



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

GABRIELA FERREIRA DIAS

**EFEITO DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO NA ERIPTOSE E NO
SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ERITRÓCITOS**

CURITIBA

2017

GABRIELA FERREIRA DIAS

**EFEITO DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO NA ERIPTOSE E NO
SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ERITRÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Dra. Andréa Novais Moreno Amaral

CURITIBA

2017

NOTA BIOGRÁFICA

Gabriela Ferreira Dias. Possui Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (2016). Participou de projetos de iniciação científica e conclusão de curso no Laboratório de Imunologia Aplicada à Doença Renal Crônica sob orientação da Dra. Andréa Novais Moreno-Amaral (Fundação Araucária 2013-14; PUCPR 2014-15 e CNPq 2015-2016) envolvendo o efeito da uremia na modulação de monócitos atípicos e no processo de eritrofagocitose e efeito de toxinas urêmicas na anemia na doença renal crônica. Vinculou-se ao Mestrado em Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná em abril de 2016 na linha de pesquisa Aspectos Celulares e Moleculares em Patogênese motivada em continuar a pesquisa com foco na toxicidade urêmica e anemia renal.

AGRADECIMENTOS

À PUCPR, pelo espaço e estrutura cedida para a realização do trabalho;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

À Prof^a Dr^a. Andréa Novais Moreno-Amaral, pela orientação e confiança no meu trabalho durante todos esses anos;

Aos todos os colegas de laboratório, especialmente à Natália, Ana Clara e Thiago pela ajuda, discussões científicas e companheirismo, que foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho, além de tornar meu dia a dia muito mais alegre;

Aos colegas de laboratório que voluntariamente aceitaram doar sangue para a realização dos ensaios, participando da pesquisa;

À minha família, por me apoiarem e me estimularem a sempre fazer o que eu amo, especialmente à Marcela, que além de ser uma colega de laboratório é minha amada irmã;

Ao meu noivo Paulo, por ser uma pessoa incrível e sempre me ajudar a ver o lado bom de cada desafio da vida acadêmica ou fora dela.

RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). A DRC está associada a muitas comorbidades, como a anemia, sendo a principal causa a falha da produção de eritropoietina (Epo) pelos rins e consequente diminuição na produção de eritrócitos pela medula óssea. Contudo, pelo acúmulo de toxinas urêmicas durante a progressão da doença, a morte precoce dos eritrócitos parece ter influência na anemia destes pacientes. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da toxina urêmica indoxil sulfato (IS), bem como do soro urêmico obtido de pacientes em hemodiálise (HD) na sobrevivência de eritrócitos através de indicadores como a indução de eriptose e produção de ROS, além de mensurar os níveis do antioxidante glutatona (GSH) em eritrócitos saudáveis. As células foram incubadas com IS (0,01; 0,09 e 0,17mM) durante 6, 12 e 24 horas, ou com soro HD durante 24h. A eriptose foi avaliada pela marcação com Anexina-V e a produção de ROS pela sonda DCFH-DA, ambos analisados por citometria de fluxo. GSH foi mensurado pelo método de DTBN por espectrômetro em 412nm. IS aumentou a produção de ROS de forma tempo- e dose- dependente em 6 e 12h de incubação, estabilizando em 24h. A eriptose foi elevada em 12 e 24h, sem aumento significativo em 6h de incubação. Ambos os processos foram atenuados na presença do difenil iodônio (DPI), inibidor da enzima NADPH oxidase. O IS e o soro HD não alteraram os níveis de GSH em eritrócitos saudáveis. No entanto, as células provenientes de pacientes em HD apresentaram diminuição desse antioxidante de 49%. Os resultados indicam que o aumento na produção de ROS causado por IS pode desencadear o aparecimento de FS na superfície celular, uma vez que a produção de ROS antecedeu a eriptose, sendo os dois processos dependentes da enzima NADPH oxidase. Além disso, IS e soro urêmico não afetaram o GSH em eritrócitos saudáveis, o que indica que essas células podem lidar com a produção de ROS exacerbada, uma vez que as células de pacientes em HD apresentaram níveis reduzidos de GSH.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica, Anemia, Eriptose, Toxicidade Urêmica, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) consists of a progressive and irreversible renal damage with loss of kidney function (glomerular, tubular and endocrine). CKD is associated with many comorbidities, such as anemia, with the primary cause being a decrease in erythropoietin (Epo) production by the kidneys and consequent decrease in erythrocyte production by bone marrow. However, due to the accumulation of uremic toxins during disease progression, the precocious death of erythrocytes seems to influence the anemia of these patients. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of uremic toxin indoxyl sulfate (IS) and uremic serum obtained from hemodialysis (HD) patients on the survival of erythrocytes through indicators such as eryptosis induction, ROS production and measure of the antioxidant glutathione (GSH) in healthy erythrocytes. Cells were incubated with IS (0.01, 0.09 and 0.17 mM) for 6, 12 and 24 hours, or with HD serum for 24h. Eryptosis was evaluated by Annexin-V labeling and ROS production by the DCFH-DA probe, both analyzed by flow cytometry. GSH was measured by the DTBN method by spectrometer at 412nm. IS increased ROS production in a time- and dose-dependent manner in 6 and 12h of incubation, stabilizing in 24h. The eryptosis was elevated at 12 and 24h, without significant increase in 6h of incubation. Both processes were attenuated in the presence of diphenyl iodonium (DPI), an inhibitor of the NADPH oxidase enzyme. IS and HD serum did not alter GSH levels in healthy erythrocytes. However, the cells obtained from patients in HD had a reduction of this antioxidant of 49%. The results indicate that the increase in the ROS production of ROS induced by IS can trigger the appearance of phosphatidylserine on the cell surface, since ROS production precedes eryptosis, the two processes being dependent on the NADPH oxidase enzyme activity. In addition, IS and uremic serum did not affect GSH in healthy erythrocytes, which indicates that these cells can handle with exacerbated ROS production, since HD patient cells had reduced levels of GSH.

Key words: Chronic Kidney Disease, Anemia, Eryptosis, Uremic Toxicity, Oxidative Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

- DPI** - Diphenyleiodonium
- DRC** – Doença Renal Crônica
- DTNB** - 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)
- Epo** – Eritropoetina
- EuTOX** – Grupo Europeu de Toxicidade Urêmica
- FS** – Fosfatidilserina
- GFR** – Glomerular Filtration Rate
- GSH** – Glutathione
- HC-RBC** – Healthy Control Red Blood Cells (cells from healthy volunteers)
- HD** – Hemodiálise
- HD-RBC** – Hemodialysis Red Blood Cells (cells from hemodialysis patients)
- IL-13** – Interleucina-13
- IS** – Indoxil Sulfato
- OAT's** – Transportadores de Íons Orgânicos
- PAF** – Fator de Ativação Plaquetária
- pCS** – *para*-cresil Sulfato
- RBC** – Red Blood Cells
- RNS** – Espécies Reativas de Nitrogênio
- ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio
- S-HC** – Healthy Control Serum
- S-HD** – Hemodialysis Serum
- TGF- β** – Fator Transformador do Crescimento- β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.2. Toxicidade Urêmica.....	7
1.3. Anemia e a DRC.....	9
2 JUSTIFICATIVA.....	13
3 OBJETIVO.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
ARTIGO.....	15
1. Introduction.....	16
2. Results.....	17
2.1. Increased ROS generation by IS.....	17
2.2. Induction of eryptosis by IS.....	18
2.3. Glutathione levels.....	20
3. Discussion.....	21
4. Materials and Methods.....	23
4.1. Blood samples and Red Blood Cells (RBC) preparations and incubations.....	23
4.2. Measurement of ROS production.....	24
4.3. Determination of eryptosis by annexin- V binding.....	24
4.4. Determination of erythrocyte glutathione.....	24
4.5. Statistical Analysis.....	25
References.....	25
7. REFERÊNCIAS.....	28
8. PROPOSTA PARA PROJETO DE DOUTORADO.....	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica (DRC) - A DRC consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). É uma síndrome complexa, com etiologia heterogênea e expressão clínica muito variável, o que resulta em taxas muito imprevisíveis de progressão. Possui incidência elevada, com alto impacto na morbi-mortalidade da população, além do enorme custo econômico e social da doença, sendo considerada um problema de saúde pública (ALEBIOSU, 2003). Apesar de melhorias nas técnicas de diálise peritoneal e hemodiálise os índices de morte entre essa população ainda é considerado alto, cerca de 20% ao ano (WILLIAMS et al. 2004). É um processo extremamente silencioso, podendo evoluir com poucos sinais e sintomas durante anos, o que dificulta o diagnóstico da DRC até estágios avançados (LIPSIC et al, 2011). A DRC é dividida em seis estágios funcionais, com base no grau da função renal, independentemente do diagnóstico: estágio 1 – inclui pessoas que possuem função renal normal e que não apresentam lesão nos rins, porém que estão no grupo de risco para desenvolvimento da DRC, como hipertensos e diabéticos; estágio 2 – compreende aparecimento de lesão renal sem comprometimento da função dos rins; estágio 3 – fase de insuficiência renal funcional leve; estágio 4 – fase de insuficiência renal laboratorial ou moderada; estágio 5 – fase de insuficiência renal clínica ou severa e estágio 6 ou fase terminal que corresponde à faixa de função renal na qual os rins perderam o controle do meio interno. Nessa fase, o paciente encontra-se intensamente sintomático. A detecção precoce da doença renal e condutas terapêuticas apropriadas para o retardamento de sua progressão podem reduzir o sofrimento dos pacientes e os custos financeiros associados à DRC (KDIGO, 2013). Nos últimos anos, medidas para a detecção precoce da doença tem sido o foco da pesquisa clínica associada à pesquisa básica.

