

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



REGULAÇÃO DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO Nrf_2 PELO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO EM CÉLULAS HELA

GONÇALO NEFF VALADARES GOMES COVAS

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



REGULAÇÃO DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO Nrf2 PELO PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO EM CÉLULAS HELA

GONÇALO NEFF VALADARES GOMES COVAS

Tese Orientada Por: Prof. Doutor Fernando Antunes e Prof^a. Doutora Luísa Cyrne

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

2011

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista Figuras	x
Lista de Quadros.....	xiii
I Introdução	1
I.I Espécies Reactivas de Oxigénio, Stress Oxidativo e antioxidantes	1
I.I.i Resposta ao Stress Oxidativo	1
I.I.i.i Mecanismos Antioxidantes.....	2
I.I.i.ii Adaptação ao Stress oxidativo	3
I.I.ii Peróxido de Hidrogénio (H ₂ O ₂).....	4
I.I.ii.i Metabolismo	4
I.I.ii.ii H ₂ O ₂ como sinalizador/regulador – importância biológica	4
I.II Sistema Nrf2-Keap1	6
I.II.i Regulação e Expressão Génica	8
I.II.ii Activação.....	10
I.II.iii Inactivação	14
I.II.iv Interacção com outros factores de transcrição	15
I.III Metodologias de exposição a stress oxidativo induzido por H₂O₂.....	16
I.IV Objectivos	19
II Materiais e Métodos	20
II.I Cultura Celular	20
II.I.i HeLa como modelo Celular	20
II.II Exposição a H₂O₂.....	21
1. Método Estado Estacionário	21
II.II.i Preparação da solução e curva de calibração de H ₂ O ₂	21
II.II.ii Método da adição bolus	22
II.III Extracção Proteica Diferencial Citosol/Núcleo.....	22
II.IV Extracção Proteica Total.....	22

II.V	Análise Proteica por SDS-PAGE e Western Blotting	23
II.V.i	Determinação da concentração proteica	23
II.V.ii	Electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	23
II.V.ii.i	Preparação Geis Poliacrilamida	24
II.V.iii	Transferência	24
II.V.iv	<i>Western blotting</i>	25
II.V.iv.i	Análise dos filmes obtidos por <i>Western Blotting</i>	26
II.VI	Ensaio de Imunofluorescência	26
II.VI.i	Preparação da montagem	26
II.VI.ii	Processamento das amostras	27
II.VI.ii.i	Captura de imagens	27
II.VI.ii.ii	Análise das imagens	27
II.VII	Extracção RNA total	30
II.VIII	Electroforese em gel de agarose	31
II.IX	Análise Estatística	31
III	Resultados e Discussão	32
III.I	Definição das condições experimentais.....	32
III.II	Activação do Factor Transcrição NrF2 pelo H₂O₂ em células HeLa	34
III.II.i	Titulação da concentração de H ₂ O ₂ que promove a activação do sistema NrF2/Keap1 em células HeLa – Exposição por adição bolus	35
III.II.i.i	Complexo nuclear NrF2-Actina e Colocalização entre a proteína NrF2 e a proteína actina	44
III.II.ii	Cinética da activação do sistema NrF2/Keap1 por exposição em estado estacionário a 12,5µM H ₂ O ₂ final – incubação até 6 horas	47
III.III	Alterações da expressão génica induzidas pelo processo de adaptação ao stress oxidativo	53
IV	Considerações Finais e Perspectivas	55
V	Anexos.....	60
V.I	Composição dos Tampões	60
V.II	Composição Soluções	61
V.III	Reagentes	61
V.IV	Script em Python para análise do perfil de imunofluorescência	61
VI	Referências.....	69

AGRADECIMENTOS

O término deste projecto não significa o fechar de um capítulo mas, pelo contrário, simboliza o meu primeiro passo na carreira de investigação científica. Posto isto, não posso deixar de agradecer aos meus orientadores Professora Doutora Luísa Cyrne e Professor Doutor Fernando Antunes, por me acolherem nesta primeira fase.

Agradeço especialmente ao Professor Fernando Antunes pelo bom espírito demonstrado durante este ano e por me ter contagiado com o seu gosto pela ciência, mesmo em momentos de dificuldade e à Professora Luísa Cyrne por me ter motivado a dar o máximo de mim, enquanto não deixava de transparecer os seus sentimentos de preocupação e vontade de ajudar. Obrigado ainda por apresentarem sempre disponibilidade para discussões, dúvidas e afins, mesmo que tal implicasse multiplicarem-se e, terem contribuído para o meu crescimento quer pessoal quer como jovem cientista.

Às Professoras Doutoradas Carla Real Afonso, Helena Soares e Susana Marinho por, embora não serem minhas orientadoras, terem desde sempre demonstrado interesse, sugerido, criticado e, assim, contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Grupo da Bioquímica de Oxidantes e Antioxidantes pelo bom ambiente de trabalho e boa disposição que facilitavam o retorno ao laboratório após um dia de trabalho. Em especial à Daniela Grácio por desde muito cedo partilharmos de um espírito de interajuda e compreensão.

Aos meus amigos por fazerem com que a minha vida não fosse somente repartida entre o laboratório e a minha casa, em especial, à Ana Cristina Silva (Kika) por me ter suportado nos momentos mais difíceis deste projecto.

À minha família agradeço especialmente por compreenderem a necessidade de dedicação quase exclusiva a este projecto.

Agradeço ainda à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto em que o meu trabalho se inseriu: *PTDC/QUI/69466/2006* “Resistência adquirida ao cancro: modulação negativa da permeabilidade da membrana plasmática pelo H_2O_2 induz a resistência de multi-fármacos” e ainda ao Centro de Química e Bioquímica (CQB) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) local onde este trabalho foi desenvolvido.

RESUMO

O modelo de activação do sistema NrF2/Keap1 ainda não se encontra bem elucidado, havendo inconsistência no que toca ao mecanismo de activação da proteína NrF2. A hipótese estabelecida na literatura é que uma activação do sistema passa pelo dissociar do complexo NrF2-Keap1 em resposta a estímulos indutores do sistema. Porém encontram-se igualmente registadas observações que suportam que uma activação do sistema NrF2/Keap1 passa pela acumulação da proteína NrF2 por síntese *de novo* e uma ineficiente degradação proteossomal da mesma por saturação da proteína Keap1.

Ainda é de salientar que a maioria dos estudos de activação do NrF2 são realizados pela exposição a fármacos e/ou concentrações de H₂O₂ elevadas ($\sim 10^{-3}$ M), condições que não mimetizam a sinalização via H₂O₂ observada *in vivo* (10^{-7} a 10^{-9} M) e por recurso à sobreexpressão da proteína NrF2. Neste trabalho praticaram-se condições próximas das fisiológicas e não se recorreu à sobreexpressão das proteínas NrF2 e/ou Keap1, o que aproxima o presente trabalho das condições fisiológicas.

Concluiu-se que o sistema NrF2/Keap1 comporta-se de maneira distinta consoante o método de exposição ao H₂O₂ empregue. Por adição bolus (50 e 100 μ M) observou-se somente um aumento dos níveis nucleares da proteína NrF2, enquanto em exposição por estado estacionário (12,5 μ M) observou-se um aumento dos níveis citosólicos da proteína NrF2 anterior ao aumento do nível nuclear da mesma. Ainda se observou por imunofluorescência, que a proteína NrF2 em condições basais apresenta baixos níveis citosólicos.

Também se observou que uma exposição prolongada (4 horas) a 12,5 μ M H₂O₂ em estado estacionário conduziu a uma terminação da activação do sistema NrF2/Keap1. Finalmente, sugere-se que o mesmo sistema participe no processo de adaptação ao *stress* oxidativo em células HeLa.

Palavras-chave: **H₂O₂, adaptação, estado estacionário.**

ABSTRACT

The molecular mechanism of Nrf2/Keap1 system activation is still not well understood, due to disagreement regarding the mechanism of Nrf2 protein activation. The hypothesis established in literature is that activation of the system involves dissociation of the Nrf2-Keap1 complex in response to stimuli. But there are also observations that support activation of Nrf2/Keap1 system by accumulation of Nrf2 protein by *de novo* synthesis and inefficient proteasomal degradation, due to saturation of the Keap1 protein.

It is noteworthy that most studies of Nrf2 activation are carried out by exposure to high concentrations of drugs and/or H₂O₂ ($\sim 10^{-3}$ M), conditions that do not mimic the H₂O₂ signaling pathway observed *in vivo* (10^{-7} to 10^{-9} M) and by means of overexpression of Nrf2 protein. This work, accomplished under near-physiological conditions and not resorting to overexpression of Nrf2/Keap1 proteins, simulates physiological conditions better.

We established that the Nrf2/Keap1 system behaves differently depending on the method by which cells are exposed to H₂O₂. For 50 to 100 μ M H₂O₂ bolus additions, an increase in nuclear levels of Nrf2 protein was observed, while under a 12.5 μ M H₂O₂ steady-state exposure an increase in cytosolic Nrf2 levels prior to the increase of the nuclear Nrf2 levels was observed. It was also observed by immunofluorescence that, under basal conditions, Nrf2 is mainly presented in the nucleus.

It was also perceived that prolonged exposure (4 hours) to 12.5 μ M H₂O₂ by steady-state led to termination of the activation of the Nrf2/Keap1. This work also proposes that Nrf2/Keap1 system partakes in adaptation process to oxidative stress in HeLa cells.

Keywords: H₂O₂, adaptation, steady-state, regulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs “X”= nm	Absorvência a “X” nanometros
ARE	Do inglês <i>antioxidant response element</i>
Bisacrilamida	N,N'-metileno-bisacrilamida
BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
bZIP	Do inglês <i>Basic Leucine Zipper Domain</i>
CBP	Do inglês <i>CREB binding protein</i>
CREB	Do inglês <i>cAMP response element-binding</i>
Cys X	Cisteína na posição X da cadeia polipeptídica
DAPI -	4,6-diamidino-2-fenilindole
DLG	Sequência polipeptídica contendo os aminoácidos ácido aspártico, leucina e glicina
DMSO	Dimetilsulfóxido, do inglês <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNase I	Desoxirribonuclease I
DTT	Ditiotreitol
ECL	Do inglês <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EpRE	Do inglês <i>electrophile response element</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ETGE	Sequência polipeptídica contendo os aminoácidos glutamato, treonina, glicina e glutamato
Fyn	Do inglês para <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn</i>
g	Aceleração gravítica
G.O.	Glucose oxidase
GFP	Proteína verde fluorescente, do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>
GPx	Glutationo peroxidase
GSH	Forma reduzida do Glutationo, do inglês <i>Glutathione</i>
GSK3	Do inglês <i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GSSG	Forma oxidada do glutatono

GST	Glutathione S-transferase
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HO [•]	Radical hidroxilo
HO-1	Hemeoxigenase I, do inglês <i>Heme oxygenase</i> ou <i>Haem oxygenase</i>
IRES	Do inglês <i>Internal ribosome entry site</i>
<i>Keap1</i>	Do inglês <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
mRNA	RNA mensageiro do inglês <i>messenger RNA</i>
NAD ⁺	Dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma oxidada), do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	Dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma reduzida), do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	Fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma reduzida), do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NES	Sequência de exportação nuclear, do inglês <i>Nuclear Export Sequence</i>
NF-κB	Do inglês <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	Sequência de localização nuclear, do inglês <i>Nuclear Localization Sequence</i>
NOX	NADPH oxidase
NP-40	Monidet P-40
<i>NrF2</i>	Do inglês <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NrF3	Do inglês <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 3</i>
O ₂	Dioxigênio singlete
O ₂ ^{•-}	Radical anião superóxido
p63	Do inglês <i>Tumor protein p63</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino, do Inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PKA	Do inglês <i>cAMP-dependent protein kinase</i>
PKC	Do inglês <i>Protein kinase C</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Prx	Peroxiredoxina
PSA	Persulfato de amônio
RGB	Vermelho, verde, azul, do inglês <i>Red, Green, Blue</i>
RNA	Ácido ribonucleico do inglês <i>ribonucleic acid</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>

RNase	Ribonuclease
RO [•]	Radical alcóxido
ROO [•]	Radical peróxido
ROOH	Hidroperóxidos orgânicos
s.s.	Estado estacionário
SDS	Sulfato de Dodecilo de Sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, do inglês <i>SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
SOD	Superóxido Dismutase
t-BHQ	t-butilhidroquinona, do inglês <i>t-butylhydroquinone</i>
TEMED	N, N, N, N-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
Trx	Tiorredoxina
UV	Radiação ultravioleta
ε "x" nm	Coeficiente de extinção molar para "x" nanômetros

LISTA FIGURAS

Figura I-1 – Representação esquemática das principais vias metabólicas das ERO	2
Figura I-2 – Processos fisiológicos regulados pelo H ₂ O ₂	5
Figura I-3 - Representação esquemática da estrutura da proteína Nrf2 e localização das regiões <i>Neh</i> . A proteína ainda contém sequências NLS e NES.	7
Figura I-4- Representação esquemática da estrutura da proteína Keap1	8
Figura I-5- Sequência de ácidos nucleicos que constituem o elemento de regulação em <i>cis Antioxidant response element/Electrophile response element</i> na região promotora de um gene	9
Figura I-6 - Representação esquemática do sistema Nrf2/Keap1 e mecanismos de activação propostos.	11
Figura I-7 – Representação esquemática da localização das cisteínas presentes na proteína Keap1.	12
Figura II-1- Esquema da montagem do sistema de <i>semi-dry electroblotting</i>	25
Figura II-2 - Exemplo da recta traçada transversalmente à célula utilizada para definir o perfil de fluorescência da mesma.....	28
Figura II-3 - Exemplo de perfil de intensidade de fluorescência para os canais vermelho, verde e azul obtido a partir da célula exposta na Figura II-3.....	28
Figura II-4 - Representação gráfica da distância ao núcleo que contém 50 % da fluorescência observada no citosol.	29
Figura II-5- Imagem representativa de: captura do canal a)verde e b) vermelho para um campo representativo da preparação total e c) mapa de colocação com escala.....	30
Figura III-1- Comparação dos <i>western blots</i> obtidos com os anticorpos anti-Nrf2 da <i>R&D systems</i> (R&D) e <i>Santa Cruz Biotechnology</i> (Sc) em extractos citosólicos de células HeLa.	32
Figura III-2 Resultados obtidos por <i>western blot</i> de extractos proteicos citosólicos de células HeLa com anticorpo anti-Nrf2 da <i>R&D Systems</i>	33

Figura III-3- Resultados obtidos por incubação simultânea de uma mesma membrana com a) anti-actina e b) anticorpo anti-Nrf2 em extractos nucleares controlo (sem tratamento).....	33
Figura III-4 – Exemplo de resultados obtidos por <i>western blot</i> para as exposições por adição bolus.....	35
Figura III-5 – Representação gráfica dos níveis a) citosólicos e b) nucleares da proteína NrF2 e c) citosólicos da proteína hemeoxigenase I determinados por <i>western blot</i> a doses bolus de (♦) 50, (■) 100, (▲) 200 e (×) 400 μ M.	36
Figura III-6 – Representação gráfica dos níveis (♦) citosólicos e (■) nucleares da proteína NrF2 e (▲) citosólicos da proteína hemeoxigenase I após exposição por 15 minutos a: 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 μ M H_2O_2 finais por adição bolus determinados por <i>western blot</i>	38
Figura III-7 - Imagens representativas das capturadas por imunofluorescência indirecta para análise dos fenótipos resultantes das exposições por adição bolus de 50 μ M de H_2O_2 por 10 e 30 minutos e 100 μ M de H_2O_2 por 10, 20 e 30 minutos..	40
Figura III-8- Representação gráfica dos parâmetros determinados para análise das imagens capturadas a partir da imunofluorescência indirecta da proteína NrF2.....	42
Figura III-9 Representação gráfica do parâmetro determinado para análise das imagens capturadas a partir da imunofluorescência indirecta da proteína NrF2 c) Distância ao núcleo que contém 50% da fluorescência total observada no citosol para uma exposição a (♦) 50 μ M e (■) 100 μ M de H_2O_2 por adição bolus.....	43
Figura III-10 Imagens representativas das capturadas para a análise da colocalização da proteína NrF2 (verde) com a proteína actina (vermelho) após exposição por 10 e 30 minutos a 50 μ M e de 10, 20 e 30 minutos a 100 μ M de H_2O_2	45
Figura III-11 – O <i>split</i> das imagens obtidas por imunofluorescência indirecta para os canais verdes e vermelho por recurso ao <i>software ImageJ</i> demonstram a contaminação do canal verde com imunofluorescência vermelha.....	46
Figura III-12 A comparação visual e o mapa de colocalização obtido para as imagens respeitantes ao <i>split vermelho</i> dos canais verde e vermelho capturados por imunofluorescência (Figura III-11) demonstram a contaminação do canal verde com	

imunofluorescência vermelha e, que esta resulta num resultado falso positivo para o teste de colocalização.....	47
Figura III-13- Exemplo de resultados obtidos por <i>western blot</i> para as exposições em estado estacionário a 12,5 μM de H_2O_2	48
Figura III-14 Representação gráfica dos níveis (♦) citosólicos e (■) nucleares da proteína Nrf2 e (▲) citosólicos da proteína hemeoxigenase I após exposição a um estado estacionário de 12,5 μM H_2O_2 , determinados por <i>western blot</i>	48
Figura III-15 – Representação gráfica dos níveis (♦) Citosólicos e (■) Nucleares da proteína Nrf2 e (▲) citosólicos da proteína heme oxigenase I após exposição por 15 minutos a 12,5, 25, 50 μM H_2O_2 finais por em estado estacionário determinados por <i>western blot</i>	50
Figura III-16 – Representação gráfica dos níveis totais da proteína (■) Nrf2 após 5, 15 e 30 minutos e 1 e 2 horas de exposição a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário de terminados por <i>Western Blot</i>	52
Figura III-17 – Caracterização da qualidade das amostra de <i>RNA</i> total obtidas.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro I-1 - Potencial de redução, tempo de semi-vida e concentração aproximada <i>in vivo</i> das principais ERO. Adaptado de Giorgio et al. 2007	4
Quadro II-1- Valores exercidos para semear as caixas de cultura (<i>Orange Scientific</i>) utilizadas nos trabalhos experimentais	20
Quadro II-2- Condições de voltagem e amperagem praticadas nos protocolos de SDS-PAGE..	24
Quadro II-3 – Reagentes e respectivos volumes utilizados para a preparação de 20 mL de gel de resolução e 10 mL de gel de concentração.	24
Quadro II-4 Anticorpos Primários e Secundários com respectivas diluições utilizadas para a detecção das proteínas de interesse por <i>Western Blotting</i>	25
Quadro II-5 – Anticorpos primários e secundários utilizados e respectivas diluições utilizadas no protocolo de imunofluorescência indirecta.	27
Quadro III-1 – Valores da variação média observada para os parâmetros a) razão entre a média da intensidade da fluorescência emitida pelo núcleo e a média da intensidade de fluorescência emitida pelo citosol e b) percentagem da fluorescência total obtida que é emitida a partir do núcleo normalizados em relação à condição controlo respectiva.....	42
Quadro III-2 – Determinação espectrofotométrica da concentração e grau de integridade das amostras de RNA total obtidas..	53

I INTRODUÇÃO

I.1 Espécies Reactivas de Oxigénio, Stress Oxidativo e antioxidantes

O dioxigénio (O_2) é um factor essencial à vida aeróbia, por ser o principal aceitador de electrões na fosforilação oxidativa, a via predominante de produção de ATP em aerobiose. Contudo apresenta toxicidade ao ser metabolizado em produtos com elevado potencial oxidante – Espécies Reactivas de Oxigénio (ERO).

As ERO são moléculas ou radicais derivados do oxigénio com potencial oxidante e reactividade que lhes confere potencial nocivo. Podem surgir como produtos/subprodutos do metabolismo celular ou por exposição a diversos factores externos como a radiação ionizante, metais pesados, hiperóxia, entre outros (Ma 2010). Encontram-se entre as espécies reactivas de oxigénio mais frequentes: o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidróxilo (HO^{\cdot}), o dioxigénio singlete (1O_2), os radicais peróxilo (ROO^{\cdot}), os radicais alcóxilo (RO^{\cdot}), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e ainda vários hidroperóxidos ($ROOH$) dos quais se salienta o hidroperóxido de hidrogénio (H_2O_2) (Ma 2010).

Devido à toxicidade das ERO, a concentração de O_2 encontra-se sujeita a regulação e os organismos desenvolveram mecanismos celulares (antioxidantes) que permitem compensar a formação de ERO e conter os danos provocados pela sua acumulação (Sies 1997; Apel & Hirt 2004). Posto isto, é possível afirmar que a célula apresenta um potencial redox resultante do balanço entre oxidantes e antioxidantes.

Quando ocorre um distúrbio no balanço entre oxidantes e antioxidantes que favoreça um aumento dos níveis de oxidantes, com potencial nocivo, a célula encontra-se sob *stress* oxidativo (Sies 1997). Este estado redox conduz a danos oxidativos nas macromoléculas como, por exemplo, oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos, quebra da cadeia e oxidação das bases do DNA, peroxidação lipídica, entre outros, que podem comprometer a viabilidade celular (Imlay 2008).

I.1.i Resposta ao Stress Oxidativo

Como referido, todas as células quando expostas a *stress* oxidativo iniciam mecanismos celulares (antioxidantes) que permitem compensar a formação de ERO e conter os danos provocados pela sua acumulação.

I.1.1.i Mecanismos Antioxidantes

Os mecanismos de protecção contra o *stress* oxidativo podem ser de natureza não enzimática, a primeira linha de defesa contra *stress* oxidativo ou de natureza enzimática.

Substâncias antioxidantes como, por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E, as poliaminas e o tripéptido glutationato (GSH) constituem a defesa antioxidante não enzimática (Apel & Hirt 2004; Ma 2010). Tem-se como definição de antioxidante um composto que em concentrações menores que um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse mesmo substrato (Halliwell 2007). O glutationato presente em concentrações elevadas (ordem dos mM) distingue-se, no caso dos humanos, dos restantes compostos antioxidantes por ser um composto endógeno, ou seja, ser sintetizado pela célula, podendo ser induzido em resposta a um *stress*.

Por outro lado, a amplificação dos mecanismos enzimáticos antioxidantes, por síntese de *novo* dos enzimas antioxidantes (revistos em Apel & Hirt 2004) ou por regulação da sua actividade constituem a resposta enzimática ao *stress* oxidativo. O metabolismo das ERO passa pela redução consecutiva das espécies oxidantes até ser obtida H_2O . Na Figura I-1 encontram-se sumarizadas as principais vias metabólicas das ERO.

