em comparação ao grupo controle, que recebeu dieta normolipídica. A administração do ASE na dose de 300 mg/kg/dia, no entanto, foi capaz de restaurar a resposta vasodilatadora do endotélio. Os marcadores da síndrome metabólica avaliados, tais como perfil lipídico, glicemia, resistência à insulina e marcadores do dano oxidativo celular, foram aumentados com a dieta *high fat*, sendo esse aumento prevenido por ASE.

O trabalho de Costa et al. (2012) pretendeu avaliar o efeito protetor do ASE em modelo de hipertensão renovascular causada pela estenose da artéria renal (*two-kidney, one-clip*; 2K-1C), que é associado a alterações morfofuncionais na vasculatura. Os autores observaram que o ASE foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial sistólica em animais 2k-1C. A vasodilatação dependente do endotélio em resposta à acetilcolina foi inferior em modelo 2K-1C em relação ao grupo controle, sendo essa resposta restaurada em LAM de animais tratados com ASE. Houve redução do estresse oxidativo em LAM de animais tratados com ASE, mensurado através da expressão e da atividade de

enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de marcadores do dano oxidativo celular. O tratamento com ASE foi eficaz na redução dos danos estruturais e no remodelamento de artérias mesentérica e aorta induzidos pelo modelo de hipertensão renovascular.

Por fim, em recente trabalho, Costa et al. (2017) avaliaram o efeito do ASE na injúria renal por isquemia crônica, em modelo 2K-1C. Os autores observaram o aumento da pressão arterial sistólica, do volume renal, da deposição de colágeno e do volume glomerular em animais 2K-1C em relação ao Controle. Com exceção do volume renal, o ASE preveniu todos os efeitos. O estresse oxidativo, avaliado através dos marcadores de dano oxidativo em proteínas e lipídios celulares, foi atenuado em animais 2K-1C tratados com ASE, bem como foi atenuado o aumento da expressão de proteínas envolvidas na defesa antioxidante enzimática (SOD, CAT e GPx). Os autores concluíram que o ASE foi capaz de prevenir a injúria e a disfunção renal, provavelmente devido à sua capacidade antioxidante e anti-hipertensiva.

Diante do exposto, sugerimos a hipótese de que o ASE seja capaz de exercer ações antioxidante e anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais frente à ação deletéria de toxinas urêmicas.

2 JUSTIFICATIVA

Em pacientes com DRC, o declínio da função renal é acompanhado do aumento da prevalência de DCV e da mortalidade. Por isso, a prevenção de DCV é de suma importância nesses pacientes. Diversos fatores de risco da DRC são associados à gênese de doenças cardiovasculares; dentre esses fatores, é relevante o papel das toxinas urêmicas. Estratégias terapêuticas com vistas à redução dos danos ocasionados por essas toxinas ainda são insuficientes. Nesse contexto, torna-se importante avaliar o potencial efeito benéfico dos compostos fenólicos do caroço do açaí nos danos causados pelas toxinas urêmicas em células endoteliais humanas e em modelo experimental de DRC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório do extrato do caroço do açaí na presença de toxinas urêmicas (indoxil sulfato e *p*-cresil sulfato) em diferentes modelos experimentais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade metabólico-funcional de células endoteliais na presença das toxinas urêmicas (IS e pCS) em células HUVEC tratadas ou não com ASE;
- Avaliar marcadores de inflamação e estresse oxidativo em células endoteliais na presença das toxinas urêmicas (IS e pCS) em células HUVEC tratadas ou não com ASE;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos e de função renal em modelo murino de DRC tratado ou não com o ASE;
- Avaliar marcadores de dano oxidativo em modelo murino de DRC tratado ou não com o ASE.

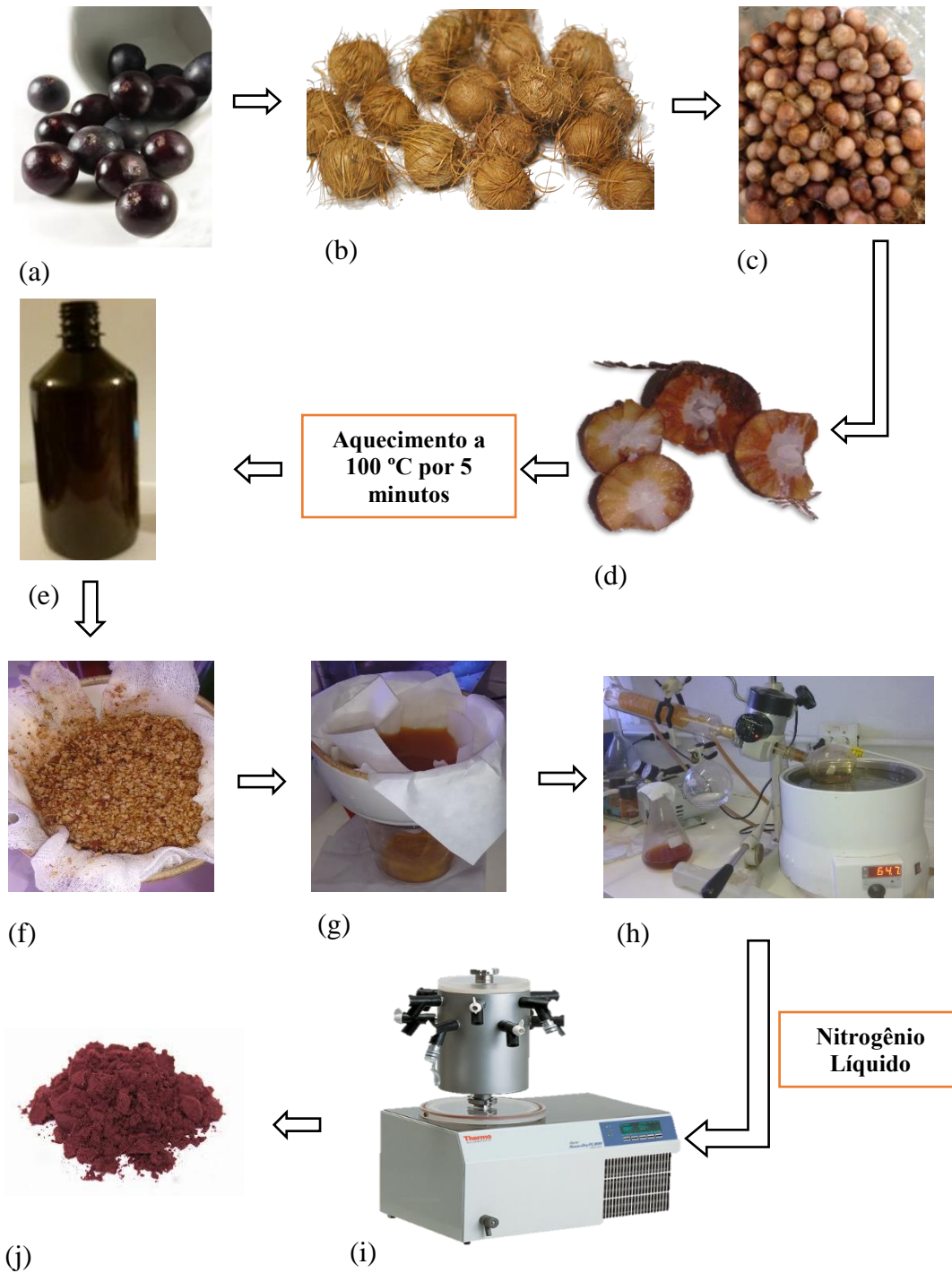
4 MÉTODOS

4.1 Confeção do extrato hidro-alcoólico do caroço de açai (*Euterpe oleracea* Mart.).

Os frutos frescos foram processados de acordo com Rocha et al. (2007) para obtenção do extrato hidro-alcoólico do caroço do açai. Os frutos, provenientes da cidade de Belém (Pará, Brasil), foram fornecidos pelo Professor Pergentino Souza da Universidade Federal do Pará (UFPA). Aproximadamente 200 g do fruto foram pesados, ainda congelados, e despulpados com auxílio de multiprocessador (Walita Mega Master). A membrana fibrosa dos caroços foi retirada manualmente e os caroços foram triturados com auxílio de graal e pistilo, e em liquidificador. Foram adicionados aos caroços triturados 400 mL de água destilada e a mistura foi submetida à decocção. Após 5 minutos de fervura, todo o decoto obtido foi resfriado naturalmente e acondicionado em garrafa de vidro âmbar com etanol P.A (400 mL) durante 10 dias sob refrigeração, com agitação mecânica (agitador Cientec CT-150) diária de 40 minutos em temperatura ambiente. Após este período o extrato hidro-alcoólico foi filtrado em gaze e papel de filtro de 22 μ m, com o auxílio de uma bomba avácuo (Prismatec 121). O filtrado foi rotaevaporado sob baixa pressão a 65°C (Fisatom 801), congelado em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado (Heto PowerDry LL3000, Thermo Scientific).

Após o preparo de todos os extratos a serem utilizados, o teor de compostos fenólicos foi avaliado, assim como o seu potencial vasodilatador verificado através da reatividade vascular. Essas medidas são utilizadas como controle de qualidade e viabilidade do extrato para a posterior utilização. A concentração de compostos fenólicos no ASE, medida pelo procedimento de Folin-Ciocalteu para análise total de fenóis (SINGLETON; ROSSI, 1965), foi de aproximadamente 250 mg/g de extrato. Usualmente, 100 g do caroço proporciona aproximadamente 5 g de extrato liofilizado.

Figura 3 - Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico do caroço de açai



Legenda: (a)- Fruto do açai; (b)- Membrana fibrosa do açai após despoldamento; (c)- Caroço do açai sem a membrana fibrosa; (d)- Caroço triturado; (e)- Extração em solução de etanol 50% v/v (10 dias); (f)- Filtração com gaze ; (g)- Filtração com papel filtro; (h)- Rotaevaporação; (i)- Liofilização; (j)- Açai Seed Extract (ASE).

4.2 Culturas de células

4.2.1 Condições de cultura celular

Para realização deste trabalho foi utilizada a linhagem de células endoteliais humanas imortalizadas *Human Umbilical Vein Endotelial Cells* (HUVEC; ATCC® CRL1730™). As células HUVEC foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 Glutamax® (Gibco, *Life Technologies*, EUA) suplementado com estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, SP, Brasil).

As células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Os experimentos *in vitro* foram realizados de acordo com as recomendações do *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox), revisadas em Cohen et al. (2007). As concentrações de pCS e IS utilizadas nos estudos *in vitro* foram de 40µg/mL (212µM) e 63µg/mL (250µM), respectivamente, compatíveis com as concentrações médias observadas em humanos em estágio 5 da DRC (VANHOLDER et al., 2014). Como ambas as toxinas são sintetizadas na forma de sal de potássio, uma solução de K₂SO₄ em concentração de 35µg/mL (200µM) foi utilizada como controle para igualar as concentrações desse íon. Uma vez que as toxinas IS e pCS são majoritariamente encontradas em sistemas biológicos ligadas às proteínas plasmáticas, utilizou-se meio de cultura suplementado com albumina de soro bovino (35g/L) para realização dos ensaios, em concordância com o preconizado pela EUTox (COHEN et al., 2007).

4.3 Ensaio de viabilidade celular com o ASE e com toxinas urêmicas

A avaliação da viabilidade celular foi realizada com uso do reagente alamarBlue® (*Life Technologies*, EUA), o qual se baseia na incorporação de um indicador REDOX (oxidação-redução) que tem sua cor alterada em resposta à atividade metabólica da célula. O composto ativo contido em alamarBlue®, inicialmente de cor azul e não fluorescente, é reduzido na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria de células metabolicamente ativas e passa a ter coloração violeta e emitir fluorescência, relacionada ao número de células viáveis.

Num primeiro momento as células endoteliais foram incubadas com diferentes concentrações de ASE visando determinar a concentração mais adequada do extrato a ser utilizada nos ensaios *in vitro*. Brevemente, 1×10^4 células/poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços a um volume inicial de 200µL. Após 24h de incubação a 37°C em

atmosfera úmida de 5% de CO₂ para permitir a aderência celular, 200µL de meio RPMI 1640 suplementado com 1% de antibiótico (ATB) e 2% de SFB, e contendo ASE em diferentes concentrações (0,1 a 100µg/mL), foram adicionados. Seguindo o mesmo protocolo de plaquemaento os efeitos das toxinas urêmicas IS e pCS sobre a viabilidade celular também foram determinados. Assim, mantendo as mesmas condições de cultivo celular as células foram incubadas com ASE (10µg/mL; concentração onde não houve perda da viabilidade celular) PCS (40µg/mL) ou IS (63µg/mL). Após os respectivos períodos de tratamento (0, 24, 48 ou 72hs), o meio de cultura foi removido através de inversão da placa e 20µL de alamarBlue® em meio RPMI livre de vermelho de fenol foi adicionado. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ pelo período de 1-4 horas e a absorbância de cada poço foi determinada em espectrofotômetro a 570nm e 600nm (*Plate Chameleon Multilabel Detection Platform*, Hidex).

4.4 Avaliação de morte celular por azul de Trypan

O ensaio com azul de Trypan é baseado no princípio de que células viáveis não captam o corante em questão, ao contrário de células não viáveis, facilitando a visualização da morfologia celular e a contagem dos núcleos celulares. As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^4 células/poço e incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ por 24h. Posteriormente, foi adicionado meio RPMI 1640 (suplementado com 1% ATB e 2% SFB) contendo ASE (10µg/mL), PCS (40µg/mL) ou IS (63µg/mL), seguido de incubação por 48hs. O meio de cultura foi então descartado por inversão da placa, para posterior lavagem com tampão PBS (500µL/poço). Após essa etapa, foi adicionada a enzima Tripsina (100µL/poço) e as células foram incubadas por 10 minutos. A seguir, foi adicionado tampão PBS (500µL/poço) e as células foram delicadamente homogeneizadas com auxílio de pipeta e transferidas a tubos para centrífuga. Realizado esse procedimento, as células foram centrifugadas por 4 minutos a 1000 rpm e 400µL de solução de azul de Trypan (0,5%) foram acrescentados a cada tubo. As células viáveis e não viáveis foram contadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS1000) com auxílio de câmara de Neubauer.

4.5 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular de células endoteliais foi realizado de acordo com o modelo estabelecido por Bürk (1973) de cicatrização *in vitro*. As células foram plaqueadas em

placas de 12 poços na concentração de 10^5 células/poço e incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 por 24h. Após tornarem-se confluentes, uma lesão na camada unicelular foi realizada com o auxílio de uma ponteira e imagens foram capturadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS1000). As células foram lavadas com tampão PBS (*phosphate saline buffer*) e meio RPMI 1640 suplementado com 1% ATB e 2% de SFB contendo ASE ($10\mu\text{g/mL}$), PCS ($40\mu\text{g/mL}$) ou IS ($63\mu\text{g/mL}$) foi adicionado. Após sucessivos períodos de incubação (6-24hs), imagens foram capturadas em campos microscópicos representativos de cada cultura celular, sendo posteriormente a área de cicatrização quantificada em cada um dos tempos analisados através do programa ImageJ® versão 1.49 (EUA).

4.6 Expressão gênica de citocinas inflamatórias pelo método de RT-qPCR

Para avaliação da expressão gênica de citocinas inflamatórias pelo método de RT-qPCR (reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativa), as células endoteliais foram plaqueadas em placas de 06 poços na concentração de 10^5 células/poço e incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 por 24h. Posteriormente, foi adicionado meio RPMI 1640 (suplementado com 1% ATB e 2% SFB) contendo ASE ($10\mu\text{g/mL}$), PCS ($40\mu\text{g/mL}$) ou IS ($63\mu\text{g/mL}$), seguido de incubação por 24hs. O meio de cultura foi então descartado por inversão da placa, com posterior lavagem com tampão PBS (1mL/poço) e adição de Trizol (1mL/poço) para extração do RNA. Uma vez realizado o protocolo de extração, o RNA foi quantificado com o uso do equipamento BioDrop μ LITE (BioDrop, Reino Unido). Após, realizou-se a conversão do RNA em cDNA (DNA complementar), molécula mais estável e passível de quantificação, através da ação da enzima Transcriptase Reversa (*Applied Biosystems High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Life Technologies, EUA*). Os parâmetros de ciclagem foram: 60 minutos a 37°C ; 5 minutos a 95°C ; resfriamento a 4°C por tempo indeterminado (em termociclador *Veriti 96Well Thermal Cycler, AppliedBiosystems, EUA*). Procedeu-se então com a adição de MasterMix (contendo enzima DNA polimerase) e *Primers* iniciadores do processo de replicação do cDNA, específicos para cada gene a ser analisado (*TaqMan® Gene Expression Assay, AppliedBiosystems, EUA*). A análise de PCR quantitativa foi realizada em equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, EUA)*.