1.2. Toxicidade Urêmica - A baixa capacidade de remoção de compostos potencialmente tóxicos pela urina, devido à falha da filtração glomerular, faz com que estes se acumulem no corpo (VANHOLDER & DE SMET, 1999). O resultado é o acúmulo de compostos que são chamados

coletivamente de solutos de retenção urêmica. Se estes forem biologicamente/bioquimicamente ativos, são chamados de toxinas urêmicas. O acúmulo desses compostos tem um impacto negativo sobre muitas funções do corpo e resulta em uma intoxicação progressiva e endógena. Atualmente, 152 toxinas estão descritas e listadas pelo grupo europeu de toxinas urêmicas (EUTox). Esses compostos foram subdivididos de acordo com seu peso molecular (Vanholder & De Smet, 1999) e classificados com base nas características físico-químicas das moléculas que influenciam a sua remoção por diálise ou estratégias relacionadas. Assim, três grandes grupos podem ser identificados: (i) pequenos compostos solúveis em água, cujo peso molecular é definido como 500 Da no máximo. Os protótipos são uréia e creatinina, que são facilmente removidos por qualquer estratégia de diálise e não têm necessariamente uma atividade tóxica marcante. (ii) as moléculas medianas, que possuem peso molecular fixado em mais de 500 Da (chegando a 15000 Da), sendo o protótipo a β 2-microglobulina. Estas moléculas só podem ser removidas por estratégias de diálise que empregam dialisador com membranas contendo poros grandes o suficiente para permitir que as mesmas atravessem, ou por diálise peritoneal (LEDEBO, 1998). Muitos dos compostos deste grupo são peptídeos que afetam um grande número de sistemas e órgãos. (iii) os compostos que se ligam às proteínas plasmáticas, sendo seus protótipos os fenóis e indóis. Muitos dos compostos deste grupo possuem atividade tóxica e são difíceis de eliminar pela maioria das estratégias de diálise disponíveis atualmente, incluindo diálise de alto fluxo.

As toxinas derivadas de grupo indol são ligadas à proteína e geradas por processos de transformação química, como a conjugação. O indoxil sulfato (IS) é um dos ânions orgânicos metabolizados no fígado e é produzido por bactérias intestinais a partir do triptofano derivado da dieta proteica. Esta toxina é elevada em pacientes com DRC e tem um papel importante na progressão do dano renal por mecanismos de indução da reação inflamatória e uma expressão aumentada de citocinas profibróticas (TGF- β , IL-13) (YU et al., 2011). Os fenóis são sintetizados a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina por bactérias intestinais, absorvidos pela mucosa intestinal e acumulados na DRC por aumento da produção intestinal e perda da filtração glomerular. São moléculas com baixa massa molecular e intensa ligação

proteica. O *p*-cresilsulfato (*p*CS) é um representante de grande relevância, pois parece estar ligado à ativação de leucócitos, o que foi determinado pelo aumento do *burst* oxidativo. O *p*CS e o IS se ligam à albumina, o que limita a filtração glomerular dessas toxinas. A excreção renal depende principalmente dos sistemas tubulares de transporte, como os transportadores de ânions orgânicos (OAT's) (DEGUCHI et al. 2004; MEIJERS et al. 2008).

1.3. Anemia e a DRC - A anemia é uma complicação comum em pacientes com dano renal, especialmente quando se encontram com insuficiência renal em estágio terminal, apesar de ser observada no estágio inicial da doença (KDIGO, 2012). Estudos indicam que o índice de anemia em pacientes com DRC é menor de 10% no estágio 2, 20% a 40% em estágio 3, 50% a 60% em estágio 4 e mais de 70% em pacientes em estágio avançado e terminal da doença (estágios 5 ou em tratamento substitutivo de diálise). Esses dados mostram que o desenvolvimento de anemia é precoce na DRC, mas essa frequência é aumentada em relação ao declínio da taxa de filtração glomerular (YILMAZ et al., 2011). Ela não somente apresenta sintomas da anemia em si como também diminui a expectativa de vida e prejudica as atividades diárias dos doentes renais.

A patofisiologia da anemia na DRC é multifatorial. Dentre os fatores que contribuem para o seu desenvolvimento incluem-se a deficiência na produção de eritropoietina (Epo) pelos rins com consequente redução da capacidade de resposta da medula óssea à Epo, o que leva à falha na produção de eritrócitos. Outros fatores envolvidos são a redução da expressão de receptores celulares à Epo, aumento da apoptose dos eritroblastos, falha nos mecanismos de defesa devido ao estresse oxidativo e metabolismo anormal do ferro (BERG et al., 2001; DALLALIO & MEANS, 2003; MACDOUGALL, 2007). Além disso, a anemia é significativamente associada com a mortalidade e morbidade em pacientes nos estádios finais da doença e tem sido ligado a doenças cardiovasculares (LEVIN et al, 2006).

Foi observada a diminuição da sobrevivência dos eritrócitos em circulação, sendo a toxicidade urêmica um dos principais indutores deste fenômeno, como também crônica perda de vitaminas durante a hemodiálise (MACDOUGALL, 2001). Desta forma, a acelerada destruição dos eritrócitos na

uremia pode estar relacionada com a retenção de um ou mais compostos urêmicos (ESCHBACH, 1967; MASSRY, 1983), uma vez que o sangue de paciente urêmico transfundido em indivíduo saudável resulta no aparecimento de uma população saudável de eritrócitos, enquanto o contrário (sangue de indivíduo normal transfundido em paciente urêmico) leva a uma diminuição do tempo de vida destas células mostrando assim a relação com a uremia (LOGE et al., 1958). Um aspecto comum desta acelerada destruição de eritrócitos na DRC, é o aparecimento de fosfatidilserina (FS) na superfície destas células, um fosfolípido aniônico encontrado principalmente na face interna das membranas plasmáticas de células eucarióticas. Eritrócitos maduros sofrem uma remoção da circulação quando estão senescentes, o que leva a uma vida média de aproximadamente 100-120 dias na circulação. Anterior à senescência, esses eritrócitos podem ainda apresentar danos irreversíveis, o que compromete sua integridade desencadeando a morte celular programada, ou no caso dos eritrócitos o processo denominado eriptose. Por não apresentarem núcleo e mitocôndrias, organelas importantes na execução no processo da apoptose, os eritrócitos não apresentam características como a despolarização de mitocôndria e fragmentação nuclear. Contudo, a eriptose e apoptose compartilham características como formação de ondas na membrana plasmática, a partir do aumento da concentração do cálcio citoplasmático que estimula a desorganização da membrana e ativa proteínas que degradam o citoesqueleto, provocando o encolhimento da célula e modificação das estruturas de membrana, seguidos da expressão de FS na superfície celular (LANG et al., 2010; LANG & QADRI, 2012). Na progressão da DRC, a exposição de FS na superfície de eritrócitos representa um sinal bem definido da eriptose, uma vez observado um aumento significativo da exposição de FS em eritrócitos de pacientes renais comparados com indivíduos saudáveis (BONOMINI et al., 1999). A exposição de FS é reconhecida por macrófagos e assim, os eritrócitos são fagocitados, degradados e então removidos da circulação sanguínea (LANG et al., 2005a).