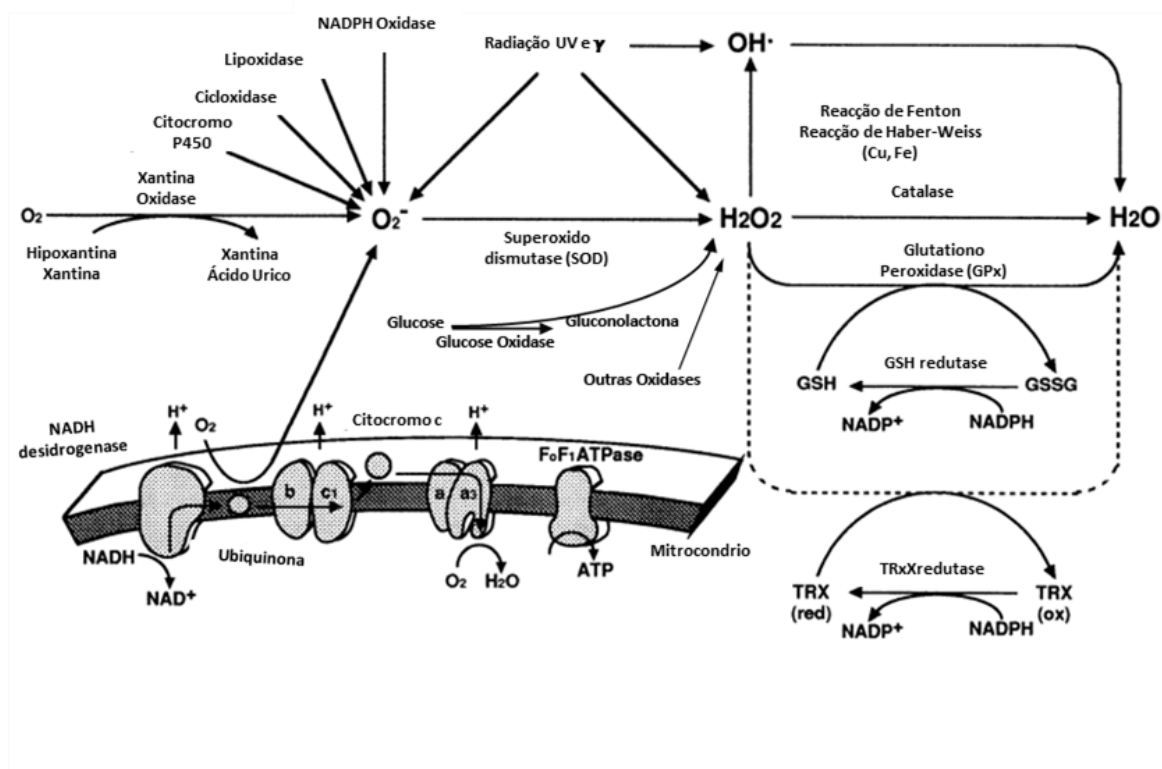


Figura I-1 – Representação esquemática das principais vias metabólicas das ERO. No caso do H_2O_2 este é produzido principalmente a partir da reacção de redução do anião superóxido, catalisada pelo superóxido dismutase. O H_2O_2 é metabolizado principalmente em H_2O por redução catalisada pelo catalase e pelo glutatioxido peroxidase. O anião superóxido pode ter várias origens sendo a via maioritária a cadeia respiratória mitocondrial. Adaptado de Kamata and Hirata 1999

Os principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogénio (H_2O_2), a catalase, a glutatióno peroxidase (GPx) as peroxiredoxinas (Prx), as tioredoxinas (Trx) e a glutatióno redutase que catalisam a conversão do peróxido de hidrogénio a água (Kamata & Hirata 1999). O enzima superóxido dismutase (SOD) é uma proteína ubíqua que apresenta duas isoformas distintas. A isoforma citoplasmática SOD1, também conhecida por Cu/ZnSOD, contém um centro activo com os iões metálicos cobre e zinco e a isoforma SOD2, ou MnSOD, contém um ião de manganês no centro activo e encontra-se na matriz mitocondrial. O enzima catalase é expresso ubiquamente e localiza-se nos peroxissomas. As tioredoxinas e a glutatióno redutase pertencem a sistemas enzimáticos que são responsáveis pela conversão destas enzimas ao seu estado reduzido através da oxidação do cofactor NAD(P)H (Sies 1997; Ma 2010). As tioredoxinas são responsáveis por manter um ambiente redutor no núcleo, essencial ao início da transcrição e à síntese de DNA.

I.I.i.ii Adaptação ao *Stress* oxidativo

Um processo de maior relevo induzido pela exposição a *stress* oxidativo é o processo de adaptação (Flattery-O'Brien et al. 1993; Lushchak 2010). É provavelmente um processo ubíquo a qualquer tipo de célula, visto ter sido observado em bactérias, leveduras, plantas e células animais (Lushchak 2010). Sucintamente, células pré-expostas a uma dose sub-letal de espécies oxidantes sofrem um processo de adaptação que lhes confere a capacidade posterior de resistir a doses de oxidantes que inicialmente eram letais.

Os mecanismos que culminam na adaptação ao *stress* oxidativo ainda não se encontram bem descritos, contudo é de salientar o sustentar a longo prazo dos mecanismos enzimáticos da defesa antioxidante e o regular da permeabilidade membranar (Lushchak 2010).

Recentemente demonstrou-se que a permeabilidade da membrana ao H_2O_2 é regulada através de modificações na composição da membrana. Isto cria um gradiente de concentrações de H_2O_2 através da membrana e, assim, permite controlar a sua concentração intracelular (Sousa-Lopes et al. 2004; Pedroso et al. 2009; Folmer et al. 2008; Matias et al. 2007; Antunes & Cadenas 2000).

Embora o *stress* oxidativo constitua o principal iniciador do processo de adaptação, a adaptação é igualmente induzida por restrição calórica (*starvation*), fármacos, entre outros. Ainda que descrita a participação de diversos factores de transcrição na resposta a insultos oxidativos e, possivelmente, na adaptação nos diversos (micro)organismos, como revisto em Lushchak 2010, nos animais superiores desconhecem-se as modificações que conduzem à adaptação e como se repartem pelos factores de transcrição. De salientar que já se encontra

descrito em bactérias a resposta distinta para o *stress* induzido pelo H_2O_2 (*OxyR*) e o radical superóxido (*SoxR*) (Lushchak 2010).

I.1.ii Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2)

A ERO mais abundante é o (hidro)peróxido de hidrogénio. Embora não apresente o maior potencial de redução, este composto distancia-se das restantes EROs por apresentar um maior tempo de semi-vida e uma maior concentração *in vivo* (Quadro I-1), sendo, por isso, o principal mediador de *stress* oxidativo (Giorgio et al. 2007).

Quadro I-1 - Potencial de redução, tempo de semi-vida e concentração aproximada *in vivo* das principais ERO. Adaptado de Giorgio et al. 2007.

	ERO			
	$O_2 \rightarrow$	$O_2^{\cdot-} \rightarrow$	$H_2O_2 \rightarrow$	$OH^{\cdot-} \rightarrow H_2O$
Potencial de Redução (V)		0,94	0.32	2.31
$T_{1/2}$ (sec)		10^{-6}	10^{-5}	10^{-9}
Concentração <i>in vivo</i> (M)		10^{-10}	10^{-7}	10^{-15}

I.1.ii.i Metabolismo

O H_2O_2 é continuamente produzido e degradado pelo que apresenta uma concentração regulada e quase estacionária *in vivo* (Giorgio et al. 2007).

A principal fonte de H_2O_2 é a reacção de dismutação do $O_2^{\cdot-}$, um subproduto do metabolismo celular normal, catalisada pelo superóxido dismutase (SOD). Contudo o H_2O_2 pode ser produzido directamente por diversos enzimas como o xantina oxidase, os NADPH oxidases (NOX), o glucose oxidase, entre outros (Figura I-1) (Ma 2010). O catalase e o glutathione peroxidase (Gpx) constituem as principais vias metabólicas de degradação do H_2O_2 (Kamata & Hirata 1999).

O H_2O_2 embora seja quimicamente bastante estável apresenta citotoxicidade indirecta ao ser reduzido ao radical hidroxilo (HO^{\cdot}), pela reacção de Fenton (Figura I-1), o qual apresenta elevada reactividade e toxicidade. Posto isto, tem-se que o estado redox da célula está fortemente dependente dos níveis de H_2O_2 , o qual actua biologicamente através das ERO a que dá origem.

I.1.ii.ii H_2O_2 como sinalizador/regulador – importância biológica

Paradoxalmente, as ERO integram-se no conjunto de biomoléculas importantes na sinalização/regulação celular (Apel & Hirt 2004; Ma 2010). O H_2O_2 intracelular está envolvido na regulação de processos fisiológicos como a proliferação e diferenciação celular e ainda a

apoptose e necrose de forma dependente da concentração (Figura I-2 a)(D P Jones 2010; Veal et al. 2007). Doses baixas de H_2O_2 (entre nM e μM) induzem processos de regulação e proliferação celular enquanto doses altas (próximos do mM) sinalizam para a morte celular por apoptose ou necrose. (Oliveira-Marques et al. 2009; Giorgio et al. 2007; Lushchak 2010). A participação das ERO em processos celulares fisiológicos encontra-se revisto em Dröge, 2002.

Ao apresentar-se como uma molécula neutra e pequena, capaz de se difundir através de membranas biológicas, o H_2O_2 pode exercer efeitos regulatórios localmente (F. Antunes & Cadenas 2001; Mishina et al. 2011). Constitui exemplo do papel regulador do H_2O_2 a sinalização para a inflamação na resposta imune inata. O enzima NADPH oxidase presente na membrana plasmática de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos induz um aumento do nível deste composto (H_2O_2) o qual difunde-se localmente e motiva os processos subjacentes à inflamação (Bedard & Krause 2007).

Embora o H_2O_2 apresente um potencial redutor baixo e, por isso, não reaja quimicamente com a maioria das macromoléculas, apresenta reactividade com os grupos sulfídricos dos resíduos de cisteínas das proteínas (Klomsiri et al. 2011; Dean P Jones & Go 2011), alterando o seu nível de oxidação. Este processo de redução-oxidação reversível dos grupos tiol das cisteínas mediado pelo H_2O_2 constitui o principal mecanismo de regulação exercido especifica e directamente por aumentos temporários da concentração deste composto. Em bactérias encontra-se descrito a activação do factor de transcrição *OxyR* pela oxidação reversível de cisteínas críticas no mesmo directamente pelo H_2O_2 (Lushchak 2010). Este facto evidência a capacidade do H_2O_2 regular a actividade de factores de transcrição.

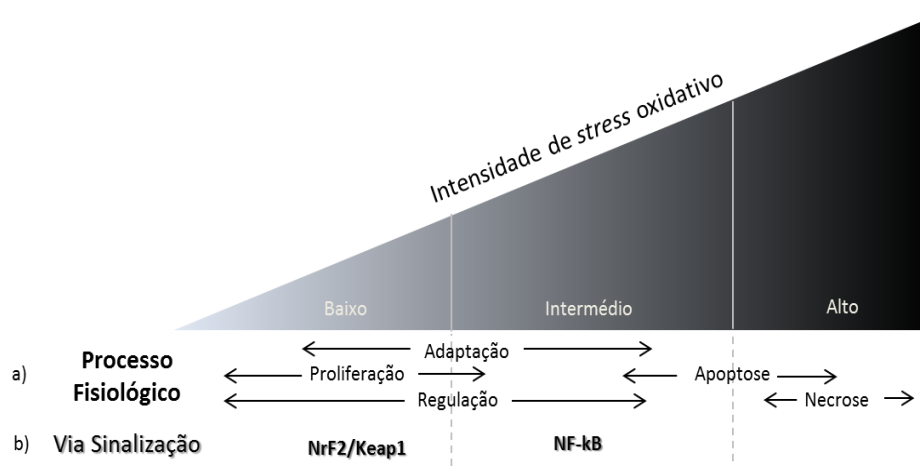


Figura I-2 –Processos fisiológicos regulados pelo H_2O_2 . a) A concentração de H_2O_2 discrimina o processo induzido: doses baixas (entre nM e μM) induzem processos de regulação e proliferação celular enquanto doses altas de H_2O_2 (próximos do mM) sinalizam para a morte celular por apoptose ou necrose. Adaptado de Oliveira-Marques et al. 2009; b) Hipótese do modelo hierárquico de resposta entre os diversos sistemas sensoriais de stress oxidativo em células eucariotas animais: O sistema NrF2 responde a doses baixas de ROS enquanto o sistema NF-κB é activado por doses intermédias de stress oxidativo. Adaptado de Lushchak 2010.

Encontra-se descrita a presença de *stress* oxidativo em diversas condições patológicas desde a inflamação, a aterosclerose, a diabetes tipo II, mesmo em neuropatologias como a doença de Parkinson, tendo sido igualmente observada a presença de *stress* oxidativo no microambiente tumoral (Lushchak 2010; Veal et al. 2007; Pelicano et al. 2004). Encontra-se também descrito na literatura que o H_2O_2 é necessário à angiogénese um processo fisiológico que, no entanto, também está envolvido no desenvolvimento tumoral (Veal et al. 2007). Todavia, encontra-se ainda por esclarecer se este evento (*stress* oxidativo) é meramente um acontecimento partilhado pelas várias condições patológicas ou se se apresenta como um iniciador das mesmas. Tem-se ainda que muitos fármacos actuam através da produção de ERO, como é o caso da maior parte dos agentes quimioterapêuticos que induzem morte celular por níveis elevados de *stress* oxidativo (Piccirillo et al. 2009).

Posto isto conclui-se que a relevância biológica das ERO é vasta, participando em um leque alargado de processos fisiológicos, pelo que a elucidação dos processos que envolvem as ERO são de extrema importância.

I.II Sistema Nrf2-Keap1

A proteína Nrf2, conjuntamente com a proteína Keap1, perfazem o sistema Nrf2/Keap1. A proteína Nrf2 apresenta duas isoformas no ser humano (*homo sapiens*). A isoforma dominante apresenta 605 aminoácidos e uma massa molecular de 67,8 kDa e a isoforma secundária que apresenta uma deleção dos primeiros 16 aminoácidos (589 aminoácidos) uma massa molecular de 66,1 kDa. A proteína Keap1, também apelidada de *INRF2* (do inglês *inhibitor of Nrf2*), com 624 aminoácidos apresenta uma massa molecular de 69,7 kDa.

a) FACTOR DE TRANSCRIÇÃO NRF2

A proteína Nrf2 [Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2], pertence à subfamília dos factores de transcrição *nuclear factor erythroid 2* (NF-E2) da família *basic leucine zipper* (bZIP). Pertence ainda à família dos receptores activados por xenobióticos (XAR, do inglês *Xenobiotic-activated receptors*), responsáveis por reconhecer especificamente xenobióticos e coordenar a transcrição genética.

Estruturalmente (Figura I-3) compreende 6 regiões *Neh* (do inglês *Nrf2-ECH homology*) que se apresentam altamente conservadas entre espécies. A região *Neh1* contém a estrutura bZIP responsável pela heterodimerização e ligação ao *DNA* (Figura I-3). Os domínios *Neh4* e *Neh5* constituem o domínio de transactivação (TA), responsável pela activação da transcrição

genética. A região terminal *Neh3* também apresenta um papel na transactivação do NrF2 (Nioi et al. 2005). A região *Neh6* é importante para a degradação nuclear da proteína NrF2 de forma independente da proteína Keap1 (McMahon et al. 2004). A ligação à proteína Keap1 é efectuada por intermédio de motivos DLG e ETGE na região *Neh2*. A proteína NrF2 ainda contém diversas sequências NES e NLS responsáveis pelo seu movimento vaivém entre o citosol e o núcleo (Jain et al. 2005). A sequência NES presente na região *Neh5* (domínio de transactivação) denominada de NES_{TA} na Figura I-3 é sensível ao estado redox da célula (W. Li et al. 2006) enquanto a sequência NES_{zip} presente no domínio bZIP é insensível. No núcleo ao formar um heterodímero a proteína NrF2 oculta os NES e consequentemente impede a sua exportação nuclear.

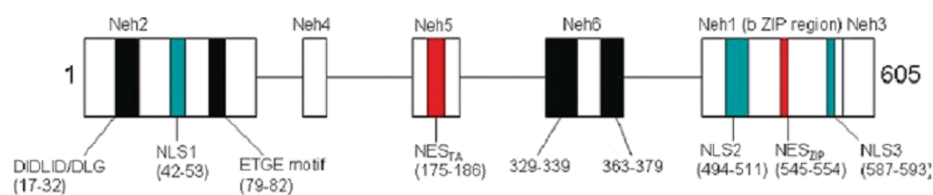


Figura I-3 - Representação esquemática da estrutura da proteína NrF2 e localização das regiões *Neh*. A proteína ainda contém sequências NLS e NES. A região *Neh1* contém a estrutura bZIP responsável pela heterodimerização e ligação ao DNA. Os domínios *Neh4* e *Neh5* constituem o domínio de transactivação (TA), responsável pela activação da transcrição genética. A região terminal *Neh3* também apresenta um papel na transactivação do NrF2 (Nioi et al. 2005). A região *Neh6* é importante para a degradação nuclear da proteína NrF2 de forma independente da proteína Keap1 (McMahon et al. 2004). A ligação à proteína Keap1 é efectuada por intermédio de motivos DLG e ETGE na região *Neh2*. A sequência NES presente na região *Neh5* (domínio de transactivação) denominada de NES_{TA} é sensível ao estado redox da célula enquanto a sequência NES_{zip} presente no domínio bZIP é insensível. Adaptado de Giudice, Arra, and Turco 2010,647.

b) PROTEÍNA KEAP1

A proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated Protein 1*) (K Itoh et al. 1999) localiza-se preferencialmente no citosol, tendo sido detectada ainda no núcleo e no retículo endoplasmático. Apresenta cinco domínios estruturais (Figura I-4): 1) região N terminal (NTR); 2) domínio BTB/POZ que é responsável pela ligação que conduz ao homodímero do Keap1 e também lhe confere a capacidade de interagir com a *Cul3 ligase*; 3) uma região intermédia (IVR) rica em cisteínas; 4) região com 6 repetições do domínio Kelch, também conhecido como domínio DGR (*double glycine repeats*). Esta região é responsável pela ligação ao domínio *Neh 2* da proteína NrF2 e aos filamentos de actina do citoesqueleto (Brigelius-Flohé & Flohé 2011); 5) região C-terminal. Embora se encontrem descritos sequências NES ou NLS na proteína Keap1, existe disparidade na literatura quanto a sua funcionalidade. Foi descrita a presença da proteína Keap1 no núcleo (Velichkova & Hasson 2005) o que sugere que esta apresente domínios NES/NLS funcionais ou sofra translocação reversível entre o citosol e o núcleo sobre

a forma de complexo Nrf2/Keap1. A sua estrutura cristalográfica foi caracterizada (X. Li et al. 2004).



Figura I-4- Representação esquemática da estrutura da proteína Keap1: 1) região N terminal (NTR); 2) domínio BTB/POZ que é responsável pela ligação que conduz ao homodímero do Keap1 e também lhe confere a capacidade de interagir com a *Cul3 ligase*; 3) uma região intermédia (IVR) rica em cisteínas; 4) região com 6 repetições do domínio Kelch, também conhecido como domínio DGR (*double glycine repeats*). Esta região é responsável pela ligação ao domínio *Neh 2* da proteína Nrf2 e aos filamentos de actina do citoesqueleto; 5) região C-terminal. e do local de ligação à proteína Nrf2. Adaptado de (Giudice et al. 2010).

De salientar que embora esteja descrita a capacidade da proteína Keap1 agregar aos filamentos de actina e, assim, associar o complexo Nrf2/Keap1 ao citoesqueleto por forma a sequestrá-lo no citosol, a literatura apresenta disparidade no que toca à colocação do complexo Nrf2/Keap1 e a proteína actina (Giudice et al. 2010; K. W. Kang et al. 2002; Martin et al. 2004; Piccirillo et al. 2009; Brigelius-Flohé & Flohé 2011).

I.II.i Regulação e Expressão Génica

A proteína Nrf2 no núcleo associa-se a outros factores da família bZIP, como por exemplo, sMaf (do inglês *small musculoaponeurotic fibrossarcoma*), ATF4 (do inglês *activation transcription factor 4*), JunD, PMF-1 (do inglês *polyamine-modulated factor-1 protein*), entre outros, dos quais se distingue o sMaf por ser considerado o parceiro de dimerização preferencial do Nrf2. O heterodímero resultante liga-se a sequências regulatórias em *cis ARE* do inglês *antioxidante response element*, também intituladas de *EpRE* do inglês *electrophile response element* (Surh et al. 2008; Tkachev et al. 2011; Giudice et al. 2010). Encontra-se por identificar a totalidade de parceiros de dimerização da proteína Nrf2 e qual a sua influência na expressão génica. Esta pode ser suprimida por dimerização do Nrf2 com parceiros inibitórios como a proteína Nrf3 ou p63, entre outras (Giudice et al. 2010).

O elemento *cis* de regulação da expressão génica *ARE/EpRE* apresenta a sequência canónica:



Figura I-5- Sequência de ácidos nucleicos que constituem o elemento de regulação em *cis Antioxidant response element/Electrophile response element* na região promotora de um gene. Encontra-se em negrito a sequência essencial à ligação ao factor de transcrição Nrf2. A azul encontra-se o excerto de sequência que pode conter uma sequência TRE (TGACTCA) e, portanto, promover a ligação às proteínas Jun. A sobrescrito indica-se o nucleótido que constitui alternativa para a posição na sequência. A letra “n” corresponde a qualquer ácido nucleico.

As sequências *ARE/EpRE* encontram-se na região promotora dos genes que codificam para vários enzimas antioxidantes, da fase 2 do metabolismo de xenobióticos e biossíntese e metabolismos de lípidos e colesterol. De notar que se encontra descrito a presença de múltiplas sequências *ARE* de natureza (sequência) distinta na região promotora de alguns genes. Isto sugere a possibilidade de uma regulação gradual e ajustada dos genes contendo motivos *ARE* (Tkachev et al. 2011).

Estudos em murganhos com *Knock-down* da proteína Nrf2 demonstram alterações na expressão de mais de 200 genes (Surh et al. 2008; Kitteringham et al. 2010; Tkachev et al. 2011). São exemplos de genes cuja transcrição é activada pelo Nrf2 os enzimas Hemeoxigenase I (HO-1), tioredoxina, NAD(P)H oxidoreductase, superóxido dismutase (SOD) e a catalase e ainda as proteínas Mrp2, Mrp3 e Mrp4 (do inglês *Multidrug Resistance Pump*), entre muitas outras (Kitteringham et al. 2010; J Lee et al. 1995; Lushchak 2010; Aleksunes et al. 2008; G. Shen & A.-N. Kong 2009; Jung & Kwak 2010; Klaassen & Reisman 2010). Por outro lado, a transcrição dos genes associados à biossíntese e metabolismo dos lípidos e colesterol é inibida pela activação do sistema Nrf2/Keap1. Ainda é de salientar que o gene *NRF2* apresenta uma sequência promotora *ARE* e, assim é regulado pelo próprio factor de transcrição Nrf2 que codifica, criando um mecanismo de retroacção positiva (Giudice et al. 2010). A proteína Keap1 e alguns constituintes do sistema proteossomal são induzidos pela activação do factor de transcrição Nrf2, o que cria um mecanismo de retroacção negativa que controla a abundância das respectivas proteínas (O.-H. Lee et al. 2007; Kaspar & Jaiswal 2010). Porém encontra-se por elucidar a totalidade de genes cuja expressão é regulada pelo sistema Nrf2/Keap1.

Como a activação do sistema Nrf2/Keap1 induz a expressão génica de genes que codificam para proteínas que apresentam um potencial papel antioxidante ou de desintoxicação celular, este factor de transcrição encontra-se fortemente associado a uma função citoprotectora. Contudo, foi observado em células tumorais um nível elevado de Nrf2 e, observou-se que a sobreexpressão de Nrf2 em linhas celulares cancerígenas conduz a uma sobreexpressão dos mecanismos citoprotectores e, assim, a uma resistência à quimioterapia (Shibata et al. 2008; D. D. Zhang 2010; Wang et al. 2008). Portanto, considera-se que o Nrf2

apresenta um papel terapêutico dúbio por ser responsável pelo balanço entre uma resposta citoprotectora benéfica e uma resposta que sustente o desenvolvimento tumoral (Kwak & Kensler 2010; D. D. Zhang 2010). Posto isto, é importante esclarecer o funcionamento do sistema Nrf2/Keap1.