4.7 Quantificação de TNF- α no sobrenadante de células endoteliais

A citocina TNF- α é um dos principais biomarcadores do processo inflamatório. Para avaliar a influência das toxinas urêmicas e do ASE na sua produção e secreção em células

endoteliais, utilizamos o kit *Human TNF Alpha PicoKine™* ELISA (EK0525; Boster Biological Technology, EUA). Foram plaqueadas 10^7 células em placas de Petri de 60 mm, e após incubação por 24h a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂, foi adicionado meio RPMI 1640 (suplementado com 1% ATB e 2% SFB) contendo ASE (10µg/mL), pCS (40µg/mL) ou IS (63µg/mL), seguido de incubação por 24hs. O sobrenadante foi então coletado em tubos com capacidade de 2,0mL e armazenado a -80°C até o momento da análise. Alíquotas de 100µL das amostras ou do padrão (*Human TNF Alpha standard*) foram adicionadas em cada poço de placa de 96 poços tratada com o anticorpo de captura (*Anti-Human TNF Pre-coated 96-well strip microplate*), seguida de incubação por 120 minutos a temperatura ambiente. O volume contido nos poços foi removido por inversão da placa e foi adicionada alíquota de 100µL do anticorpo biotilado (*Anti-Human TNF antibody*), seguida de incubação por 90 minutos a temperatura ambiente. Após essa etapa, foi adicionado o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase, sendo o mesmo incubado por 40 minutos; para a reação colorimétrica, foi adicionado o reagente para o desenvolvimento de cor (TMB), o qual é substrato para a peroxidase e cuja reação origina composto de cor azul. Esse composto é prontamente modificado a amarelo quando interrompida a reação. A densidade ótica do composto foi lida a 450nm em leitor de microplaca (*Plate Chameleon Multilabel Detection Platform*, Hidex).

4.8 Avaliação da expressão de proteínas pela técnica de *Western blot*

A técnica de *Western blot* foi utilizada para investigação da expressão de proteínas envolvidas na defesa antioxidante e na resposta inflamatória em células endoteliais. São elas as enzimas glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e o fator de transcrição NFκB fosforilado (pNFκB p50).

Foram plaqueadas 10^7 células em placas de petri de 60 mm, e após incubação por 24h a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂, as células foram tratadas sob as diferentes condições experimentais. Após o período de tratamento, as placas foram lavadas com tampão PBS gelado (*Phosphate buffer saline*) e lisadas com 100µL de tampão RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, SDS 0,1%, NaF 50 mM, pirofosfato de sódio 30 mM e água milli-Q) e 10µL coquetel de inibidores de proteases (Sigma Aldrich, Alemanha). O lisado foi recolhido em tubos de capacidade 1,5mL e centrifugado (140000xg, 5 min, 4°C). A concentração de proteínas foi determinada pelo kit BCA (Bio-Rad), conforme especificações do fabricante. Em seguida, o volume correspondente a 60 µg de proteína total foi adicionado

ao tampão de amostra e aquecido a 95°C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8% ou 10%) e submetidas à corrida eletroforética (20V, 328mA, 60min). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e os sítios de ligação inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução de BSA a 5% em TBS-T por período de 4h à temperatura ambiente. Os respectivos anticorpos das proteínas de interesse foram adicionados e incubados *overnight* a 4°C sob agitação suave. Após este período, as membranas foram lavadas 03 vezes com TBS-T por 10 minutos. Posteriormente às lavagens, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário não-conjugado por 40 minutos, seguido de sequência de lavagens com TBS-T, incubação com estreptavidina por 40 minutos e nova sequência de lavagens com TBS-T. A seguir, a revelação das membranas foi realizada com auxílio do kit *Clarity Western ECL* (Bio-Rad) e do equipamento *ChemiDoc™ XRS* (Bio-Rad). As imagens foram analisadas com auxílio do *software Imagelab V4.0 build 16* (Bio-Rad) e *software ImageJ*.

4.9 Atividade das enzimas antioxidantes

4.9.1 Atividade da catalase

A enzima catalase tem a função de catalisar a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. Sua atividade foi avaliada através do consumo de H_2O_2 no lisado celular por espectrofotometria no comprimento de onda de 240 nanômetros (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Foram utilizadas alíquotas de 20 e 40 μ L de amostra de cada grupo experimental em cubetas de quartzo separadas. As amostras foram incubadas com 2mL de tampão fosfato e H_2O_2 (0,16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 0, 30 e 60 segundos (GREENE et al., 1999), sendo os resultados normalizados através da dosagem de proteínas de cada amostra pelo método de Bradford (1976).

4.9.2 Atividade da glutatona peroxidase (GPx)

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, utilizando a glutatona (GSH) como doadora de elétrons (BURGOYNE et al., 2013). A atividade da GPx foi medida em função da taxa de decaimento da NADPH por espectrofotometria no comprimento de onda de 340

nanômetros (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Foram utilizados 60µL de lisado celular de cada grupo experimental em cubetas separadas, sendo em cada cubeta adicionados 1590µl de tampão fosfato (PBS), glutathiona reduzida (GSH; 2mM), glutathiona redutase (GR; 0,11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL). Após incubação por 10 minutos, foram adicionados 200µl de NADPH (10 nM), seguida de incubação por mais 3 minutos. Na sequência, adicionou-se 200µl de H₂O₂ e a leitura foi feita por 3 minutos a 340nm (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Os resultados foram normalizados pela dosagem de proteínas de cada amostra utilizando-se o método de Bradford (1976).

4.9.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por metodologia adaptada de Bannister et al. (1987). O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o H₂O₂, tendo o ânion superóxido como substrato. A atividade enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm). A adrenalina é oxidada pelo ânion superóxido para formar um produto róseo chamado adrenocromo. Foram utilizadas alíquotas de 20, 40 e 60µL de cada amostra de lisado celular em cubetas separadas. Em cada cubeta, foram adicionados 20µL de catalase (0,0024g/mL de água destilada), 970µL de tampão glicina (0,75g em 200mL de água destilada) e 40µL de norepinefrina (95mg em 5mL de água destilada + 15µl/mL de HCl fumegante). Por fim, procedeu-se com a leitura das amostras durante 3 minutos a 480nm (Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Scientific). Foi realizada normalização dos resultados através da dosagem de proteínas de cada amostra pelo método de Bradford (1976).

4.10 **Carbonilação de proteínas**

Para avaliação do estresse oxidativo *in vitro*, foi realizada a quantificação de proteínas carboniladas, utilizando-se protocolo experimental adaptado de Levine et al. (1990). De forma sucinta, foram coletadas duas alíquotas de 100µL cada do lisado celular. Para cada uma das alíquotas, foram adicionados 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 2.000 rpm e temperatura de 28°C, sendo o sobrenadante descartado. Uma parte das amostras (série A) foi incubada com 500µL de DNPH e outra parte (série B) incubada com 500µL de HCl 2 M por 10 minutos a 28°C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de TCA 10% em ambas as séries de amostras e as mesmas foram

centrifugadas por 2 minutos a 2.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Os pellets foram então lavados com solução de etanol: acetato de etila (1:1) e centrifugados por 2 minutos a 2.000 rpm e temperatura de 28°C. Após descarte do sobrenadante, as etapas de lavagem com solução de etanol: acetato de etila e subsequente centrifugação foram repetidas mais duas vezes. Todas as amostras foram adicionadas de 1mL de guanidina 6M, com posterior centrifugação a 5.000 rpm por 3 minutos a 28°C. A leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 370nm (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). As proteínas totais das amostras foram quantificadas através do kit da BioRad em placa de 96 poços, utilizando uma curva padrão de albumina bovina, conforme instruções do fabricante.

4.11 **Ensaio *in vivo***

4.11.1 Delineamento experimental

O ensaio *in vivo* foi aprovado pelo Comitê de Ética de Estudos em Animais da Universidade de Lyon, França (EU05340-INSA-Lyon-APAFiS), sendo realizado sob autorização APAFIS n°3210-2015121608242729v1. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações do Ministério da Agricultura (*Ministère del'Agriculture*, n° 87–848) e das Diretrizes do Conselho Europeu para Manejo e Uso de Animais de Laboratório (*European Union Council Directive for the Care and Use of Laboratory Animals of November 24, 1986; 86/609/EEC*).

Foram utilizados no ensaio 40 camundongos machos da linhagem CD1 Swiss (Janvier-Labs, França) acondicionados em ambiente de temperatura e umidade controladas (21°C±0,5°C e 60%–70% umidade), sob ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso às dietas e água. A doença renal crônica foi induzida quimicamente com dieta contendo adenina (0,25% p/p; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França); subprodutos formados no metabolismo da adenina se depositam na forma de cristais na região tubular proximal e induzem dano tubulointersticial e fibrose (RABE et al., 2016). A dieta padrão comercial utilizada no ensaio *in vivo* tinha como composição nutricional 46,7% de carboidratos, 3,9% de fibras, 16,1% de proteínas, 3,1% de lipídios e valor calórico de 3.339 Kcal/kg (dieta A04, Safe Diets, França).

Os animais foram randomicamente divididos em 04 grupos, a saber: (1) Grupo Controle, recebeu dieta padrão comercial e água ao longo de todo o experimento; (2) Grupo

Controle + ASE, que recebeu dieta padrão ao longo de todo o experimento e bebida contendo ASE durante a segunda metade do experimento (ASE diluído na água a ser ofertada aos animais, cuja dose era de 300 mg/kg/dia); (3) Grupo DRC, que teve a indução da doença renal através da oferta de dieta contendo adenina (0,25%) durante 04 semanas, seguida de oferta de dieta padrão nas 04 semanas posteriores; (4) Grupo DRC+ASE (300mg/Kg/ dia, em água de beber), que recebeu dieta contendo adenina durante 04 semanas, e após a indução da doença renal, recebeu dieta padrão e bebida contendo ASE nas 04 semanas posteriores.

Os animais tiveram o peso corporal aferido na frequência de 03 vezes na semana, assim como o consumo da dieta e a ingestão hídrica. Na semana anterior ao sacrifício, 02 animais de cada grupo foram alocados em gaiolas metabólicas para coleta da urina, com a finalidade de avaliação da diurese e dos demais indicadores da função renal, além da análise de metabólitos (metodologias descritas a seguir). O monitoramento da glicemia de jejum (após 08 horas de jejum) e pós-prandial foi realizado através da coleta de uma gota sangue da porção terminal da cauda e com auxílio de glicurômetro Accu-Check®Performa (Roche, Meylan, França).

Ao final das 08 semanas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (35mg/kg) e eutanasiados, para posterior remoção dos órgãos e tecidos de interesse. Tais tecidos e órgãos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises. O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos heparinizados e centrifugado (3500g/2 min) para separação do plasma, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises. O peso e o comprimento corporais foram mensurados, e o índice de Lee foi calculado pela razão entre o peso corporal e o comprimento naso-anal dos animais.

A avaliação da função renal dos animais foi realizada através da análise dos seguintes parâmetros: ingestão hídrica (mL/24hs), diurese (mL/24hs), proteinúria (mg/24hs) e concentração de uréia plasmática (mg/dL).

4.11.2 Análises bioquímicas

Para a quantificação de uréia em plasma dos animais, foi utilizado kit comercial (Sobioda, França), baseando-se na atividade da enzima urease, adicionada ao meio reacional, e sua capacidade em degradar a uréia em composto colorimétrico. De forma sucinta, alíquotas de 1µL de plasma foram coletadas e adicionadas dos respectivos reagentes em diluições

recomendadas pelo fabricante. Após período de incubação, foi realizada leitura em espectrofotômetro (MultiskanGo, ThermoScientific) em comprimento de onda de 580nm.

A dosagem de proteínas totais foi realizada em urina dos animais, de acordo com método de Bradford (1976). Para tal, alíquotas de 10 μ L de cada fluido foram retiradas e adicionadas do reagente de Bradford (Sigma Aldrich, EUA), com posterior incubação e leitura em espectrofotômetro a 595nm (MultiskanGo, ThermoScientific). Foi realizada curva padrão utilizando-se albumina do soro bovino (BSA) (Sigma Aldrich, EUA).

A dosagem de colesterol e triglicerídeos em plasma foi realizada através de kits comerciais (Sobioda, França), baseando-se em reação enzimática colorimétrica. Em ambas as análises, alíquotas das amostras de plasma foram diluídas e adicionadas dos respectivos reagentes em diluições recomendadas pelo fabricante. Após período de incubação, foi realizada leitura em espectrofotômetro (MultiskanGo, ThermoScientific) em comprimento de onda de 505nm.

4.11.3 Carbonilação de proteínas em fígado e rim dos animais

A quantificação de proteínas carboniladas foi realizada em tecidos hepático e renal dos animais como um indicador do estresse oxidativo *in vivo*. De forma resumida, foram coletadas duas alíquotas de 100 μ L cada de homogenato do tecido em questão. Para cada uma das alíquotas, foram adicionados 750 μ L de HCl (2,5N) como controle ou de DNPH (10mM). Após incubação por 1 hora em ambiente escuro, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 20% e posteriormente incubadas em banho de gelo por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi resuspenso em TCA 10%, para posterior centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com solução de etanol: acetato de etila (1:1) e centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, as etapas de lavagem com solução de etanol: acetato de etila e subsequente centrifugação são repetidas mais duas vezes. Após lavagem final, foi adicionada solução de hidrocloreto de guanidina (6M), e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 5 minutos a 4°C. Por fim, foram transferidos 200 μ L do sobrenadante de ambos os tubos para poços de uma placa de 96 poços, em duplicata, e foi mensurada absorvância a 370nm (MultiskanGo, ThermoScientific). A absorvância de cada amostra é corrigida subtraindo-se a absorvância apresentada pelo controle de cada amostra. Foi realizada normalização dos resultados através da dosagem de proteínas de cada amostra pelo método de Bradford (1976).

4.11.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como parte da avaliação do dano oxidativo renal nos animais, procedemos com a análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O dano em lipídios de membrana é estimado através da concentração do ácido malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica. A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), por sua vez, gera um produto de coloração rósea, cuja absorbância é lida a 532nm.

Alíquotas de 50-100µL de homogenato de tecido renal foram transferidas para tubos e acrescidas de solução de ácido tiobarbitúrico a pH 3,0 (10mM) e de ácido acético (P.A.). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vórtex e, após, as amostras foram incubadas a 95°C em banho seco por 1h, rapidamente resfriadas em gelo por 5 minutos e por fim acidificadas com HCl (6N). O complexo MDA-TBA formado foi extraído com acetato de etila, sendo separada a fase orgânica por centrifugação (3000rpm por 10 minutos). Após secagem em N₂ líquido para evaporação do solvente, foram adicionados 200µL da mistura etanol:água (1:9) e posteriormente um volume de 100µL foi injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent LC 1100). Para elaboração da curva padrão, foram elaboradas diferentes concentrações do ácido 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). Os parâmetros cromatográficos são os descritos a seguir: fase estacionária composta por coluna C18 de fase reversa (Nucleosil; 250x4,6mm, com 5µm de tamanho de partícula); fase móvel composta de metanol e água destilada (2:8); corrida isocrática com débito de 0,8mL/min; pressão de 150 bars. A absorbância do eluente foi monitorada por detector com arranjo de diodos e espectro na faixa do UV-VIS a 532 nm (DAD/ UV-VIS).

4.11.5 Dosagem de colágeno em tecido renal

O teor de colágeno em tecido renal foi determinado através da dosagem de hidroxiprolina. Para tal, utilizamos o kit *Hydroxyproline Assay* (Sigma-Aldrich, EUA), cujo método se baseia na reação de oxidação da hidroxiprolina com o composto 4-(dimetilamino)-benzaldeído (DMAB), resultando em produto colorimétrico proporcional ao conteúdo de hidroxiprolina presente. Em linhas gerais, alíquotas de 100µL do homogenato tecidual foram hidrolisadas em HCl (12M) a 120°C por 3 horas. Após hidrólise ácida, alíquotas de 50µL das amostras foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e secas em forno a 60°C. Prosseguiu-se com a incubação das amostras com cloramina-T à temperatura ambiente por 5 minutos, seguida da incubação com DMAB a 60°C por 90 minutos. A absorbância foi lida a

560nm (MultiskanGo, ThermoScientific) e a concentração de hidroxiprolina foi determinada com auxílio de curva padrão utilizando-se o composto cis-4-hidroxi-L-prolina. O cálculo do teor de colágeno foi realizado assumindo-se que 13,5% da molécula de colágeno é composta por hidroxiprolina (NEUMAN; LOGAN, 1950).

4.11.6 Análise dos compostos fenólicos em plasma e metabólitos na urina dos animais

Para análise dos compostos fenólicos em plasma e urina foram destinados 08 animais, sendo 04 animais pertencentes ao grupo Controle + ASE e 04 animais do grupo DRC+ASE. Um a dois animais de cada grupo foram alocados em gaiolas metabólicas por 24-48 horas para coleta de urina; para a análise em plasma, foi utilizado o total de 04 animais por grupo.

A extração dos compostos fenólicos em plasma foi realizada conforme descrito a seguir: alíquotas de 200µL das amostras foram adicionadas de 20µL de HCl (12N), 1mL de água destilada e 6mL de acetato de etila; após, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos. Foram removidos 6mL do sobrenadante e adicionados 3mL de acetato de etila para segunda extração. Após esse procedimento, foram removidos 3mL do sobrenadante e as amostras foram evaporadas em N₂ líquido a 38°C, para posterior ressuspensão no momento da análise cromatográfica.

Em amostras de urina, foi realizada extração em fase sólida (SPE; *solid phase extraction*). O cartucho utilizado para a extração (Waters SPE Oasis HLB 3mL, EUA) foi ativado com 2mL de metanol e lavado com 2mL de água destilada. Após esse procedimento, as amostras foram diluídas (1:1) em solução aquosa acidificada (H₃PO₄4%) e carregadas no cartucho. Em amostras do grupo Controle + ASE, houve etapa de clarificação por centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos, previamente ao carregamento no cartucho. Procedeu-se com as etapas de lavagem com 2mL de solução de água/metanol (95:5, v/v) e eluição com 2mL de metanol contendo ácido fórmico (1mL/L). Findada a extração, os volumes de amostra foram coletados e evaporados em N₂ líquido a 38°C, para posterior ressuspensão no momento da análise cromatográfica.