Além da exposição de FS, a eriptose é um processo que envolve o encolhimento celular e aparecimento de ondulações na membrana plasmática. O encolhimento celular é causado pela ativação dos canais de Ca^{2+} e K^+ . A ativação dos canais de K^+ leva à hiperpolarização da membrana celular, que

aumenta a força motriz elétrica para que o Cl^- saia para o espaço extracelular. Assim, o aumento da atividade dos canais de K^+ e Cl^- leva à perda de KCl celular acompanhado de água e conseqüentemente promovendo a perda de volume e encolhimento da célula (FÖLLER et al., 2008). O encolhimento osmótico dos eritrócitos, além de deixá-los mais sensíveis aos canais de Ca^{+2} e levar à exposição de FS, desencadeia a liberação do fator de ativação plaquetária (PAF) através da enzima fosfolipase A2. A exposição dos eritrócitos ao PAF ativa a enzima esfingomielinase, o que acarreta na formação da ceramida. A ceramida, por sua vez, é capaz de modificar a interação da membrana celular com o citoesqueleto, aumentar a fragilidade da membrana e estimular a scramblase nos eritrócitos, enzima que é responsável por deslocar a FS da membrana interna dos eritrócitos, para seu folheto externo (LANG et al., 2005b).

A eriptose pode ser desencadeada por outros danos como o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é parcialmente efetivo devido à ativação dos canais permeáveis ao Ca^{2+} , além da ativação dos canais de Cl^- , que como descrito anteriormente, são necessários para o encolhimento celular, e assim, participando também do desencadeamento da eriptose (LANG et al., 2014). O estresse oxidativo é caracterizado por um estado de oscilação entre a produção de radicais livres e a sua degradação pelo sistema antioxidante, que leva ao acúmulo desses radicais. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) é um fenômeno aumentado em pacientes com DRC (AVELES et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2011) e uma diminuição no sistema antioxidante pode ser atribuído ao ambiente tóxico promovido pela doença (CANAUD et al., 1999). Na DRC, a atividade do antioxidante glutathiona (GSH) é negativamente correlacionada com as toxinas urêmicas (RUTKOWSHI et al., 2006) e positivamente correlacionada com a remoção de creatinina (CEBALLOS-PICOT et al., 1996), sugerindo que GSH é um indicador da função renal (TUCKER et al., 2013). Diferentes mecanismos poderiam explicar o aumento do estresse oxidativo na DRC tais como características dos pacientes renais, como a idade avançada, diabetes, hipertensão renal, níveis baixos de vitaminas antioxidantes devido a restrição alimentar para evitar hiperfosfatemia, e falha na remoção de ROS, que com declínio na função renal estão implicados no aumento do estresse oxidativo e progressão da DRC (PALANEESWARI et

al., 2014). A patogênese do estresse oxidativo em pacientes com DRC é complexa e inclui fatores relacionados com a uremia e com a diálise. Estudos anteriores indicaram que o soro de pacientes em hemodiálise (HD) possui níveis maiores de malondialdeído e severa deficiência de vitaminas, que pode encurtar o tempo de vida dos eritrócitos na DRC (KAO et al., 2010; LAHERA et al., 2006). A exposição de eritrócitos normais a indutores do estresse oxidativo mostraram que ROS induzem rigidez da membrana, reduzem a elasticidade, e oxidam a hemoglobina associada à membrana, bem como grupos sulfidrilo do citoesqueleto e proteínas transmembrana (HEBBEI et al., 1990; JOINER et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A análise da resposta *in vitro* ao estímulo de toxinas representa um avanço na compreensão da toxicidade urêmica relacionada ao desencadeamento da anemia. Compreender qual é o mecanismo de ação de toxinas urêmicas e qual seu impacto na saúde dos pacientes pode ser um passo inicial para desvendar as vias que agravam a anemia renal mesmo quando o tratamento com eritropoietina é administrado. A caracterização da disfunção antioxidante na DRC levará a uma melhor compreensão dos efeitos adversos que o estresse oxidativo promove, com objetivo de melhorar o quadro clínico geral do paciente que é tão debilitado pela inflamação crônica característica dessa doença. Além disso, diferentes níveis de toxinas urêmicas podem auxiliar na estratificação dos pacientes sob risco das complicações da DRC e contribuir para novos alvos de tratamento, reduzindo a morbimortalidade destes pacientes.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da toxina urêmica indoxil sulfato (IS) na sobrevivência de eritrócitos através de indicadores como a indução de eriptose e estresse oxidativo, relacionando com o acúmulo progressivo da toxina na doença renal crônica.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a eriptose de eritrócitos de indivíduos saudáveis submetidos ao IS através da exposição de fosfatidilserina;
2. Explorar o potencial do IS em promover o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em eritrócitos saudáveis;
3. Avaliar a participação da enzima NADPH oxidase no processo de eriptose e aumento ROS;
4. Mensurar os níveis do antioxidante glutatona em eritrócitos saudáveis submetidos ao IS ou soro urêmico;
5. Mensurar os níveis do antioxidante glutatona em eritrócitos de pacientes em hemodiálise.

ARTIGO PARA SUBMISSÃO NA TOXINS (A2)

Triggering of ROS production precedes eryptosis induced by the uremic toxin indoxyl sulfate.

Gabriela Dias¹, Natalia Borges Bonan¹, Thiago Maass Steiner¹, Silvia Daniele Rodrigues², Lia Sumie Nakao², Viktoriya Kuntsevich³, Peter Kotanko³, Roberto Pecoits Filho¹ and Andréa N Moreno-Amaral^{1, *}

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Brazil;

fdias.gabriela@gmail.com, natybonan@globo.com, thiago.m.steiner@gmail.com, r.pecoits@pucpr.br, andrea.moreno@pucpr.br

² Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brazil; silviahellfire@gmail.com, lia.nakao@ufpr.br

³ Renal Research Institute (RRI), NY; vkshplsncchk@gmail.com, Peter.Kotanko@rriny.com

* Correspondence: andrea.moreno@pucpr.br; Tel.: +55-4132712028

Abstract: Indoxyl sulfate (IS) is an important uremic toxin accumulated in the blood from patients with chronic kidney disease (CKD), which can contribute to the progression of this disease and associated comorbidities. Our aim was to evaluate the capacity of IS in triggering eryptosis, increase reactive oxygen species (ROS) and decrease glutathione (GSH) content. Erythrocytes (RBC) from healthy subjects were incubated with IS (0.01; 0.09 or 0.17 mM) in the presence or absence of the NADPH oxidase inhibitor, diphenyleneiodonium chloride (DPI; 10 μ M). The eryptosis was evaluated by Annexin-V binding and ROS generation by DCFH-DA probe, analyzed by flow cytometry. GSH levels were measured by DTNB method. IS increased ROS in a time- and dose-dependent manner between 6 and 12h, and stabilized after 24h. Eryptosis was increased in a dose- and time-dependent manner after 12 and 24h, without significant eryptosis in 6h. In the presence of DPI, ROS production and eryptosis were inhibited to levels compared to control. IS and serum obtained from hemodialysis (HD) patients did not change GSH content in healthy RBC, but cells obtained from HD patients had a decrease of 49% in GSH content. In conclusion, IS promoted ROS production and eryptosis, being both NADPH

oxidase-dependent processes. Furthermore, IS did not affect GSH in healthy RBC, which indicates that healthy RBC can deal with increased ROS production, once RBC from renal patients presented reduced levels of this antioxidant.

Keywords: chronic kidney disease; indoxyl sulfate; eryptosis; oxidative stress

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by a reduction in kidney function: excretory, endocrine and metabolic functions [1]. Decreased glomerular filtration rate (GFR) leads to accumulation of solutes that can potentially cause degenerative processes. Many of these compounds, as indoxyl sulfate (IS), are present in high concentrations in the blood of renal patients once their removal is compromised by being bound to protein [2]. The IS plays an important role in the progression of renal damage by mechanisms of induction of oxidative stress and endothelial dysfunction [3]. Furthermore, uremic toxicity has been described as an inhibitor of erythropoiesis and to accelerate suicidal erythrocyte death, or eryptosis, suggesting an involvement of these compounds with renal anemia [4]. Eryptosis and apoptosis share characteristics such as blebbing in plasmatic membrane and increased cytoplasmic calcium activity, which stimulates membrane disorganization and activates proteins that degrade the cytoskeleton, causing cell shrinkage and modification of membrane structures, followed by phosphatidylserine (PS) exposure on the cell surface. Exposed PS binds to inflammatory monocytes CD14⁺⁺/CD16⁺ and are then engulfed and cleared from the circulation [5,6]. Eryptosis can be triggered by other damages, such as oxidative stress. The oxidative stress activates Ca⁺² permeable channels, as well as the activation of the Cl⁻ channels, which are necessary for cellular shrinkage, and thus also participating in accelerate death of these cells and also accelerating anemia process [7]. In view of the presented efforts, the aim of this study was to evaluate the effect of IS on the survival of erythrocytes through indicators such as eryptosis, production of reactive oxygen species (ROS) and consumption of the antioxidant glutathione (GSH).