I.II.ii Activação

O sistema Nrf2/Keap1 pode ser induzido por uma pleiotropia de compostos naturais e sintéticos, como por exemplo, difenóis, fenilenediaminas, quinonas, isotiocianatos, espécies reactivas de oxigénio (ERO) entre outros revistos em Tkachev et al. 2011. Os compostos que promovem a activação do Nrf2 foram classificados em 6 classes consoante a sua estrutura e mecanismo molecular de activação (M. Kobayashi et al. 2009).

Em condições basais (ausência de *stress* oxidativo ou outro sinal que induza a activação do sistema) a proteína Nrf2 encontra-se sequestrada no citosol por acção de duas moléculas de Keap1 e, assim, inactiva. O homodímero de Keap1 serve de intermediário ao ligase E3 ubiquitina Cul3-Rbx1 que marca por ubiquitinação a proteína Nrf2 para degradação proteossomal (Figura I-6 a)). Posto isto, a proteína Nrf2 apresenta níveis basais baixos, resultantes do balanço entre a síntese *de novo* e a degradação proteossomal. Em condições basais a proteína Nrf2 apresenta um tempo de meia vida de 10 a 30 minutos (A. Kobayashi et al. 2004).

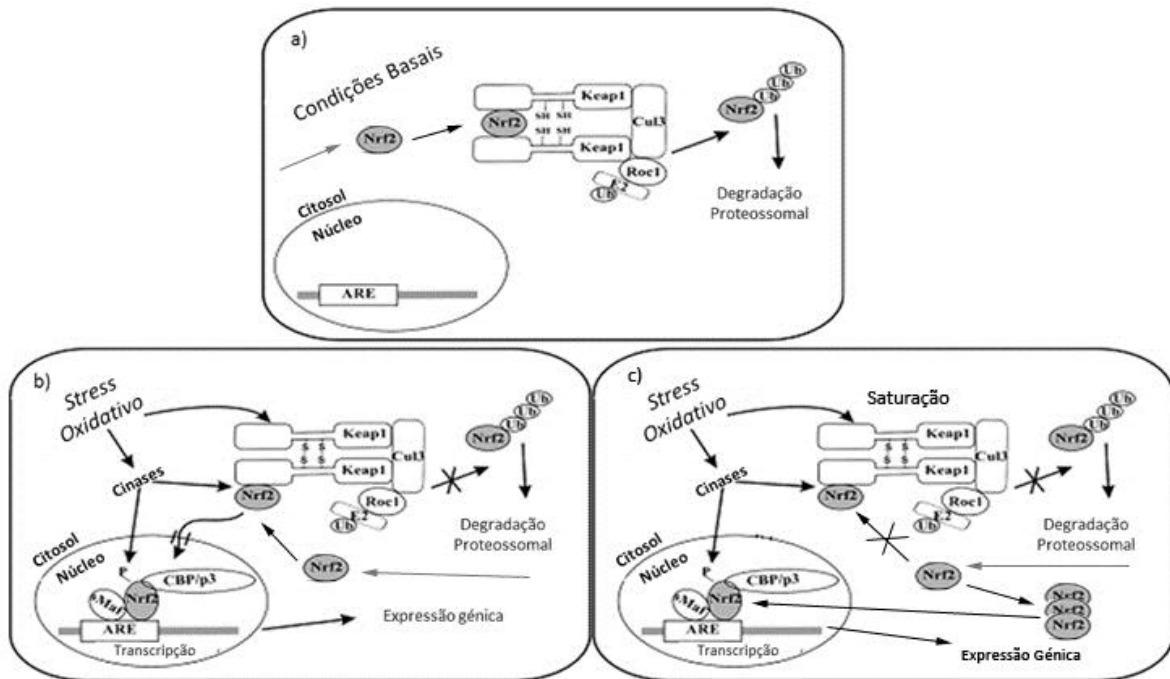


Figura I-6 - Representação esquemática do sistema Nrf2/Keap1 e mecanismos de ativação propostos; a) Em condições basais a proteína Nrf2 encontra-se sequestrada no citosol por acção de um homodímero de Keap1 e assim inactivo; Em condições de *stress* oxidativo: b) o complexo Nrf2/Keap1 é destabilizado por alterações oxidativas na proteína Keap1 e/ou fosforilação da proteína Nrf2 e a proteína Nrf2 livre migra para o núcleo para exercer a sua actividade de regulação da expressão génica; c) o complexo Nrf2/Keap1 por alterações conformacionais perde a sua capacidade de marcar a proteína Nrf2 para degradação proteossomal; de seguida ocorre um aumento dos níveis totais da proteína Nrf2 por síntese de *ново* e saturação da proteína Keap1 o que sustenta a translocação da proteína Nrf2 para o núcleo e activação do sistema Nrf2/Keap1. Adaptado de Lushchak 2010 e Brigelius-Flohé and Flohé 2011.

Encontram-se descritas duas vias alternativas para a activação do Nrf2 (Figura I-6 b e c) pelo *stress* oxidativo. A proteína Keap1 humana contém 27 resíduos de cisteínas (Figura I-7), 25 dos quais altamente conservado entre espécies. Os resíduos cys151, cys226 e cys613 são oxidáveis e um aumento do nível de ERO promove a formação de ligações persulfureto intramoleculares entre as cys 226 e cys 613 e a ligação intermolecular entre as cys 151 dos dois dímeros de Keap1 (Fourquet et al. 2010). A alteração conformacional subjacente liberta a proteína Nrf2 (Figura I-6), ficando esta livre para migrar para o núcleo e exercer a sua actividade de regulação da expressão génica (Figura I-6)(Fourquet et al. 2010). Neste caso, a sinalização é efectuada de forma directa por oxidação da proteína Keap1, a qual actua como sensor do estado *redox* da célula (Holland & Fishbein 2010).

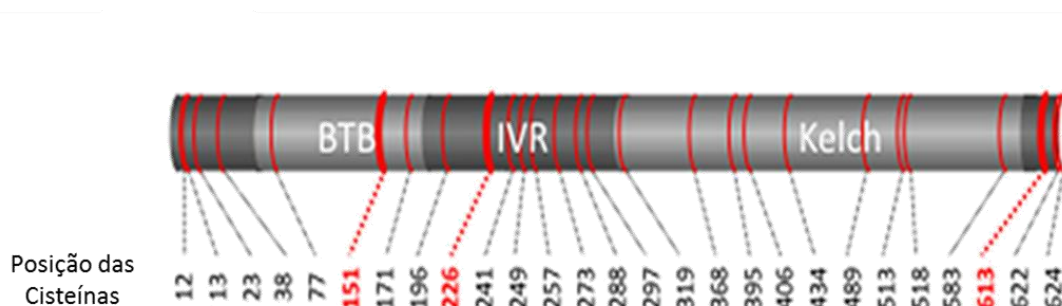


Figura I-7 – Representação esquemática da localização das cisteínas presentes na proteína Keap1. Em letra vermelha encontram-se as cisteínas que sofrem oxidação por intermédio de uma dose bolus de 200 μM de H_2O_2 durante 5 min. Adaptado de Fourquet et al. 2010.

De salientar que começam a surgir evidências que compostos activadores do factor de transcrição Nrf2 diferentes oxidam cisteínas diferentes na proteína Keap1 e que, portanto, o sistema Nrf2/Keap1 é capaz de distinguir os diversos compostos através de um fenómeno de código de cisteínas (do inglês “*cysteine code*”) (M. Kobayashi et al. 2009). A proteína Nrf2 contém 6 cisteínas e, embora pouco estudado o processo de oxidação directa de cisteínas na proteína Nrf2 como método da sua activação, existem evidências que estas possam participar na activação do mesmo. Por exemplo, Ma descreveu que mutações das cisteínas da proteína Nrf2 conduzem a um maior sequestro da proteína Nrf2 pela proteína Keap1 e, consequentemente maior degradação proteossomal da proteína Nrf2 (Ma 2010).

Por outro lado, a proteína Nrf2 sequestrada pelo homodímero de Keap1 pode ser directamente fosforilada, o que permite a dissociação do complexo Nrf2-Keap1 e, assim, a migração da proteína Nrf2 para o núcleo. Karapetian et al. descreveram a fosforilação directa da proteína Nrf2 quer *in vivo* quer *in vitro* por acção das cinases PERK (do inglês *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) e PKC (do inglês *protein kinase C*) (Karapetian et al. 2005) e foi sugerido que estas enzimas ou um cinase a montante na cascata de sinalização actue como sensor do estado *redox* da célula (Lushchak 2010; Ding et al. 2008). Piccirillo et al descreveram em células de adenocarcinoma gástrico a fosforilação da proteína Nrf2 na serina 40 pela PKC após uma exposição a 200 μM de H_2O_2 por adição bolus. Os mesmos autores concluíram ainda que a fosforilação é necessária para ocorrer a translocação para o núcleo e actividade transcricional da proteína Nrf2 (Piccirillo et al. 2009).

No entanto, Niture et al afirmam que é necessário a oxidação da cisteína 151 da proteína Keap1 conjuntamente com uma fosforilação da proteína Nrf2 na serina 40 pelo PKC para ocorrer uma libertação do Nrf2 do complexo Nrf2/Keap1 e, consequente activação da actividade transcricional (Niture et al. 2009).

Pi et al. ainda descreveram a presença de duas formas fosforiladas da proteína Nrf2 em células de neuroblastoma humano que apresentam propriedades de migração distintas em

gel de poliacrilamida. As formas fosforiladas apresentam uma velocidade de migração menor (98 e 118 kDa) em relação à não fosforilada (68 kDa). Os mesmos autores ainda referiram que as formas fosforiladas são predominantes no núcleo e vice-versa, que a fosforilação é mediada pelo cinase CK2 (do inglês *casein kinase 2*) e, que apenas a forma de 98 kDa apresenta actividade transcricional, sendo que a forma de 118 kDa é preferencialmente degradada (Pi et al. 2007).

Porém é de relevo salientar que Wenge Li et al. refutam o modelo de libertação da proteína Nrf2 do dímero de Keap1 como método de activação do sistema Nrf2. Afirmam que activação do sistema passa por uma degradação ineficiente da proteína Nrf2, e assim, por um desequilíbrio entre a degradação e síntese de novo da mesma que culmina num aumento dos níveis totais da proteína Nrf2 (Figura I-6 c) (W. Li & A.-N. Kong 2009). Este modelo é suportado pela observação que modificações nas cisteínas da proteína Keap1 não interferem na afinidade Keap1-Nrf2, mas resulta na perda da interacção com o enzima Cul3 (Salazar et al. 2006). Posto isto, os mesmos autores postulam que os sinais activadores do sistema Nrf2/Keap1 induzem alterações conformacionais que impedem a ubiquitinação da proteína Nrf2 e, assim, a sua metabolização eficiente, o que culmina na saturação da proteína Keap1 e, consequentemente num aumento dos níveis de Nrf2 livre. Contudo é de ressaltar que os autores referenciam alterações directamente na proteína Nrf2, como por exemplo, fosforilação de resíduos de lisina, como um mecanismo de desassociação do complexo Nrf2-Keap1 (Giudice et al. 2010).

Purdum-Dickinson et al. descreveram em cardiomiócitos de rato que uma exposição ao H₂O₂ (100 µM bolus) promove um aumento rápido, observável após 10 minutos de exposição, dos níveis da proteína Nrf2 (Purdum-Dickinson et al. 2007), sustentando por síntese *de novo* da proteína, por um aumento da tradução. Os autores não observaram aumento da transcrição ou estabilização da proteína. Concluiu-se ainda que a expansão dos níveis de Nrf2 é dependente do cinase PI3 (do inglês *Phosphoinositide 3 kinase*). W. Li et al. identificaram uma sequência *IRES* (do inglês *internal ribosomal entry site*) capaz de recrutar a subunidade 18S do ribossoma no mRNA que codifica para a proteína Nrf2 humana. Descreveram ainda que a sequência *IRES* apresenta uma estrutura em forma de *hairpin* sensível ao stress oxidativo que impede a sua interacção com o ribossoma em condições basais. Observaram ainda que uma exposição a 200 µM de H₂O₂ por 2 horas (por adição bolus) desfaz o *hairpin* e permite um aumento da tradução do mRNA que codifica para a proteína Nrf2 (W. Li et al. 2010). Estas observações sustentam a hipótese defendida por Wenge Li et al. e, ao terem sido observadas em células *wild type*, sem recurso a sobreexpressão da proteína Nrf2, aproximam-se das condições fisiológicas de activação do sistema Nrf2/Keap1.

Ainda se encontra descrito por Zheng Sun et al. e Kawai et al. a acetilação/deacetilação da proteína NrF2 como método de regular a sua localização celular, capacidade de ligação ao DNA e activação transcricional (Z. Sun et al. 2009; Kawai et al. 2010).

Em suma, encontram-se descritos vários intervenientes e mecanismos de activação do sistema NrF2/Keap1, havendo disparidade no que toca a condições necessárias para activação do sistema. Contudo, os mecanismos apresentados não são mutuamente exclusivos, estando descrita colaboração, por exemplo, entre a oxidação da cisteína 151 da proteína Keap1 e a fosforilação da serina 40 na proteína NrF2. A disparidade observada sugere que o sistema NrF2/Keap1 seja complexo no que toca ao(s) seu(s) modelo(s) molecular(es) de activação. Porém a mesma disparidade pode ser o resultado de estudos realizados em células de natureza diferente diferentes e/ou promoção da activação do sistema por compostos diferentes.

Ainda é de realçar que o factor de transcrição NrF2 apresenta um nível de actividade basal mesmo na ausência de estímulos que sinalizem para a sua activação e, consequentemente, para a expressão dos genes a montante deste (Kwak & Kensler 2010; D. D. Zhang 2010). Karapetian et al, relataram o movimento vaivém do complexo NrF2-Keap1 entre o citosol e o núcleo (Karapetian et al. 2005) e ainda que a proteína ProTα (do inglês *nuclear oncoprotein prothymosin α*) é capaz de impedir a associação da proteína Keap1 à proteína NrF2 no núcleo por competir com esta (NrF2) na ligação à proteína Keap1. A ProTα é uma pequena proteína nuclear ubíqua e abundante, envolvida na proliferação e prevenção da apoptose e, neste caso, por estar presente em excesso em relação ao NrF2 no núcleo permite que exista NrF2 sob a forma livre no núcleo e, assim, expressão basal dos genes a montante deste (Karapetian et al. 2005). O nível basal de actividade do sistema NrF2/Keap1 pode ainda ser explicado segundo o modelo proposto por Wenge Li et al., pela existência de um reservatório de proteína NrF2 livre, que escapa a degradação proteossomal e sustenta os níveis basais de actividade do sistema.

I.II.iii Inactivação

A inactivação do sistema NrF2/Keap1 é necessária para impedir os efeitos nefastos da indução prolongada de proteínas citoprotectoras, como acima descrito. A proteína Keap1 quando presente no núcleo ao se ligar à proteína NrF2, promove a dissociação desta última com o DNA e expõe os resíduos NES presentes na mesma proteína (NrF2). Isto indica que a proteína Keap1 é capaz de sequestrar o NrF2 para o citosol conduzindo assim à inactivação do sistema NrF2-Keap1 (Z. Sun et al. 2007). Ainda se encontra descrita a possibilidade de a

proteína Keap1 promover a degradação da proteína Nrf2 directamente no núcleo (Niture et al. 2010; Z. Sun et al. 2007).

Um mecanismo sugerido para a inactivação do sistema Nrf2/Keap1 é a sinalização para a exclusão nuclear da proteína Nrf2 por cascata de fosforilações. Uma exposição ao H_2O_2 promove a fosforilação da tirosina 216 da proteína GSK3 (do inglês *Glycogen Synthase Kinase-3*) que por sua vez promove a fosforilação do *Fyn* na treonina 12. Este cinase (*Fyn*) vai migrar para o núcleo e fosforilar a tirosina 568 da proteína Nrf2. Esta fosforilação vai promover o reconhecimento da sequência NES_{Zip} pela exportina *Crm1* e, assim, sustentar a exclusão nuclear da proteína Nrf2 (Jain & Jaiswal 2007; Rojo et al. 2008; Salazar et al. 2006; Brigelius-Flohé & Flohé 2011).

A proteína Nrf2 como apresentado na Figura I-3, apresenta múltiplas sequências NLS e NES que lhe confere, e ao complexo Nrf2-Keap1, uma capacidade de vaivém entre o citosol e o núcleo. O processo de importação e exportação nuclear do Nrf2 consiste num mecanismo adicional de regulação do sistema Nrf2/Keap1 que se encontra pouco elucidado. A presença de múltiplas sequências NLS e NES quer no Nrf2 como no Keap1 e a possibilidade de a sua actividade ser regulada por intermédio de mecanismos de oxidação/fosforilação sugere uma interacção e equilíbrio dinâmico entre as diversas sequências no controlo da localização celular da proteína.

Como já referido, componentes do sistema proteossomal e a proteína Keap1 apresentam sequências ARE nas suas regiões promotoras, o que sugere um mecanismo de retroacção negativo como modelo de inactivação do sistema Nrf2/Keap1 (Karapetian et al. 2005; Jain et al. 2005; Z. Sun et al. 2007; Giudice et al. 2010).

Ning e colaboradores ainda descreveram que doses de H_2O_2 até 500 μM adicionadas por bolus a células microvasculares do endotélio pulmonar conduzem a uma activação do sistema Nrf2/Keap1 enquanto doses maiores que 500 μM adicionadas por bolus conduzem a uma diminuição da ligação da proteína Nrf2 ao DNA e à sua exclusão nuclear (Ning et al. 2010).

Em resumo, a elucidação do mecanismo de inactivação do sistema Nrf2/Keap1 está ainda por definir, sendo que é importante o seu esclarecimento por forma a permitir, por exemplo, o desenvolvimento de terapias anticancerígenas mais eficientes.

I.II.iv Interacção com outros factores de transcrição

Embora estejam descritos factores de transcrição sensíveis ao nível de ROS distintos para células de origem distinta, o nível de complexidade dos sistemas envolvendo estes factores de

transcrição é maior nas células eucariotas animais (Lushchak 2010). Nas células animais encontram-se, até à data, descritos diversos sistemas de resposta ao *stress* oxidativo e começam a emergir evidências de uma regulação consertada, complementar e especializada entre os diversos factores de transcrição, capaz de diferenciar entre diversos níveis de *stress* oxidativo e, assim, permitir uma resposta gradual (Figura I-2 b))(Lushchak, 2010).

Como esquematizado na Figura I-2 b) a níveis baixos de *stress* oxidativo domina a resposta mediada pelo factor de transcrição NrF2, enquanto a doses intermédias a resposta mediada pelo factor NF- κ B torna-se dominante (Lushchak 2010). Encontra-se descrito na literatura que a subunidade p65 do factor de transcrição NF- κ B, quando activa compete no núcleo com a proteína NrF2 por parceiros que permitem uma ligação ao *DNA* e promove a hipoacetilação da cromatina nas sequências *ARE*, inibindo assim a regulação da expressão génica via NrF2 (G.-H. Liu et al. 2008). Posto que o fenómeno de adaptação ocorre principalmente para doses regulatórias e baixas (Figura I-2), um bom candidato a mediador da resposta adaptativa em células animais é o factor de transcrição NrF2. Reforça esta proposta a observação por Leiser e Miller que a activação do factor de transcrição NrF2 em células de adenocarcinoma por exposição a arsenito culmina numa adaptação das mesmas ao H_2O_2 , entre outros compostos (Leiser & Miller 2010).

Ainda é de salientar que recentemente se observou, como já referido, que o NrF2 é igualmente responsável pela regulação de genes que codificam para proteínas importantes na biossíntese e metabolismos de ácidos gordos e outros lípidos (Kitteringham et al. 2010). Esta observação, aliada ao facto de ter sido reportado que a adaptação em *Saccharomyces cerevisiae* passa por alterações na composição em lípidos da membrana (Pedroso et al. 2009; Folmer et al. 2008; Sousa-Lopes et al. 2004; Matias et al. 2007) reforça a proposta do factor de transcrição NrF2 como o mediador da adaptação em células eucariotas animais.

I.III Metodologias de exposição a stress oxidativo induzido por H_2O_2

Como referido, o H_2O_2 sinaliza para processos fisiológicos distintos consoante a sua concentração intracelular. Posto isto, a manutenção de uma concentração de H_2O_2 definida e sustentada ao longo do ensaio é de importância extrema. A exposição ao H_2O_2 pode ser feita através de três metodologias diferentes: a) adição bolus, b) por glucose oxidase e c) por titulação de H_2O_2 em estado estacionário (Oliveira-Marques et al. 2009; F. Antunes & Cadenas 2001).

a) EXPOSIÇÃO AO H_2O_2 PELO MÉTODO DE ADIÇÃO BOLUS

Esta metodologia constitui a abordagem típica e mais empregue nos estudos da exposição a doses de H_2O_2 . Sucintamente, a dose desejada de H_2O_2 é adicionada unicamente no início do ensaio e, à medida que o H_2O_2 vai sendo consumido intracelularmente, a concentração deste composto vai decrescendo. Para compensar esta diminuição, especialmente para ensaios de maior tempo, recorre-se a doses iniciais elevadas ($> 100 \mu M H_2O_2$). Por o decréscimo da concentração de H_2O_2 depender do número e tipo de células em ensaio, a concentração a um dado instante da exposição é desconhecida, pelo que é impossível inferir com rigor qual a concentração de H_2O_2 responsável pelas observações efectuadas.

b) EXPOSIÇÃO AO H_2O_2 VIA GLUCOSE OXIDASE

Uma abordagem alternativa à adição por bolus é a adição de glucose oxidase (Korn et al. 2001; Zmijewski et al. 2007). Este enzima oxida a glucose presente no meio de cultura a D-Gluconolactona, produzindo continuamente H_2O_2 (Equação I-1).



Assim, enquanto a velocidade de formação de H_2O_2 for maior que a sua velocidade de consumo pelas células, por efeitos cumulativos, a concentração de H_2O_2 vai aumentando progressivamente ao longo do tempo de ensaio. Posto isto, a concentração de H_2O_2 depende do número e tipo de células presente no ensaio e da quantidade de glucose oxidase adicionada. A concentração final de H_2O_2 resulta do balanço entre a velocidade de formação de H_2O_2 pela glucose oxidase e a velocidade de consumo pelas células, pelo que depende do tempo total de ensaio. Portanto, nesta abordagem, a concentração de H_2O_2 a um dado instante é desconhecida, pelo que é igualmente impossível inferir com rigor qual a dose de H_2O_2 responsável pelas observações efectuadas.

c) TITULAÇÃO DO H_2O_2 EM ESTADO ESTACIONÁRIO

Uma outra abordagem consiste em criar uma concentração de H_2O_2 estacionária para o valor de interesse. Brevemente, é adicionada uma dose desejada de H_2O_2 e, simultaneamente, uma quantidade de glucose oxidase que compense o consumo de H_2O_2 pelas células. Desta forma, garante-se que a concentração de H_2O_2 é virtualmente constante ao longo de todo o ensaio (F. Antunes & Cadenas 2001). Esta metodologia distancia-se das abordadas anteriormente por permitir exposições a concentrações baixas de H_2O_2 de forma controlada e sustentada (estado estacionário), mimetizando assim os processos de sinalização observados *in vivo*. Devido à concentração de H_2O_2 durante a exposição ser conhecida, esta metodologia facilita estudos de dose vs efeito (Oliveira-Marques et al. 2009).