As amostras de urina foram ressuspensas em 500µL de fase A (composição da mesma será descrita a seguir), sendo ainda as amostras do grupo Controle + ASE previamente diluídas em água milli-Q (1:1). As amostras de plasma foram ressuspensas em 350µL de fase A. Os padrões utilizados na análise foram os seguintes: ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido isovanílico, ácido vanílico, ácido 4-(OH)-fenilacético, ácido 3,4-di(OH)-

fenilacético, ácido hipúrico, quercetina e quercetina-3-glicosídeo (em concentrações de 20ppm).

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu) acoplado a bomba LC-10AD, degaseificador (DGU-14A) e detector com arranjo de diodos com espectro na faixa do UV-VIS (DAD/ UV-VIS; SPD-M10A). Como fase estacionária, foi utilizada coluna Kromasil C18 (E177745; 5µm, 150x2,1mm; AkzoNobel), com pressão inicial de 164 kgf (amostras) e 141 kgf (padrões). O sistema gradiente de eluição foi composto pelas fases A (ácido fórmico 0,3% e acetonitrila 1% em água) e B (acetonitrila 1% em metanol), conforme demonstrado na Tabela 1. O fluxo utilizado foi de 1mL/minuto e o volume de injeção foi de 10µL. Os resultados foram calculados pelo *software LC Solution* e a quantificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das amostras com os tempos de retenção dos padrões, juntamente com a comparação de seus respectivos espectros. Os resultados foram expressos em µg do composto fenólico por mL de plasma ou urina.

Tabela 1 – Sistema gradiente de eluição utilizado nas análises de compostos fenólicos em plasma e urina dos animais experimentais

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (ácido fórmico 0,3% e acetonitrila 1% em água) (%)	Fase Móvel B (acetonitrila 1% em metanol) (%)
0	81,8	18,2
01	79,8	20,2
18	56,6	43,4
23	14,2	85,8
30	14,2	85,8
30,01	81,8	18,2
40,01	81,8	18,2

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

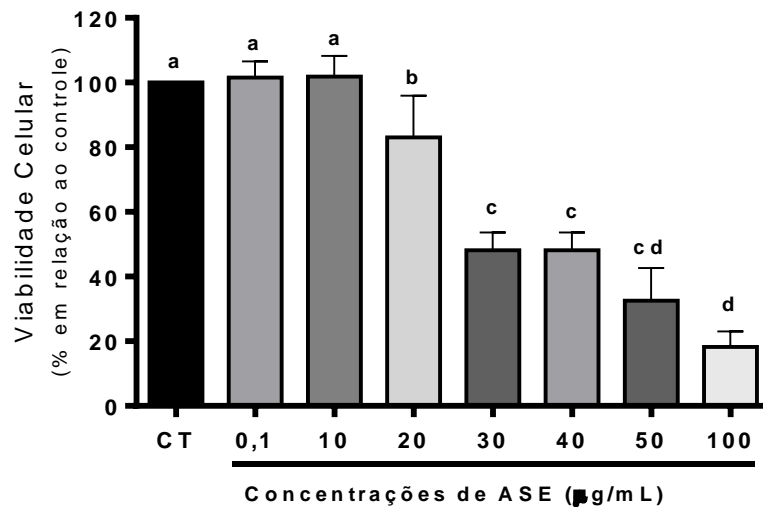
Os resultados foram comparados através da análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Para a análise dos compostos fenólicos em plasma e urina dos animais, foi utilizado o Teste T de *Student* para comparação entre as médias dos grupos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para análise dos dados biométricos do ensaio *in vivo*, foi utilizado software estatístico Stat View®. Para as demais análises, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prisma® versão 6.0 com nível de significância de 5% (bicaudal).

6 RESULTADOS

6.1 Viabilidade celular com ASE

A avaliação da viabilidade de células endoteliais na presença de diferentes concentrações de ASE foi realizada a fim de se determinar a concentração mais adequada do extrato a ser utilizada nos ensaios *in vitro* (Figura 4). As células endoteliais foram tratadas por 24h com diferentes concentrações de ASE (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$). Através dos dados obtidos, observamos que a partir da concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ houve redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle ($p < 0,05$). Tendo em vista que concentrações inferiores a 20 $\mu\text{g/mL}$ não alteraram a viabilidade celular em comparação ao controle, optou-se por utilizar a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ para a realização dos demais experimentos *in vitro*.

Figura 4 - Viabilidade de células endoteliais tratadas com ASE



Legenda: Viabilidade de células endoteliais tratadas com ASE. As células receberam tratamentos em diferentes concentrações de ASE (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$), e foram incubadas por 24hs. CT = grupo controle de células incubadas com meio suplementado de 1% ATB e 2% SFB. Os dados expressam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes ($n=8$) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

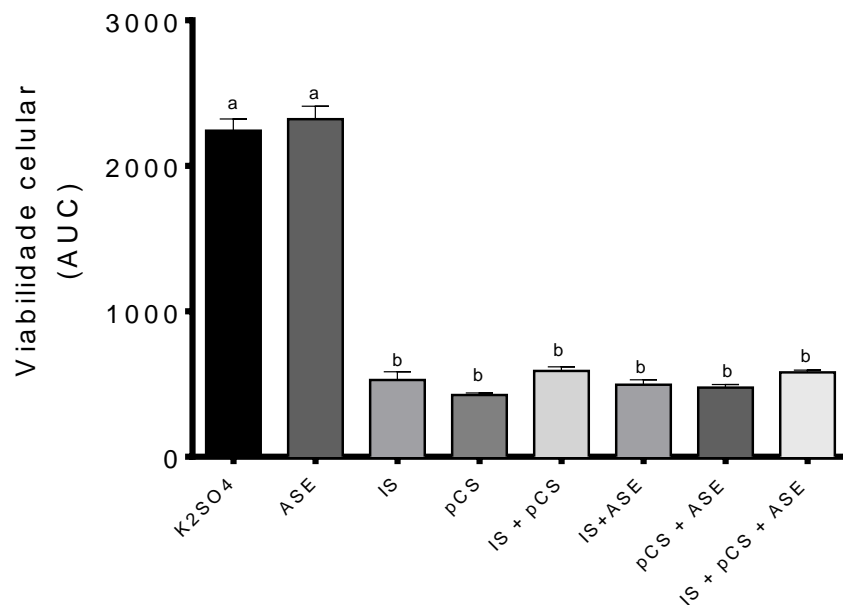
6.2 Ensaio de viabilidade celular

De acordo com o observado na Figura 5, a incubação com ambas as toxinas urêmicas IS e pCS, de forma isolada ou concomitante, reduziram a atividade metabólica das células, representada pelo menor percentual de redução do indicador alamarBlue® ($p < 0,05$). Em

comparação ao grupo Controle, houve redução de 76% e 81% na viabilidade celular em células tratadas com IS e pCS, respectivamente, e de 73% em células endoteliais tratadas com ambas as toxinas simultaneamente ($p<0,05$). Esse dado pode ser indicativo da perda de função celular, característica no processo de disfunção endotelial comumente encontrada em pacientes urêmicos.

A utilização do ASE na concentração de $10\mu\text{g/mL}$ não foi capaz de recuperar a atividade metabólica observada em nenhuma das condições analisadas. O tratamento com as toxinas urêmicas e ASE simultaneamente promoveu redução na viabilidade celular em 78% para o tratamento com IS e ASE, 79% para o tratamento com pCS e ASE, e 74% para o tratamento com ambas as toxinas e ASE, em relação ao grupo Controle ($p<0,05$). Já com a incubação isolada do ASE em HUVEC, houve manutenção da atividade metabólica celular, sem diferença significativa em relação ao controle ($p>0,05$).

Figura 5 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas e/ou ASE na viabilidade celular

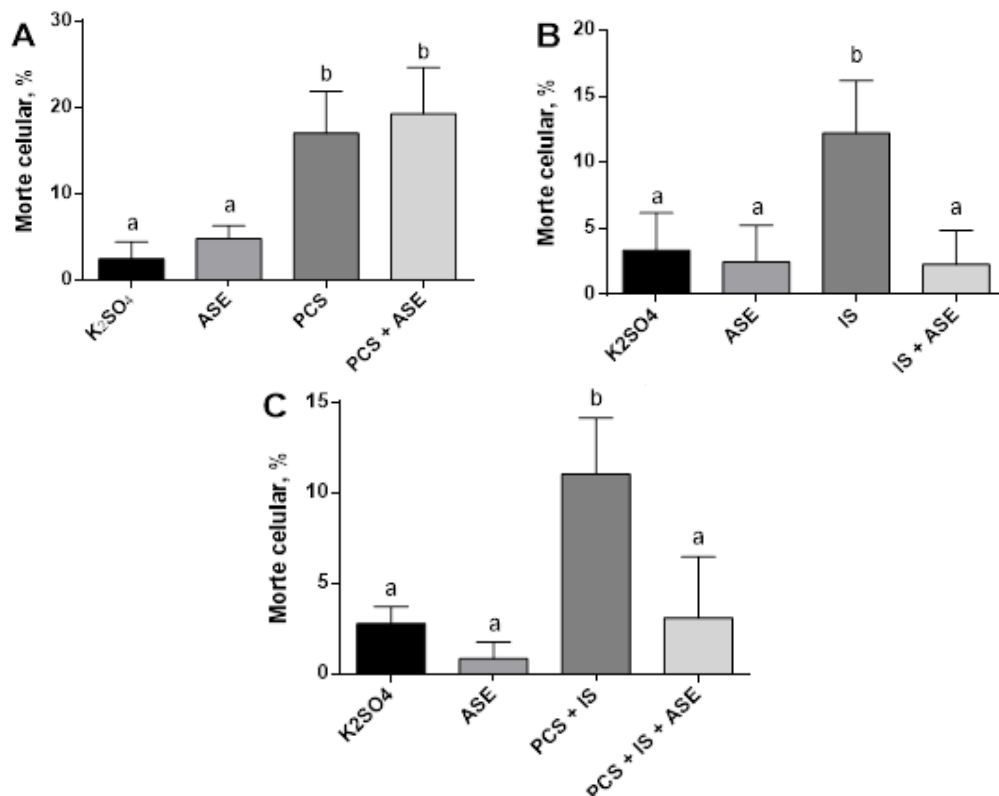


Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas e/ou ASE na viabilidade celular. As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com as toxinas urêmicas IS ($63\mu\text{g/mL}$) e pCS ($40\mu\text{g/mL}$), e ASE ($10\mu\text{g/mL}$), administrados isoladamente ou em concomitância, em diferentes períodos de incubação (0-72hs). As células do grupo controle receberam K₂SO₄ ($35\mu\text{g/mL}$). Os dados expressam média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes ($n=8$) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p<0,05$). AUC = área sob a curva.

6.3 Avaliação de morte celular por azul de Trypan

Através dos resultados obtidos, é possível observar que o tratamento com pCS culminou em um maior percentual de células inviáveis em comparação às células do grupo Controle (+594%), e que o tratamento com a toxina e o ASE em concomitância não foi capaz de reverter o quadro observado (+675%) ($p < 0,05$). Em células tratadas com IS, foi observado comportamento semelhante ao pCS em relação ao Controle (aumento de 263% no percentual de morte celular), porém células tratadas com IS e ASE tiveram o percentual de células inviáveis restaurado (-31%) ($p < 0,05$). O tratamento com ambas as toxinas IS e pCS igualmente apresentou maior percentual de morte celular em relação ao Controle (+295%), com restauração desse percentual ao nível observado no grupo Controle (+11%) ($p < 0,05$). As células tratadas somente com ASE apresentaram percentual de inviabilidade semelhante ao grupo Controle (Figura 6). Sugerimos, portanto, que o ASE pode atuar de forma benéfica na prevenção da morte celular com o tratamento com IS.

Figura 6 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na morte celular.

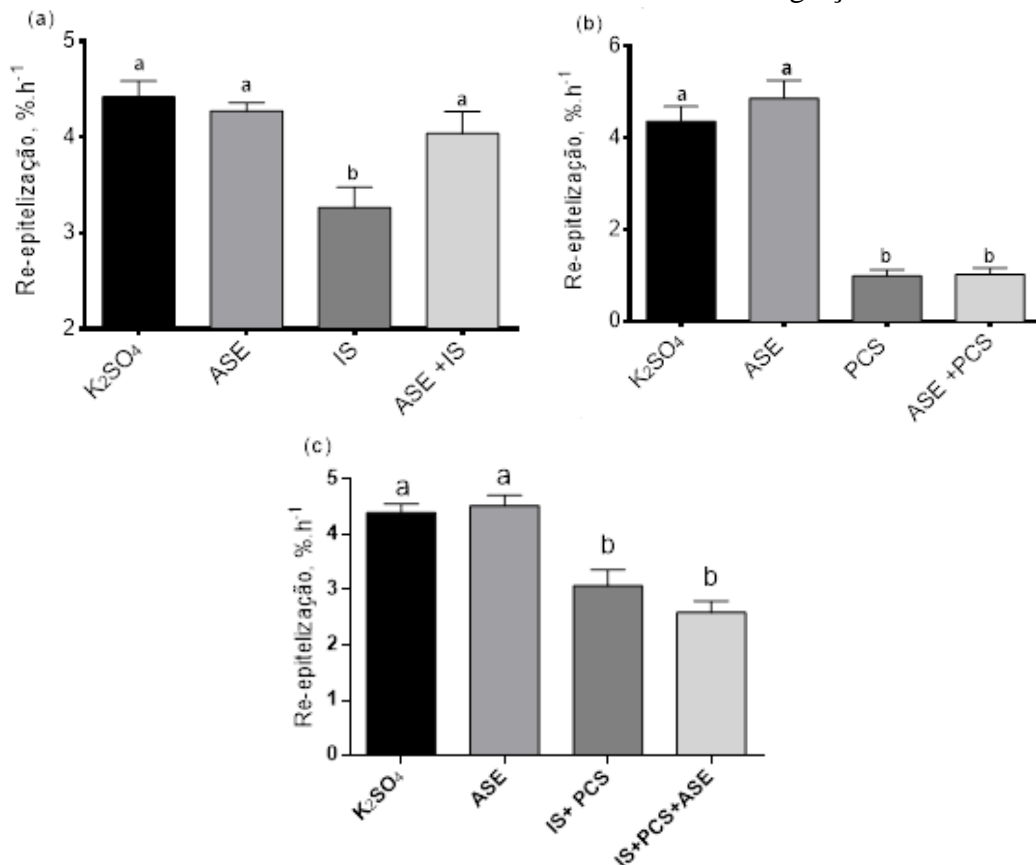


Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na morte celular. As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com ASE (10µg/mL) e/ou com as toxinas urêmicas (a) pCS (40µg/mL); (b) IS (63 µg/mL); (c) PCS (40µg/mL) + IS (63 µg/mL), e foram incubadas por 48hs. As células do grupo controle receberam K₂SO₄ (35µg/mL). Os dados expressam média ± desvio padrão de 5-8 experimentos (n=5-8) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

6.4 Migração celular

De acordo com o observado na Figura 7, podemos concluir que ambas as toxinas urêmicas (avaliadas de forma isolada ou concomitantemente) inibiram a migração celular, retardando o processo de regeneração após a lesão. Frente à incubação concomitante com ASE, observamos diferentes comportamentos: em células tratadas com IS, o ASE foi capaz de reverter o efeito deletério promovido; já com pCS, o ASE não foi capaz de restaurar a capacidade migratória e regenerativa celular. De modo semelhante ao tratamento com pCS, o ASE não foi capaz de restaurar a capacidade migratória de células incubadas com ambas as toxinas urêmicas em concomitância. Logo, concluímos que embora o tratamento com ASE não preveniu os danos ocasionados pelo pCS, ele foi capaz de prevenir os danos ocasionados pelo IS na migração de células endoteliais. As células tratadas somente com ASE apresentaram percentual de migração semelhante ao do grupo Controle ($p < 0,05$).