2. Results

2.1. Increased ROS generation by IS

An increased ROS production was observed after 6, 12 and 24 hours of incubation with IS in a dose- and time dependent manner (Fig. 1 A, B and C, respectively) compared with control cells (HC-RBC). The exception was the lowest IS concentration (0.01mM), which only had an effect on the induction of ROS production by HC-RBC after 24h of incubation ($11\pm4.5\%$ versus $3.9\pm3.6\%$ of HC-RBC). It is worth mentioning that the lowest IS concentration promoted lower levels of ROS production by HC-RBC at all times analyzed (6, 12 and 24h), when compared to ROS production by HD-RBC ($5\pm2.7\%$, $6.6\pm2.9\%$ and $11\pm4.5\%$ compared to $21.24\pm2.7\%$ from HD). Furthermore, all higher concentrations of IS (0.09mM and 0.17mM) were able to increase the production of ROS by HC-RBC (6h - $13.6\pm5.3\%$ and $13.1\pm5.1\%$ compared to $2.9\pm3.2\%$ from HC; 12h - $21.3\pm6\%$ and $26.4\pm7.6\%$ compared to $2.7\pm3.9\%$ from HC, 24h - $15.2\pm3.4\%$ and $20.5\pm3.9\%$ compared to $3.9\pm3.6\%$ from HC), but for the 0.09mM and 0.17mM IS concentrations there was no statistical difference between 12h to 24h of incubation (Figure 1 B and C, respectively). Pre-treatment of HC-RBC with a NADPH oxidase inhibitor DPI significantly reduced ROS production levels after 24 hours of incubation in the presence of different IS concentrations ($6.6\pm3.7\%$, $7.9\pm2.2\%$ to intermediate and higher concentration, respectively, with DPI compared to $15.2\pm3.4\%$ and $20.5\pm3.9\%$ without DPI) (Fig. 1 C and D).

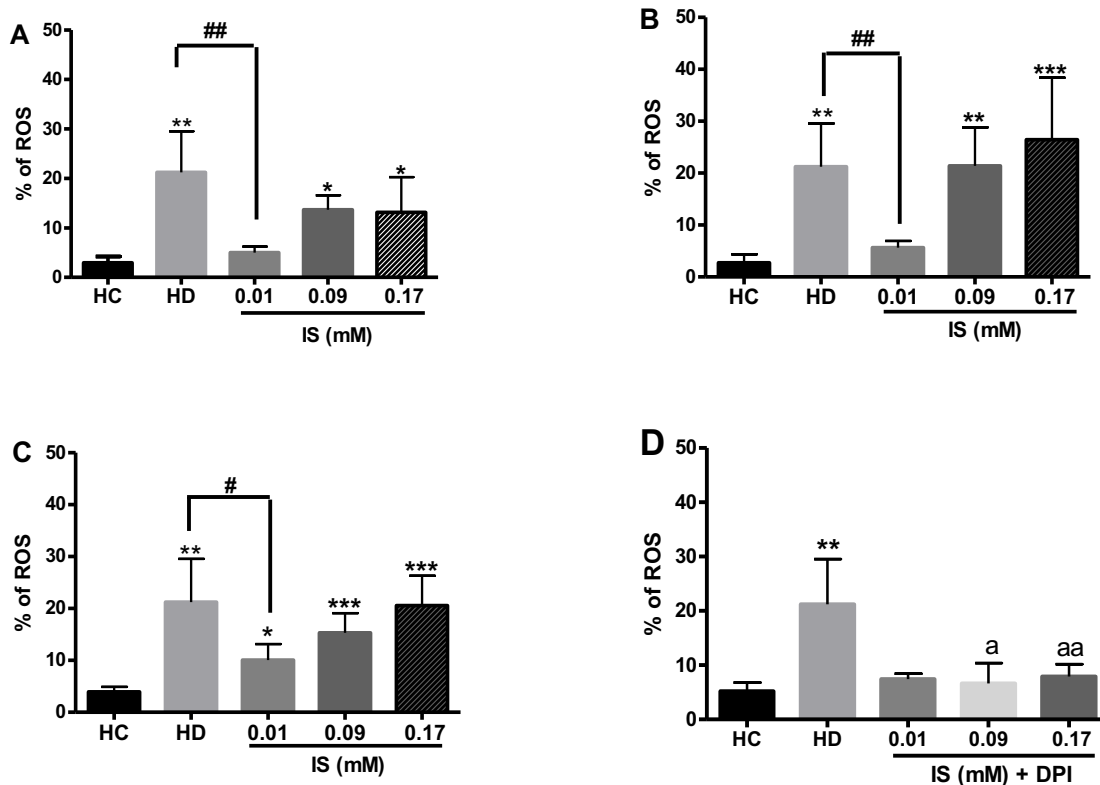


Figure 1 – Effect of IS in ROS generation. Incubation of HC-RBC only with Tris-Glc (HC) buffer; with serum previously obtained from patients on hemodialysis (HD) or with the different concentrations of IS (0.01, 0.09 and 0.17mM) for (a) 6h n=4; (b) 12h n=8 or (c) 24h n=8. In addition, (d) HC were incubated with DPI (10mM) for 30 min before the addition of the different IS concentrations to complete 24h incubation, n=3. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 versus HC. # p<0.05; ## p<0.01 versus HD. a p<0.05, aa p<0.001 versus same concentration of IS without DPI.

2.2. Induction of eryptosis by IS

To understand the trigger involved in the balance between ROS production and the RBC death (eryptosis) induced by IS, the same protocol performed to ROS production was used to observe the exposure of phosphatidylserine (PS) on HC-RBC by a dose-time dependent assay. Some important results were observed, First: no eryptosis was observed after 6h using all IS concentrations (0.01, 0.09 and 0.17mM) ($1.8 \pm 0.9\%$; $2.1 \pm 0.7\%$; $2.4 \pm 1.6\%$, respectively compared to $1.6 \pm 2.6\%$ from HC), even the highest concentrations (0.09 and 0.17mM) (Fig 2 A), which were able to induce ROS production by HC-RBC (Fig 1 A). Second: In the same line of interpretation, no eryptosis was observed using the lowest IS concentration (0.01mM) in all period of time analyzed ($1.8 \pm 0.9\%$; $8.4 \pm 3.5\%$; $8 \pm 4.5\%$, respectively compared to

1.6±2.6%; 4.2±1.3%; 4.5±0.3% from HC (Fig 2 A, B and C). Third: after 24h of incubation the highest IS concentrations (0.09 and 0.17mM) were able to promote increased PS exposure, more than the observed in HD-RBC, which was significant to the highest concentration (17.2±5.3%; 30.9±6.3% compared to 12.5±3.8% from HD) (Fig 2 B and C). In addition, when the HC-RBC were incubated previously with the NADPH oxidase inhibitor for 30 min, followed by 24h of incubation, the eryptosis induced by the intermediate and higher (0.09 and 0.17mM) IS concentration were inhibited (5.8±1.5%; 7.1±1.4% to intermediate and higher concentration, respectively, with DPI compared to 20±2.8% and 30±7.3 without DPI) (Figure 2 C and D).