I.IV Objectivos

O modelo de activação do sistema NrF2/Keap1 ainda não se encontra bem elucidado, havendo inconsistência no que toca ao mecanismo de activação da proteína NrF2. A hipótese estabelecida na literatura é que uma activação do sistema NrF2/Keap1 passa pelo desassociar do complexo NrF2-Keap1 em resposta a estímulos indutores do sistema. Porém encontram-se igualmente registadas observações que suportam a hipótese Weng et al., que afirma que uma activação do sistema NrF2/Keap1 passa por uma ineficiente degradação proteossomal da proteína NrF2 que conduz à saturação da proteína Keap1 e, consequentemente, à acumulação da proteína NrF2 por síntese *de novo*. Ainda é de salientar que a maioria dos estudos de activação do NrF2 são realizados pela exposição a fármacos e/ou concentrações de H₂O₂ elevadas ($\sim 10^{-3}$ M), condições que não mimetizam a sinalização via H₂O₂ observada *in vivo* (10^{-7} a 10^{-9} M) e por recurso à sobreexpressão da proteína NrF2, frequentemente sob a forma de proteína de fusão com um TAG como o GFP ou o MYC. (Kwak & Kensler 2010; Leonarduzzi et al. 2010; Ma 2010).

Este trabalho propõe-se a elucidar o mecanismo e a cinética da activação do sistema NrF2/Keap1 em condições que simulam as fisiológicas – 12,5 μ M H₂O₂ em estado estacionário e sem recurso à sobreexpressão da proteína NrF2. Ainda se tenciona delimitar a concentração de H₂O₂ que promove a activação do sistema NrF2/Keap1 e testar a hipótese de o sistema NrF2/Keap1 participar no processo de adaptação ao *stress* oxidativo em células eucariotas e elucidar quais as alterações na expressão génica durante e após o processo de adaptação.

II MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 Cultura Celular

Células HeLa (*American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) Soro Bovino Fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de Streptomicina e 2 mM de L-Glutamina, obtidos a partir da *Hyclone, Thermo Scientific*, e suportadas numa estufa *Snijders CO190TC-20* com atmosfera húmida, a 37°C e 5 % (v/v) CO₂.

Manteve-se um *stock* de células em crescimento exponencial e em monocamadas subconfluentes pela passagem sucessiva dos *stocks* a cada 2-3 dias. A cada 3-4 meses, por forma a não envelhecer a cultura, renovou-se o *stock* de células a partir de células quiescentes preservadas em azoto líquido em FBS suplementado com 10% (v/v) DMSO.

As células foram semeadas 48 h antes da experiência a uma densidade que permitisse a sua expansão até à desejada (Quadro II-1). Para tal, calculou-se a concentração celular após tripsinização do *stock* de células e centrifugação a 137 *g* por 5 minutos numa centrífuga de bancada *Hettich*, pela contagem do número de células em microscópio de contraste de fase (*Olympus CK40*). O meio de cultura das caixas foi renovado 1 hora antes de qualquer trabalho experimental.

Quadro II-1- Valores exercidos para semear as caixas de cultura (*Orange Scientific*) utilizadas nos trabalhos experimentais.

Caixa	Densidade Celular		Volume Meio Final
	Inicial	Final	
100 mm diâmetro	500×10^3 /caixa	1×10^6 /caixa	10 mL/caixa
6 Poços	25×10^3 /poço	50×10^3 /poço	2 mL/poço

Todas as manipulações celulares foram feitas na esterilidade por recurso a uma câmara de fluxo laminar vertical *Danlaf VFRS 1206*.

II.1.i HeLa como modelo Celular

As células HeLa são de natureza epitelial humana, foram derivadas a partir de células de adenocarcinoma cervical e apresentam um crescimento aderente sem inibição por contacto. Constituem uma das linhas celulares mais primordiais e mais utilizadas na investigação

científica. Um dos trabalhos pioneiros realizado nestas linhas celulares foi o teste da vacina da poliomielite em 1950. Desde então foram utilizadas numa pleiotropia de matérias, desde estudos de estados patológicos, efeitos de toxicidade, mapeamento genético, estudo de mecanismos de sinalização, entre outros. Apresentam-se como um bom modelo de células humanas por serem resistentes, simples de manipular e manter em laboratório e, conservarem as principais vias de sinalização intracelulares. Contudo, distanciam-se das células humanas por serem de natureza tumoral e conterem um telomerase activo durante a replicação e assim, não apresentarem limite de *Hayflick* (replicações).

II.II Exposição a H_2O_2

1. Método Estado Estacionário

O estado estacionário de H_2O_2 - $[H_2O_2]_{ss}$ - foi obtido pela adição da concentração desejada de H_2O_2 e simultaneamente de uma quantidade de glucose oxidase (*E.C.1.1.3.4 - Aspergillus Niger, Sigma-Aldrich* – G.O.) que compense o consumo de H_2O_2 pelas células e, assim, mantenha a concentração deste composto constante ao longo do ensaio (F. Antunes & Cadenas 2001).

A concentração de H_2O_2 foi determinada periodicamente retirando uma alíquota de 1 mL do meio (repostos a quantidade de meio, H_2O_2 e G.O. retirados) e medindo o oxigénio formado em solução após a adição de 10 μ L de catalase (1,5 mg/mL – aproximadamente 15 U – *E.C. 1.11.1.6 - Fígado Bovino, Sigma-Aldrich*), recorrendo a um eléctrodo de oxigénio (*Hansatech Instruments*) acoplado ao *software Oxygraph2.1*. O sinal obtido foi convertido em concentração de H_2O_2 através de uma curva de calibração de concentrações de H_2O_2 conhecidas (vide Preparação da solução e curva de calibração de H_2O_2), realizada nas mesmas condições (F. Antunes & Cadenas 2001).

Apenas foram considerados ensaios cuja concentração de H_2O_2 não tenha variado mais que 20% do valor pretendido. No fim de cada ensaio, após determinar-se a concentração de peróxido como acima descrito, a exposição ao H_2O_2 foi terminada pela substituição do meio de cultura por 1 mL de *PBS* a 4°C.

II.II.i Preparação da solução e curva de calibração de H_2O_2

A solução-mãe de H_2O_2 foi preparada pela diluição 1/1000 de Peridrol 30% H_2O_2 (Merk) e a sua concentração foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{240nm} = 43,4 M^{-1}cm^{-1}$) (Noble & Gibson 1970) por recurso a um espectrofotómetro *Camspec M350 Double Beam*. As soluções padrão da curva de calibração foram obtidas por diluição da solução-mãe em água destilada.

II.II.ii Método da adição bolus

A exposição adição bolus foi feita pela adição da dose de peróxido desejada ao meio de cultura. O ensaio foi terminado pela substituição do meio de cultura por 1 mL *PBS* a 4°C.

II.III Extracção Proteica Diferencial Citosol/Núcleo

A extracção diferencial das proteínas do citosol/núcleo foi efectuada de acordo com o método descrito por Roebuck et al. 1995. Por forma a prevenir a desnaturação e degradação proteica, o processo foi efectuado em gelo e todos os reagentes encontravam-se previamente a 4°C.

As células crescidas numa caixa de cultura de 100 mm de diâmetro foram lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato salino (*PBS* - vide secção Composição de Tampões em Anexo) e lisadas com 300 µL de solução tampão de lise citosólica (vide secção Composição de Tampões em Anexo). O lisado foi transferido para tubos *ependorfs* e as células remanescentes na caixa foram colectadas com 100 µL de solução tampão de lise citosólica.

Os extractos das proteínas citosólicas foram obtidos após centrifugação a 3000 *g* durante 4 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 300 µL de solução tampão de lise citosólica, centrifugado a 3000 *g* durante 4 minutos a 4°C e ressuspenso em 30 µL de solução tampão de lise nuclear (vide secção Composição de Tampões em Anexo). As amostras foram deixadas incubar 21 minutos em gelo, tendo-se agitado as mesmas 3 vezes, em intervalos de 7 minutos, nesse tempo com auxílio de um *vortex Heidolph ReaxTop*. Os extractos das proteínas nucleares foram obtidos após centrifugação a 10000 *g* por 15 minutos a 4°C. As amostras foram guardadas a -80°C. Todas as centrifugações foram efectuadas numa centrífuga refrigerada *Sigma 4k10*.

II.IV Extracção Proteica Total

A extracção proteica total foi efectuada de acordo com o método descrito por Luo et al. 2004. Por forma a prevenir a desnaturação e degradação proteica, o processo foi efectuado em gelo e todos os reagentes encontravam-se previamente arrefecidos.

As células, após serem lavadas duas vezes com solução *PBS*, foram lisadas com 400 µL de solução tampão RIPA (vide secção Composição de Tampões em Anexo). O lisado foi recolhido para tubos *ependorf* e as células remanescentes na caixa recolhidas com 100 µL de tampão RIPA. Após 10 minutos de incubação a 4°C, os extractos das proteínas totais foram obtidos por centrifugação a 10000 *g* a 4°C por 10 minutos.

II.V Análise Proteica por SDS-PAGE e *Western Blotting*

A análise por *Western Blotting* permite identificar especificamente uma proteína e determinar a sua quantidade relativa. Nesta técnica uma mistura proteica é separada por *SDS-PAGE*, transferida para uma membrana de nitrocelulose e, posteriormente, as proteínas de interesse são detectadas por imunoreactividade. Esta técnica foi utilizada para determinar a concentração relativa das proteínas NrF2, Hemeoxigenase I (HO-1) e actina.

II.V.i Determinação da concentração proteica

A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando soluções padrão de BSA (*Sigma-Aldrich*) de concentração conhecida.

Preparou-se uma diluição das amostras a analisar de 1/20 e 1/40 para as fracções citosólicas/totais e nucleares, respectivamente, para um volume final de 100 µL. Aplicou-se 20 µL de cada diluição e solução padrão, em triplicado, numa placa de 96 poços. A cada poço com amostra aplicou-se 200 µL de reagente de Bradford (*Bio-Rad*) diluído 1/5. Após 10 min a incubar à temperatura ambiente e 45 segundos de agitação, mediu-se a absorvência das amostras a 595 nm num leitor de microplacas *Tecan Sunrise*, acoplado ao *software RdrOle4*.

II.V.ii Electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*)

As amostras, após determinada a sua concentração proteica foram diluídas por forma a aplicar-se a mesma quantidade proteica de cada amostra no gel. Analisou-se tipicamente cerca de 50 µg de extracto proteico citosólico, total ou nuclear.

As amostras proteicas, após diluídas em solução tampão de amostra (*Loading Buffer* - Vide secção Composição de Tampões em Anexo) e desnaturadas a 90°C por 5 min, foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida num sistema vertical descontínuo com um gel de resolução a 12,5% (m/v) e um gel de concentração a 5% (m/v) de [acrilamida/bisacrilamida 30:0,8% (m/v)], ambos com 1,5 mm de espessura, segundo as condições expostas no quadro Quadro II-2 e de acordo com as condições descritas por Laemmli 1970 e na secção “Preparação Geis Poliacrilamida”. A cada gel foi ainda adicionado em pelo menos um poço uma mistura de proteínas de massa molar conhecida (marcadores de massa molecular - *NzyTechColour Protein Marker II*).

Quadro II-2- Condições de voltagem e amperagem praticadas nos protocolos de SDS-PAGE. Foram utilizadas as fontes de tensão BIO-RAD PAC200 e Amersham Pharmacia Biotech EPS601.

Sistema	Amperagem	Voltagem
Bio-Rad Mini-Protean II	25 mA/gel	Sem limite
Home-made	40 mA/gel	150 V/gel

II.V.ii.i Preparação Geis Poliacrilamida

As soluções de acrilamida foram preparadas de acordo com o descrito no Quadro II-3. A polimerização foi iniciada pela adição de TEMED e PSA 10% (m/v).

Quadro II-3 – Reagentes e respectivos volumes utilizados para a preparação de 20 mL de gel de resolução e 10 mL de gel de concentração. Volume de solução que permite preparar 2 géis para o sistema Mini-Protean II ou 1 gel para o sistema Home-Made. Composição das soluções em anexo na secção Composição de Tampões.

Gel	12,5% (m/v) Resolução	5%(m/v) Concentração
Acrilamida 30% (m/v) bis-acrilamida 0,8%(m/v)	8,1 mL	1,7 mL
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	4,96 mL	0,625 mL
SDS 10% (m/v)	0,2 mL	0,10 mL
ddH ₂ O	6,8 mL	7,625 mL
TEMED	10 µL	10 µL
PSA 10% (m/v)	100 µL	100 µL

II.V.iii Transferência

Após terminada a separação por SDS-PAGE o gel de poliacrilamida e a membrana de nitrocelulose (Protan, Schleicher & Schuell) foram equilibrados em solução tampão de transferência (vide secção Composição de Tampões em Anexo) por 30 minutos e transferiram-se as proteínas do gel para membranas de nitrocelulose por *semi-dry electroblotting*, a 0,8mA/cm² de membrana a uma voltagem limitante de 25 V por uma hora, recorrendo a um *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad* segundo o esquema representado na Figura II-1.

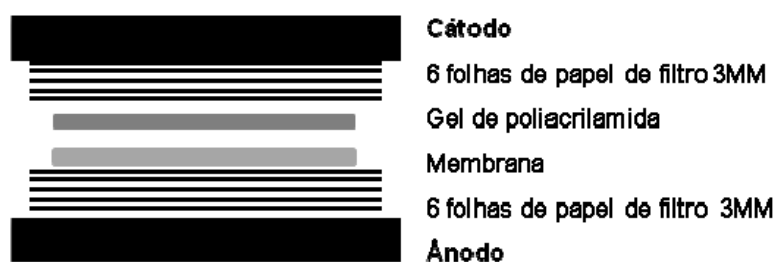


Figura II-1- Esquema da montagem do sistema de *semi-dry electroblotting*. O sistema é composto por dois conjuntos de 6 tiras de papel 3MM (Whatman 3MM Chr) saturados em solução tampão de transferência que pressionam o gel de poliacrilamida e a membrana e, por servirem de condutor eléctrico, fecham o circuito.

As membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau S* (vide secção Composição de Tampões em Anexo) para confirmar a uniformidade e eficiência da transferência.

II.V.iv *Western blotting*¹

As membranas após digitalizadas foram lavadas brevemente em solução *PBS* para remover a coloração por *Ponceau S* e foram bloqueadas 1 hora a temperatura ambiente com leite magro em pó (Molico Nestlé ®) a 5 % (m/v) em *PBS* sobre agitação orbital. As condições de incubação para os anticorpos utilizados foram optimizadas e encontram-se descritas no Quadro II-4.

Quadro II-4 Anticorpos Primários e Secundários com respectivas diluições utilizadas para a detecção das proteínas de interesse por *Western Blotting*. Os anticorpos foram diluídos na solução de bloqueio.

Proteína	Primário	Origem	Diluição	Secundário*	Origem	Diluição
Anti-NrF2	R&D 383727	Murganho	1:600	Sc2005	Cabra	1:2000
Anti-Heme	Enzo ADI-SPA-89	Coelho	1:1000	Sc2004	Cabra	1:5000
Oxigenase I						
Anti-Actina	Ab8227	Coelho	1:10000			

Sc - Santa Cruz Biotechnology; R&D - R&D System; Enzo - Enzo Life Sciences; Ab - abcam

*-conjugado com Peroxidase de Rábano

Todas as incubações foram feitas a temperatura ambiente e sobre agitação orbital, durante 2 horas para os anticorpos primários e 1 hora para os anticorpos secundários. As membranas foram lavadas em solução de *Tween-20* 0,1 % (v/v) em *PBS* e em solução *PBS* 3 vezes por 15 minutos após incubação com os anticorpos primários e secundários, respectivamente.

A imunorreactividade foi detectada recorrendo ao kit *ECL* (Amersham Biosciences), segundo instruções do fornecedor. Brevemente, as membranas foram incubadas 1 minuto na

¹ Protocolo adaptado a partir de Gershoni & Palade (Gershoni & Palade 1983).

solução ECL e o sinal detectado pela exposição a chapas auto-radiográficas (*Amersham Hyperfilm ECL System*). Estas últimas foram reveladas e fixas em revelador e fixador manual (*Kodac*), respectivamente.

II.V.iv.i Análise dos filmes obtidos por *Western Blotting*

Os filmes foram digitalizados e a intensidade das bandas obtidas foi determinada relativamente a banda controlo (extracto proteico de células que não foram expostas a qualquer tratamento), por recurso ao *software ImageJ*². Por forma a corrigir diferenças na quantidade total de proteína aplicada em cada poço do gel, utilizou-se como factor de correcção a intensidade relativa da coloração com vermelho de *Ponceau S* da área respectiva a cada poço.

II.VI Ensaios de Imunofluorescência

A localização celular das proteínas NrF2 e actina foi determinada por microscopia de imunofluorescência indirecta em células aderentes HeLa cultivadas em lamelas de vidro, conforme o descrito em RIGGS et al. 1958.

II.VI.i Preparação da montagem

Cultivaram-se lamelas de 22x22 mm em placas de 6 poços segundo as condições descritas no capítulo “Cultura Celular”. As lamelas, após a exposição ao H₂O₂, foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução *PBS* e as células fixas com 200 µL de paraformaldeído a 3,7 % (m/v) em *PBS* por 10 minutos. De seguida, as mesmas foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução *PBS* por 5 minutos e permeabilizadas com 300 µL de Triton 0,1 % (v/v) em solução *PBS* por 2 minutos. Após 2 lavagens de 5 minutos com 1 mL de solução *PBS* e uma lavagem com 1 mL de Tween-20 0,1 % (v/v) em solução *PBS* as lamelas foram incubadas 30 minutos com BSA (*Calbiochem*) 3 % (m/v) em *PBS*.

De seguida, as amostras foram incubadas com 40 µL de solução de anticorpo primário durante 1 hora e incubadas com 40 µL de solução de anticorpo secundário por 30 minutos, segundo o protocolo descrito no Quadro II-5. Após cada incubação as amostras foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução *PBS* por 5 minutos e depois uma vez com Tween-20 0,1 % (v/v) em solução *PBS*.

² Rasband, W.S (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 1997

Quadro II-5 – Anticorpos primários e secundários utilizados e respectivas diluições utilizadas no protocolo de imunofluorescência indirecta. As marcações duplas foram feitas por incubação simultânea dos dois anticorpos.

Proteína	Primário	Diluição	Origem	Secundário	Diluição	Origem	Coloração
NrF2	Sc-722	1/75	Murganho	IM Alexa Fluor 498	1/500	Cabra	Verde
				IM Alexa Fluor 647	1/500	Cabra	Vermelha
Actina	IM Phalloidina	1/200	--	--	--	--	Vermelha

Sc - Santa Cruz Biotechnology; IM - Invitrogen Molecular Probes;

A seguir, os núcleos foram marcados com 40 μ L de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilidole, *Sigma-Aldrich*) diluído 1/750 (v/v) em água durante um minuto e as lamelas lavadas 1 vez com 1 mL de solução PBS por 10 minutos. As lamelas foram montadas em lâminas de vidro com 10 μ L de meio de montagem MOWIOL 4-88 (*Calbiochem*) suplementado com 2,5% (m/v) de DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano - *Sigma-Aldrich*). Todos os procedimentos foram feitos 20-25°C e defendidos da luz.

II.VI.ii Processamento das amostras

II.VI.ii.i Captura de imagens

As amostras foram observadas num microscópio de fluorescência *Olympus Bx41*, acoplado a uma fonte *Olympus U-RFL-T*. As imagens representativas da preparação foram capturadas com uma câmara fotográfica digital *Olympus CAMEDIA C-4040 Zoom* auxiliada por uma objectiva *Olympus C3040-ADV*, acoplada a um adaptador *Olympus U-CMAD3*.

II.VI.ii.ii Análise das imagens

Os dados obtidos foram analisados por recurso ao *software ImageJ*, auxiliado pelos suplementos *Color Profiler* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/color-profiler.html>) e *Colocalization Colormap* (<http://sites.google.com/site/colocalizationcolormap/home>).

a) ANÁLISE DO PERFIL DE FLUORESCÊNCIA

Primeiro, procedeu-se à montagem das imagens compostas pelos 3 canais (vermelho, verde e azul – RGB), com auxílio do programa *ImageJ* e, seguidamente, traçou-se uma recta transversal à célula que abranja tanto o citosol como o núcleo da mesma, como exemplificado na Figura II-2. Por forma a minimizar a variação introduzida pela variabilidade da forma e do tamanho do núcleo em relação ao citosol de célula para célula, teve-se o cuidado de traçar a recta paralela ao eixo de maior diâmetro do núcleo. Teve-se ainda o cuidado de iniciar e

finalizar a recta de perfil numa área desprovida de células por forma a obter-se uma medida reprodutível e fidedigna do valor do *background* da imagem.

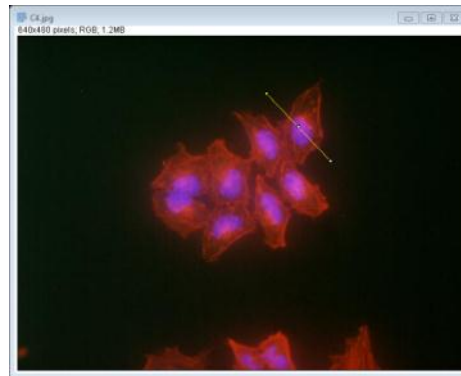


Figura II-2 - Exemplo da recta traçada transversalmente à célula utilizada para definir o perfil de fluorescência da mesma. Neste exemplo apresenta-se a imagem que resulta da sobreposição dos 3 canais capturados: a vermelho a proteína Actina, a verde a proteína Nrf2 e a azul (DAPI) os núcleos.

De seguida, por intermédio do suplemento Color Profiler determinou-se o perfil da intensidade de fluorescência para cada um dos canais presentes na imagem (vermelho, verde e azul- RGB) (Figura II-3). Os dados do perfil obtido foram guardados no formato *txt* para futura análise através do script escrito em linguagem Python® apresentado em anexo (Script em Python para análise do perfil de imunofluorescência).

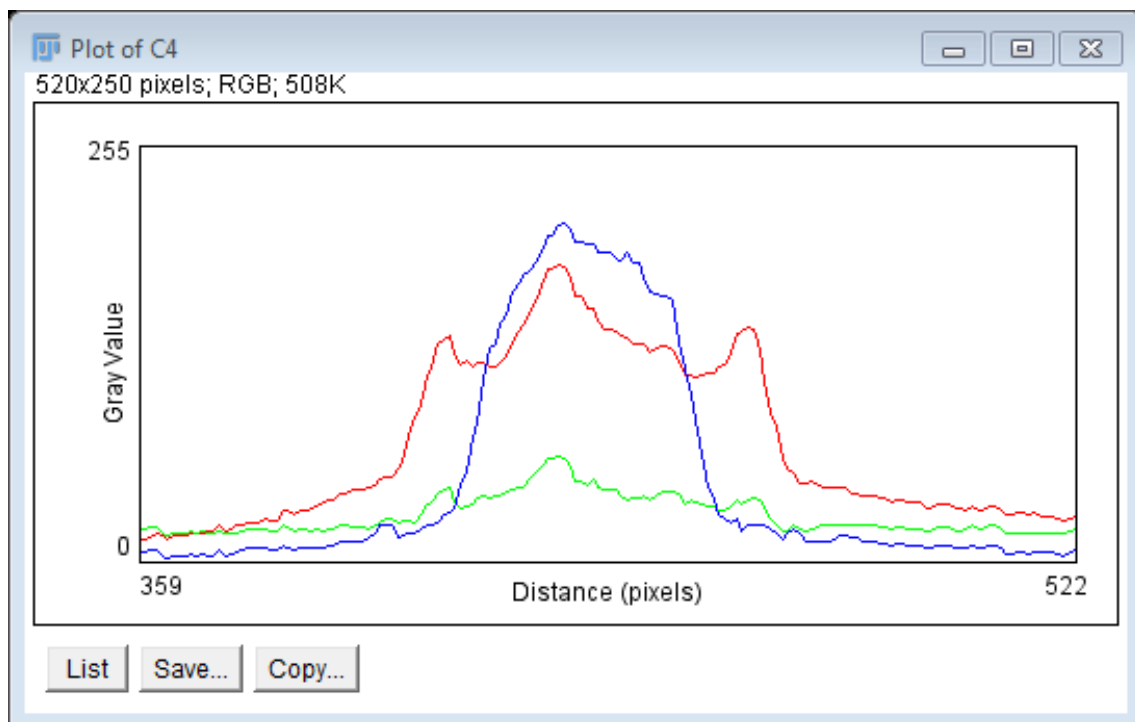


Figura II-3 - Exemplo de perfil de intensidade de fluorescência para os canais vermelho, verde e azul obtido a partir da célula exposta na Figura II-3.