Figura 7 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na migração celular

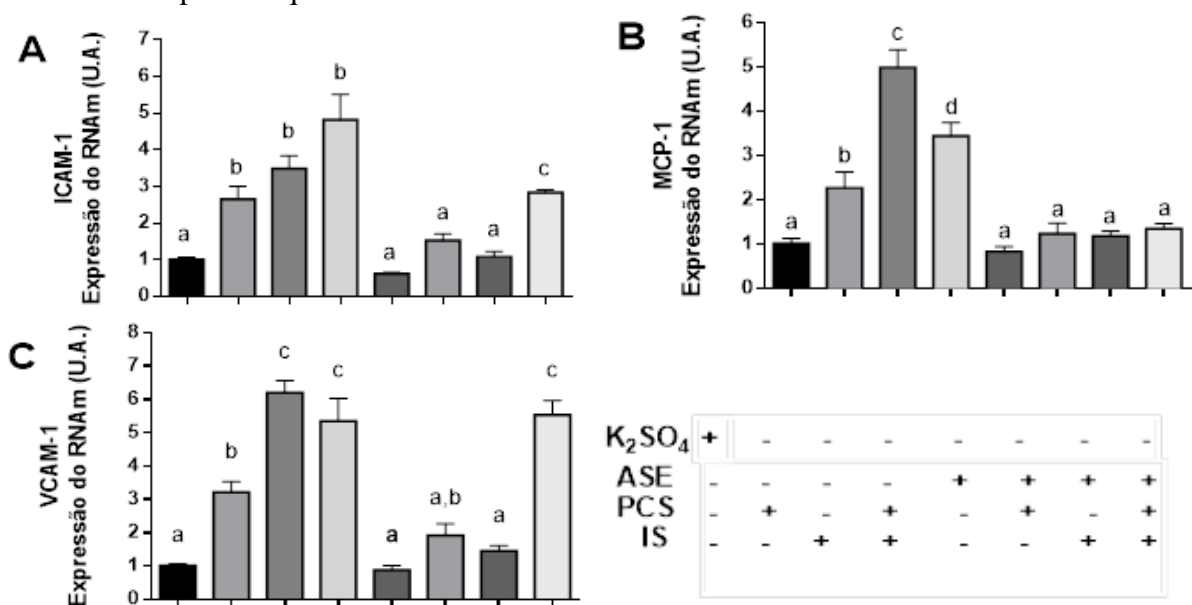


Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na migração celular. Uma lesão na monocamada confluyente de células endoteliais foi realizada, e posteriormente as células receberam os diferentes tratamentos com ASE (10µg/mL) e/ou com as toxinas urêmicas (a) IS (63µg/mL); (b) pCS (40 µg/mL); (c) ICS (63µg/mL) + PCS (40 µg/mL). As células do grupo controle receberam K₂SO₄ (35µg/mL). As células foram incubadas por até 24hs e a área re-epitelizada foi mensurada através de imagens obtidas em microscópio invertido. Os dados expressam média ± desvio padrão de 5 experimentos (n=5) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

6.5 Expressão de marcadores inflamatórios

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 8, o tratamento de células HUVEC com as toxinas pCS e IS (isoladas ou em concomitância) foi capaz de modular positivamente o gene responsável pela transcrição da molécula de adesão VCAM-1 em relação ao controle, bem como ocorreu com as outras moléculas analisadas ICAM-1 e MCP-1 ($p < 0,05$). O tratamento das células endoteliais com ASE, por outro lado, reverteu o aumento da expressão das citocinas em questão, apresentando-se de forma semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$). A adição de ASE ao meio de cultura contendo toxinas urêmicas culminou em diferentes resultados: em meio contendo pCS, a adição do ASE foi capaz de prevenir o aumento na expressão de MCP-1 e ICAM-1, mas esse efeito na expressão de VCAM-1 não foi significativo ($p > 0,05$). Já com relação à toxina IS, o acréscimo de ASE demonstrou-se eficaz em modular negativamente a expressão das três moléculas estudadas. Por fim, a adição de ASE em meio contendo ambas as toxinas resultou na diminuição da expressão de MCP-1, tendo esse efeito menor amplitude na expressão das demais moléculas de adesão. Sugerimos então que o ASE foi capaz de modular de forma positiva os efeitos deletérios causados por IS na expressão de moléculas pró-inflamatórias em células endoteliais, de modo que tal efeito foi menos significativo em relação ao tratamento com pCS.

Figura 8 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na expressão de citocinas inflamatórias por RT-qPCR

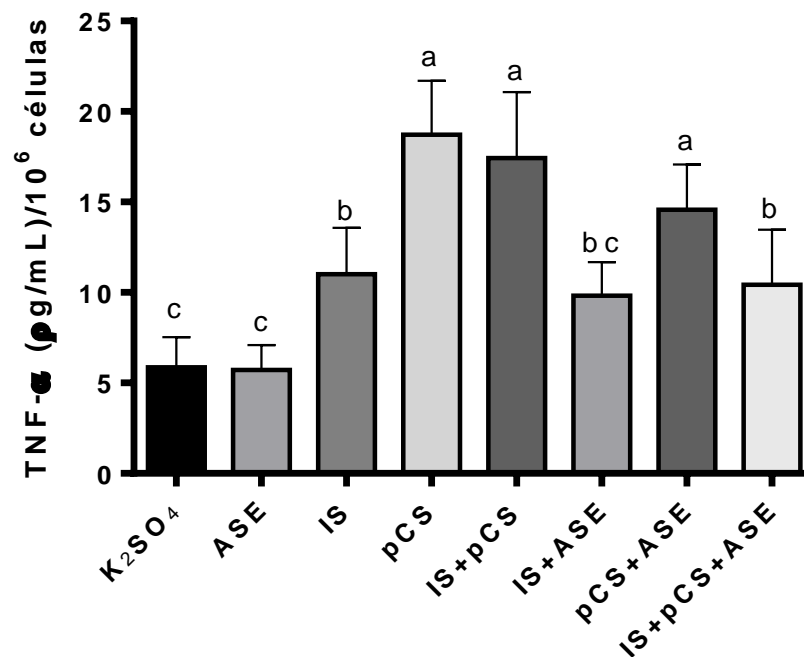


Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na expressão das citocinas inflamatórias por RT-qPCR. As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com as toxinas urêmicas IS (63 µg/mL) e pCS (40 µg/mL) e ASE (10 µg/mL), administrados isoladamente ou em concomitância, e foram incubadas por 24hs. As células do grupo controle receberam K₂SO₄ (35µg/mL). Os dados expressam média ± desvio padrão de 3 experimentos (n=3) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

6.6 Produção de TNF-alfa pelas células endoteliais

Os resultados da concentração de TNF- α no sobrenadante de células endoteliais tratadas com toxinas urêmicas e ASE estão expostos na Figura 9. Através da Figura, foi possível observar que o tratamento isolado com IS e pCS aumentou de forma significativa a concentração da citocina pró-inflamatória em comparação aos grupos Controle e Controle + ASE ($p < 0,05$). De forma semelhante, as células tratadas com as toxinas simultaneamente também apresentaram maiores concentrações de TNF- α em relação às células do grupo Controle e tratadas apenas com o ASE ($p < 0,05$). O tratamento com ASE foi capaz de diminuir a concentração de TNF- α no sobrenadante de células tratadas com IS+pCS, sem efeitos significativos sobre o tratamento com IS e pCS isoladamente.

Figura 9 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na secreção de TNF- α pelas células endoteliais



Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na secreção de TNF- α pelas células endoteliais. As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com as toxinas urêmicas IS (63 μ g/mL) e pCS (40 μ g/mL) e ASE (10 μ g/mL), administrados isoladamente ou em concomitância, e foram incubadas por 24hs. As células do grupo controle receberam K₂SO₄ (35 μ g/mL). Os dados expressam média \pm desvio padrão de 3 experimentos (n=3) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

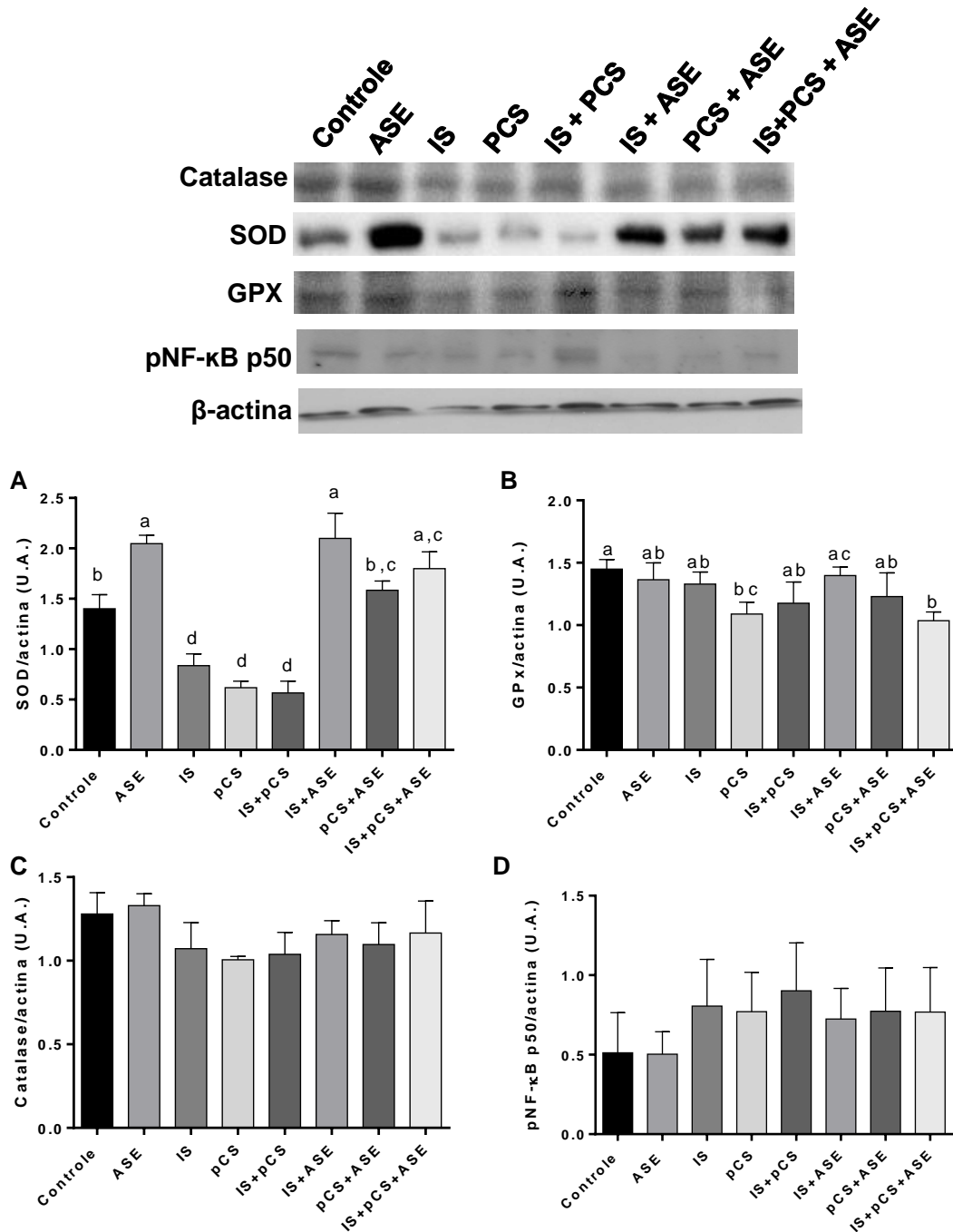
6.7 Expressão de proteínas envolvidas na atividade antioxidante e na inflamação em células endoteliais

A expressão de proteínas envolvidas na defesa antioxidante (SOD, GPx, catalase) e do fator de transcrição NF- κ B foi avaliada pela técnica de *western blot*. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10A, observamos que as células tratadas com ASE apresentaram aumento na expressão de SOD em comparação às células do grupo Controle e que em células tratadas com toxinas urêmicas houve diminuição significativa da expressão dessa enzima ($p < 0,05$). Em decorrência do tratamento concomitante com ASE, a redução da expressão de SOD promovida pelas toxinas foi prevenida. Em células tratadas com IS e ASE, a expressão de SOD foi estatisticamente semelhante às células tratadas apenas com ASE ($p > 0,05$).

A Figura 10B relata a expressão de GPx em células dos diferentes grupos experimentais. Podemos notar que em células tratadas com pCS, houve redução na expressão da enzima em comparação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Já em células tratadas com IS, pCS e ASE simultaneamente, houve redução em relação ao Controle, e em comparação às células do grupo IS+ASE ($p < 0,05$). A expressão da GPx não apresentou diferenças significativas entre os demais grupos experimentais ($p > 0,05$).

No que concerne à enzima catalase e ao fator de transcrição NF- κ B, observamos que não houve diferenças significativas em suas expressões nos diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$; Figuras 10C e 10D, respectivamente).

Figura 10 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na expressão de enzimas antioxidantes e do fator de transcrição NF- κ B pelas células endoteliais



Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na expressão de enzimas antioxidantes e do fator de transcrição NF- κ B pelas células endoteliais. (A) Catalase; (B) superóxido dismutase (SOD) (C) Glutathione Peroxidase (GPx); (D) *Nuclear factor kappa B* fosforilado (pNF κ B p50). As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com as toxinas urêmicas IS (63 μ g/mL) e PCS (40 μ g/mL) e ASE (10 μ g/mL), administrados isoladamente ou em concomitância, e foram incubadas por 24hs. As células do grupo controle receberam K₂SO₄ (35 μ g/mL). Os dados expressam média \pm desvio padrão de 3 experimentos (n=3) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% (p<0,05).

6.8 Efeito do ASE e das toxinas urêmicas na atividade antioxidante

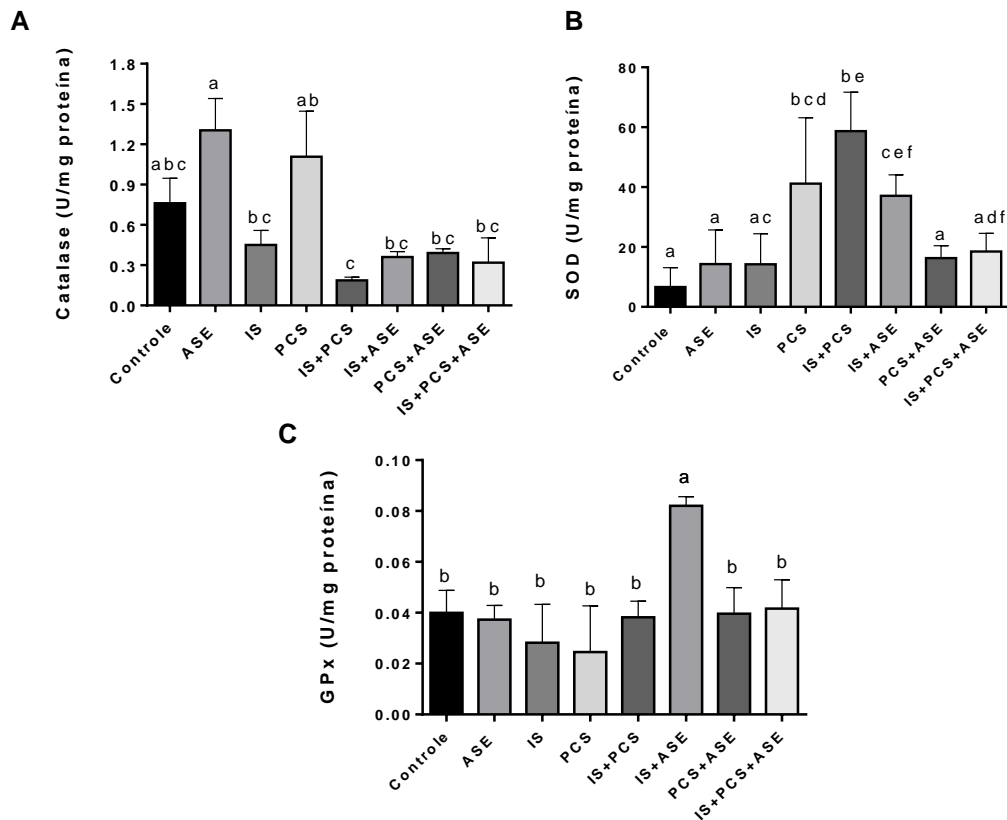
De acordo com a Figura 11A, podemos observar a redução na atividade da catalase em células tratadas com IS (-65,5%; $p < 0,05$) e IS+pCS (-85,7%; $p < 0,05$) em comparação ao ASE. Em células tratadas com pCS, a atividade da catalase apresentou-se semelhante estatisticamente em relação ao ASE ($p > 0,05$). Já com o tratamento concomitante de toxinas urêmicas e o ASE, observamos que o ASE não foi capaz de restaurar a atividade dessa enzima, sendo a redução de 72,4% no grupo IS+ASE, 70,1% no grupo pCS+ASE e 75,5% no grupo IS+pCS+ASE ($p < 0,05$). Em relação ao grupo Controle, não houve diferença significativa entre nenhum dos tratamentos apresentados ($p > 0,05$).

A Figura 11B apresenta os resultados da atividade da superóxido dismutase. Em relação ao grupo Controle, as células tratadas com as toxinas pCS e IS+pCS apresentaram atividade da SOD significativamente superior (+517% e 781%, respectivamente; $p < 0,05$); o mesmo foi observado em relação ao grupo Controle + ASE (288% e 411%, respectivamente; $p < 0,05$). Em células tratadas com IS e ASE em concomitância, podemos igualmente notar esse fenômeno, qual seja, o aumento significativo da atividade da SOD em comparação aos grupos Controle (457%, $p < 0,05$) e Controle + ASE (162%, $p < 0,05$). Já em células tratadas apenas com a toxina IS, não foi possível observar diferença significativa em relação aos grupos Controle e Controle + ASE; o mesmo foi notado entre células tratadas com as toxinas pCS e IS+pCS com adição do ASE, e ambos os grupos Controle ($p > 0,05$). O tratamento das células com pCS e ambos IS e pCS em conjunto promoveu um aumento significativo na atividade da SOD em comparação ao tratamento apenas com IS (188% e 312%, respectivamente; $p < 0,05$). Células tratadas com pCS e IS+pCS apresentaram ainda aumento significativo na atividade da SOD em relação aos seus tratamentos adicionais com ASE (152% e 217%, respectivamente; $p < 0,05$). Por fim, observamos ainda que células tratadas com IS+pCS e IS+ASE apresentaram atividade da SOD significativamente superior em relação ao tratamento com pCS e ASE em concomitância (260% e 128%, respectivamente; $p < 0,05$).

A Figura 11C apresenta os resultados da atividade enzimática da Glutathiona peroxidase. Observamos que apenas em células tratadas duplamente com IS e ASE houve aumento da atividade dessa enzima, quando comparada aos demais grupos tratados com toxinas urêmicas. Ao compararmos células tratadas com IS e com IS e ASE em concomitância, podemos observar que o ASE promoveu um aumento de 150% na atividade dessa enzima ($p < 0,05$). No entanto, não foi notada diferença significativa entre o referido

grupo e os grupos Controle e Controle + ASE ($p>0,05$), assim como observado na comparação entre os dois grupos Controle e os demais grupos tratados com toxinas urêmicas.