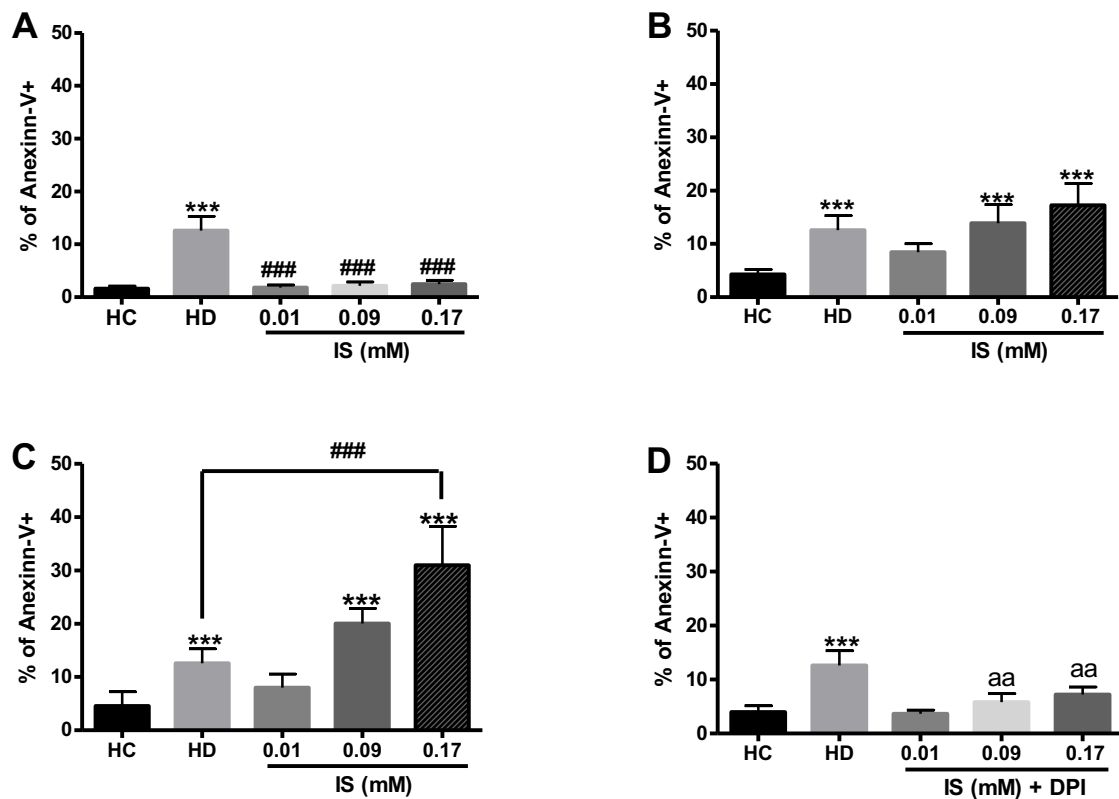


Figure 2 - Effect of IS in eryptosis of healthy RBC. Incubation of HC-RBC only with Tris-Glc buffer; with serum previously obtained from patients on hemodialysis (HD) or with the different concentrations of IS (0.01, 0.09 and 0.17mM) for (a) 6h n=4; (b) 12h n=8 or (c) 24h n=8. In addition, (d) HC were incubated with DPI (10mM) for 30 min before the addition of the different IS concentrations to complete 24h incubation, n=6. *** p<0.001 versus HC. ### p<0.001 versus HD. aa p<0.001 versus same concentration of IS without DPI.

2.3. Glutathione levels

Finally, to verify the relationship between oxidative stress, eryptosis and antioxidant status in HC-RBC stimulated by all IS concentration for 6, 12 or 24h of incubation, intracellular GSH was evaluated. Surprisingly, the GSH levels were identical in erythrocytes incubated with different concentrations of IS (0.01, 0.09 and 0.17mM) when compared to HC (102%; 103%; 103% compared to 100% from HC; positive control TBHP = 69%) (Fig 3 A, B and C, respectively). To better confirm that, we used HC-RBC incubated with serum obtained from healthy donors (S-HC) or serum obtained from hemodialysis patients (S-HD) for 24h of incubation, and the same result was observed, no GSH consumption was observed using HC-RBC (100%; 89,5%, respectively compared to 46.5% from TBHP) (Fig 3 D). However, when we analyzed glutathione levels in isolated erythrocytes from HD patients, a decrease of approximately 50% compared to HC-RBC was observed (49.95% compared to 100% from HC; TBHP = 32.05%) (Fig 3 E).

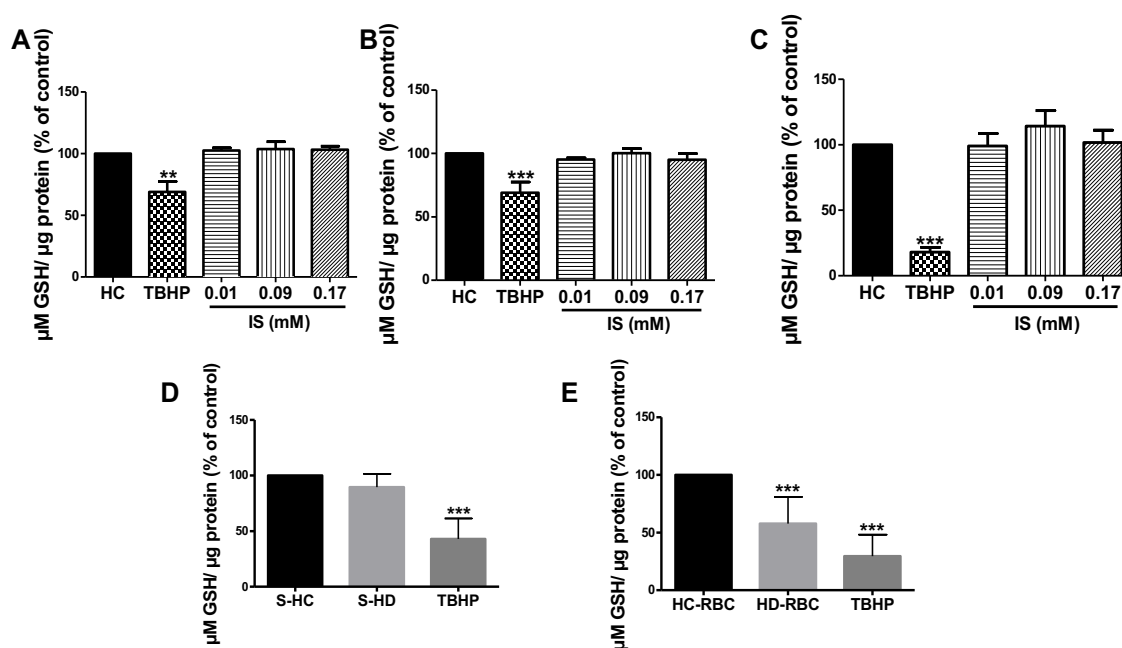


Figure 3 - Effect of indoxyl sulfate in glutathione content. HC-RBC were incubated with Tris-glc solution and different concentrations of IS for (a) 6h n=6; (b) 12h n=6 and (c) 24h n=4. Positive control (TBHP) cells were incubated for 30 minutes. (d) HC-RBC incubated with serum from healthy individuals (S-HC) or hemodialysis patients (S-HD) (1:1) for 24 hours (n=6). (E) RBC isolated from healthy individuals (HC-RBC) or hemodialysis patients (HD-RBC) n=4. Data are expressed as percentage compared to the control, which was considered ideal (100%). *** p<0.001

3. Discussion

Anemia is a common complication associated with CKD and appears even in patients receiving erythropoiesis-stimulating agents. Although this disease occurs mainly due to impaired renal erythropoietin release and subsequent decrease of erythropoiesis, the anemia in CKD can be affected by eryptosis. This suggestion is based on the fact that RBC begins to express PS and have a reduced life span [9]. This evidence was seen when erythrocytes from uremic patients incubated with annexin-V had almost twice the expression of PS on the cell surface compared to cells from healthy volunteers. To understand whether this increased expression results from a plasma component, healthy erythrocytes were incubated with plasma from renal patients and PS expression was higher in these cells [10,6]. Our study shows the ability of the uremic toxin IS *per se* in increasing eryptosis in healthy erythrocytes. This result corroborates with Gao and collaborators [11], who also found enhanced eryptosis caused by IS, but we have achieved our result at a lower concentration of the toxin. In addition, Ahmed and coworkers [12] showed, apart from the accelerated eryptosis, that increased cytosolic Ca^{2+} and ceramide formation are key factors of the eryptosis process triggered by IS. Not only IS, but other uremic toxins were described to participate in enhancing eryptosis, as acrolein and methylglyoxal [13,14]. As a result of the marked expression of PS inflammatory monocytes and also macrophages will phagocyte and eliminate these cells from circulation, which may contribute to renal anemia [6,15]. PS can interact with the endothelial cell receptor CXCL16 of the vascular wall, blocking microcirculation and thus contribute to thrombosis [16]. Interestingly, our results showed that the lowest incubation period of time (6h) didn't change PS exposure in all IS concentrations, this phenomenon only appears after 12 and 24h of incubation with the highest IS concentrations.

Even though they are devoid of mitochondria, erythrocytes produce ROS in large amounts. Hemoglobin (Hgb) comprises more than 95% of the cytoplasm of these cells and is able to undergo autoxidation, leading to $O_2^{\cdot-}$ production. ROS are capable of interacting with the red cell membrane directly and causing damage, as alterations in lipid and protein structure. Surely, excessive oxidative stress production has been related with a substantial extent

of diseases such as cardiovascular diseases, atherosclerosis, hypertension and renal diseases [17]. Clinical studies have shown that oxidative stress is an early event during the progression of CKD. This increased ROS generation can be attributed to complications, such as chronic infections, iron overload, blood-dialyzer membrane interaction and accumulation of uremic toxins. Moreover, measurements in blood of renal patients exhibit decreased levels of antioxidant enzymes, glutathione and ascorbic acid [18]. Also, ROS were significantly higher in erythrocytes exposed to plasma from CKD patients than in erythrocytes exposed to plasma from healthy volunteers [10]. Our results showed that IS by itself was able to increase ROS generation in erythrocytes in a time and dose-dependent manner. Studies show that uremic toxins play such biological effects on other cell types. Yu and collaborators [3] observed the induction of oxidative stress in endothelial cells after 10 minutes of IS stimulation. Furthermore, it has been found an association between IS and p-cresyl sulfate (pCS) with increased inflammation and suppressed antioxidant activity in patients with CKD, it suggests proinflammatory and pro-oxidative properties for both toxins [19]. Indeed, this non-dialyzable toxin may contribute to cellular damage and eryptosis. We also indicate the required involvement of NADPH oxidase in this process. IS activates this enzyme resulting in increased ROS production. Similar results were found when tubular renal cells treated with pCS showed enhanced ROS production, NADPH oxidase expression, damage and loss of cell viability due to increased oxidative stress [20]. However, increased ROS production was suppressed in the presence of the NADPH oxidase inhibitor. In our study, the presence of DPI did not only attenuate ROS but also eryptosis, emphasizing that oxidative stress is a key contributor to eryptosis. This factor may be part of a pathway that worsens anemic status in patients, once that ROS precedes suicidal erythrocyte death, as we showed in the present study.