A partir dos dados do perfil de fluorescência de cada célula e, por intermédio do *script* em linguagem Python® (*Script* em Python para análise do perfil de imunofluorescência), determinaram-se três parâmetros para o canal que representa a proteína de interesse:

- Razão da intensidade média de fluorescência no núcleo pela intensidade média de fluorescência do citosol, obtido através da equação:

$$\frac{\text{Média Intensidade Fluorescência Núcleo}}{\text{Média Intensidade Fluorescência Citosol}} \quad \text{Equação II-1;}$$

- Percentagem da fluorescência emitida pelo núcleo, dada pela equação:

$$\frac{\sum \text{Fluorescência Núcleo}}{\sum \text{Fluorescência Núcleo} + \sum \text{Fluorescência Citosol}} \quad \text{Equação II-2;}$$

- Distância ao núcleo que contém 50% da fluorescência total observada no citosol (Figura II-4). Este parâmetro indica, de forma indirecta, o nível de heterogeneidade da distribuição de fluorescência ao longo do citosol e, se esta última é mais intensa a distância curtas ou longas do núcleo.

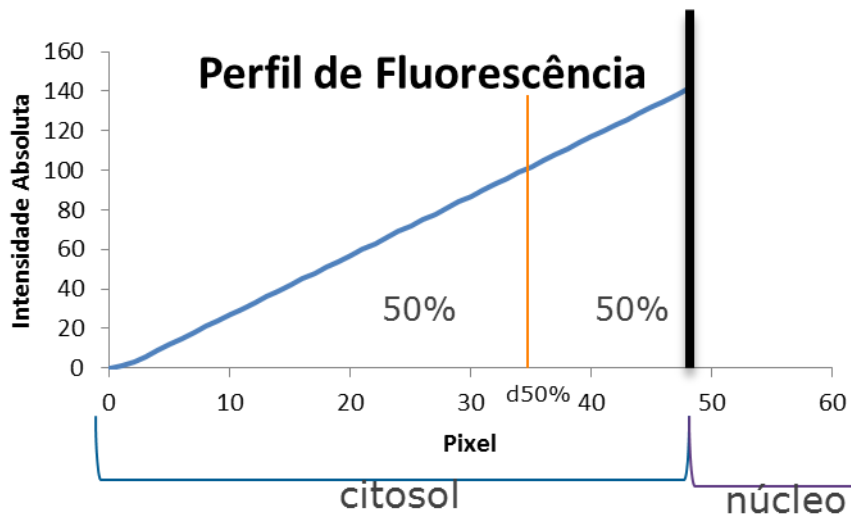


Figura II-4 - Representação gráfica da distância ao núcleo que contém 50 % da fluorescência observada no citosol. Neste caso apresenta-se uma situação em que a distribuição da fluorescência é heterogênea e mais intensa para distâncias próximas do núcleo.

De salientar que a análise do perfil de intensidade de fluorescência por recurso ao *script* em linguagem *Python*[®] apresenta as seguintes aproximações/limitações:

- O *background* foi definido como a média da fluorescência dos primeiros e últimos 15 *pixels* do perfil;
- O início do citosol da célula foi definido como o pixel a partir do qual a intensidade do sinal obtido é maior que o valor obtido para o *background* – o análogo foi definido para o fim do citosol;
- Os limites físicos do núcleo foram definidos como o ponto de inflexão da derivada do perfil de fluorescência para o canal azul – DAPI;

- De importância salientar que esta definição impõe que o perfil adquirido para cada célula apresente um componente do canal azul com um pico correspondente à posição do núcleo bem resolvido, como exposto na Figura II-3;
- Os perfis, por as imagens capturadas não terem origem num microscópio confocal, apresentam a limitação de a intensidade obtida para a zona do núcleo conter interferência da fluorescência proveniente da porção citosólica que se encontra na mesma área da célula.

b) ANÁLISE DA COLOCALIZAÇÃO

Para análise da colocalização procedeu-se a montagem das imagens compostas pelos 3 canais (vermelho, verde e azul – RGB), com auxílio do programa ImageJ e, seguidamente, por recurso ao suplemento *colocalization colormap* determinou-se a colocalização entre o canal vermelho e verde para cada *pixel*. Como descrito no *site* do suplemento (<http://sites.google.com/site/colocalizationcolormap/home>), é criada uma imagem contendo o mapa de colocalização *pixel a pixel* segundo uma escala colorida (Figura II-5 c). A escala distribui-se entre a cor azul (ausência de colocalização) e à cor vermelha (colocalização perfeita).

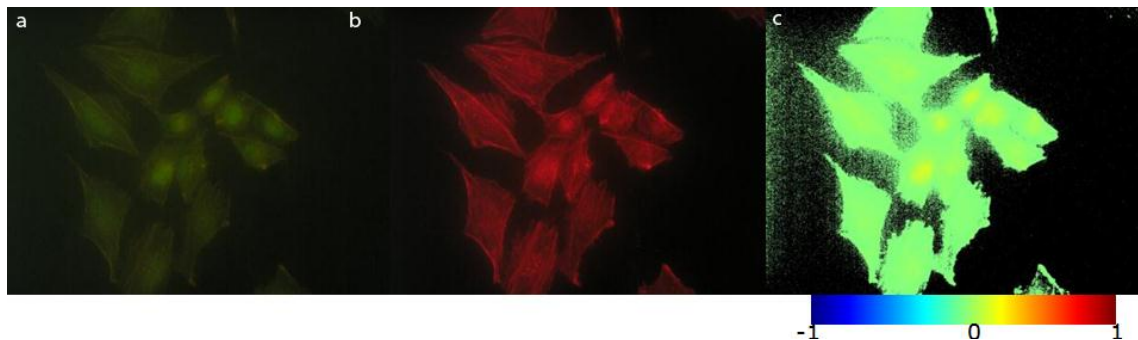


Figura II-5- Imagem representativa de: captura do canal a)verde e b) vermelho para um campo representativo da preparação total e c) mapa de colocalização com escala;

II.VII Extracção RNA total

A extracção de RNA total foi efectuada com o *kit MicroElute Total RNA (Ezra)*, segundo as instruções do mesmo. As células foram lavadas duas vezes com *PBS* anteriormente à lise com o kit. Os extractos de *RNA* total obtidos foram tratados com *DNase I* para remover o *DNA* genómico da solução. Este tratamento foi efectuada com o *kit DNase I, RNase Free* da *Fermentas Life Science*, segundo instruções do fornecedor.

II.VIII Electroforese em gel de agarose

As amostras de *RNA* foram diluídas em solução tampão amostra de *RNA* (Vide secção Composição de Tampões em Anexo) e separadas por electroforese em gel de agarose a 1 % (m/v) com *Greensafe* $2,5 \times 10^{-3}$ % (v/v) em solução tampão TAE (Vide secção Composição de Tampões em Anexo) num sistema horizontal *Hoefer Scientific Instruments Model He33* a 80 mV.

II.IX Análise Estatística

A análise geral e tratamento estatístico dos dados foram efectuados em *Microsoft Office Excel® v2010* e em *Systat SigmaStat® v3.5*. Para testar se a diferença entre as amostras tratadas em relação às amostras controlo era estatisticamente significativa recorreu-se ao método de *Holm-Sidak*.

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 Definição das condições experimentais

O trabalho experimental da tese de mestrado, desenvolvido ao longo do ano, foi executado após a determinação das condições experimentais óptimas necessárias à execução do seu plano de tarefas, tendo sido o primeiro passo a escolha dos anticorpos mais adequados a utilizar. Para tal, compararam-se os *western blots* obtidos com os anticorpos anti-NrF2 da *R&D systems* e *Santa Cruz Biotechnology* (C20) em extractos citosólicos de células HeLa (Figura III-1). Para o anticorpo anti-NrF2 da *R&D systems* (Figura III-1 a)) observou-se uma única banda com uma migração correspondente a aproximadamente a 65 kDa. Para o anticorpo da Santa Cruz Biotechnology (C20) (Figura III-1 b)) são observáveis pelo menos três bandas bem definidas com migrações que correspondem a estruturas com uma massa molecular inferior a 65 kDa. Estas bandas podem resultar de uma reactividade cruzada uma vez que Piccirillo et al. descreveram que o anticorpo anti-NrF2 C-20 da *Santa Cruz Biotechnology* apresenta reactividade cruzada. Os mesmos autores ainda afirmam que a banda correspondente à proteína NrF2 apresenta uma posição relativa que não corresponde exactamente à sua massa molecular e defendem que tal facto pode motivar a discrepância nas observações efectuadas por recurso a este anticorpo (Piccirillo et al. 2009).

Tendo em conta que a massa molecular da proteína NrF2 é de 67,8 kDa optou-se por utilizar o anticorpo da *R&D systems* nos estudos por *western blot*.

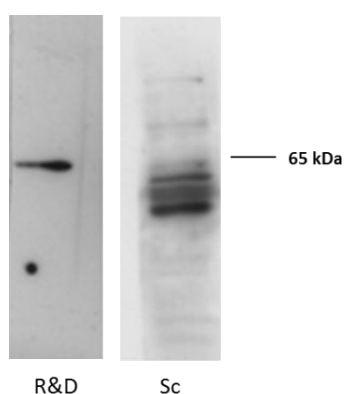


Figura III-1- Comparação dos *western blots* obtidos com os anticorpos anti-NrF2 da *R&D systems* (R&D) e *Santa Cruz Biotechnology* (Sc) em extractos citosólicos de células HeLa. As condições de ensaio foram: para o anticorpo da *R&D* uma diluição de 1/500 durante cerca de 18 h do anticorpo primário e 1 hora para uma diluição 1/2000 do anticorpo secundário sc2005; para o anticorpo da *Santa Cruz Biotechnology*, uma diluição de 1/100 durante cerca de 18 h do anticorpo primário e 1h para uma diluição 1/5000 do anticorpo secundário sc2004. Da observação da figura conclui-se que os resultados respectivos ao anticorpo anti-NrF2 C20 da *Santa Cruz Biotechnology* apresenta um número maior de bandas que os resultados respectivos ao anticorpo anti-NrF2 da *R&D Systems*.

Contudo, com o anticorpo anti-Nrf2 da *R&D Systems* foi ainda possível observar em determinados *western blots* anti-Nrf2 obtidos com o anticorpo da *R&D systems* duas bandas distintas com migrações muito próximas entre si (Figura III-2). Dada a velocidade de migração das duas bandas ser próxima a 65kDa, a qual é próxima à massa molecular prevista para a proteína Nrf2, conclui-se que as bandas identificadas correspondiam à proteína referida. Como as duas bandas se sobrepõem parcialmente entre si foi impossível proceder à quantificação independente das mesmas. A pequena diferença na migração observada entre as duas bandas sugere estas possam corresponder às isoformas da proteína Nrf2. Porém não foi possível descartar se correspondem a formas com uma modificação pós-transducional diferente, como por exemplo, fosforilação ou acetilação.

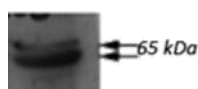


Figura III-2 Resultados obtidos por *western blot* de extractos proteicos citosólicos de células HeLa com anticorpo anti-Nrf2 da *R&D Systems*. No autoradiograma obtido são observáveis pelo menos duas bandas com migrações diferentes (assinaladas por intermédio de seta).

Nos extractos nucleares (Figura III-3 painel b)), observou-se a presença de uma banda com uma de migração que indica um produto com uma massa próxima dos 100 kDa. Esta observação sugere que a banda identificada possa corresponder ao complexo Nrf2-actina descrito por Kang e colaboradores (K. W. Kang et al. 2002) ou às formas fosforiladas da proteína Nrf2 (98 e 118 kDa) descritas por Pi et al em células de neuroblastoma humano (Pi et al. 2007).

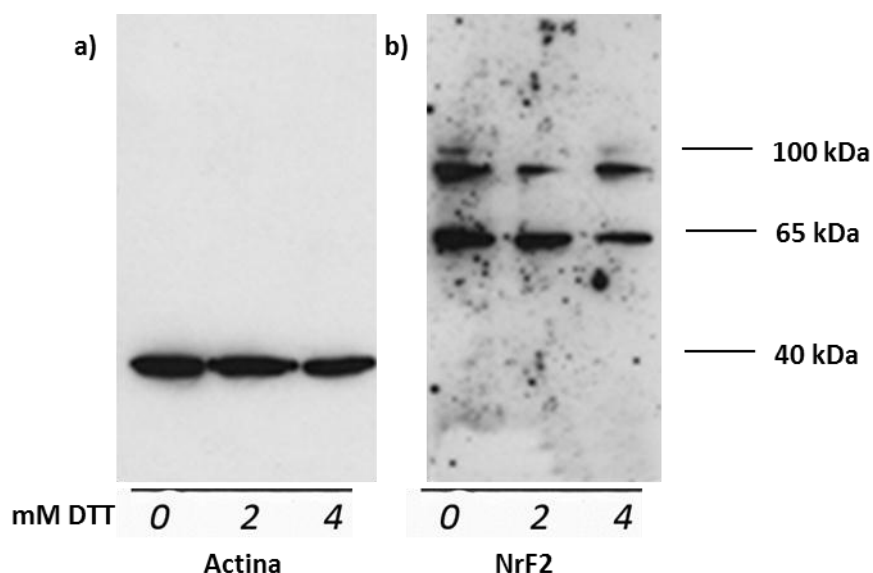


Figura III-3- Resultados obtidos por incubação simultânea de uma mesma membrana com a) anti-actina e b) anticorpo anti-Nrf2 em extractos nucleares controlo (sem tratamento). Foi ainda realizada uma titulação da concentração de DTT (0, 2 e 4 mM) na solução tampão de lise utilizada no processo de extracção proteica. Em extractos nucleares de células HeLa é observável uma banda com uma migração que sugere um produto com uma massa de 100 kDa.

Para testar a hipótese de a banda observada corresponder ao complexo NrF2-Actina efectuou-se a incubação da mesma membrana com anticorpo anti-NrF2 da *R&D Systems* e com o anticorpo anti-actina (Figura III-3). Uma vez que Kang e colaboradores afirmam que o complexo NrF2-Actina é induzido pela exposição de células *H4IIE* a *t-BHQ* (*tert-butyl-quinonona*) e reportaram que o complexo é dissociado por recurso a uma concentração de DTT superior na solução tampão de lise (4mM DTT), ainda se procedeu a uma titulação da concentração de DTT nas soluções tampão de lise utilizadas (0, 2 e 4 mM) durante as extracções proteicas por forma a testar se o complexo era sensível à concentração do agente redutor referido.

Por não ser observável uma banda com uma migração que sugira um produto com uma massa de 100 kDa na incubação com o anticorpo anti-actina (Figura III-3 a)) conclui-se que o produto observado para uma mesma região de massa molecular com o anticorpo anti-NrF2 (Figura III-3 b)) não deve corresponder a um complexo NrF2-actina. Reforça esta conclusão não ter sido observada uma influência da concentração do agente redutor DTT praticada na solução tampão de lise na intensidade da banda que sugere um produto com uma massa de 100 kDa. Esta observação sugere ainda a inexistência de uma ligação persulfureto entre duas proteína hipotéticas que constituem a banda referida. Porém é de ressaltar que o anticorpo utilizado para detectar a proteína actina pode não reconhecer a mesma em complexo com a proteína NrF2. Tal facto poderia ser explicado pela associação do complexo ocultar ou alterar a conformação do epítipo reconhecido pelo anticorpo anti-actina.

Como referido, Pi et al. descreveram a presença de duas formas fosforiladas da proteína NrF2 em células de neuroblastoma humano que apresentam uma migração menor (98 e 118 kDa) em relação à não fosforilada (68 kDa) e predominantes no núcleo. Posto isto, é possível que a banda observada para uma migração aproximada de 100 kDa corresponda a uma forma fosforilada da proteína NrF2. Contudo, como não foi testada tal hipótese, procedeu-se somente à quantificação da banda com uma migração próxima dos 65 kDa.

III.II Activação do Factor Transcrição NrF2 pelo H_2O_2 em células HeLa

Para apurar qual o comportamento do factor de transcrição NrF2 em resposta a um estímulo oxidativo mediado pelo H_2O_2 testou-se a sua activação em células HeLa e determinou-se o perfil dos seus níveis proteicos. Ainda se determinaram os níveis do enzima hemeoxigenase I (HO-1), cuja expressão génica é ampliada pela activação do sistema NrF2/Keap1 e é considerado como um controlo positivo da activação do mesmo.

III.II.i Titulação da concentração de H_2O_2 que promove a activação do sistema Nrf2/Keap1 em células HeLa – Exposição por adição bolus

De modo a delimitar a concentração de H_2O_2 que promove uma activação do sistema Nrf2/Keap1, considerando que a activação do sistema Nrf2/Keap1 passa por um aumento da concentração da proteína Nrf2 no compartimento nuclear, por translocação do citosol para o núcleo, determinou-se a evolução temporal dos níveis das proteínas Nrf2 e HO-1 nestes compartimentos celulares.

Determinou-se a evolução temporal do sistema em resposta a uma exposição por 10, 20 e 30 minutos para 50, 100, 200 e 400 μM de H_2O_2 finais por adição bolus nos níveis citosólicos e nucleares da proteína Nrf2 e citosólicos do enzima HO-1 por *western blot* (Figura III-4).

Da análise da Figura III-5 observa-se para os níveis nucleares da proteína Nrf2 um aumento estatisticamente significativo para uma exposição de 30 minutos a 50 μM de H_2O_2 e uma exposição por 20 e 30 minutos a 100 μM de H_2O_2 . Para as restantes condições experimentais não foi observável uma diferença estatisticamente significativa em relação à condição controlo. Esta observação sugere que uma exposição a uma dose superior conduz a uma activação do sistema Nrf2/Keap1 mais precoce. No entanto, para doses muito elevadas (200 e 400 μM) não se observou o aumento do Nrf2 no núcleo, indicando que a activação de Nrf2 se fará numa gama de concentrações de H_2O_2 relativamente estreita.

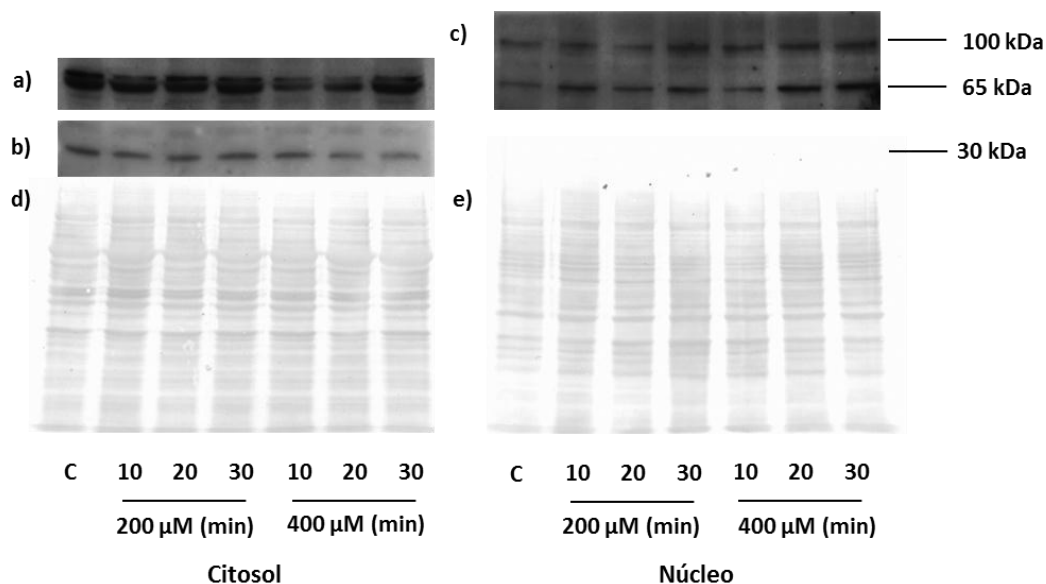


Figura III-4 – Exemplo de resultados obtidos por *western blot* para as exposições por adição bolus. Incubação de extractos citosólicos com a) anticorpo anti-Nrf2 da *R&D Systems*, b) anticorpo anti-hemeoxygenase 1 e c) de amostras extractos nucleares com anticorpo anti-Nrf2 da *R&D Systems*. As amostras foram expostas por 10, 20 e 30 minutos a 200 μM e 400 μM H_2O_2 . Coloração das membranas com amostras d) citosólica e e) nuclear com vermelho de *Ponceau S* que demonstram uma aplicação equitativa das amostras nos poços.

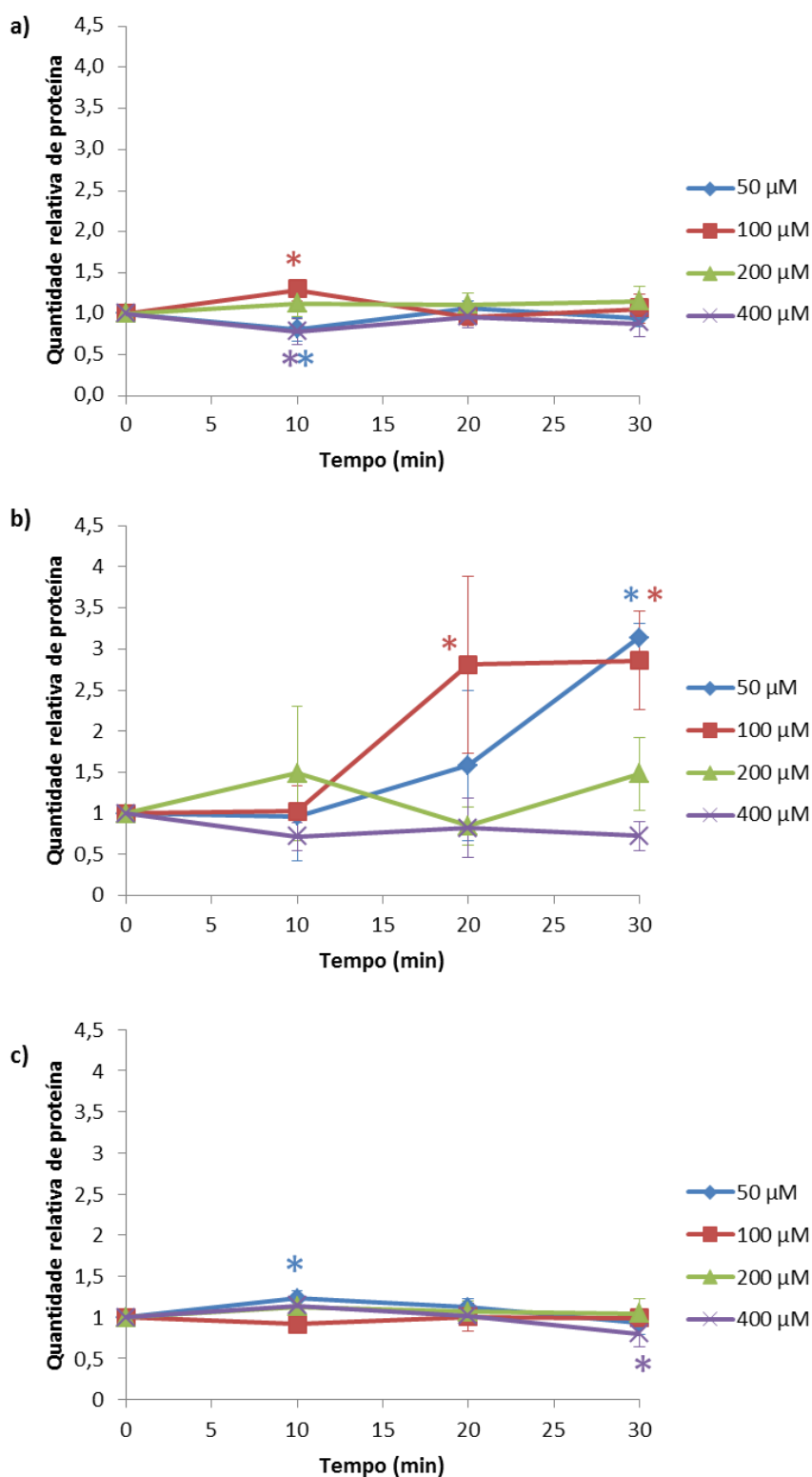


Figura III-5 – Representação gráfica dos níveis a) citosólicos e b) nucleares da proteína Nrf2 e c) citosólicos da proteína hemeoxygenase I determinados por *western blot* a doses bolus de (♦) 50, (■) 100, (▲) 200 e (×) 400 μ M. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos 3 replicados e as barras de erro ao desvio padrão populacional dos replicados analisados. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controle respectivo segundo o método de *Holm-Sidak*.