Figura 11 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na atividade das enzimas antioxidantes

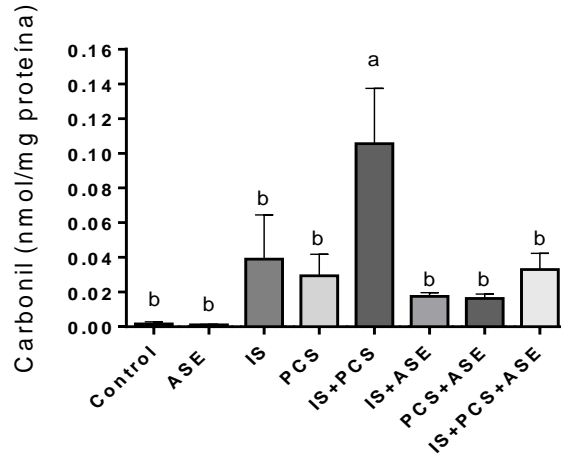


Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na atividade das principais enzimas antioxidantes (A) Catalase, (B) SOD, (C) GPx. As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com as toxinas urêmicas IS (63 $\mu\text{g/mL}$) e pCS (40 $\mu\text{g/mL}$) e ASE (10 $\mu\text{g/mL}$), administrados isoladamente ou em concomitância, e foram incubadas por 24hs. As células do grupo controle receberam K_2SO_4 (35 $\mu\text{g/mL}$). Os dados expressam média \pm desvio padrão de 3 experimentos ($n=3$) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p<0,05$).

6.9 Efeito do ASE e das toxinas urêmicas na carbonilação de proteínas *in vitro*

A Figura 12 apresenta os resultados do ensaio de carbonilação de proteínas em células endoteliais tratadas com toxinas urêmicas e ASE. Podemos observar que em células tratadas simultaneamente com ambas as toxinas houve aumento significativo da concentração de proteínas carboniladas em relação aos demais grupos, sendo que o ASE não foi capaz de reverter esse fenômeno ($p<0,05$). O tratamento com as toxinas isoladamente não alterou de forma significativa as concentrações de proteínas carboniladas ($p>0,05$).

Figura 12 - Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na carbonilação de proteínas *in vitro*

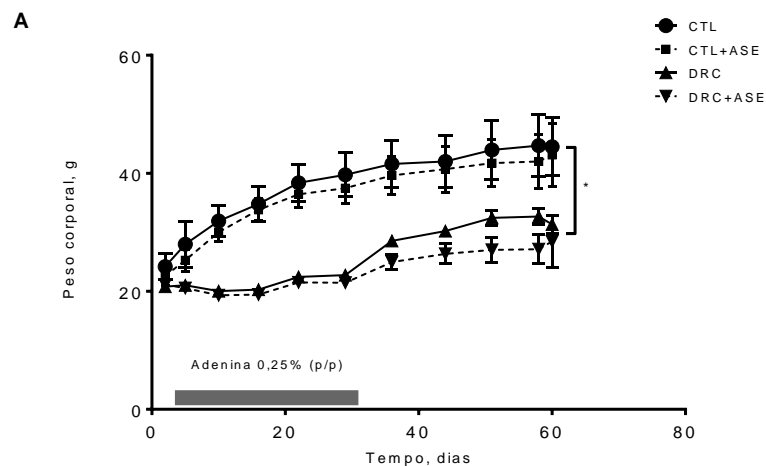


Legenda: Efeito do tratamento de toxinas urêmicas ou ASE na carbonilação de proteínas. As células endoteliais receberam diferentes tratamentos com as toxinas urêmicas IS (63 $\mu\text{g/mL}$) e PCS (40 $\mu\text{g/mL}$) e ASE (10 $\mu\text{g/mL}$), administrados isoladamente ou em concomitância, e foram incubadas por 24hs. As células do grupo controle receberam K_2SO_4 (35 $\mu\text{g/mL}$). Os dados expressam média \pm desvio padrão de 3 experimentos (n=3) e foram submetidos a ANOVA com pós-teste de Tukey. Letras iguais representam mesmo nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

6.10 Ensaio *in vivo*

Os resultados relativos ao ensaio *in vivo* com animais experimentais estão expostos a seguir. A Figura 13 apresenta o gráfico de curva de ganho de peso dos diferentes grupos experimentais, e a Tabela 2 reporta os dados biométricos dos animais.

Figura 13 - Curva de ganho de peso dos animais experimentais.



Legenda: Curva de ganho de peso dos animais. Dados representam média \pm desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Através dos resultados demonstrados na Figura 13 e na Tabela 2, observamos que os animais DRC apresentaram menor ganho de peso corporal ao final do experimento em comparação aos animais dos grupos Controle e Controle + ASE. Foi observada redução de 26% do peso corporal no grupo DRC ($p < 0,001$) e 27% no grupo DRC + ASE ($p < 0,001$) em relação aos animais do grupo Controle. Quando comparamos com os animais do grupo Controle + ASE, observamos a redução de 24% no peso corporal dos animais DRC ($p < 0,01$) e DRC + ASE ($p < 0,001$). Em relação à ingestão de dieta, não houve diferença entre os grupos durante todo período experimental.

Ainda de acordo com os dados da Tabela 2, os animais dos grupos DRC apresentaram menor comprimento corporal e menor peso dos rins ao final do experimento em relação aos animais dos grupos Controle. Os animais do grupo DRC apresentaram 39% de redução no peso dos rins em relação ao grupo Controle ($p < 0,0001$) e 34% em relação ao grupo Controle + ASE ($p < 0,0001$). Similarmente, em animais DRC que foram tratados ASE, essa redução foi de 40% em comparação ao Controle ($p < 0,0001$) e 36% em relação ao grupo Controle + ASE ($p < 0,0001$).

É possível notar também o aumento significativo no peso do coração dos animais com DRC em relação aos animais dos grupos Controle e Controle + ASE ($p < 0,05$); o mesmo foi observado entre animais do grupo DRC + ASE e dos grupos Controle e Controle + ASE ($p < 0,05$). Além disso, os animais experimentais com DRC apresentaram menor percentual de gordura corporal total e nos três segmentos de tecido adiposo branco avaliados (tecido adiposo branco subcutâneo, epididimário e retroperitoneal), quando comparados com os animais dos grupos Controle. Em animais do grupo DRC, notamos uma redução do percentual de gordura corporal total em 61% em relação ao grupo Controle ($p < 0,01$) e 45% em comparação ao grupo Controle + ASE ($p < 0,05$). Já no grupo DRC + ASE, houve redução de 65% ($p < 0,001$) e 51% ($p < 0,01$) em relação aos grupos Controle e Controle + ASE, respectivamente.

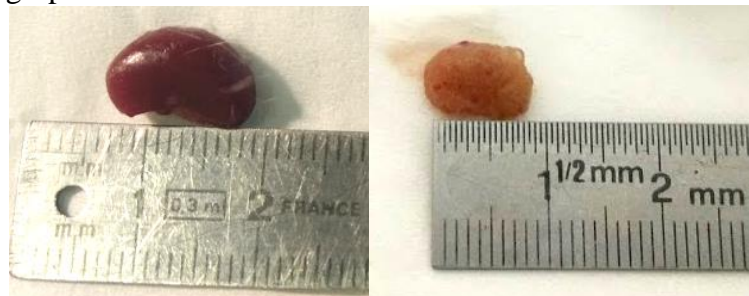
Foi possível observar no presente estudo que os rins dos animais dos grupos Controle apresentavam coloração e aspecto morfológico próprios ao tecido, diferentemente dos animais dos grupos experimentais. Em animais com DRC que receberam ou não o ASE, os rins apresentaram alterações morfológicas além da considerável redução em seu peso, tais como a coloração mais clara e a presença de pequenas vesículas em todo o órgão, conforme apresentado na Figura 14.

Tabela 2 - Dados biométricos dos animais experimentais

	Controle	Controle +ASE	DRC	DRC+ASE	P valor
Peso corporal (g)	44,5±1,6 ^a	43,1±1,8 ^a	33,0±1,2 ^b	32,6±2,0 ^b	<0,001
Comprimento (cm)	11,2±0,1 ^a	11,0±0,1 ^a	10,0±0,2 ^b	10,0±0,2 ^b	<0,001
Índice de Lee (x10³)	318±3	319±4	320±4	318±3	0,828
Fígado, mg/10g	482±26	499±17	443±16	448±16	0,203
Coração, mg/10g	43±1 ^a	44±1 ^a	59±2 ^b	61±2 ^b	<0,001
Rins, mg/10g	148±7 ^a	137±7 ^a	90±10 ^b	88±4 ^b	<0,001
TABsc, mg/10g	74±8 ^a	87±30 ^a	31±6 ^b	39±5 ^b	<0,001
TABe, mg/10g	217±31 ^a	222±96 ^a	76±13 ^b	119±16 ^c	<0,001
TABr, mg/10g	61±8 ^a	78±36 ^a	29±5 ^b	38±6 ^b	<0,001
TAB total, mg/10g	425±51 ^a	475±188 ^a	166±28 ^b	235±30 ^c	<0,001

Legenda: Dados biométricos dos animais experimentais. Dados representam média±desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. O índice de Lee foi calculado como sendo a razão entre o peso corporal elevado ao cubo e o comprimento naso-anal. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes. Abreviaturas: TABsc = tecido adiposo branco subcutâneo; TABe = tecido adiposo branco epididimário; TABr = tecido adiposo branco retroperitoneal. Peso dos órgãos em mg/10g de peso corporal.

Figura 14 - Fotos ilustrativas de rim retirado de animal dos grupos Controle e DRC



Legenda: Rim retirado de animal do grupo Controle (à esquerda) e de animal do grupo DRC (à direita).

6.10.1 Dados bioquímicos

Os dados bioquímicos dos animais experimentais estão expostos na tabela a seguir:

Tabela 3: Dados bioquímicos dos animais experimentais.

	Controle	Controle-ASE	DRC	DRC+ASE	P valor
Glicemia de jejum, mg/dL	77±3 ^a	74±4 ^a	99±7 ^{a,b}	106±12 ^b	0,001
Glicemia, mg/dL	161±4 ^a	162±5 ^a	185±8 ^b	187±9 ^b	0,001
Triacilgliceróis, mg/dL	134±17	107±11	89±6	108±15	0,121
Colesterol total, mmol/L	81±10 ^a	87±4 ^a	150±23 ^b	197±22 ^b	<0,001

Legenda: Dados representam média±desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes.

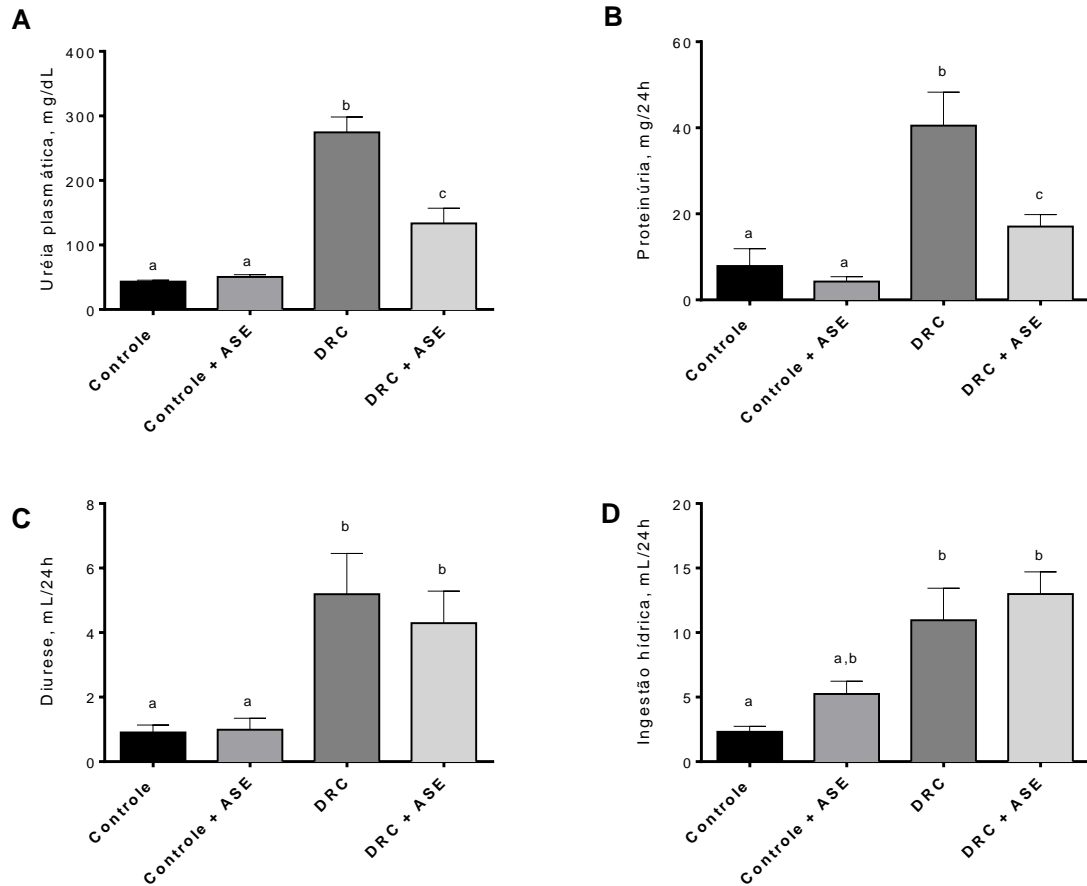
De acordo com os resultados expostos acima, é possível observar que os animais com DRC + ASE apresentaram valores de glicemia de jejum mais elevados do que os valores apresentados pelos animais dos grupos Controle ($p < 0,05$) e Controle + ASE ($p < 0,05$). Embora sem diferença estatística significativa, houve uma tendência ao aumento da glicemia de jejum nos animais do grupo DRC em relação aos grupos Controle. No que diz respeito à glicemia pós-prandial, os animais dos grupos DRC e DRC+ASE apresentaram valores superiores em comparação aos apresentados pelos animais dos grupos Controle ($p < 0,05$) e Controle + ASE ($p < 0,05$).

As concentrações plasmáticas de colesterol total foram significativamente maiores nos grupos DRC e DRC + ASE em relação aos grupos Controle ($p < 0,05$) e Controle + ASE ($p < 0,05$). A concentração plasmática de triacilgliceróis não diferiu significativamente entre os grupos ($p > 0,05$).

6.10.2 Indicadores de função renal

A Figura 15 apresenta os indicadores da função renal dos animais experimentais. É possível observar na Figura 15A que os animais com DRC apresentaram concentrações de uréia plasmática significativamente superiores em relação aos grupos Controle ($p < 0,05$), sendo o ASE capaz de prevenir as elevadas concentrações séricas dessa toxina em animais do grupo DRC+ASE, mesmo não retornando aos níveis apresentados pelos grupos Controle. Igualmente, as taxas de proteinúria apresentam a mesma tendência supracitada, tendo o ASE efeito na redução da excreção urinária desse metabólito ($p < 0,05$) (Figura 15B). No que tange aos parâmetros de ingestão hídrica e diurese, observamos que houve um aumento significativo de ambos os marcadores em animais com DRC, e que o ASE não teve efeito na reversão desse quadro ($p < 0,05$) (Figuras 15 C e D).

Figura 15 - Indicadores da função renal dos animais experimentais



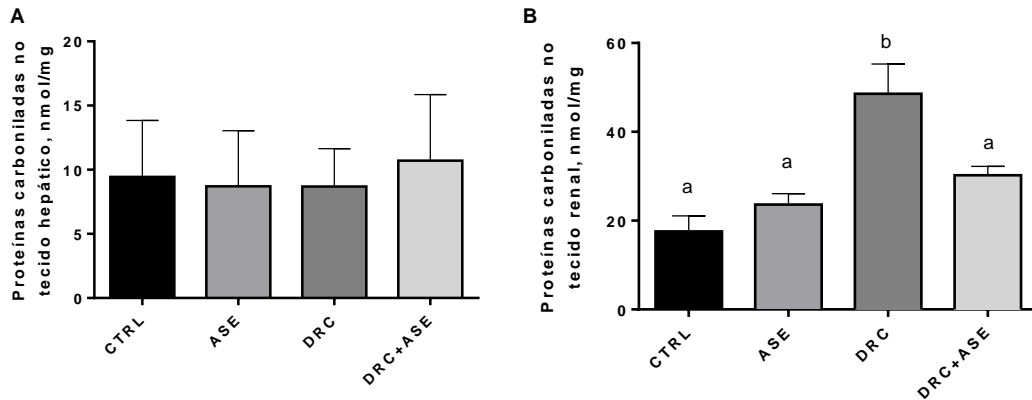
Legenda: Indicadores da função renal dos animais experimentais. Dados representam média±desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes.

6.10.3 Efeito do ASE em marcadores de estresse oxidativo *in vivo*

6.10.3.1 Carbonilação de proteínas em tecidos hepático e renal

A Figura 16 apresenta os resultados do ensaio de carbonilação de proteínas em tecidos hepático e renal dos animais experimentais. Podemos observar que no tecido renal (Figura 16B) de animais com DRC houve aumento significativo da concentração de proteínas carboniladas em relação aos demais grupos, tendo o ASE efeito protetor do dano oxidativo ($p < 0,05$). Em tecido hepático, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 16A).