Khazim and collaborators found that erythrocyte GSH/GSSG redox potential is lower in HD than in healthy controls [21]. Others studies revealed the diminished activity of antioxidant enzymes in the plasma of these patients, such as superoxide dismutase and GSH peroxidase [22]. Furthermore, there was a relationship between total antioxidant capacity and malondialdehyde levels, Hgb levels and haematocrit levels in HD patients [23]. Taken together,

these findings highlight the impaired antioxidant system in CKD and its consequences as contribution to the progression of the disease and other comorbidities such anemia. When we measured the GSH levels in cells incubated with IS, no difference was observed when compared to control cells. Against these results, we measured the levels of GSH in erythrocytes from HD patients and a drastic decrease was observed. This can be explained by Alhamdani's study [24], that also found a decrease in GSH levels and activities of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase, enzymes responsible for de novo synthesis of GSH. This decreased enzymatic activity is probably due to uremia and dialysis. Moreover, inhibitory metabolites of γ -glutamylcysteine synthetase, such as cysteine, are accumulated in CKD. These factors are not present in healthy erythrocytes incubated with the toxin, but only in systemic conditions. Further studies are needed to understand how the antioxidant system is established in CKD, the role of uremic toxins in this scenario and its effects on associated diseases, such anemia, as many of these results are controversial.

In conclusion, the uremic toxin indoxyl sulfate was able to increase ROS production and eryptosis in healthy erythrocytes, which involved NADPH oxidase. Furthermore, erythrocytes from HD patients showed a lower level of GSH and IS did not change GSH level on healthy RBC.

4. Materials and Methods

4.1. Blood samples and Red Blood Cells (RBC) preparations and incubations

Heparinized blood (5-10ml) was obtained from healthy volunteers (HC) or patients in hemodialysis (HD). The Ethical Committee from PUCPR approved the study and informed consent was obtained from all subjects (registration number 509). Blood sample was centrifuged at 3000 rpm for 15min at room temperature and the buffy coat was carefully discarded. After that, the HC-RBC were washed three times with cold PBS (1x) and then were incubated at a hematocrit of 0.5% for different periods of time (6, 12 or 24 hours), at 37°C with 5% CO₂ in the presence of different concentrations of Indoxyl Sulfate (IS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (IS - 0.01mM 0.09mM and 0.17mM, concentrations established by Duranton and coworkers[8]) diluted in TRIS-

glucose buffer (Tris-Glc) (mM - 21.0 Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 4.7 KCl; 2.0 CaCl₂, 140.5 NaCl; 1.2 MgSO₄ and 5.5 glucose – pH 7.4). Additionally, cells were preincubated with diphenyleneiodonium (DPI - 10µM), a NADPH oxidase inhibitor for 30 min before IS incubation for 24h. For GSH dosage, 150µl of pure RBC were used. Control cells were incubated for the same period of time only in pure Tris-Glc.

4.2. Measurement of ROS production

After incubations, RBC were centrifuged and resuspended in 2mM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Abcam), for 30min in the dark. After that, cells were washed once with PBS and resuspended in 200µl of PBS 0.4% formaldehyde (Fix-FACS). ROS fluorescence intensity was quantified by flow cytometry (FACS Calibur, BD, Bioscience USA). RBC from hemodialysis patients (HD-RBC) were stained at the same way immediately after obtainment.

4.3. Determination of eryptosis by annexin- V binding

RBC were stained with Annexin-V-PE (BD Bioscience, USA) for 15min under protection from light, according the manufacturer's instructions. In the following, they were washed once with PBS and resuspended in 200µl of Fix-FACS. Annexin-V fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD, Bioscience USA). RBC from hemodialysis patients (HD-RBC) were stained at the same way immediately after obtainment.

4.4. Determination of erythrocyte glutathione

RBC samples were incubated for 24h with all stimuli described above. 150 µl of a cell suspension (50% hematocrit) were deproteinized with 650 µl of a solution of 2M perchloric acid containing 4 mM DTPA and centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4°C. On ice and under protection from light, pH of the supernatant (100 µl) was adjusted to ~7 with 800 µl of 300mM phosphate buffer containing 10mM EDTA. After a short spin, the supernatant was incubated with the DTNB solution 1:1 v/v (0.25 mM DTNB in 300 mM phosphate buffer containing containing 0.1 mM DTPA pH 7.5). After 10 min, the absorbance at

412 nm was measured in a U-2900 Hitachi spectrophotometer. RBC were also incubated for 24h with serum from healthy individuals (S-HC) or with serum obtained from HD patients (1:1) (S-HD). Tert-Butyl hydroperoxide (TBHP) (5mM, 30 minutes of incubation in Tris-glc) was used as positive control for these experiments. Protein content was determined by Bradford method from the initial 50% hematocrit suspension.

4.5. Statistical Analysis

Data were expressed as means \pm SD or percentage compared to the control, which was considered ideal (100%). The significance of differences was determined by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's multiple comparisons test. GraphPad Prism 5 was utilized for statistical analysis. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgments: This research was supported by grants from CNPq. Gabriela Dias was the recipient of research fellowship from PIBIC/CNPq. Roberto Pecoits Filho and Lia Sumie Nakao were recipients of the CNPq scholarship.

Author Contributions: Gabriela Ferreira Dias, Natalia Borges Bonan, Thiago Maass Steiner and Silvia Rodrigues performed the experiments and participated in the preparation of the manuscript. Lia Sumie Nakao was responsible to analyze the GSH data and also prepared the manuscript. Viktoriya Kuntsevich, Peter Kotanko and Roberto Pecoits Filho prepared the manuscript to published, specifically in a critical review by commentary and revision. Andréa N Moreno-Amaral was responsible to supervising research, coordinating the research activities and prepared the manuscript to published.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease *Off. J. Int. Soc. Nephrol.* **2013**, *3*, 1–150.

- [2] Jourde-Chiche, N.; Dou, L.; Cerini, C.; Dignat-George, F.; Vanholder, R.; Brunet, P. Protein-bound toxins-update 2009. *Semin. Dial.* **2009**, *22*, 334–339.
- [3] Yu, M.; Kim, Y. J.; Kang, D.-H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *6*, 30–39.
- [4] Macdougall, I. C. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. *Kidney international. Supplement.* **2001**, *78*, 67–72.
- [5] Lang, F.; Qadri, S. M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* **2012**, *33*, 125–130.
- [6] Bonan, N. B.; Steiner, T. M.; Kuntsevich, V.; Virzi, G. M.; Azevedo, M.; Nakao, L. S.; Barreto, F. C.; Ronco, C.; Thijssen, S.; Kotanko, P.; Pecoits-Filho, R.; Moreno-Amaral, A. N. Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia. *Blood Purif.* **2016**, *41*, 317–323.
- [7] Lang, F.; Abed, M.; Lang, E.; Föller, M. Oxidative Stress and Suicidal Erythrocyte Death. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, 1–16.
- [8] Durantou, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argiles. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *23*, 1258–1270.
- [9] Georgatzakou, H. T.; Antonelou, M. H.; Papassideri, I. S. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease. **2016**, 1–13.
- [10] Abed, M.; Artunc, F.; Alzoubi, K.; Honisch, S.; Baumann, D.; Föller, M.; Lang, F. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J. Mol. Med.* **2014**, *92*, 871–879.
- [11] Gao, C.; Ji, S.; Dong, W.; Qi, Y.; Song, W.; Cui, D.; Shi, J. Indolic Uremic Solutes Enhance Procoagulant Activity of Red Blood Cells through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *Toxins.* **2015**, *7*, 4390–4403.
- [12] Ahmed, M. S. E.; Abed, M.; Voelkl, J.; Lang, F. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol.* **2013**, *14*, 1–7.
- [13] Ahmed, M. S. E.; Langer, H.; Abed, M.; Voelkl, J.; Lang, F. The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press. Res.* **2013**, *37*, 158–167.
- [14] Nicolay, J. P.; Schneider, J.; Niemoeller, O. M.; Artunc, F.; Portero-Otin, M.; Haik, G.; Thornalley, P. J.; Schleicher, E.; Wieder, T.; Lang, F. Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell. Physiol. Biochem.* **2006**, *18*, 223–232.