Para os níveis citosólicos da proteína NrF2 apenas foi observado um aumento estatisticamente significativo para uma exposição de 10 minutos 100 μ M. Porém, o significado biológico destas diferenças não é claro, pois doses de 50 e 400 μ M de H₂O₂ promovem uma ligeira diminuição dos níveis citosólicos da proteína NrF2 após 10 minutos de exposição. De salientar que as diferenças observadas foram de baixa intensidade podendo concluir-se que, de um modo geral, não foram encontradas variações biologicamente relevantes nos níveis citosólicos da proteína NrF2.

Os níveis citosólicos do enzima hemeoxigenase I não foram significativamente alterados na maioria das condições experimentais testadas. Porém, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para uma exposição por 10 minutos a 50 μ M de H₂O₂ e por 30 minutos a 400 μ M de H₂O₂. À semelhança do descrito para o factor de transcrição NrF2, as diferenças observadas são de baixa intensidade e os níveis proteicos do HO-1 na sua generalidade são idênticos aos da condição controlo, o que torna difícil atribuir um significado biológico às diferenças observadas.

A observação de não ocorrer variação dos níveis da proteína hemeoxigenase I nas condições ensaiadas poderá ser explicada pelo facto de só se ter observado os níveis da mesma até aos 30 min e, não ter havido tempo para que os níveis proteicos de HO-1 aumentassem em resposta à activação do sistema NrF2/Keap1. Este assunto voltará a ser analisado no ponto III.II.ii.

Para uma análise mais detalhada do efeito da concentração do H₂O₂ na activação do sistema NrF2/Keap1 e, dada a resposta rápida do NrF2, sujeitaram-se as células a adições bolus de H₂O₂ entre 12,5 μ M e 400 μ M de H₂O₂ para um tempo de 15 min (Figura III-6).

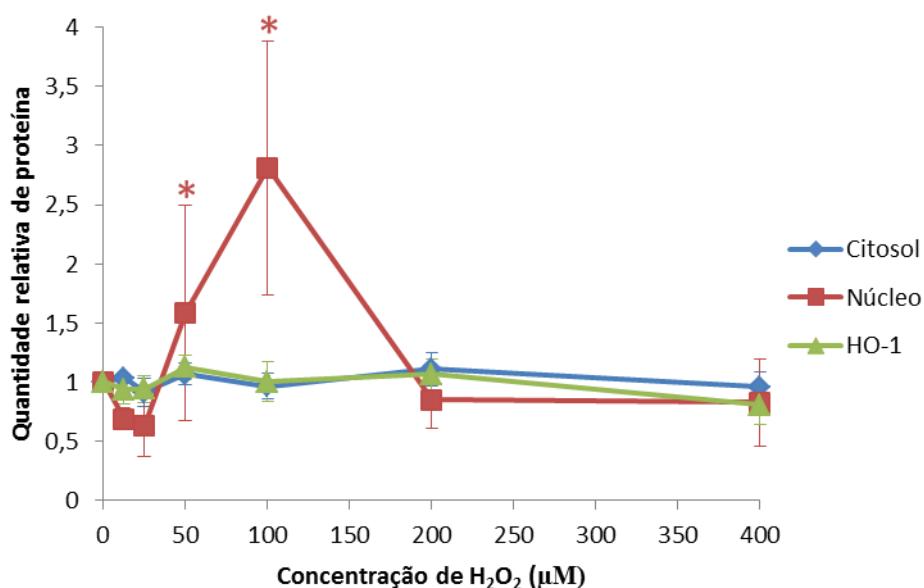


Figura III-6 – Representação gráfica dos níveis (♦) citosólicos e (■) nucleares da proteína NrF2 e (▲) citosólicos da proteína hemeoxigenase I após exposição por 15 minutos a: 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 μM H_2O_2 finais por adição bolus determinados por *western blot*. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos 3 replicados e as barras de erro ao desvio padrão populacional dos replicados analisados. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controlo respectivo segundo o método de Holm-Sidak.

A Figura III-6 torna muito perceptível que activação do sistema NrF2/Keap1, medida através dos níveis nucleares da proteína NrF2, ocorre numa gama de concentrações de H_2O_2 muito estreita, entre 50 e 100 μM . Confirma-se também a ausência de variações dos níveis citosólicos das proteínas NrF2 e HO-1. De salientar que a ausência de activação do sistema NrF2/Keap1 para concentrações mais elevadas de H_2O_2 já tinha sido observada. Ning e colaboradores descreveram que doses de H_2O_2 até 500 μM adicionadas por bolus em células endoteliais pulmonares conduzem a uma activação do sistema NrF2/Keap1 enquanto doses maiores que 500 μM adicionadas por bolus conduzem a uma diminuição da ligação da proteína NrF2 ao DNA e à sua exclusão nuclear (Ning et al. 2010). As diferenças nos valores de H_2O_2 que promovem uma activação do sistema NrF2 podem ser motivadas por os estudos serem efectuados em células de natureza distinta.

Para complementar a análise feita for *western blot*, determinou-se por imunofluorescência indirecta a localização celular da proteína NrF2. Na Figura III 6 encontram-se imagens representativas das capturadas para cada uma das condições experimentais ensaiadas. Da observação das imagens obtidas para a condição controlo (ausência de exposição a *stress* oxidativo) é possível concluir que a proteína NrF2 em condições basais encontra-se preferencialmente no núcleo, apresentando uma intensidade de fluorescência

baixa no citosol. Piccirillo et al. observaram igualmente uma maior intensidade de fluorescência da proteína NrF2 no núcleo em células de adenocarcinoma gástrico em condições controlo (Piccirillo et al. 2009). Esta observação confirma que em condições basais (ausência de exposição a *stress* oxidativo) a proteína NrF2 apresenta níveis citosólicos baixos. A maior intensidade de fluorescência no núcleo em relação ao citosol pode ser justificada por existir uma *pool* da proteína NrF2 no núcleo para assegurar a actividade basal do sistema NrF2/Keap1.

A análise das imagens capturadas para condições experimentais de exposição a doses de H₂O₂ é de difícil interpretação, pelo que torna subjectivo concluir que existem diferenças entre as diversas condições experimentais e a condição controlo. Posto isto, determinaram-se três parâmetros: a) razão entre a média da intensidade da fluorescência emitida pelo núcleo e a média da intensidade de fluorescência emitida pelo citosol; b) Percentagem da fluorescência total obtida que é emitida a partir do núcleo; c) distância ao núcleo que contém 50% da fluorescência total observada no citosol.

Os parâmetros a) e b) permitem determinar em que compartimento celular a proteína NrF2 é mais abundante enquanto o parâmetro c), como referido nos materiais e métodos, permite determinar de forma indirecta a heterogeneidade da distribuição da proteína NrF2 no citosol e, se esta se localiza preferencialmente a distância curtas ou longas da membrana nuclear.

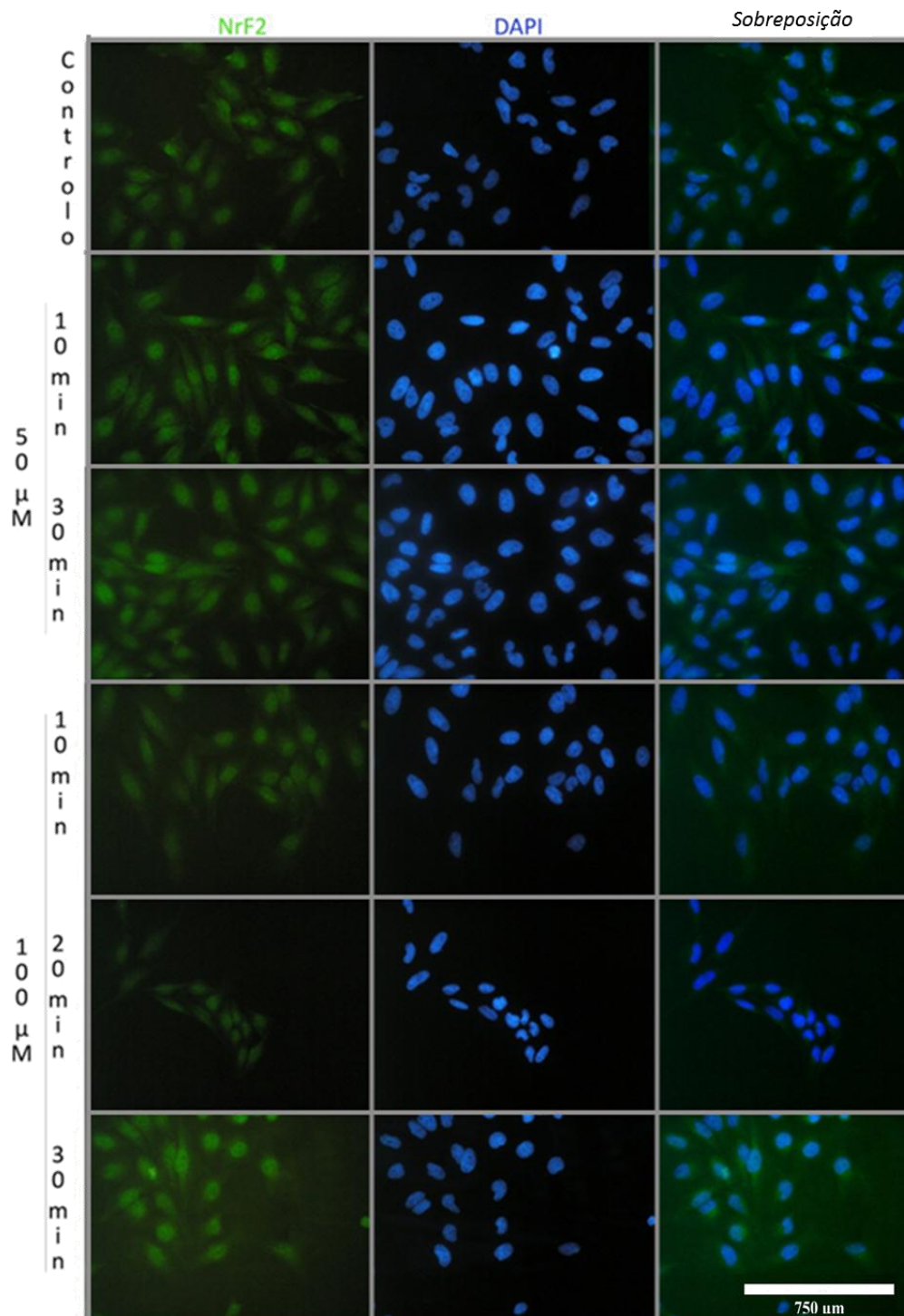


Figura III-7 - Imagens representativas das capturadas por imunofluorescência indirecta para análise dos fenótipos resultantes das exposições por adição bolus de 50 μM de H_2O_2 por 10 e 30 minutos e 100 μM de H_2O_2 por 10, 20 e 30 minutos. A proteína NrF2 encontra-se marcada pelo anticorpo da *Santa Cruz Biotechnology* (verde) e os núcleos pelo DAPI (azul). A sobreposição dos canais verde e azul permite identificar a região da célula que corresponde ao núcleo na imagem que corresponde à marcação da proteína NrF2.

Para o parâmetro a) razão entre a média da intensidade da fluorescência emitida pelo núcleo e a média da intensidade de fluorescência emitida pelo citosol observou-se que para as condições experimentais testadas (50 μM de H_2O_2 10 e 30 minutos e 100 μM H_2O_2 10, 20 e 30

minutos) os valores eram menores que o observado para a condição controlo (Figura III-8). A diferença observada em todas as condições experimentais é estatisticamente significativa, segundo o método de comparação múltipla de *Holm-Sidak*. Para o parâmetro b) percentagem da fluorescência total que é emitida a partir do núcleo, observou-se igualmente uma diminuição do valor obtido com a exposição às condições mencionadas (Figura III-8). Embora o perfil das diferenças para o parâmetro b) seja semelhante ao perfil obtido para o parâmetro a), as diferenças observadas são no geral de menor amplitude para o parâmetro b) (ver Quadro III-1), sendo que a diferença observada para os 10 minutos de exposição a 50 μM de H_2O_2 não é estatisticamente significativa segundo o método de *Holm-Sidak*.

A diminuição do valor dos parâmetros a) e b) para as condições experimentais indica que uma exposição ao H_2O_2 conduz a um favorecimento da localização citosólica para a proteína Nrf2. Contudo por *western blot* para uma exposição a 100 e 200 μM de H_2O_2 por adição bolus (Figura III-5) para intervalos de tempo iguais não foi observável um aumento dos níveis citosólicos da proteína Nrf2, apenas dos níveis nucleares da mesma proteína para uma exposição por 30 minutos a 100 μM e 20 e 30 minutos a 200 μM de H_2O_2 . A disparidade das observações pode ser devida a terem sido utilizados anticorpos diferentes para a detecção por *western blot* e imunofluorescência indirecta.

Como referido, Piccirillo et al. descrevem que o anticorpo anti-Nrf2 C-20 da *Santa Cruz Biotechnology* apresenta reactividade cruzada a qual pode estar no cerne da discrepância das observações efectuadas por recurso a este anticorpo (Piccirillo et al. 2009).

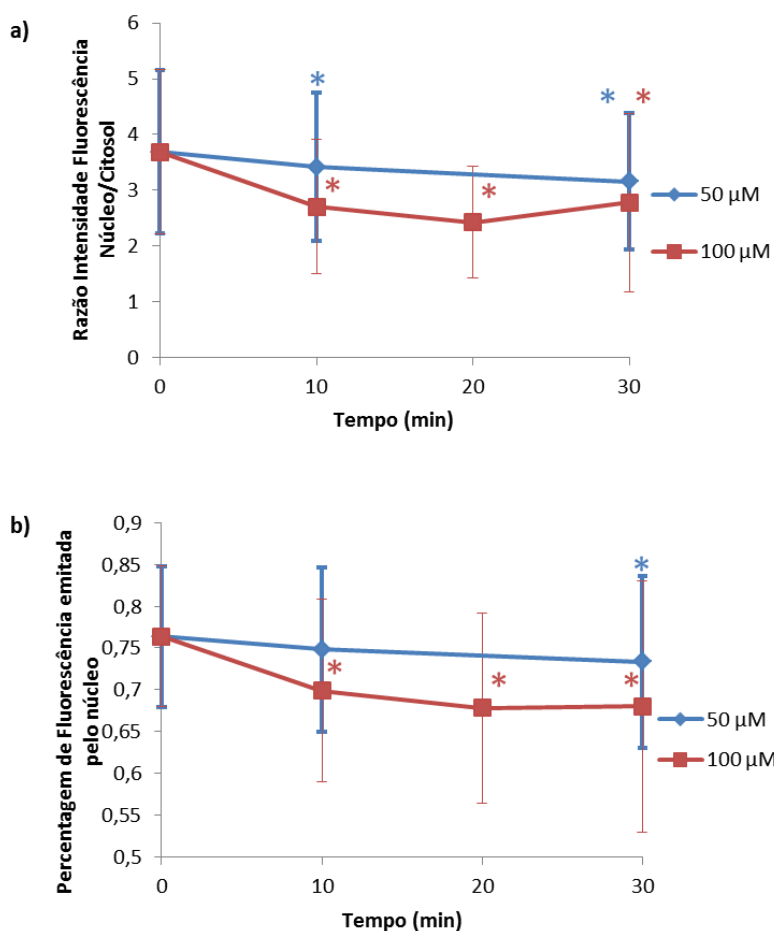


Figura III-8- Representação gráfica dos parâmetros determinados para análise das imagens capturadas a partir da imunofluorescência indirecta da proteína NrF2: a) Razão entre a média da intensidade da fluorescência emitida pelo núcleo e a média da intensidade de fluorescência emitida pelo citosol; b) Percentagem da fluorescência total obtida que é emitida a partir do núcleo; após exposição a (♦) 50 μM e (■) 100 μM de H_2O_2 por adição bolus. A média e desvio padrão expostos resultam da análise independente de pelo menos 100 células diferentes para cada condição experimental. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controlo respectivo segundo o método de *Holm-Sidak*. A metodologia da análise encontra-se descrita nos materiais e métodos e foi executada por recurso a um script escrito em linguagem Python® (Script em Python para análise do perfil de imunofluorescência).

Quadro III-1 – Valores da variação média observada para os parâmetros a) razão entre a média da intensidade da fluorescência emitida pelo núcleo e a média da intensidade de fluorescência emitida pelo citosol e b) percentagem da fluorescência total obtida que é emitida a partir do núcleo normalizados em relação à condição controlo respectiva.

Condição experimental	Razão Citosol/Núcleo	Percentagem Núcleo
Controlo	1	1
50 μM H_2O_2 10 min	0,927	0,980
50 μM H_2O_2 30 min	0,856	0,960
100 μM H_2O_2 10 min	0,734	0,915
100 μM H_2O_2 20 min	0,659	0,888
100 μM H_2O_2 30 min	0,754	0,891

Para o parâmetro c) distância ao núcleo que contém 50% da fluorescência observada no citosol (Figura III-9), obteve-se uma diminuição do valor médio para todas as condições experimentais em relação à condição controlo. Porém, apenas para as exposições a 100 μM de H_2O_2 estas apresentavam significado estatístico. Este acontecimento sugere que uma exposição a *stress* oxidativo conduz a uma localização preferencial desta na proximidade do núcleo, o que por sua vez, sugere que ocorra translocação citosol-núcleo da proteína NrF2. Esta observação é concordante com a de Piccirillo et al. que descrevem uma localização perinuclear da proteína NrF2 (Piccirillo et al. 2009).

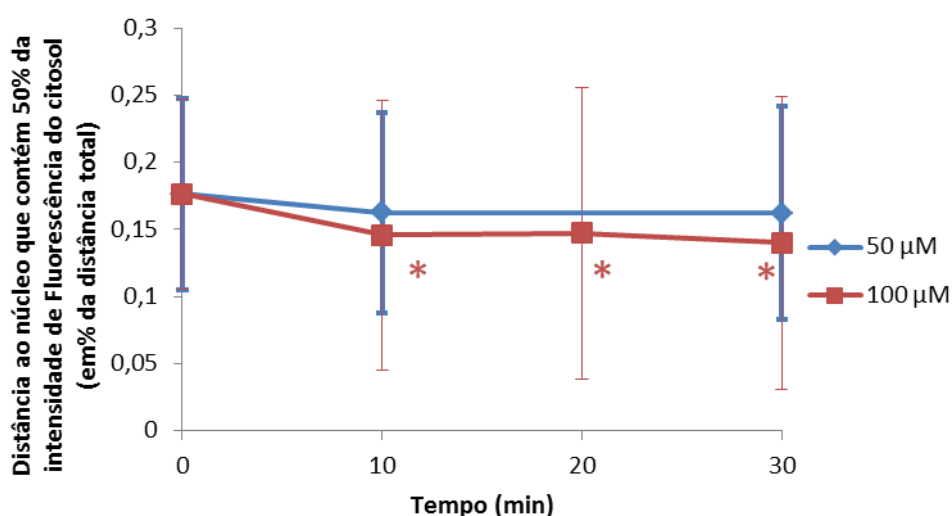


Figura III-9 Representação gráfica do parâmetro determinado para análise das imagens capturadas a partir da imunofluorescência indirecta da proteína NrF2 c) Distância ao núcleo que contém 50% da fluorescência total observada no citosol para uma exposição a (♦) 50 μM e (■) 100 μM de H_2O_2 por adição bolus. A média e desvio padrão expostos resultam da análise independente de pelo menos 100 células diferentes para cada condição experimental. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controlo respectivo segundo o método de *Holm-Sidak*.

Em suma, foi observado um aumento de cerca de 3 vezes dos níveis nucleares da proteína NrF2 para exposições por adição bolus para 50 e 100 μM de H_2O_2 finais dos dados obtidos por *western blot* enquanto o mesmo não foi observável para doses de 200 e 400 μM . Tal sugere que adições bolus entre 50 e 100 μM de H_2O_2 culminem numa activação do sistema NrF2/Keap1. De salientar que no entanto os dados obtidos por imunfluorescência indirecta sugerem um aumento da proteína NrF2 no citosol para uma exposição por adição bolus para 50 e 100 μM . A discrepância entre as duas técnicas pode ser devida, como referido, à utilização de anticorpos distintos em cada uma das metodologias. Como não foi observável um aumento dos níveis citosólicos da proteína HO-1 não é possível descartar a hipótese de o aumento dos níveis nucleares da proteína NrF2 não culminarem numa activação do sistema.

III.II.i.i Complexo nuclear NrF2-Actina e Colocalização entre a proteína NrF2 e a proteína actina

Como mencionado anteriormente, encontra-se descrito na literatura a colocalização entre a proteína NrF2 e a proteína F-actina que constitui os filamentos do citoesqueleto (Giudice et al. 2010; K. W. Kang et al. 2002; Martin et al. 2004; Piccirillo et al. 2009; Brigelius-Flohé & Flohé 2011). Kang e colaboradores reportaram a presença de um complexo NrF2/actina com 100 kDa no núcleo de células *H4IIE* após exposição a *t-BHQ* (do inglês tert-Butylhydroquinone) (K. W. Kang et al. 2002) e Piccirillo et al. descreveram em células de adenocarcinoma gástrico a sobreposição da translocação das proteínas NrF2 e F-actina e sugerem que a translocação da proteína NrF2 para o núcleo requeira um arranjo dos filamentos de actina (Piccirillo et al. 2009).

Observou-se por *western blot* (Figura III-3 b)) em extractos proteicos nucleares de células HeLa a presença de uma banda com uma migração que sugere um produto com uma massa próxima dos 100 kDa. No entanto não foi possível concluir por *western blot* se a banda observada correspondia ao complexo NrF2-Actina descrito por Kang e colaboradores.