Figura 16 - Carbonilação de proteínas em tecidos hepático e renal dos animais experimentais

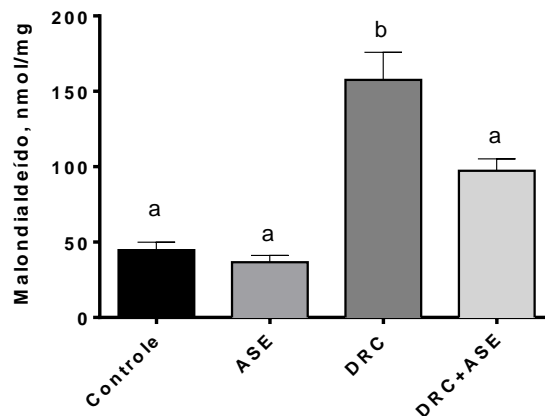


Legenda: Carbonilação de proteínas em tecidos hepático e renal dos animais experimentais. Dados representam média±desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes.

6.10.3.2 TBARS em tecido renal

A Figura 17 apresenta os resultados da dosagem de subprodutos da peroxidação lipídica (tal como o malondialdeído, MDA) em tecido renal dos animais experimentais. Podemos observar que no tecido renal de animais com DRC houve aumento significativo da concentração de MDA em relação aos demais grupos, tendo o ASE efeito redutor do dano oxidativo ao reduzir a concentração desse composto em tecido de animais DRC ($p < 0,05$).

Figura 17 - Concentração de Malondialdeído em tecido renal dos animais experimentais

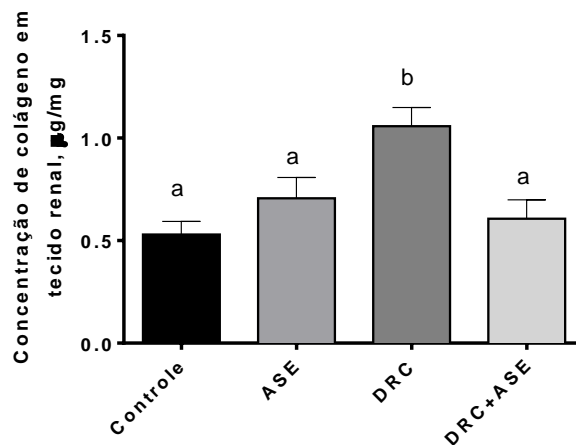


Legenda: Concentração de Malondialdeído em tecido renal dos animais experimentais. Dados representam média±desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes.

6.10.4 Efeito do ASE na concentração de colágeno em tecido renal

A Figura 18 apresenta os resultados da dosagem da concentração de colágeno em tecido renal dos animais experimentais. Notamos através da Figura que em animais com DRC, houve aumento significativo da concentração de colágeno em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Em tecido de animais DRC tratados com ASE, foi possível observar a redução do teor de colágeno, estando equiparado aos níveis encontrados nos grupos Controle ($p < 0,05$).

Figura 18 - Teor de colágeno em tecido renal dos animais experimentais



Legenda: Teor de colágeno em tecido renal dos animais experimentais. Dados representam média±desvio padrão para N = 9-10 para cada grupo. As médias foram comparadas por ANOVA e, quando apropriado, teste *pos-hoc* de Tukey foi aplicado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes.

6.10.5 Perfil de compostos fenólicos em plasma e urina dos animais experimentais

A fim de compararmos as rotas metabólicas dos compostos fenólicos do ASE e a possível influência da DRC, realizamos a análise metabólitos no plasma e urina dos compostos fenólicos ingeridos pelos animais experimentais. A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados. Observamos que o ácido hipúrico é o metabólito de maior concentração encontrado na urina dos animais experimentais de ambos os grupos, e que a concentração do mesmo é equivalente em ambos os grupos. Já o ácido 3,4-dihidroxifenilacético apresenta concentração 5 vezes maior na urina de animais com DRC, em comparação ao seu grupo Controle ($p < 0,05$). Os compostos fenólicos catequina e ácido

vanílico tiveram maior excreção urinária em animais do grupo Controle + ASE, em relação ao grupo DRC + ASE ($p < 0,05$). O ácido gálico teve taxa de excreção similar em ambos os grupos ($p > 0,05$). O somatório dos metabólitos totais em urina dos animais apresentou-se semelhante estatisticamente em ambos os grupos, enquanto que a exclusão do ácido hipúrico demonstrou maior excreção de metabólitos na urina dos animais do grupo Controle + ASE ($p < 0,05$).

Em plasma dos animais experimentais, foi possível identificar apenas o ácido hipúrico, sendo que a concentração desse metabólito em animais DRC é duas vezes maior do que a encontrada em animais do grupo Controle ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Metabólitos dos compostos fenólicos em plasma e urina dos animais experimentais

Metabólitos ($\mu\text{g/mL}$)	ASE	DRC +ASE
Urina		
Ácido hipúrico	285,6 \pm 34	278,9 \pm 3,0
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	4,5 \pm 0 ^a	22,4 \pm 1,0 ^b
Catequina	35,2 \pm 7 ^a	4,7 \pm 1,0 ^b
Ácido vanílico	8,8 \pm 3 ^a	nd
Ácido gálico	0,02 \pm 0	0,02 \pm 0,0
<i>Total</i>	334,1 \pm 29,7	306,02 \pm 9,1
<i>Total (excluindo ácido hipúrico)</i>	48,5 \pm 6,8 ^a	27,1 \pm 0,1 ^b
Plasma		
Ácido hipúrico	7,1 \pm 1,0 ^a	15,5 \pm 1,0 ^b

Legenda: Metabólitos em plasma e urina dos animais experimentais. Dados representam média \pm desvio padrão para N = 4 para cada grupo. As médias foram comparadas por Teste T de Student. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram simbolizadas por letras diferentes. nd = não detectado.

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, comprovamos o potencial deletério exercido pelas toxinas urêmicas IS e pCS em células do endotélio vascular. Ambas as toxinas reduziram significativamente a viabilidade das células em comparação aos grupos Controle. Foi possível observar ainda que em células tratadas com as toxinas e o ASE em concomitância, a viabilidade manteve-se reduzida em relação aos grupos Controle, sugerindo que o ASE na concentração utilizada não exerça papel preventivo desse parâmetro. A redução da viabilidade celular provocada por toxinas urêmicas é também descrita em outros trabalhos na literatura (TUMUR; NIWA, 2009; YANG et al., 2012).

De forma complementar, avaliamos a ação das toxinas urêmicas e do ASE na morte de células endoteliais utilizando o azul de trypan. Observamos que o tratamento com ambas as toxinas, isoladas ou em concomitância, ocasionou aumento significativo no percentual de células mortas em relação aos grupos Controle, e que o ASE foi capaz de prevenir o aumento do percentual de morte celular quando no tratamento com IS e ambas as toxinas em conjunto. Similarmente, células endoteliais tratadas com soro de pacientes urêmicos apresentaram aumento significativo no percentual de células inviáveis, assim como no decréscimo da viabilidade celular, em comparação às células tratadas com soro de pacientes saudáveis (CHITALIA et al., 2011). Sugerimos que as toxinas urêmicas oferecem potencial danoso à viabilidade e funcionalidade de células endoteliais, e que no caso do IS, sua toxicidade pode ser atenuada pelo ASE.

A disfunção endotelial tem papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que é a *causa mortis* mais comum em pacientes renais. A manutenção da integridade física e metabólica do endotélio é crucial na prevenção ou no retardo da progressão da doença vascular e, no caso de injúria endotelial, é requerido um processo de reparo ativo. A habilidade do endotélio em proliferar e migrar atua de forma significativa na regeneração e no reparo da lesão (LEE et al., 2001). Observamos no presente estudo que as toxinas urêmicas prejudicaram a capacidade migratória de células endoteliais e que o ASE preveniu esse dano em células tratadas com o IS. De forma semelhante, Dou et al. (2004) conduziram investigação utilizando células da linhagem HUVEC e as toxinas IS e *p*-cresol, e observaram que ambas as toxinas inibiram a migração de células endoteliais em concentrações próximas às utilizadas no presente estudo. Ressalta-se, no entanto, que a utilização do *p*-cresol como toxina urêmica em ensaios *in vitro* pode ser limitada, uma vez

que a molécula não é o produto final do metabolismo da tirosina e se apresenta em baixas concentrações em plasma de pacientes urêmicos (VANHOLDER et al., 2011).

Zhu et al. (2012), em trabalho que avaliou o impacto do tratamento de células progenitoras endoteliais (EPC) com *p*-cresol e pCS, concluíram que pCS não causara efeito negativo na proliferação, migração e diferenciação celular, diferentemente de sua molécula precursora. Os autores sugerem que ambos os compostos devem atuar de maneira distinta na função vascular e que se faz necessário conhecer melhor os mecanismos de ação da toxicidade do pCS no sistema cardiovascular. Por outro lado, Wu et al. (2013) observaram decréscimo significativo no percentual de migração de EPCs após incubação com IS, bem como foi descrito no trabalho de Hung et al. (2016). É importante ressaltar, no entanto, que as células progenitoras endoteliais, apesar de serem consideradas marcadoras de função endotelial, tem seu metabolismo diferenciado em comparação à célula endotelial madura, que efetivamente compõe o endotélio vascular.

Na sequência, avaliamos a expressão de citocinas envolvidas no processo inflamatório local. Tais moléculas são responsáveis pelo maior recrutamento de monócitos e linfócitos ao espaço subendotelial de artérias que sofreram injúria e, portanto, perpassam por processo inflamatório presente na disfunção endotelial; vale ressaltar que esse fenômeno é característico das etapas iniciais do processo aterosclerótico e pode resultar na formação da placa de ateroma, através da maturação de monócitos em macrófagos e consequente formação das células espumosas (*foam cells*). Assim sendo, é de fundamental importância a avaliação da expressão dessas moléculas na síndrome cardiorrenal. Observamos em nossos resultados que as toxinas urêmicas IS e pCS aumentaram de forma significativa a expressão das citocinas pró-inflamatórias estudadas em relação aos grupos Controle. Notamos ainda que o ASE foi capaz de prevenir o aumento da expressão das citocinas inflamatórias, principalmente em células tratadas com IS. Logo, apontamos para o efeito benéfico do ASE na inflamação do endotélio vascular. Ainda nesse cenário, avaliamos a produção de TNF-alfa pelas células endoteliais e notamos que o tratamento das células com as toxinas urêmicas foi capaz de estimular a produção dessa citocina pró-inflamatória, sendo que o ASE apresentou efeito protetor da inflamação em células tratadas com ambas as toxinas simultaneamente. Por fim, avaliamos a expressão da forma ativa do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Embora sem diferenças significativas entre os grupos experimentais, nossos resultados apontam para uma tendência ao aumento da expressão do NF- κ B em células tratadas com toxinas urêmicas em relação aos grupos Controle.

Tumur et al. (2010) avaliaram a expressão de MCP-1 e ICAM-1 em células endoteliais tratadas com IS em diferentes concentrações. Assim como no presente estudo, houve aumento na expressão das referidas citocinas. A utilização de inibidores do NFκB (PDTC e isohelenina) e do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) reverteu o aumento na expressão de ambas as moléculas, indicando que tal aumento promovido por IS ocorre via indução do estresse oxidativo e da ativação do NF-κB. Watanabe et al. (2013b) também apontam para o aumento na expressão de MCP-1 em células endoteliais tratadas com IS e que esse efeito é relacionado com a instauração do estresse oxidativo (avaliado pela ativação da isoforma NOX4 da enzima pró-oxidante NADPH oxidase e pelo aumento na produção de ânions superóxido). A toxina pCS também promoveu aumento na expressão de MCP-1 e na secreção dessa proteína no sobrenadante de células endoteliais (WATANABE et al., 2014).

Os efeitos cardioprotetores de compostos fenólicos vêm sendo apontados em inúmeros ensaios *in vitro* e *in vivo*. Liu et al. (2016) observaram a ação protetora do composto epigallocatequina-3-galato (EGCG) na prevenção do aumento na expressão de mediadores inflamatórios vasculares (dentre eles VCAM-1 e ICAM-1) em cultura de células endoteliais tratadas com um poluente ambiental (bifenilpoliclorado). De forma semelhante, Warner et al. (2016) também concluíram que compostos fenólicos, em especial o ácido protocatecúico, podem prevenir o aumento da expressão de VCAM-1 em células endoteliais estimuladas por TNF-α. Em estudo conduzido por Medina-Rémon et al. (2016), foi observado que a ingestão de dieta mediterrânea, rica em compostos fenólicos, foi capaz de reduzir as concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios (dentre eles VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1) em indivíduos idosos. Conforme mencionado anteriormente, sugerimos que o ASE, rico em compostos fenólicos tais como (+)-catequina e (-)-epicatequina (SOARES et al., 2017), possa atuar na prevenção de danos inflamatórios ocasionados pelas toxinas urêmicas (em particular pelo IS) em células endoteliais.

O estresse oxidativo é um fenômeno considerado peça-chave no desenvolvimento de diversas doenças crônicas não-transmissíveis e é gerado quando o potencial pró-oxidante supera a capacidade antioxidante. Esse desequilíbrio entre espécies pró- e antioxidantes pode causar dano oxidativo em moléculas como lipídios, proteínas e o DNA celular (HIMMELFARB et al., 2002). Dada a sua importância na gênese de doenças renais e cardiovasculares, investigamos a expressão e a atividade das principais enzimas atuantes na defesa antioxidante, bem como em marcadores do dano oxidativo celular *in vitro* e *in vivo*.

Através dos resultados expostos, observamos o aumento da expressão da SOD em células tratadas com ASE em relação ao Controle, em contraste à diminuição da expressão

dessa enzima em células tratadas com toxinas urêmicas. Notamos que o ASE previne a redução da expressão da SOD quando em concomitância às toxinas, sendo que no tratamento com IS, a expressão da enzima é semelhante estatisticamente ao grupo Controle + ASE. Logo, sugerimos que as toxinas urêmicas possam favorecer o desequilíbrio da resposta antioxidante no que diz respeito à primeira linha de defesa celular. Sugerimos ainda que o ASE atua de forma preventiva aumentando a expressão da SOD, sendo mais efetiva sua atuação quando em conjunto com o IS. Foi possível observar também que a expressão de GPx em células tratadas com pCS foi reduzida em comparação às células do grupo Controle. Logo, sugerimos que o pCS possa influenciar a resposta antioxidante da GPx em células endoteliais. Em relação à expressão de catalase, não houve diferença significativa entre os grupos.

No que diz respeito à atividade enzimática da SOD, células tratadas com pCS e com ambas as toxinas IS+pCS apresentaram atividade dessa enzima significativamente superior ao encontrado em células dos grupos Controle e Controle+ASE. Tal fato sugere que o pCS, isolado ou em conjunto com o IS, é capaz de promover um quadro de estresse agudo nas células endoteliais, estimulando a ativação da primeira linha de defesa antioxidante endógena. Assim como relatado por De Moura et al. (2012), sugerimos que o aumento das espécies oxidantes provocado pelas toxinas seja proporcional e paralelo ao incremento da atividade da SOD e de seu substrato. O tratamento das células com pCS e ambos IS e pCS em conjunto promoveu um aumento significativo na atividade da SOD em comparação ao tratamento com IS isoladamente, demonstrando que, nesse caso, há maior eficácia na instauração do desequilíbrio oxidativo quando em presença do pCS. O tratamento concomitante de pCS e IS+pCS com ASE manteve a atividade da SOD semelhante à apresentada por células dos grupos Controle, sugerindo possíveis mecanismos distintos de ação do ASE na normalização da resposta antioxidante, como por exemplo a possível atuação direta como *scavenger* de espécies reativas.

Observamos ainda uma redução na atividade da enzima catalase em células tratadas com a toxina IS e com ambas as toxinas IS e pCS em concomitância quando comparadas às células tratadas com ASE. Tal observação aponta para um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante enzimática, podendo estar associada à geração de espécies reativas, que por sua vez são altamente danosas ao organismo e estão relacionadas à patogênese da doença renal e de doenças cardiovasculares. O tratamento com pCS não reduziu significativamente a atividade da catalase em relação ao ASE, sugerindo a ocorrência de um estresse agudo promovido por essa toxina capaz de estimular essa linha de defesa endógena. Foi possível observar que o ASE, embora apresente efeito antioxidante comprovado e habilidade em

normalizar a resposta antioxidante em outros modelos experimentais (DA COSTA et al., 2012; CORDEIRO et al., 2017), não atuou nesse sentido em nenhuma das condições analisadas no que tange à enzima catalase. Sugerimos que os compostos fenólicos do ASE possam atuar diretamente na neutralização de espécies reativas, em detrimento da indução da atividade dessa enzima.

Em relação à GPx foi possível notar que, em células tratadas com IS e ASE em conjunto, houve um aumento expressivo na atividade dessa enzima quando em comparação ao estímulo provocado apenas pela toxina. Tal observação sugere que, nesse caso específico, o ASE possa auxiliar na resposta antioxidante através do aumento da atividade da GPx. Em suma, sugerimos que o pCS apresenta maior impacto na funcionalidade das principais enzimas atuantes na defesa antioxidante que o IS. Sugerimos ainda que o ASE possa atuar benéficamente na restauração do equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, atenuando o quadro de estresse oxidativo instaurado principalmente pelo IS.

É importante ressaltar que os diferentes compostos bioativos presentes no ASE, bem como as diferentes toxinas urêmicas, podem causar impacto de modo e intensidade distintos no sistema redox. Dessa forma, podemos esperar que as enzimas antioxidantes se comportem de maneira diferente frente aos diferentes estímulos (KOHEN; NYSKA, 2002; MARINELI et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). Devemos pontuar ainda que as espécies reativas podem atuar tanto no sentido de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes quanto diminuí-las, já que elas podem tanto inibir quanto estimular a resposta antioxidante, como um mecanismo compensatório na tentativa de restaurar a homeostase diante de um estado pró-oxidante.