- [15] de Back, D. Z.; Kostova, E. B.; van Kraaij, M.; van den Berg, T. K.; van Bruggen, R. Of macrophages and red blood cells; A complex love story. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 1-11.
- [16] Borst, O.; Abed, M.; Alesutan, I.; Towhid, S. T.; Qadri, S. M.; Foller, M.; Gawaz, M.; Lang, F. Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2012**, *302*, 644–651.
- [17] Çimen, M. Y. B. *Clin. Chim. Acta.* Free radical metabolism in human erythrocytes. **2008**, *390*, 1–11.
- [18] Vaziri, N. D. *Semin. Nephrol.* Oxidative stress in uremia: Nature, mechanisms, and potential consequences. **2004**, *24*, 469–473.
- [19] Rossi, M.; Campbell, K. L.; Johnson, D. W.; Stanton, T.; Vesey, D. a; Coombes, J. S.; Weston, K. S.; Hawley, C. M.; Mcwhinney, B. C.; Ungerer, J. P. J.; Isbel, N. Protein-bound Uremic Toxins , Inflammation and Oxidative Stress : A Cross-sectional Study in Stage 3 e 4 Chronic Kidney Disease. *Arch. Med. Res.* **2014**, *45*, 309–317.
- [20] Watanabe, H.; Miyamoto, Y.; Honda, D.; Tanaka, H.; Wu, Q.; Endo, M.; Noguchi, T.; Kadowaki, D.; Ishima, Y.; Kotani, S.; Nakajima, M.; Kataoka, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Tanaka, M.; Fukagawa, M.; Otagiri, M.; Maruyama, T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* **2013**, *83*, 582–592.
- [21] Khazim, K. Glutathione Redox Potential is Low and Glutathionylated and Cysteinylated Hemoglobin Levels are Elevated in Maintenance Hemodialysis Patients. *Transl Res.* **2012**, *162*, 1-20.
- [22] Ceballos-picot, I.; Witko-sarsat, V.; Merad-boudia, M.; Nguyen, A. N. H. T. H. U.; Venin, M. T. H.; Jaudon, M. C.; Zingraff, J.; Verger, C.; Jungers, P.; Descamps-latscha, B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *21*, 845–853.
- [23] Çelic, G.; Yötem, M.; Bilge, M.; Cilo, M.; Ünaldi M. The Relationship between the Antioxidant System and Anaemia in Haemodialysis Patients. *J. Int. Med. Res.* **2011**, 1954–1960.
- [24] Alhamdani, M. S. S. Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uraemia and dialysis *Nephrol. Dial. Transplant.* **2005**, *20*, 124–128.

7. REFERÊNCIAS.

ALEBIOSU, C. O. An update on “progression promoters” in renal diseases. **Journal of the National Medical Association**, v. 95, n. 1, p. 30–42, 2003.

AVELES, P. R. et al. Association between Biomarkers of Carbonyl Stress with Increased Systemic Inflammatory Response in Different Stages of Chronic Kidney Disease and after Renal Transplantation. **Nephron Clin Pract.** v. 116, n. 4, p. 294–299, 2010.

BERG, C. P.; ENGELS, I. H.; ROTHBART, A; et al. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 8, p. 1197–1206, 2001.

BONOMINI, M.; SIROLI, V.; SETTEFRATI, N.; et al. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 10, n. 9, p. 1982–90, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477151>>. .

CANAUD B, CRISTOL J-P, MORENA M, LERAY-MORAGUES H, BOSC J-Y, VAUSSENAT F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. **Blood Purification.** v.17 p. 99–106, 1999.

CEBALLOS-PICOT, I.; WITKO-SARSAT, V.; MERAD-BOUDIA, M.; et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 6, p. 845–853, 1996.

DALLALIO, G.; MEANS, R. T. Effects of oxidative stress on human erythroid colony formation: modulation by γ -interferon. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 141, n. 6, p. 395–400, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022214303000416>>.

DEGUCHI, T.; KUSUHARA, H.; TAKADATE, A.; et al. Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. **Kidney International**, v. 65, n. 1, p. 162–174, 2004.

FÖLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB life**, v. 60, n. 10, p. 661–8, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720418>>. Acesso em: 17/7/2014.

HEBBEL, B. R. P.; LEUNG, A.; MOHANDAS, N. Oxidation-Induced Changes in Microrheologic Properties of the Red Blood Cell Membrane. **Blood**, v. 76, n. 5, p. 1015–1020, 1990

JOINER, C. H.; RETTIG, R. K.; JIANG, M.; FRANCO, R. S. KCl cotransport mediates abnormal sulfhydryl-dependent volume regulation in sickle reticulocytes. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2954–2961, 2016.

KAO, M. P. C.; ANG, D. S. C.; PALL, A.; STRUTHERS, A. D. Oxidative stress in renal dysfunction : mechanisms , clinical sequelae and therapeutic options.

Journal of Human Hypertension, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2010.

KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Official Journal of the International Society of Nephrology**, v. 3, n. 1, p. 1–150, 2013. Disponível em: <http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_CKD-MBD_GL_KI_Suppl_113.pdf> <<http://www.nature.com/doi/10.1038/kisup.2012.73>> <<http://www.nature.com/doi/10.1038/kisup.2012.76>>. .

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

LAHERA, V.; GOICOECHEA, M.; GARCI, S.; et al. Oxidative Stress in Uremia : The Role of Anemia Correction Oxidative Stress : Definition and. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 174–177, 2006.

LANG, F.; ABED, M.; LANG, E.; FÖLLER, M. Oxidative Stress and Suicidal Erythrocyte Death. **Antioxidants & redox signaling**, p. 1–16, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359125>>.

LANG, F.; GULBINS, E.; LANG, P.; ZAPPULLA, D.; FOLLER, M. Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 21–28, 2010.

LANG, F.; QADRI, S. M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. **Blood Purification**, v. 33, p. 125–130, 2012.

LANG, P. A; KEMPE, D. S.; TANNEUR, V.; et al. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 6, p. 1233–43, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741229>>.

LANG, U. E.; PULS, I.; MÜLLER, D. J.; STRUTZ-, N.; GALLINAT, J. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. **Cell Physiol Biochem**, , n. 15, p. 195–202, 2005.

LEDEBO I. Principles and practice of hemofiltration and hemodiafiltration. **Artif Organs** v. 22, n. 1, p. 20–25, 1998.

LESAFFER, G.; SMET, R. DE; LAMEIRE, N.; et al. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 15, p. 50–57, 2000.

LIPSIC, E.; MEER, P.; VAN DER.; VELDHUISEN, D. Erythropoiesis-Stimulating Agents and Heart Failure. **Cardiovascular therapeutics.**, v. 29 p.52-59, 2011.

MACDOUGALL, I. C. Anaemia of chronic kidney disease. **Medicine**, v. 35, n. 8, p. 457–460, 2007.

MACDOUGALL, I. C. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. **Kidney international. Supplement**, 2001.

MEIJERS, B. K. I.; BAMMENS, B.; VERBEKE, K.; EVENEPOEL, P. A Review of Albumin Binding in CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, n. 5, p. 839–850, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638608000693>>. .

PALANEESWA A. M. S., SIVAKUMAR N., ARCOT J. M. D. Chronic Kidney Disease—Effect of Oxidative Stress. **Chinese Journal of Biology**, p. 01-06, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/216210>

RUTKOWSKI P, MALGORZEWICZ S, SLOMINSKA E, RENKE M, LYSIAK-SZYDLOWSKA W, SWIERCZYNSKI J, RUTKOWSKI B. Interrelationship between uremic toxicity and oxidative stress. **J Ren Nutr**, v. 3, n. 16, p. 190-193, 2006.

SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; et al. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 22, n. 2, p. 592–6, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040995>>. Acesso em: 30/1/2014.

TAKAHASHI, N.; MORIMOTO, S.; OKIGAKI, M.; SEO, M.; SOMEYA, K. Decreased plasma level of vitamin C in chronic kidney disease : comparison between diabetic and Disease and after Renal Transplantation. **Nephron Clin Pract**. V. 116, n. 4, p. 294–299, 2010.

TUCKER, S. et al. Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. **Biomarkers**. V. 18, n. 2, p. 103-115, 2013. Disponível em:

VANHOLDER, R.; DE SMET, R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 8, p. 1815-23, 1999.