Posto isto, testou-se a possibilidade de ocorrer a formação de um complexo NrF2-actina e de o mesmo ser induzido por exposição das células HeLa a uma dose de H_2O_2 por imunofluorescência indirecta. Para tal testou-se a hipótese de as proteínas NrF2 e actina colocalizarem em condições controlo e após uma exposição de 10 e 30 minutos a 50 μM e de 10, 20 e 30 minutos a 100 μM de H_2O_2 final (Figura III-10).

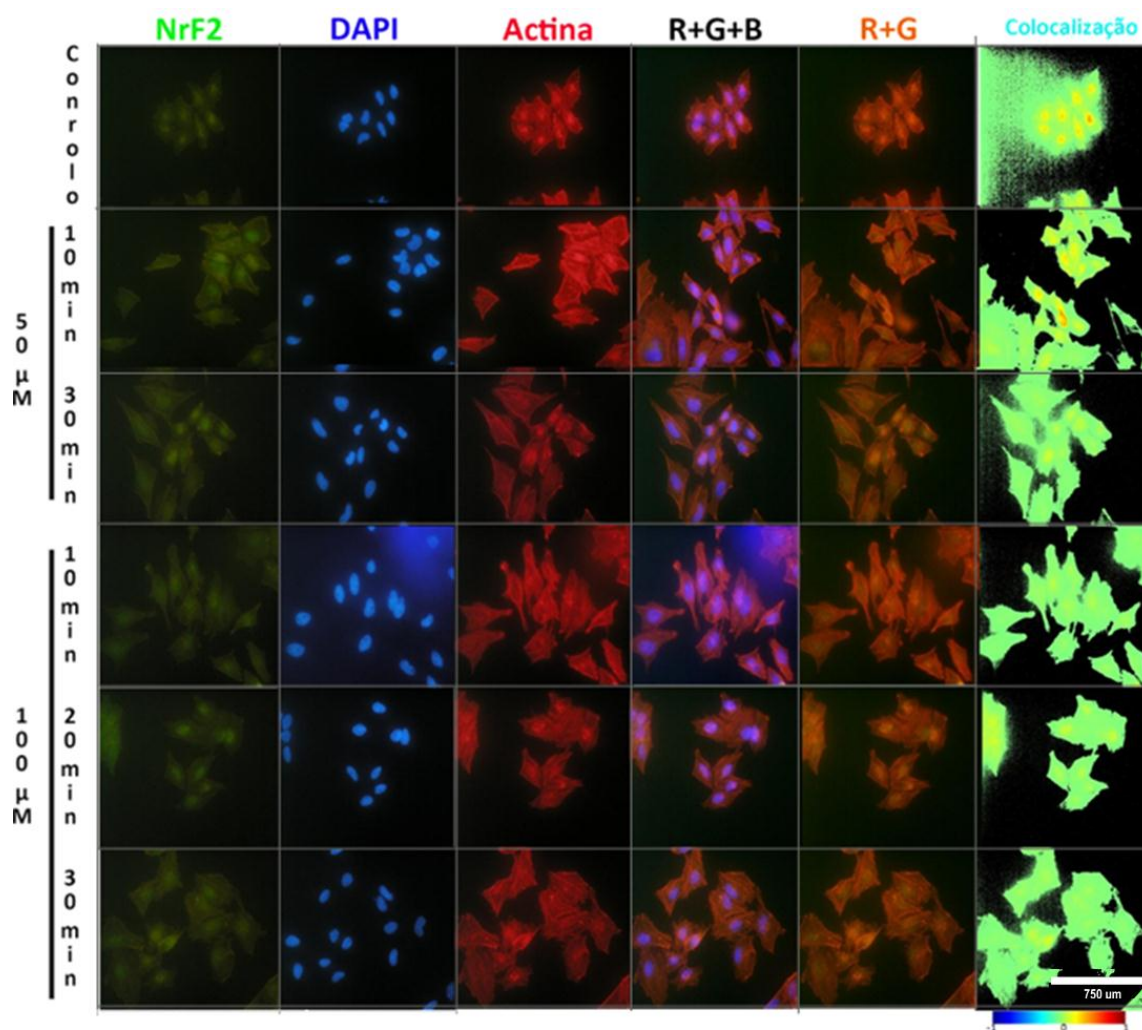


Figura III-10 Imagens representativas das capturadas para a análise da colocalização da proteína NrF2 (verde) com a proteína actina (vermelho) após exposição por 10 e 30 minutos a 50 μM e de 10, 20 e 30 minutos a 100 μM de H_2O_2 . A azul encontra-se marcado os núcleos (DAPI). Mostrada sobreposição dos canais vermelho, verde e azul (R+G+B) e dos canais verde e vermelho (R+G). Ainda se apresenta a imagem da colocalização entre os canais verde e vermelho segundo o *script Colocalization Colormap* descrito nos materiais e métodos, com uma escala que se distribui entre a cor azul (ausência de colocalização) e a cor vermelha (colocalização perfeita).

A sobreposição da emissão verde e vermelha dá origem à cor amarela, pelo que locais em que a proteína NrF2 e a proteína actina se encontrem fisicamente próximas emitiriam uma cor amarela. A sobreposição parcial das duas cores origina uma cor alaranjada. Posto isto, concluiu-se pela análise visual da imagem da sobreposição dos canais verde e vermelho (R+G) que não ocorre localização entre as duas proteínas quer para a condição controlo, quer para as condições experimentais ensaiadas. Porém é de referir que as células apresentam uma coloração alaranjada global na imagem da sobreposição dos canais vermelho e verde, o que sugere que a possibilidade de haver colocalização parcial entre as duas proteínas. Assim, a colocalização dos dois canais foi testada por recurso ao *script Colocalization Colormap*, como

descrito na secção materiais e métodos. O mapa de colocalização resultante confirma que não existe sobreposição dos dois canais e, consequentemente, colocalização das duas proteínas.

De salientar que os núcleos de algumas das células apresentam, como demonstrado na Figura III-10, locais de sobreposição parcial (cor amarela no mapa de colocalização) e sobreposição total (cor vermelha no mapa de colocalização). Embora esta observação sugira uma colocalização entre as duas proteínas no núcleo, confirmando a possibilidade da formação de um complexo NrF2-actina no núcleo, como descrito por Kang e colaboradores, é de salientar que o resultado pode não ser significativo. Tal deve-se ao facto de a imagem obtida para o canal verde apresentar a possibilidade de estar contaminada com emissão vermelha, proveniente neste caso da proteína actina (Figura III-11). Isto pode resultar num resultado falso positivo na sobreposição dos canais verdes e vermelho, criando um artefacto no que toca a colocalização das duas proteínas (Figura III-12).

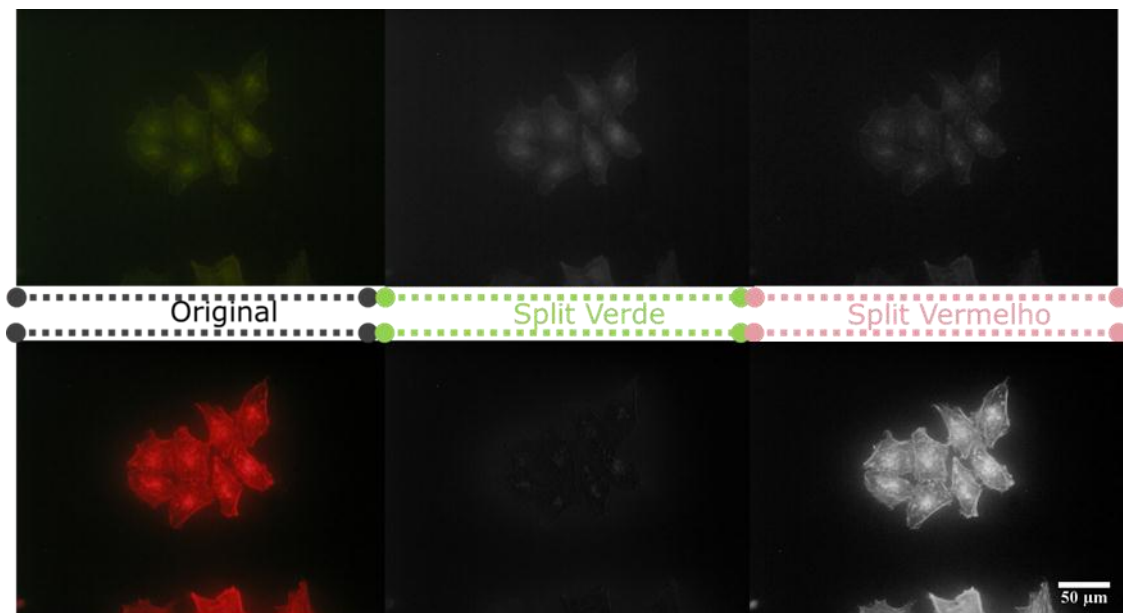


Figura III-11 – O *split* das imagens obtidas por imunofluorescência indirecta para os canais verdes e vermelho por recurso ao *software ImageJ* demonstram a contaminação do canal verde com imunofluorescência vermelha. No painel superior encontra-se da esquerda para a direita a imagem representativa da captura do canal verde por imunofluorescência, o *split* com a coloração verde e o *split* com a coloração vermelha presente na mesma imagem. No painel inferior encontra-se uma construção igual para uma imagem representativa do canal vermelho capturado por imunofluorescência.

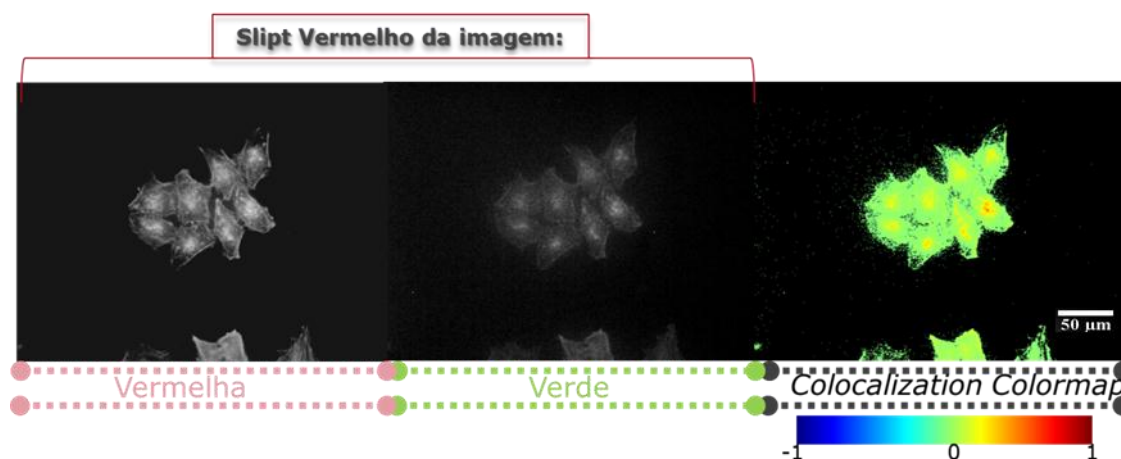


Figura III-12 A comparação visual e o mapa de colocalização obtido para as imagens respeitantes ao *split vermelho* dos canais verde e vermelho capturados por imunofluorescência (Figura III-11) demonstram a contaminação do canal verde com imunofluorescência vermelha e, que esta resulta num resultado falso positivo para o teste de colocalização. Escala de colocalização como descrita na Figura III-10

Em suma, é impossível concluir através dos dados de imunofluorescência obtidos sobre a presença de um complexo NrF2-Actina, porém os dados obtidos por *western blot* sugerem que este não exista em células HeLa.

III.II.ii Cinética da activação do sistema NrF2/Keap1 por exposição em estado estacionário a 12,5μM H₂O₂ final – incubação até 6 horas

Como descrito, a exposição com estados estacionários de H₂O₂ representa uma metodologia que permite um melhor controlo sobre a incubação com o H₂O₂ e representa um método mais fisiológico de exposição de células ao H₂O₂. Deste modo, procedeu-se à exposição de células HeLa a um estado estacionário de 12,5 μM e determinaram-se as concentrações relativas da proteína NrF2 no citosol e núcleo e a concentração relativa da proteína HO-1 no citosol por *western blot* (Figura III-13). Esta concentração de H₂O₂ modula o sistema do NF-κB (de Oliveira-Marques et al. 2007) e, é também uma concentração que induz o fenómeno da adaptação em células HeLa (Grácio 2011).

Da análise da Figura III-14 salienta-se o facto dos níveis citosólicos da proteína NrF2 apresentarem um aumento substancial (aproximadamente 55%) para os primeiros 15 minutos de exposição seguida de uma diminuição para níveis controlo que se conservam a partir das 2 horas de exposição. Observou-se, simultaneamente à diminuição dos níveis citosólicos da proteína NrF2, um aumento progressivo da média dos níveis nucleares da proteína NrF2 de valores menores para maiores que os observados para o controlo. Aos 120 minutos os níveis nucleares da proteína NrF2 atingem um valor máximo com um aumento de aproximadamente

de 33% em relação ao controlo. Estas observações sugerem que ocorra uma rápida síntese da proteína NrF2, seguida de uma translocação da proteína NrF2 do citosol para o núcleo e, assim, uma activação do sistema NrF2/Keap1. De seguida os níveis nucleares da proteína NrF2 diminuem e mantêm-se até às 6 horas de exposição valores menores que os observados na condição controlo.

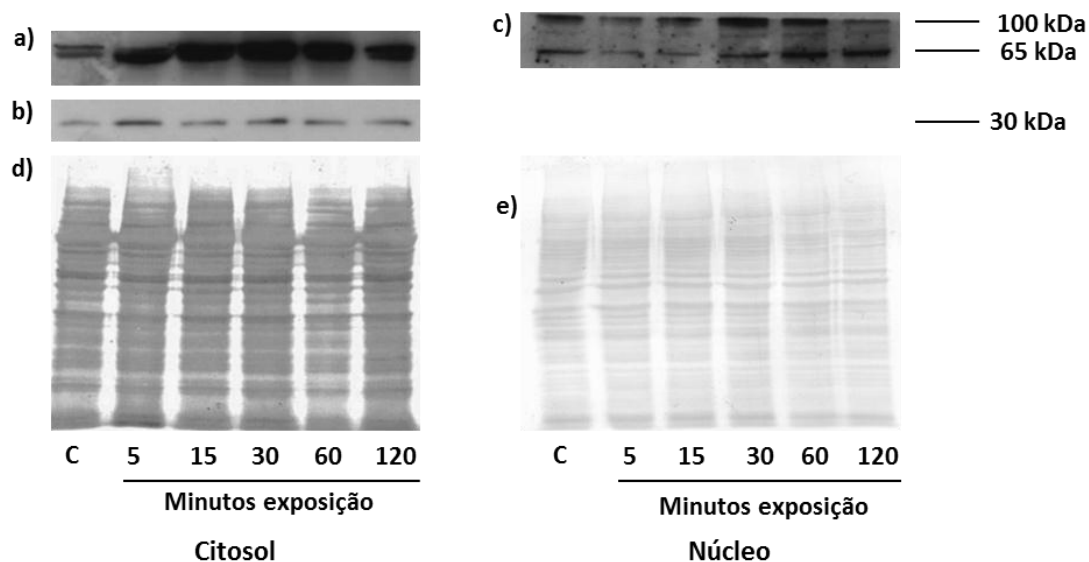


Figura III-13- Exemplo de resultados obtidos por *western blot* para as exposições em estado estacionário a $12,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . Incubação de extractos citosólicos com a) anticorpo anti-NrF2 da R&D Systems, b) anticorpo anti-Hemeoxygenase 1 e c) de amostras extractos nucleares com anticorpo anti-NrF2 da R&D Systems). As amostras foram expostas por 10, 20 e 30 minutos a $200 \mu\text{M}$ e $400 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Coloração das membranas com amostras d) citosólica e e) nuclear com vermelho de Ponceau S que demonstram uma aplicação equitativa das amostras nos poços.

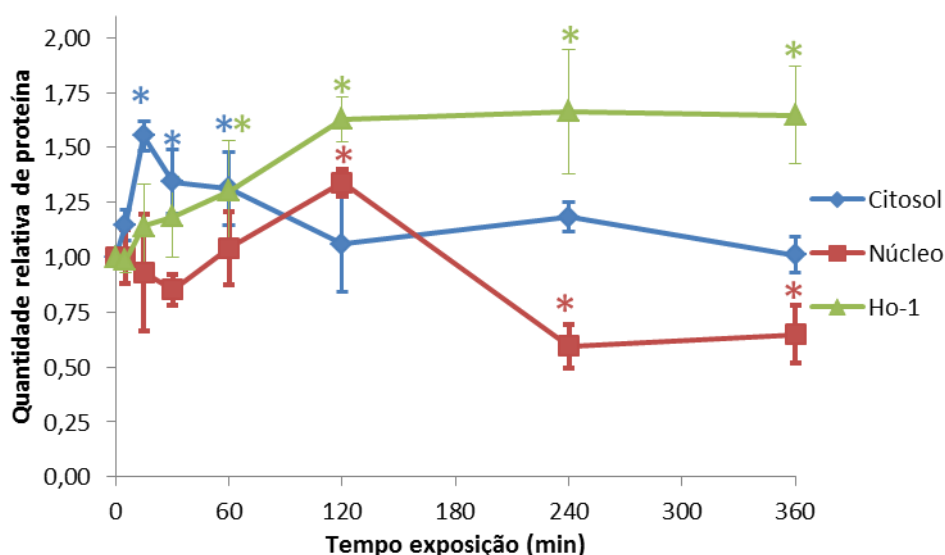


Figura III-14 Representação gráfica dos níveis (♦) citosólicos e (■) nucleares da proteína NrF2 e (▲) citosólicos da proteína hemeoxygenase I após exposição a um estado estacionário de $12,5 \mu\text{M}$ H_2O_2 , determinados por *western blot*. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos 3 replicados e as barras de erro ao desvio padrão populacional dos replicados analisados. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controlo respectivo segundo o método de Holm-Sidak.

Tal evidencia uma eliminação da proteína NrF2 do compartimento nuclear, o que sugere que após uma exposição prolongada ao H_2O_2 ocorre uma inactivação do sistema NrF2/Keap1. Esta exclusão da proteína NrF2 do núcleo, tal como referido na introdução teórica, pode ser suportada pelo restar e/ou aumento da degradação proteossomal da proteína NrF2 mediada pela proteína Keap1 e/ou pela sinalização por cascata de fosforilações iniciada pela proteína *GSK3*. O gene que codifica para a proteína Keap1 ao apresentar uma sequência *ARE* é regulado pela proteína NrF2, o que cria um mecanismo de retroacção negativa que é responsável pela inactivação do sistema NrF2/Keap1. Este evento é importante para prevenir os efeitos nefastos de uma activação prolongada do sistema NrF2/Keap1 (Kwak & Kensler 2010; D. D. Zhang 2010).

Para o nível médio da proteína hemeoxigenase 1 observa-se um aumento progressivo desde os 15 minutos até aos 120 minutos de exposição (aproximadamente 60% em relação à condição controlo) que se conserva até às 6 horas de exposição. A diferença observada apresenta significado estatístico para períodos de exposição superior a 1 hora, o que suporta a hipótese desta proteína necessitar de um tempo relativamente longo para ser expressa. Posto isto, concluiu-se que a proteína HO-1 não se apresenta como um bom indicador da actividade do sistema NrF2/Keap1 em células HeLa.

Embora o enzima hemeoxigenase I seja considerado, por padrão, um indicador do nível da actividade do factor de transcrição NrF2, sendo inclusive em muitos estudos utilizado como controlo positivo da presença de actividade do sistema NrF2/Keap1, neste caso o aumento dos níveis proteicos de HO-1 aparentam ser prematuros em relação à activação do sistema NrF2/Keap1.

Segundo os níveis nucleares da proteína NrF2, apenas existe uma translocação da proteína NrF2 para o núcleo estatisticamente significativa a partir das duas horas de exposição. Como é expectável um aumento dos níveis da proteína NrF2 no núcleo previamente a uma acção de regulação da expressão génica via NrF2, este encadeamento de observações sugere que o incremento dos níveis do enzima HO-1 não seja mediado pelo NrF2, pelo menos para tempos curtos de exposição.

Contudo não se pode excluir a hipótese de ocorrer activação do sistema NrF2/Keap1 previamente ao aumento dos níveis nucleares da proteína NrF2 às duas horas de exposição. Tal poderia ser explicado por a tempos curtos de exposição a $12,5 \mu M$ de H_2O_2 em estado estacionário ocorrer a conversão da proteína NrF2 presente no núcleo numa forma activa do ponto de vista transcricional e, portanto, capaz de regular a expressão génica. Como já referido Pi et al. descrevem a presença de 3 isoformas da proteína NrF2 no núcleo com

propriedades de migração diferentes e afirmam que somente a forma fosforilada com 98 kDa apresenta capacidade de regular a expressão génica em células de neuroblastoma.

De salientar que após o máximo dos níveis da proteína NrF2 no núcleo (120 minutos) ocorre a estabilização dos níveis da proteína HO-1. Esta observação pode estar relacionada com um tempo elevado de semi-vida do enzima hemeoxigenase I. Este apresenta um tempo de semi-vida de 6 horas em células renais (Pimstone et al. 1971) e de 15 horas em células embrionárias de fígado de pinto após tratamento com heme (Srivastava et al. 1993) e em hepatócitos após exposição a iões metálicos (Sardana et al. 1982).

Em suma, os perfis proteicos obtidos mostram uma activação do sistema NrF2 para as condições testadas neste ensaio (12,5 μM H_2O_2 por exposição em estado estacionário). No entanto, não é clara a correlação entre o nível nuclear da proteína NrF2 e o nível do enzima hemeoxigenase I.

Para uma análise mais detalhada do efeito da concentração de H_2O_2 na activação do sistema NrF2/Keap1 e, dada a resposta rápida dos níveis citosólicos de NrF2 observada na Figura III-14, determinaram-se os níveis citosólicos e nucleares da proteína NrF2 e citosólicos da proteína heme oxigenase I, por western blotting, após 15 minutos de exposição a 12,5, 25 e 50 μM de H_2O_2 *state* (Figura III-15).

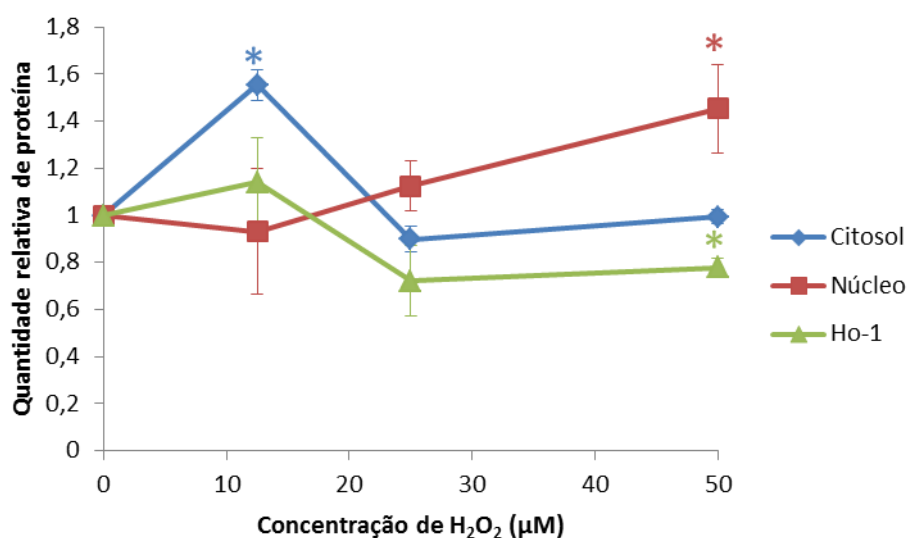


Figura III-15 – Representação gráfica dos níveis (♦) Citosólicos e (■) Nucleares da proteína NrF2 e (▲) citosólicos da proteína heme oxigenase I após exposição por 15 minutos a 12,5, 25, 50 μM H_2O_2 finais por em estado estacionário determinados por *western blot*. OS valores apresentados correspondem à média de pelo menos 3 replicados e as barras de erro ao desvio padrão populacional dos replicados analisados. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controlo respectivo segundo o método de *Holm-Sidak*.