Com a finalidade de investigar o dano oxidativo celular, prosseguimos com a avaliação da peroxidação lipídica *in vivo* e a dosagem de proteínas carboniladas *in vitro* e *in vivo*. A concentração de MDA em tecido renal dos animais demonstrou ser significativamente superior em animais com DRC em comparação aos grupos Controle e Controle + ASE, apontando para a instauração do quadro de estresse oxidativo com o desenvolvimento da doença renal. Em animais com DRC que consumiram ASE, notamos uma redução na concentração de MDA renal. Essa observação nos indica que o ASE pode atuar positivamente na proteção ao dano lipídico ocasionado na DRC, auxiliando na manutenção da integridade da membrana plasmática e conseqüentemente na manutenção da função celular.

A avaliação do dano oxidativo em proteínas foi realizada em células endoteliais e em tecidos hepático e renal dos animais experimentais. Foi possível constatar o aumento significativo na concentração de proteínas carboniladas em células tratadas duplamente com IS e pCS em comparação aos demais grupos. Os tratamentos com as toxinas de forma isolada

apresentaram resultados estatisticamente semelhantes aos dos grupos Controle. O tratamento de células endoteliais com ASE na presença de ambas as toxinas em concomitância promoveu a redução da concentração de proteínas carboniladas, retornando a níveis estatisticamente semelhantes aos apresentados pelos grupos Controle. Desse modo, sugerimos que ambas as toxinas quando atuantes em conjunto podem potencializar o dano oxidativo em células endoteliais, sendo o ASE capaz de auxiliar beneficemente na reversão desse quadro. De forma semelhante ao MDA, a análise de carbonilação de proteínas em tecido renal dos animais foi estatisticamente superior em animais com DRC em comparação aos grupos Controle e Controle + ASE, tendo o ASE o potencial de reduzir esse parâmetro indicador do dano oxidativo. Sugerimos, portanto, que o ASE exerce um papel protetor em células do endotélio vascular e em tecido renal no combate ao dano oxidativo, seja atuando na modulação da atividade de enzimas antioxidantes, ou ainda possivelmente atuando como *scavenger* de espécies reativas.

No presente estudo, avaliamos o impacto do consumo do ASE em animais com DRC induzida quimicamente através da dieta com adenina. Esse modelo é amplamente utilizado na literatura como promotor do dano tubulointersticial. Após absorção intestinal, a adenina é prontamente metabolizada em 2,8-dihidroxiadenina, que por sua vez se precipita na forma de cristais nos túbulos proximais renais. Os cristais de 2,8-dihidroxiadenina podem provocar oclusão tubular e ainda promover injúria local, e com isso a instauração da inflamação no epitélio tubular, fibrose tubulointersticial e disfunção renal (EDDY et al., 2012; MISHIMA et al., 2015; RABE; SCHAEFFER, 2016). De fato, conforme evidenciado por indicadores da função renal tais como o aumento da concentração de uréia plasmática e da proteinúria, o modelo experimental utilizado foi eficiente na instauração da DRC, em concordância com diversos relatos na literatura (JIA et al., 2013; SANTANA et al., 2013). O aumento nas concentrações plasmáticas de uréia e da proteinúria na DRC foi atenuado pelo ASE nesse modelo experimental.

Em nosso estudo, os animais dos grupos DRC e DRC + ASE apresentaram menor ganho de peso corporal em comparação aos animais dos grupos Controle. Em estudo de Santana et al. (2013), também foi observada a redução de 26% do peso corporal em animais que consumiram dieta com adenina (0,2%) por 6 semanas, quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão. Jia et al. (2013) também observaram a redução do peso corporal durante fase de indução da DRC, utilizando-se dieta com adenina em concentração de 0,3% por 10 dias. A redução da concentração de adenina na dieta (0,15 a 0,2%), no entanto, estabilizou a perda de peso dos animais. Os animais dos grupos DRC e DRC + ASE

apresentaram redução no peso do tecido adiposo total, bem como de diferentes padrões de tecido adiposo, em relação aos animais dos grupos Controle. Tal observação também foi feita por Koppe et al. (2013), que notaram a diminuição nas reservas de tecido adiposo e a distribuição ectópica de gordura corporal em animais nefrectomizados e que receberam injeções intraperitoneais de pCS. Notamos que o ASE atuou de forma benéfica na atenuação da perda de tecido adiposo na DRC. No que diz respeito aos dados bioquímicos, destacamos a elevação da glicemia e colesterolemia em animais de ambos os grupos DRC em comparação aos grupos Controle. Tais observações sugerem a ocorrência de distúrbios no metabolismo glicídico e lipídico em decorrência da DRC, podendo contribuir para o desenvolvimento de co-morbidades como as dislipidemias e o diabetes *mellitus*, comumente associadas à DRC. No presente trabalho, o ASE não auxiliou na redução desses índices como relatado em outros modelos experimentais (CORDEIRO et al., 2017).

A progressão da DRC é frequentemente veiculada ao acúmulo de colágeno tubulointersticial, sendo o teor total de colágeno renal um parâmetro comumente utilizado na avaliação do processo de fibrose (EDDY et al., 2012). Observamos em nosso modelo experimental que a concentração de colágeno em tecido renal foi significativamente superior em animais dos grupos DRC em relação aos grupos Controle e Controle + ASE. De fato, Niwa e colaboradores (2012) relataram que em animais nefrectomizados tratados com IS observou-se a progressão da DRC e o aumento da expressão de genes fibrogênicos, tais como (TGF)- β 1, (TIMP)-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) e pro- α 1-(I)-colágeno. Além disso, o ASE apresentou efeito benéfico e preventivo desse efeito em animais do grupo DRC + ASE.

A determinação do perfil de compostos fenólicos em urina e plasma dos animais experimentais Controle + ASE e DRC+ASE foi realizada a fim de avaliarmos as possíveis rotas do metabolismo de compostos fenólicos presentes no ASE, e a plausível influência da DRC nesse processo. De acordo com estudo prévio do nosso grupo (SOARES et al., 2017), o ASE tem como compostos fenólicos principais (+)-catequina e (-)-epicatequina, seguidos de (-)-epigallocatequina galato; tais compostos são pertencentes à subclasse dos flavan-3-óis. Estudos relatam que mais de 80% dos flavan-3-óis ingeridos na dieta não são absorvidos no intestino delgado e chegam ao cólon, sendo então submetidos ao metabolismo da microbiota colônica (MONAGAS et al., 2010; MOSELLE et al., 2015). Os flavan-3-óis são metabolizados pela microbiota colônica em diversos compostos fenólicos intermediários, tais como as hidroxifenil- γ -valerolactonas e os ácidos fenilvaléricos, que por sua vez são oxidados a ácidos hidroxifenilpropionícos, e posteriormente ácidos dihidroxifenilacéticos. A

progressiva transformação microbiana desses compostos leva à formação de outros ácidos fenólicos, tais como o ácido benzóico. Outros metabólitos de flavan-3-óis incluem os ácidos hipúrico, *p*-cumárico, vanílico e gálico, este último componente da estrutura molecular de flavan-3-óis (MONAGAS et al., 2010; MOSELLE et al., 2015; ZHANG et al., 2016; ÁLVARES-CILLEROS et al., 2018).

De fato, observamos no presente estudo que o consumo de ASE, rico em flavan-3-óis, resultou na excreção urinária de catequina e dos ácidos hipúrico, vanílico, 3,4-dihidroxifenilacético e gálico. No entanto, a excreção desses compostos ocorreu de forma diferente entre os animais do grupo Controle e animais com DRC. Os animais do grupo Controle que consumiram o ASE apresentaram maior excreção de catequina e do ácido vanílico em relação aos animais com DRC que também tiveram o ASE ofertado. Possivelmente, esses compostos são metabolizados pela microbiota intestinal de animais com DRC e originam outros compostos secundários que não foram detectados em nosso estudo. Em contrapartida, os animais do grupo DRC+ASE apresentaram maior excreção do ácido 3,4-dihidroxifenilacético em comparação ao grupo Controle + ASE. De forma similar, sugerimos que essa alteração observada seja decorrente da mudança na composição da microbiota intestinal, que por sua vez atua em diferentes vias de metabolização desses compostos. Ressaltamos ainda que o ácido 3,4-dihidroxifenilacético é molécula precursora do pCS, sendo um dos metabólitos intermediários na produção dessa toxina. Por essa razão, é possível que a instauração da DRC nos animais experimentais tenha acarretado na mudança da composição da microbiota colônica, favorecendo o crescimento de espécies proteolíticas formadoras da toxina urêmica pCS (GRYP et al., 2017).

Em ambos os grupos, o ácido hipúrico apresentou-se como metabólito de maior concentração na urina dos animais, não apresentando diferença significativa entre os grupos. De fato, o ácido hipúrico figura entre os principais ácidos fenólicos excretados após o consumo de flavan-3-óis (SUCHY-DICEY et al., 2016). No entanto, a concentração desse metabólito é duas vezes maior no plasma de animais do grupo DRC+ASE. De fato, esse ácido fenólico é considerado uma toxina urêmica na DRC, já que pode se acumular no plasma de pacientes renais e promover efeitos tóxicos ao organismo. Mishima e colaboradores (2017) analisaram o perfil de metabólitos em plasma e urina de animais urêmicos que receberam dieta contendo adenina (0,2%) durante 5 semanas. Similarmente ao encontrado em nosso estudo, o ácido hipúrico apresentou-se em concentrações mais elevadas no plasma de animais urêmicos em comparação ao grupo Controle, sendo essa diferença atribuída à disbiose decorrente da DRC e à menor depuração renal desse composto. Em contrapartida, a excreção

urinária desse metabólito foi similar entre esses grupos, assim como observado no presente trabalho. Os autores sugerem que o aumento na concentração plasmática desse composto resulta em maior carga de filtrado glomerular, culminando no retorno de sua taxa de excreção aos níveis considerados normais. Logo, apesar de ambos os grupos apresentarem taxas de excreção urinária semelhantes desse metabólito, a concentração plasmática em animais do grupo DRC é aumentada devido ao seu menor *clearance* renal. Com efeito, os trabalhos de Poesen et al. (2013) e Poesen et al. (2016) relatam que a concentração de solutos na urina de pacientes com DRC não é necessariamente reduzida, mesmo em face ao *clearance* renal diminuído.

Por fim destacamos que, quando excluímos o ácido hipúrico do somatório dos compostos analisados, o teor total de metabólitos excretados por animais do grupo Controle + ASE é significativamente superior se comparado ao teor apresentado por animais do grupo DRC + ASE. O ácido hipúrico pode ser oriundo do metabolismo de outras moléculas além dos compostos fenólicos, justificando assim tal exclusão.

A disbiose tem sido frequentemente associada à DRC e é caracterizada pela mudança qualitativa e quantitativa no perfil do microbioma do hospedeiro e em alterações na função protetora da barreira intestinal. Dentre as alterações no perfil da microbiota colônica encontradas na DRC, destacam-se a maior prevalência de bactérias proteolíticas e produtoras de enzimas como ureases, uricases e de solutos urêmicos, dentre eles as toxinas IS e pCS. Além disso, há a menor prevalência de espécies bacterianas produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, associados à homeostase intestinal. A disbiose intestinal pode contribuir para a progressão da DRC, o aumento do risco cardiovascular na DRC, a toxicidade urêmica e inflamação (VAZIRI et al., 2013; RAMEZANI; RAJ, 2014; NALLU et al., 2017). Pontuamos, por fim, que as mudanças no perfil microbiano intestinal podem alterar o processo de metabolização de diferentes componentes da dieta, a exemplo dos compostos fenólicos, e que as alterações no microbioma podem ser responsáveis pelas variações individuais na homeostase do organismo e sobre os efeitos exercidos por um determinado composto na saúde como observado no presente trabalho.

CONCLUSÃO

- Concluimos com o presente trabalho que as toxinas urêmicas são capazes de promover dano à viabilidade e funcionalidade das células endoteliais humanas, e que o ASE parece atenuar a citotoxicidade promovida principalmente pelo IS;
- O ASE foi capaz de prevenir o dano inflamatório ocasionado pelas toxinas em células endoteliais, destacando-se novamente sua atuação frente aos efeitos exercidos pelo IS;
- As toxinas urêmicas favorecem o desequilíbrio da resposta antioxidante celular, e o ASE parece atuar benéficamente na restauração do equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, atenuando o quadro de estresse oxidativo instaurado principalmente pelo IS;
- Em modelo murino de DRC, o ASE foi capaz de minimizar o dano oxidativo e a disfunção renal, evidenciada principalmente pelo elevado teor de colágeno em tecido renal;
- Os animais com DRC apresentaram perfil e concentração de metabólitos distintos em comparação ao grupo Controle, sugerindo diferentes rotas de metabolização dos compostos fenólicos do ASE *in vivo*.

RERERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-CILLEROS, D. et al. (–)-Epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid protect renal proximal tubular cell against high glucose-induced oxidative stress by modulating NOX-4/SIRT-1 signalling. **Journal of Functional Foods**, 46,19–28, 2018.
- BANNISTER, J.V. et al. Assays for superoxide dismutase. **Meth Biochem Anal**, 32:279-312,1987.
- BARBAGALLO, I. et al. Potential therapeutic effects of natural hemeoxygenase-1 inducers in cardiovascular diseases. **Antioxidants & redox signaling**, 18:5, 2013.
- BARRETO, F. C. et al. (EUTox) Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clin J Am SocNephrol**, 4(10):1551–1558, 2009.
- BOLATI, D. et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF-Kb. **BMC Nephrology**, 14:56, 2013.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72:248-254,1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde. p.: 37 p.: i, 2014
- BRUNET, P. et al. Does Uremia Cause Vascular Dysfunction? **Kidney Blood Press Res**, 34:284–290, 2011.
- BURGOYNE, J. R. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 9, p. 1042–1052, 2013.
- BÜRK R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proc Natl Acad Sci**, 70(2):369–72, 1973.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. **Circ Res**, 87:8, 2000.
- CHITALIA, V. C. et al. Matrix-embedded endothelial cells are protected from the uremic milieu. **Nephrol Dial Transplant**, 26: 3858–3865, 2011.
- CHOI, B.; KYUNG, S. K.; KWAK, M. K. Effect of redox modulating NRF2 activators on Chronic Kidney Disease. **Molecules**, 19,12727-12759, 2014.

- COHEN G.; GLORIEUX, G.; THORNALLEY, P. Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro – towards a standardized approach for research on uraemia. **Nephrol Dial Transplant**, 22:3381-3390, 2007.
- CORDEIRO V. S. C. et al. Euterpe oleracea Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. **Eur J Nutr.**, 57(2):817-832, 2017
- DA COSTA, C. A. et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 385:1199–1209, 2012.
- DA COSTA, C. A. et al. Effect of Euterpe oleracea Mart. seeds extract on chronic ischemic renal injury in renovascular hypertensive rats. **Journal of Medicinal Food**, 00(0)1-9, 2017.
- DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. **Circulation**, 109[suppl III]:III-27–III-32, 2004.
- DE MOURA, R. S. et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **J. Pharm. Pharmacol.** 54, 1515–1520, 2002.
- DE MOURA R. S. et al. Addition of açai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food Chem Toxicol.** 49(4):855-63, 2011.
- DE MOURA, R. S. et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 262–9, 2012.
- DE MOURA R. S.; RESENDE A. C. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açai, an Amazon Plant. **J Cardiovasc Pharmacol.** 68(1):19-26, 2016.
- DE OLIVEIRA P. R. B. et al. Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PLoS ONE**, 10(12): e0143721, 2015.
- DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & redox signaling**, 18,14, 2013.
- DURANTON, F. et al. (EUTox). Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. **J Am Soc Nephrol**, 23: 1258–1270, 2012.
- DOU, L. et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. **Kidney Int**, 65(2):442-51, 2004.
- DOU, L. et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. **J Thromb Haemost**, 5(6):1302-8, 2007.
- EDDY A. A. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. **Pediatr Nephrol** 27:1233–1247, 2012.

ENDEMANN, D.; SCHIFFFRIN, E. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, 15: 1983–1992, 2004.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, 105:114-121, 1984.

FOLEY R. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. **Journal of Renal Care** 36 (Suppl. 1), 4–8, 2010.

GALLORI, S. et al. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11-12, p. 739–743, 2004.

GAO H.; LIU S. Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. **Life Sciences**, 185, 23–29, 2017.

GARCÍA-JÉREZ A. et al. Effect of uraemia on endothelial cell damage is mediated by the integrin linked kinase pathway. **Physiol**, 593(3):601-18, 2015

GO S. et al. Chronic Kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalizations. **N Engl J Med**; 351: 1296 – 1305, 2004.

GREENE, D. A. et al. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **European journal of pharmacology**, v. 375, n. 1-3, p. 217–23, 1999.

GRIENGLING K. K.; FITZGERALD G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, 108: 1912–1916, 2003.

GRYP T. p-Cresyl Sulfate. **Toxins**. 29;9(2), 2017.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, 35, 1147–1150, 2007.

HAN, H. et al. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. **J. Am. Heart Assoc.** 4, e001852, 2015.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) — A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, 4:10-21, 2011.

HIMMELFARB, J. et al. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. **Kidney Int.**, 62(5):1524-38, 2002.

HUNG, S. C. et al. Indoxyl sulfate suppresses endothelial progenitor cell-mediated neovascularization. **Kidney Int.**, 89(3):574-85, 2016.

ITO, S.; YOSHIDA, M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. **Toxins**, 20;6(2):665-78, 2014.