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

WILLIAMS, J. D.; TOPLEY, N.; CRAIG, K. J.; et al. The Euro-Balance Trial: the effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. **Kidney international**, v. 66, n. 1, p. 408–418, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200450>>.

YILMAZ, M. I.; SOLAK, Y.; COVIC, A.; GOLDSMITH, D.; KANBAY, M. Renal anemia of inflammation: The name is self-explanatory. **Blood Purification**, v. 32, p. 220–225, 2011.

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

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3022246&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROPOSTA PARA PROJETO DE DOUTORADO

GABRIELA FERREIRA DIAS

**INVESTIGAÇÃO DA DISFUNÇÃO EM ERITRÓCITOS URÊMICOS ATRAVÉS
DA ATIVIDADE OXIDATIVA E O PROCESSO DE ERIPTOSE EM RESPOSTA À
HIPÓXIA**

Orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral

CURITIBA
2017

1 INTRODUÇÃO

No contexto da anemia renal, a hipóxia é um fator que pode acelerar o declínio da atividade de eritrócitos. A hipóxia é definida como um estímulo clássico da eritropoiese; a secreção de Epo é inversamente regulada pela concentração sanguínea de hemoglobina (Hgb) (BEVERBORG et al., 2015), enquanto a hipóxia estimula a produção de Epo, que por sua vez estimula a eritropoiese na medula óssea (KOURY & HAASE, 2015). A hipóxia pode ser descrita como uma condição em que uma região do corpo ou o corpo como um todo é privado do suprimento necessário de oxigênio. Porém, experimentos *in vitro* mostram claramente que a hipóxia foi mais significativa como um fator promotor da liberação de ferro e formação de metahemoglobina (MetHb) em eritrócitos do que a reoxigenação (CICCOLI et al., 2004). Em condições de hipóxia, o radical superóxido é formado e a autooxidação da Hgb ocorre, o que também implica na amplificação da MetHb e produção de ROS (BALAGOPALAKRISHNA et al., 1996). Quando essa produção de ROS excede a capacidade antioxidante dos eritrócitos, caracteriza-se a etapa bioquímica do estresse oxidativo induzido pela hipóxia. A hipóxia também induz a hiperatividade glicolítica e acumulação de 2, 3-DPG (ARNAUD & GUTIERREZ, 1984).

A interação entre hipóxia e produção de ROS é observada quando há acúmulo de Hgb oxidada, que induz a oxidação fosfolipídica e rompimento de membrana. Durante essa condição de desbalanço oxidativo, os eritrócitos são cometidos à senescência e à morte celular (KIEFER & SNYDER, 2000). Como resultado disso, o estresse oxidativo causado pelo ROS é considerado um dos principais desencadeadores da eriptose nos eritrócitos sob condição de hipóxia (BARVITENKO, et al., 2005). Uma vez que isso ocorre em células desprovidas de mitocôndria e núcleo, a eriptose representa um sistema único de morte celular através da regulação da membrana celular. Na fisiologia normal, uma resposta adequada à hipóxia promove a ativação dos fatores indutores de hipóxia (HIF) que por sua vez irão promover a adaptação e sobrevivência da célula contra a redução da pressão parcial do oxigênio (pO₂) (SEMENZA et al., 1992; NANGAKU & ECKARDT, 2007). Em pacientes com doença renal crônica, a hipóxia renal permite a liberação da Epo, mas a resposta da medula

óssea à Epo é reduzida devido às citocinas pró-inflamatórias e ao estresse oxidativo (MEANS & KRANTZ, 1992; BAMGBOLA et al., 2009; BAMGBOLA, 2011) que é aumentado nesses pacientes. O estresse oxidativo prejudica a fluidez da membrana dos eritrócitos, reduzindo seu tempo de vida, além de bloquear o metabolismo do ferro e a resposta da Epo devido à inflamação.

Além disso, a exposição de FS nos eritrócitos pode promover sua adesão nas células endoteliais vasculares através da interação da FS com CXCL16 endotelial. Esta proteína endotelial é uma quimiocina, que quando ligada a membrana atua como um receptor de limpeza, que reconhece a FS e lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (GOUGH et al., 2004; SHIMAOKA et al., 2007). A eriptose desencadeada por Ca^{2+} ionóforo ionomicina ou pela depleção de glicose promove a adesão de eritrócitos eriptóticos nas células endoteliais através CXCL16 (BORST et al., 2012). Sendo assim, a eriptose excessiva no estágio avançado da doença renal crônica pode desencadear trombose e interromper a microcirculação.

2 JUSTIFICATIVA

Esse cenário destaca a importância da tríade: estresse oxidativo, inflamação e eriptose na progressão da doença renal, e o estabelecimento da anemia renal pode ser um excelente ponto de partida para decifrar a correlação destes fatores em um ambiente em hipóxia bem como compreender os mecanismos que podem promover a anemia nesses pacientes em que a hipóxia atua como um fator somatório. Ainda, este pode ser um momento para melhor compreensão das consequências da hipóxia nos eritrócitos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Explorar a influência da hipóxia e/ou uremia na resistência dos eritrócitos ao estresse oxidativo, eriptose aumentada, bem como a adesão dessas células no endotélio.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eriptose de eritrócitos de indivíduos saudáveis submetidos à hipóxia e/ou ambiente urêmico através de indicadores como exposição de fosfatidilserina, produção de ROS, liberação de ATP e Ca^{2+} intracelular;
- Verificar a organização do citoesqueleto em eritrócitos submetidos à hipóxia e uremia através da rodamina-faloidina para F-actina; anti-espectrina (microscopia de fluorescência) e expressão de Rac1 e Rac2 (Western-blot);
- Avaliar sistemas de defesa antioxidante nos eritrócitos hipoxêmicos (GSH e GSSG, sistema hipoxantina e xantina oxidase, determinação de NADP e NADPH, avaliação da superóxido dismutase, análise de peroxirredoxina 2 por e medida de Heme oxigenase);
- Explorar a uremia e hipóxia como agentes de adesão dos eritrócitos em células endoteliais vasculares.

4 REFERÊNCIAS

ARNAUD & GUTIERREZ. Human red cell glycolysis in high altitude chronic hypoxia. **Am J Phys Anthropol**, v. 63, n. 3, p. 307-314, 1984.

BALAGOPALAKRISHNA, C. et al. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. **Biochemistry**, v. 35, n. 20, p. 6393-8, 1996.

BAMGBOLA, O. F. Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 80, n. 5, p. 464–474, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.179>>.

BAMGBOLA, O. F.; KASKEL, F. J.; COCO, M. Analyses of age, gender and other risk factors of erythropoietin resistance in pediatric and adult dialysis cohorts. **Pediatric nephrology**, v. 24, p. 571–579, 2009.

BARVITENKO, N. N.; ADRAGNA, N. C.; WEBER, R. E. Erythrocyte Signal Transduction Pathways, their Oxygenation Dependence and Functional Significance. **Cell Physiol Biochem**, v. 15, p. 1–18, 2005.

BEVERBORG, N. G.; VERWEIJ, N.; KLIP, I. T.; WAL, H. H. VAN DER. Erythropoietin in the General Population : Reference Ranges and Clinical , Biochemical and Genetic Correlates. **Plos One**, p. 1–14, 2015.

BORST, O.; ABED, M.; ALESUTAN, I.; et al. Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. **Am J Physiol Cell Physiology**, v. 302, p. 644–651, 2012.

CICCOLI, L.; ROSSI, V.; LEONCINI, S.; et al. Iron release , superoxide production and binding of autologous IgG to band 3 dimers in newborn and adult erythrocytes exposed to hypoxia and hypoxia-reoxygenation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1672, p. 203–213, 2004.

GOUGH, P. J.; GARTON, K. J.; WILLE, P. T.; et al. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 3678–3685, 2004.

KIEFER & SNYDER. Oxidation and erythrocyte senescence. **Curr Opin Hematol**. V.7, n.2, p. 113-6, 2000.

KOURY & HAASE. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, p. 394–410, 2015.

MEANS, R. T.; KRANTZ, S. B. Progress in Understanding the Pathogenesis of the Anemia of Chronic Disease. **Blood**, v. 80, n. 7, p. 1639–1648, 2016.

NANGAKU, M.; ECKARDT, K. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. **J Mol Med**, v. 85, p. 1325–1330, 2007.

SEMENZA, G. L.; WANG, G. L. A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 12, p. 5447–5454, 1992.

SHIMAOKA, T.; SEINO, K.; KUME, N.; et al. Critical Role for CXC Chemokine Ligand 16 (SR-PSOX) in Th1 Response Mediated by NKT Cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 8172–8179, 2007.