- JIA et al. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. **BMC Nephrology**, 2013,14:116.
- JOURDE-CHICHE N. et al. Vascular incompetence in dialysis patients: protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. **Semin Dial.**; 24(3):327-37, 2011.
- KAMIŃSKI et al. Indoxyl sulfate – the uremic toxin linking hemostatic system disturbances with the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. **BMC Nephrology**, 18:35, 2017.
- KLEEMANN, R. et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. **Atherosclerosis**, 218(1):44-52, 2011.
- KOHEN R.; NYSKA A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, vol 30, no 6, pp 620–650, 2002.
- KOPPE L. et al. p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. **J Am Soc Nephrol.**, 24(1):88-99, 2013.
- KUCHTA, A. et al. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. **Kidney Blood Press Res**, 34:12–9; 2011.
- LEKAWANVIJIT S. et al. Krum H. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. **Circ Res**, 9;111(11):1470-83, 2012.
- LEVEY A. S. et al. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. **JAMA**; 313: 837–46, 2015.
- LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1983, p. 464–478, 1990.
- LIABEUF S. et al. (EUTox) Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, 25(4):1183–1191, 2010.
- LIABEUF, S.; DRUEKE, T. B.; MASSY, Z. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. **Toxins**, 3, 911-919, 2011.
- LIN C. J. et al. Serum p-Cresyl sulfate predicts cardiovascular disease and mortality in elderly hemodialysis patients. **Arch Med Sci**, 30; 9(4):662-8, 2013.
- LIN C. J. et al. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. **PLoS One**, 14;10 (7), 2015.
- LIU D.; PERKINS J. T.; HENNIG B. EGCG prevents PCB-126-induced endothelial cell inflammation via epigenetic modifications of NF- κ B target genes in human endothelial cells. **J Nutr Biochem**, 28:164-70, 2016.

- LORENZ, M. et al. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. **J. Biol. Chem.**, 279, 6190–6195, 2004.
- MALYSZKO, J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta**, 411, 1412–1420, 2010.
- MARINELLI, R. S. et al. Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. **Food Research International** doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.039, 2015.
- MASSON P. et al. Chronic kidney disease and the risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. **Nephrol Dial Transplant**; 30: 1162–69, 2015.
- MEDINA-REMÓN, A. et al. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: A sub-study of The PREDIMED trial. **Br J Clin Pharmacol**, doi: 10.1111/bcp.12986, 2016.
- MEHENDALE, S. R. et al. Chronic pretreatment with American ginseng berry and its polyphenolic constituents attenuate oxidant stress in cardiomyocytes. **Eur J Pharmacol**, 553, 1-3, 28, 209-14, 2006.
- MEIJERS, B. K. et al. p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate in hemodialysis patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, 4(12):1932–1938, 2009.
- MEYER T. W., HOSTETTER T.H. Uremic solutes from colon microbes. **Kidney Int**. 81(10):949-954, 2012.
- MEYER T. W., HOSTETTER T.H. Approaches to Uremia. **J Am Soc Nephrol** 25:2151–2158, 2014.
- MISHIMA E. et al. Alteration of the Intestinal Environment by Lubiproseed Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. **J Am Soc Nephrol** 26: 1787–1794, 2015.
- MITJAVILA, M. T.; MORENO, J. J. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, 84:1113–1122, 2012.
- MONAGAS M. et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food Funct.**, 1, 233–253, 2010.
- MOSELE, J. I. et al. Metabolic and Microbial Modulation of the Large Intestine Ecosystem by Non-Absorbed Diet Phenolic Compounds: A Review. **Molecules**, 20, 17429-17468, 2015.
- MUTSAERS et al. Proximal tubular efflux transporters involved in renal excretion of p-cresyl sulfate and p-cresyl glucuronide: Implications for chronic kidney disease pathophysiology. **Toxicology in Vitro**, 29 1868–1877, 2015.

NALLU, A. et al. Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities. **Transl Res.**, 179:24-37, 2017.

NEGRÃO R. et al. Different effects of catechin on angiogenesis and inflammation depending on VEGF levels. **J Nutr Biochem**, 24(2):435-44. 2013.

NEUMAN R. E.; LOGAN M. A. The determination of hydroxyproline. **J Biol Chem**, 184: 299-306, 1950.

NICHOLSON, S.; TUCKER, G. A.; BRAMELD, J. M. Physiological concentrations of dietary polyphenols regulate vascular endothelial cell expression of genes important in cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, 103, 1398–1403, 2010.

NIWA, T. Indoxyl Sulfate, A Tryptophan Metabolite, Induces Nephro-Vascular Toxicity. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 26:sup1, 129-133, 2012.

NIWA T.; SHIMIZU H. Indoxyl Sulfate Induces Nephrovascular Senescence. **Journal of Renal Nutrition**, vol. 22, n° 1 pp 102-106, 2012.

NOLL, C. et al. Effect of catechin/epicatechin dietary intake on endothelial dysfunction biomarkers and proinflammatory cytokines in aorta of hyperhomocysteinemic mice. **Eur J Nutr**, 52:1243–1250, 2013.

OLIVEIRA P. R. et al. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. In the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **J Cardiovasc Pharmacol**. 56(6):619-26, 2010.

OWADA S. et al. Indoxyl sulfate reduces superoxide scavenging activity in the kidneys of normal and uremic rats. **Am J Nephrol**. 2008;28(3):446-54, 2008.

PASTEN, C. et al. Polyphenols downregulate PAI-1 gene expression in cultured human coronary artery endothelial cells: molecular contributor to cardiovascular protection. **Thromb Res**, 121:(1) 59-65, 2007.

PEDRUZZI, L. M. et al. Nrf2-keap1 system versus NF-κB: the good and the evil in chronic kidney disease? **Biochimie**, 94(12):2461-2466, 2012.

PENG, Y. et al. Effects of Indoxyl Sulfate on Adherens Junctions of Endothelial Cells and the Underlying Signaling Mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**. 113:1034–1043, 2012.

POESEN, R. et al. Metabolism, Protein Binding, and Renal Clearance of Microbiota-Derived p-Cresol in Patients with CKD. **Clin J Am Soc Nephrol**, 11: 2016.

POESEN, R. et al. Renal Clearance and Intestinal Generation of p-Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate in CKD. **Clin J Am Soc Nephrol**. 8: 1508–1514, 2013.

POVEDA J. et al. p-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. **Nephrol Dial Transplant** 29:56–64, 2014.

RABE M.; SCHAEFER F. Non-Transgenic Mouse Models of Kidney Disease. **Nephron** 133:53–61, 2016.

- RAMEZANI, A.; RAJ, D. S. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions **J AM SOC NEPHROL**, 25: 657–670, 2014.
- RIBEIRO V. M. et al. High fat diet and high polyphenols beverages effects in enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity. **Nutr Hosp**, 35:169-175, 2017.
- ROCHA A. P. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascul Pharmacol** 46(2):97–104, 2007.
- ROCHA A. P. et al. Antihypertensive effects and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). **J Pharmacol Toxicol** 3(6):435–448, 2008.
- RODRIGUES R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **J Agric Food Chem** 54:4162–4167, 2006.
- ROMÃO JUNIOR J. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Bras Nefrol** Volume XXVI - nº 3 - Supl. 1, 2004.
- RUDIJANTO, A. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells on The Pathogenesis of atherosclerosis. **Acta Med Indones-Indones J Intern Med**, 39:2, 2007.
- RUIZ, S. et al. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. **Kidney Int**. 83(6):1029-41, 2013.
- SAITO, H. Toxicopharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases. **Biochemical Pharmacology**, 85:865–872, 2013.
- SAITO, H. et al. Hepatic sulfotransferase as a nephroprotecting target by suppression of the uremic toxin indoxyl sulfate accumulation in ischemic acute kidney injury. **ToxicolSci**. 141(1):206-17, 2014.
- SANTANA, A. C. Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice. **Nephrol Dial Transplant**, 28: 1140–1149, 2013.
- SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 2006(a).
- SCHAUSS A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). **J Agric Food Chem**. 1;54 (22):8604-10, 2006(b).
- SCHIFFRIN, E. L.; LIPMAN, M.; MANN, J. Chronic Kidney Disease: Effects on the Cardiovascular System. **Circulation**. 116:85-97, 2007.
- SCHULZ, E.; GORI, T.; MUNZEL, T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension Research**, 34, 665–673, 2011.

- SHIMIZU H. et al. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of MCP-1 via production of ROS and activation of NF- κ B, p53, ERK, and JNK in proximal tubular cells. **Life Sciences**, 90, 525–530, 2012.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vit**, 16:144-58, 1965.
- SOARES E. R. et al. Up-regulation of Nrf2 antioxidant signaling by açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) extract prevents oxidative stress in human endothelial cells. **Journal of Functional Foods**, 37, 107–11, 2017.
- SOHEL B. M. et al. Renal function trajectory over time and adverse clinical outcomes. **Clin Exp Nephrol**, 20(3):379-93, 2016
- STOCKLER-PINTO M. B. et al. Indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease. Could these toxins modulate the antioxidant Nrf2-Keap1 pathway? **J Ren Nutr**. 24(5):286-91, 2014.
- STOCLET J. C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **Eur J Pharmacol**, 500(1-3):299-313, 2004.
- SUCHY-DICEY, A. M. Tubular Secretion and Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol**, 27: 2148–2155, 2016.
- SUN C. Y., CHANG S. C., WU M. S. Uremic Toxins Induce Kidney Fibrosis by Activating Intrarenal Renin–Angiotensin–Aldosterone System Associated. Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **PLoS ONE**, 7(3): e34026, 2012.
- TEPEL M. et al. The antioxidantacetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. **Circulation** 107:992–995, 2003.
- TUMUR, Z. et al. Indoxyl Sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-inducedNF-kappaB activation. **Am J Nephrol**. 31(5):435-41, 2010.
- TUMUR, Z.; NIWA, T. Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells.**Am J Nephrol**. 29(6):551-7, 2009.
- VANHOLDER R. et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney Int**.63(5):1934-43, 2003.
- VANHOLDER R. et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrol Dial Transplant**. 20:1048-56, 2005.
- VANHOLDER R. et al. Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin.**Nephrol Dial Transplant**. 26(5):1464-7, 2011.
- VANHOLDER R. et al. An update on protein-bound uremic retention solutes. **J Ren Nutr**. 22(1):90-4, 2012.

VANHOLDER, R. et al. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. **J Am Soc Nephrol.** 25(9):1897-907, 2014.

VAZIRI, ND et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. **Kidney International**, 83, 308–315, 2013.

WARNER, E. F. et al. Common Phenolic Metabolites of Flavonoids, but Not Their Unmetabolized Precursors, Reduce the Secretion of Vascular Cellular Adhesion Molecules by Human Endothelial Cells. **J Nutr.** 146(3):465-73, 2016.

WATANABE, H. et al. Update on the Pharmacokinetics and Redox Properties of Protein-Bound Uremic Toxins. **J Pharm Sci.** 100:3682–3695, 2011.

WATANABE, H. et al. p-cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPHoxidase. **Kidney Int.** 83(4):582-92, 2013a.

WATANABE, I. et al. Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Indoxyl Sulfate-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Circ J**, 77:224-230, 2013b.

WATANABE, H. et al. p-cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. **Pharmacol Res Perspect.** 3(1), 2014.

WEBSTER A. C. et al. Chronic Kidney Disease. **Lancet**, 389(10075):1238-1252, 2016.

WU, I. W. et al. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant.** 26,938–947, 2011.

WU V. C. et al. In acute kidney injury, indoxyl sulfate impairs human endothelial progenitor cells: modulation by statin. **Angiogenesis.** 16(3):609-24. 2013.

YAMADA, H.; WATANABE H. Tea polyphenols in preventing cardiovascular diseases. **Cardiovasc Res**, v.73, n.2, Jan 15, p.439-40. 2007.

YAMAGUCHI K. K. L, PEREIRA L. F. R, LAMARÃO C. V. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chem.**179:137-151, 2015.

YANG, K. et al. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein. **Toxicol Lett.** 215(2):77-83, 2012.

YU, M. et al.

Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. **Am Soc Nephrol.** 6(1):30-9, 2011.

ZHANG, L. Y. et al. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. **Food Funct.**, DOI: 10.1039/C5FO01244A, 2016.

ZAPOLSKA-DOWNAR, D. et al. Aronia melanocarpa fruit extract exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Eur J Nutr.** 51:563–572, 2012.

ANEXO A– Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Paris, le lundi 29 février 2016

Direction générale
de la recherche
et de l'innovation

Service de la performance,
du financement et de la
contractualisation avec les
organismes de recherche

Département de la culture
scientifique et des relations
avec la société

Expérimentation animale -
Autorisation de projet

Affaire suivie par
Didier HOFFSCHIR
Conseiller scientifique
auprès du DGRI

Florence HERVATIN
Chargée de mission

Téléphone
01 55 55 84 05
Fax
01 55 55 99 59
Mél.
florence.hervatin-queney
@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Monsieur,

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R. 214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro *APAFIS#3210-2015121608242729 v1*
- ayant pour titre : « *Les polyphénols de l'Açaï: une stratégie pour minimiser l'inflammation et le stress oxydant associés à la maladie rénale chronique* »,
- déposé par l'Établissement Utilisateur : INSA LYON, numéro d'agrément A692660501, dont le responsable est *Monsieur Éric MAURINCOMME*,
- et dont le responsable de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est *Monsieur Christophe SOULAGE*,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'Établissement Utilisateur, pour une durée de *6 mois* à partir du 29/02/2016

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale n°102 et a reçu un avis *favorable*.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation
l'adjointe du chef du service de la performance,
du financement et de la contractualisation avec
les organismes de recherche

Christine COSTE

Monsieur Éric MAURINCOMME
INSA LYON



Research paper

Determination of the binding properties of *p*-cresyl glucuronide to human serum albumin

Dan Yi ^{a,1}, Elisa Bernardes Monteiro ^{a, b,1}, Stéphane Chambert ^c, Hédi A. Soula ^d,
Julio B. Daleprane ^b, Christophe O. Soulage ^{a,4}

^a Univ. Lyon, CarMeN, INSERM U1060, INRA U1397, INSA de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69621 Villeurbanne, France

^b Laboratory for Studies of Interactions Between Nutrition and Genetics, LEING, Department of Basic and Experimental Nutrition, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

^c INSA Lyon, ICIMS, Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique, Bât J. Verne, 20 av A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France

^d Sorbonne Universités, Univ. Pierre et Marie Curie - Paris 6, 75006 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2017

Accepted 23 April 2018

Available online 26 April 2018

Keywords:

Uremic toxin

Uremia

p-Cresyl-glucuronide

Serumalbumin

Protein binding

ABSTRACT

p-Cresyl glucuronide (*p*-CG) is a by-product of tyrosine metabolism that accumulates in patients with end-stage renal disease. *p*-CG binding to human serum albumin in physiological conditions (37°C, pH 7.40) was studied by ultrafiltration (MWCO 10 kDa) and data were analyzed assuming one binding site. The estimated value of the association constant was $2.77 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and a maximal stoichiometry of 3.80 mol per mole. At a concentration relevant for end-stage renal patients, *p*-CG was 23% bound to albumin. Competition experiments, using fluorescent probes, demonstrated that *p*-CG did not bind to Sudlow's site I or site II. The *p*-CG did not interfere with the binding of *p*-cresyl-sulfate or indoxyl sulfate to serum albumin.

© 2018 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by the progressive and irreversible loss of renal function. Many solutes normally excreted in urine by the kidneys accumulate in the body fluids of patients with CKD. These retention solutes may interact with biological functions and exert major toxic effects; for this reason, they are often referred to as uremic toxins [1,2]. Of note, protein-bound uremic toxins are especially relevant, due to their poor removal by commonly used dialysis techniques and high toxicity [3,4]. *p*-Cresol is the main product of tyrosine biotransformation by anaerobic intestinal bacteria and is transformed into both *p*-cresyl sulfate (*p*-CS) and *p*-cresyl glucuronide (*p*-CG) in the liver by sulfatation and

glucuronidation, respectively (Fig. 1). *p*-CS, the most preponderant metabolite of *p*-cresol in human, is frequently associated with increased mortality rate and risk of cardiovascular diseases among uremic patients [5–8]. Experimental studies demonstrated that *p*-CS can exert deleterious effects both *in vitro* and *in vivo*, such as induction of oxidative stress [9], endothelial damage [10,11], proximal tubular injury [12] and insulin resistance [13]. While *p*-CS has been extensively studied, only limited publications in literature were dedicated to *p*-CG behavior. This later metabolite is produced at markedly lower concentrations in human and further investigations are needed in order to better elucidate its role in uremia. Total and free *p*-CG concentrations are independently associated with mortality in predialysis patients [14]. Additionally, *p*-CG was found to act synergistically with *p*-CS increasing the oxidative burst in leucocytes and contributed to the pro-inflammatory effect [15]. Other authors also demonstrated that *p*-CG could exert pro-inflammatory effects that contributed to vascular damage by stimulating crosstalk between leukocytes and vessel wall, when acted synergistically with *p*-CS [16]. Both *p*-cresol derivatives are bound to plasmatic proteins in biological systems; however, the percentage of protein binding varies drastically between the two conjugates. *p*-CS is found to be approximately 90%

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; CMPE, 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ESRD, end-stage renal disease; HPLC, high pressure liquid chromatography; HSA, human serum albumin; NSB, non specific binding; IS, indoxyl-sulfate; PBS, phosphate buffered saline; *p*-CG, *p*-Cresyl glucuronide; *p*-CS, *p*-cresyl sulfate.

* Corresponding author. CarMeN, UMR INSERM U.1060, INSA-Lyon, Bldg IMBL, 15 avenue Jean Capelle, 69 621 VILLEURBANNE cedex, France

E-mail address: christophe.soulage@insa-lyon.fr (C.O. Soulage).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.019>

0304-9084/© 2018 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.