Relativamente aos níveis citosólicos da proteína NrF2 foi observado um aumento para uma exposição a 12,5 μM de H_2O_2 com significado estatístico e para as restantes condições experimentais os níveis desta proteína no citosol apresentaram-se semelhante à condição

controle. Para os níveis nucleares da mesma proteína foi observável um aumento progressivo da média entre os 12,5 e os 50 μM de exposição de valores semelhantes aos observados na condição controle para valores 50% superiores respectivamente. Porém apenas para uma exposição a 50 μM de H_2O_2 em estado estacionário a diferença foi estatisticamente significativa. A relação do valor médio da quantidade proteica de NrF2 no núcleo com a concentração de H_2O_2 praticada sugere que concentrações superiores de H_2O_2 por intermédio de exposição em estado estacionário culminem num aumento de maior intensidade da proteína NrF2 no núcleo para um mesmo intervalo de tempo.

Tendo em conta o perfil que define a cinética de activação do sistema NrF2/Keap1 obtido para uma exposição em estado estacionário de 12,5 μM (Figura III-14) e, considerando que o comportamento do sistema será semelhante para outras concentrações que promovam a sua activação, espera-se observar um aumento dos níveis citosólicos da proteína NrF2 anteriormente ao diminuir dos mesmos níveis simultaneamente a um aumento dos níveis nucleares. Posto isto, tendo em conta que para um mesmo tempo de exposição (15 minutos) para um concentração de 12,5 μM se observou um aumento dos níveis citosólicos da proteína NrF2 sem alteração dos níveis nucleares da mesma proteína e para uma concentração de 25 e 50 μM se observou um aumento dos níveis nucleares da proteína NrF2 sem se observar aumento da mesma proteína no citosol é possível concluir que a exposição a uma concentração maior de H_2O_2 culmina num aumento mais precoce dos níveis nucleares da proteína NrF2 e, portanto, numa possível activação do sistema NrF2/Keap1 mais célere.

Para os níveis citosólicos da proteína HO-1, embora se observe uma variação dos níveis para uma exposição por 15 minutos a 50 μM de H_2O_2 , não se observam grandes variações para os níveis deste enzima, provavelmente por se ter praticado um ensaio de curto tempo.

Em suma, foram observados comportamentos que sugerem uma activação do sistema NrF2/Keap1 por exposição em estado estacionário para 25 μM e 50 μM finais. Ainda se concluiu que doses superiores de H_2O_2 em estado estacionário culminam numa activação do sistema mais célere.

Talvez o resultado mais significativo obtido seja o aumento substancial dos níveis citosólicos da proteína NrF2 para os primeiros 15 minutos de exposição a uma 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário (Figura III-14 e Figura III-15).

Posto isto, considerou-se a hipótese de o incremento dos níveis citosólicos da proteína NrF2 ser sustentado por um aumento dos níveis totais da proteína NrF2 por síntese *de novo*. Para testar esta hipótese mediram-se por *western blot* os níveis totais das proteínas NrF2 e hemeoxigenase I após uma exposição em estado estacionário a 12,5 μM de H_2O_2 por 5, 15 e 30 minutos e ainda 1 e 2 horas (Figura III-16).

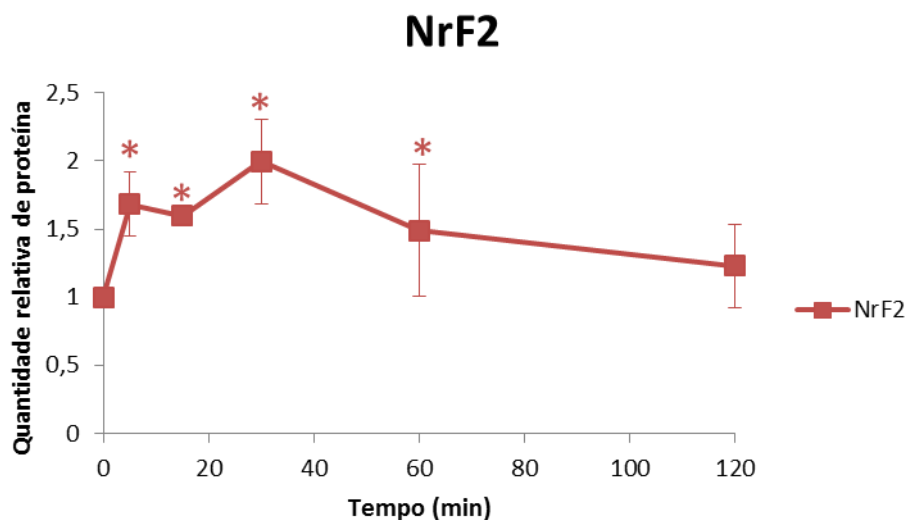


Figura III-16 – Representação gráfica dos níveis totais da proteína (■) NrF2 após 5, 15 e 30 minutos e 1 e 2 horas de exposição a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário de terminados por *Western Blot*. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos 3 replicados e as barras de erro ao desvio padrão populacional dos replicados analisados. *- Valores estatisticamente diferentes do valor controle respectivo segundo o método de *Holm-Sidak*.

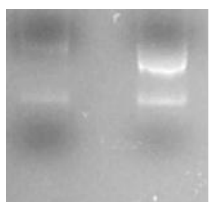
Da análise da Figura III-16 conclui-se que uma exposição a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário conduz a um aumento dos níveis totais da proteína NrF2 desde tempos curtos de exposição (5 minutos). Foi observado um aumento progressivo do nível total da proteína NrF2 até aos 30 minutos de exposição seguido por uma diminuição progressiva até às duas horas de exposição, condição em que se observou níveis semelhantes aos da condição controle. O perfil obtido para os níveis totais da proteína NrF2 acrescenta que a activação do sistema NrF2/Keap1 por uma dose em estado estacionário de 12,5 μM de H_2O_2 passa por um aumento transiente dos níveis totais desta proteína.

A observação de um aumento dos níveis totais da proteína NrF2 desde tempos de exposição bastantes curtos (5 minutos) é concordante com a observação de Purdom-Dickinson et al. que relatam um aumento após 10 minutos de exposição a 100 μM de H_2O_2 por adição bolus em cardiomiócitos de rato. Os mesmos autores ainda descreveram que o aumento observado dos níveis da proteína NrF2 era sustentado por síntese *de novo* da proteína por aumento da tradução do mRNA que codifica para a proteína NrF2. O aumento da tradução do mRNA que codifica para a proteína NrF2 pode ser sustentado pelo dissociar de uma estrutura em forma de *hairpin* sensível ao H_2O_2 no mRNA que oculta uma sequência capaz de recrutar a subunidade 18 S do ribossoma (W. Li et al. 2010).

III.III Alterações da expressão génica induzidas pelo processo de adaptação ao *stress* oxidativo

Por forma a elucidar quais as alterações na expressão génica durante e após o processo de adaptação extraíu-se o *RNA* total de células HeLa após uma exposição de 20 e 90 minutos e ainda 6 horas a 12,5 μM H_2O_2 em estado estacionário. Ainda se extraíu o *RNA* total de células incubadas 18 horas em meio fresco após uma exposição por 6 horas a 12,5 μM H_2O_2 em estado estacionário. As exposições até 6 horas permitem caracterizar a evolução temporal da expressão génica durante o processo de adaptação ao *stress* oxidativo e os níveis de expressão génica após 18 horas da indução do processo de adaptação permitem identificar quais as alterações na expressão génica promovidas por este processo que são preservadas a longo termo.

A concentração e grau de integridade das amostras obtidas foram determinados espectrofotometricamente (Quadro III-2). Ainda se testou a qualidade das amostras de *RNA* total obtido por identificação do estado de integridade das bandas correspondentes aos *rRNAs* 17S e 25S das subunidades 40S e 60S ribossomais, respectivamente nos replicados 1 da amostra controlo e amostra exposta por 20 minutos a 12,5 μM H_2O_2 em estado estacionário. Por forma a minimizar o consumo de amostra no processo de determinação da sua qualidade, os replicados 1 da amostra controlo e amostra exposta por 20 minutos a 12,5 μM H_2O_2 em estado estacionário foram escolhidos como representativos da *pool* de amostras.



C 20 min

Figura III-17 – Caracterização da qualidade das amostra de *RNA* total obtidas. Identificou-se as bandas correspondentes aos *rRNAs* 17S e 25S das subunidades 40S e 60S ribossomais, respectivamente nos replicados 1 da amostra controlo (c) e amostra exposta por 20 minutos a 12,5 μM H_2O_2 em estado estacionário (20 min), por electroforese em gel de agarose a 1 % (m/v) a 80 mV para amostras controlo 1 e 20 minutos de exposição 1.

Quadro III-2 – Determinação espectrofotométrica da concentração e grau de integridade das amostras de RNA total obtidas. Os parâmetros Abs_{280 nm}/Abs_{230 nm} e Abs_{260 nm}/Abs_{230 nm} permitem determinar o grau de contaminação da amostra com lípidos e proteína, respectivamente. As amostras encontram-se identificadas pelo tempo de exposição a 12,5 μ M H₂O₂ em estado estacionário e os replicados distinguidos por intermédio de numeração árabe. As amostras que foram incubadas 18 h em meio fresco após a exposição a 6h de 12,5 μ M H₂O₂ em estado estacionário encontram-se apelidadas de “6 h + 18 h”.

Amostra	ng/ μ L	Abs _{280 nm}	Abs _{260 nm}
		Abs _{230 nm}	Abs _{230 nm}
Controlo 1	308,9	2,03	1,16
Controlo 2	340,5	2,01	1,63
Controlo 3	447,9	2,02	0,98
Controlo 4	400,7	1,94	1,16
20 min 1	297,8	2,11	0,72
20 min 2	314,8	2,08	0,82
20 min 3	649,1	2,26	0,35
90 min 1	269,2	1,80	0,71
90 min 2	295,4	2,05	1,24
90 min 3	240,0	2,05	1,34
6 h 1	444,4	2,01	1,83
6 h 2	203,1	2,03	1,49
6 h 3	166,7	2,01	1,27
6 h + 18 h 1	419,1	2,04	1,45
6 h + 18 h 2	742,3	2,11	1,76
6 h + 18 h 3	923,2	2,19	0,51

Da análise dos parâmetros mencionados no Quadro III-2 e por ter-se identificado as bandas correspondentes aos *rRNAs* 17S e 25S das subunidades 40S e 60S ribossomais por electroforese em gel de agarose a 1 % (m/v) para os replicados 1 da amostra controlo e amostra exposta por 20 minutos a 12,5 μ M H₂O₂ em estado estacionário (Figura III-17) concluiu-se que as amostras de RNA total preparadas não se encontram degradadas.

As amostras de RNA total obtidas foram remetidas para a empresa *Kompentenzentrum Fluoreszente Bioanalytik* para análise por DNA microarray e aguarda-se o retorno de resultados.

IV CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O modelo de activação do sistema NrF2/Keap1 ainda não se encontra bem elucidado, havendo discórdia no que toca aos acontecimentos moleculares necessários à activação do mesmo. Até à data a hipótese estabelecida na literatura é de que o mecanismo molecular de activação do sistema NrF2/Keap1 passa pelo dissociar do complexo NrF2-Keap1 em resposta a estímulos indutores do sistema, o que possibilita a translocação da proteína NrF2 do citosol para o núcleo e, assim uma regulação da expressão génica via NrF2 (Fourquet et al. 2010; Karapetian et al. 2005; Ding et al. 2008; Niture et al. 2009). Porém foi sugerida uma alternativa que refuta que o mecanismo molecular de activação do sistema NrF2/Keap1 passe pela dissociação do complexo NrF2/Keap1. Acumulam-se evidências que suportam a hipótese sugerida por Weng Li et al., que apoiam que a activação do sistema NrF2/Keap1 passa pela acumulação da proteína NrF2 resultante da síntese *de novo* simultânea à sua ineficiente degradação e, consequente saturação da proteína Keap1 (W. Li & A.-N. Kong 2009; W. Li et al. 2010; Giudice et al. 2010; Salazar et al. 2006; Purdom-Dickinson et al. 2007). Weng et. al sugerem que os estímulos oxidativos motivam alterações na proteína Keap1 que diminuem a eficiência da sua ligação à proteína CulE3 ligase e, assim, originam uma ineficiente degradação proteassomal da proteína NrF2 que se encontra associada à proteína Keap1 e, consequentemente, à saturação da *pool* da proteína Keap1.

A discórdia no que toca ao mecanismo de activação do sistema NrF2/Keap1 pode ser produto do confronto de estudos realizados em células de natureza distinta e pela indução do sistema NrF2/Keap1 por compostos distintos, estando descrito um mecanismo molecular distinto de activação do sistema NrF2 a compostos diferentes, através de um fenómeno de código cisteínas (M. Kobayashi et al. 2009). Ainda acresce, como já referido, que a maioria dos estudos do sistema NrF2/Keap1 são realizados com sobreexpressão da proteína NrF2 e/ou Keap1 (Kwak & Kensler 2010; Leonarduzzi et al. 2010; Ma 2010), o que distâcia os resultados obtidos dos fenómenos que ocorrem em condições fisiológicas. O trabalho apresentado distancia-se dos restantes apresentados na literatura por não recorrer à sobreexpressão de proteínas (NrF2 e/ou Keap1) e terem sido ensaiadas condições que se aproximam das fisiológicas (12,5 μ M H₂O₂ por exposição em estado estacionário). Assim, as observações realizadas expressam de maneira mais próxima da fisiológica o processo de activação do sistema NrF2/Keap1.

A observação de um aumento de elevada magnitude dos níveis citosólicos e totais da proteína NrF2 para um curto intervalo de exposição a 12,5 μ M H₂O₂ em estado estacionário (aumento de 70% ao fim de 5 minutos para os níveis totais, Figura III-16) indica que activação do sistema NrF2/Keap1 é sustentado pelo aumento dos níveis de proteína NrF2 livre por síntese de *novο* e, não somente pela libertação do NrF2 sequestrado no citosol por acção da proteína Keap1. Tal afirmação é reforçada pelo facto de em condições controlo a proteína NrF2 apresentar níveis citosólicos baixos (Piccirillo et al. 2009) e, assim, não ser possível a presença de uma *pool* de proteína NrF2 sequestrada pela proteína Keap1 em condições controlo que ao ser libertada após uma exposição ao *stress* oxidativo justifique um aumento de elevada magnitude da proteína NrF2 citosólica. Assim, as observações efectuadas neste trabalho reforçam o modelo de activação do sistema NrF2/Keap1 defendido por Wenge et al..

Concluiu-se ainda que a exposição a uma dose maior de H₂O₂ resulta numa activação mais célere do sistema NrF2/Keap1 quer por exposição em estado estacionário quer por exposição por adição bolus. Pressupondo que a activação do sistema NrF2/Keap1 ocorre pelo mecanismo proposto por Wenge et al., uma activação mais precoce do sistema pode ser explicado por uma dose maior de H₂O₂ conduzir a uma depleção mais rápida da proteína Keap1, o que provoca uma degradação ineficiente da proteína NrF2 mais prematura.

Ainda foi possível concluir que o sistema NrF2/Keap1 comporta-se de forma distinta consoante o método de exposição empregue. Por um lado, não se observaram alterações significativas nos níveis citosólicos da proteína NrF2 para exposições por adição bolus, contrariamente ao observado para exposições em estado estacionário. A inexistência de um aumento dos níveis citosólicos da proteína NrF2 anterior ao aumento dos níveis nucleares da mesma proteína após uma exposição por adição bolus contraria a hipótese de uma activação do sistema NrF2/Keap1 ser sustentada por um aumento dos níveis totais da proteína NrF2 por aumento da síntese *de novo* da mesma. Porém, a observação de um aumento dos níveis nucleares da proteína NrF2, em simultâneo com um inalterar dos níveis citosólicos da mesma, sugere um aumento dos níveis totais da proteína NrF2.

Por outro lado, por adição bolus, para se observar um comportamento que sugira a activação do sistema NrF2/Keap1, foi necessário empregar concentrações de H₂O₂ superiores às praticadas por estado estacionário. As alterações nos níveis nucleares da proteína NrF2 observadas por exposição por adição bolus são de maior amplitude e para um tempo de exposição menor que as observadas após uma exposição em estado estacionário. As disparidades observadas podem ser motivadas pelas diferenças da dose e método de exposição praticados para motivar *stress* oxidativo. Tal facto demonstra o impacto do método

de exposição nos resultados obtidos e realça a importância do método de exposição utilizado para simular os processos fisiológicos.

Em suma, os dados obtidos sugerem que o sistema Nrf2/Keap1 seja complexo no que toca ao(s) seu(s) modelo(s) molecular(es) de activação.

Qiang Ma alerta para o facto de o analisar da maior parte das vias de sinalização que envolvem ERO ter por base estudos em que se testam as respostas celulares a estímulos oxidativos/electrófilos exógenos que culminam numa resposta génica exarcebada, a qual se afasta das condições observadas nos processos fisiológicos e patológicos. - *“One caveat in analysing these transcriptional signalling pathways to ROS is that many of the well-established examples come from analysing cellular responses to exogenous oxidant/electrophile challenges that often result in robust induction of gene transcription. On the other hand, the moderate and sustained rise in the amount of ROS observed in many disease processes, such as chronic inflammation and diabetic complications, presumably results in smaller but equally regulated alterations in gene transcription in vivo.”* (Ma 2010).

Como referido, o nível de complexidade dos sistemas envolvendo os factores de transcrição sensíveis ao nível de ROS é maior nas células eucariotas animais; Lushchak especula que exista uma regulação consertada, complementar e especializada entre os diversos factores de transcrição, capaz de diferenciar entre diversos níveis de *stress* oxidativo e, assim, permitir uma resposta gradual (Lushchak 2010). O sistema Nrf2/Keap1 medeia a resposta a níveis baixos de *stress* oxidativo e é responsável pela regulação de genes que codificam para proteínas importantes na biossíntese e metabolismos de ácidos gordos e outros lípidos (Kitteringham et al. 2010). Tal, aliado ao facto de ter sido reportado que a adaptação em *Saccharomyces cerevisiae* passa por alterações na composição em lípidos da membrana (Pedroso et al. 2009; Folmer et al. 2008; Sousa-Lopes et al. 2004; Matias et al. 2007), evidência o sistema Nrf2/Keap1 como um potencial interveniente no processo de adaptação em células eucariotas.

Como referido, durante a elaboração do presente trabalho foi possível concluir que a exposição a uma dose de H₂O₂ de 12,5 µM em estado estacionário conduz a uma activação do sistema Nrf2/Keap1 no intervalo de tempo ensaiado. Posto que as mesmas condições de exposição promovem o processo de adaptação ao *stress* oxidativo (Grácio 2011), este trabalho reforça as evidências de o mesmo factor poder participar no processo de adaptação referido em células eucariotas.

Como perspectivas, dado que neste trabalho ainda foram obtidas evidências que sugerem que a banda proteica com uma massa molecular aproximada de 100 kDa em extractos nucleares não corresponde a um complexo Nrf2-actina, seria importante testar se se

trata uma forma da proteína Nrf2 com uma modificação pós-traducional ou a uma proteína hipotética identificada por reacção cruzada do anticorpo. Uma vez que foi descrito por Pi et al. em células de neuroblastoma que a forma com actividade transcripcional da proteína Nrf2 se encontra fosforilada e apresenta uma massa molecular aproximada de 98 kDa, seria de interesse testar se a banda referida corresponde a uma forma fosforilada da proteína Nrf2.

Caso se confirme que a estrutura com uma massa molecular aproximada de 100 kDa corresponde a uma forma fosforilada, seria de interesse testar se, tal como descrito por Pi et al., esta corresponde à forma com actividade transcripcional nas condições testadas neste trabalho. De salientar que foram descritas fosforilações distintas da proteína Nrf2 em células de natureza distinta, o que revela que o processo de regulação da actividade da proteína Nrf2 por fosforilação seja complexo e, possivelmente apresente especificidade para o tecido e/ou condição de indução.

Porém, é de salientar que a literatura é díspar no que toca à necessidade de regulação por fosforilação para a activação do sistema Nrf2/Keap1, tendo sido descrita a activação do sistema Nrf2 somente pela sobreexpressão da sequência *Neh2* da proteína Nrf2 (responsável pela interacção com a proteína Keap1) sem a ocorrência de fosforilação da proteína Nrf2 (D. Zhang 2010).

Tendo em conta que foi observado após uma exposição prolongada (4 horas) a uma dose 12,5 μM de H_2O_2 a eliminação nuclear da proteína Nrf2 e que, na literatura a exclusão nuclear da proteína Nrf2 se encontra associada a uma sinalização por cascata de fosforilações (Jain & Jaiswal 2007; Rojo et al. 2008; Salazar et al. 2006; Brigelius-Flohé & Flohé 2011) e/ou um aumento do nível da proteína Keap1 por um mecanismo de retroacção negativa (O.-H. Lee et al. 2007; Kaspar & Jaiswal 2010), seria interessante testar o estado de fosforilação da proteína Nrf2 nuclear e, determinar os níveis da proteína Keap1 para as mesmas condições de exposição. Seria ainda vantajoso determinar os níveis da proteína Keap1 e o seu estado de oxidação para exposições curtas (até 2 horas) a 12,5 μM de H_2O_2 por forma a elucidar a participação da proteína Keap1 na regulação da activação do sistema Nrf2/Keap1 nas condições referidas.

Uma vez que se encontra descrito um mecanismo de retroacção positiva entre a proteína Nrf2 e o nível de expressão do gene que codifica para a mesma proteína (Giudice et al. 2010) seria interessante testar se ocorre indução da expressão deste gene para exposições curtas (até 2 horas) a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário.

Por estarem descritos para o sistema Nrf2/Keap1 mecanismos de retroacção negativa e positiva por indução das proteínas Keap1 e Nrf2, respectivamente, propõe-se que a regulação da actividade do sistema Nrf2/Keap1 resulte do balanço dos dois mecanismos

referidos. A observação de um comportamento como o descrito sugere que a regulação da actividade do sistema NrF2/Keap1 a longo termo possa ser concebida por intermédio de activaões transientes do sistema, de forma análoga ao comportamento do sistema NF- κ B (Giudice et al. 2010).

Seria igualmente interessante elucidar quais as alterações da expressão génica durante e após o processo de adaptação e, quais destas estão dependentes do sistema NrF2/Keap1 e ainda testar se ocorre, para as condições que culminam num processo de adaptação, a activação paralela de outros sistemas de regulação da expressão génica, como por exemplo, o NF- κ B.

V ANEXOS

V.I Composição dos Tampões

- PBS pH 7.4
 - 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 3.0 mM KCl e 8.0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$;
- Solução tampão de lise citosólica pH 7.2
 - 50 mM HEPES, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 250 mM Sacarose, 2 mM DTT, 10% (v/v) Nonidet P40 e inibidores de proteases (*Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA*): 1 mM PMSF, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Benzamidina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina, todos adicionados de fresco;
- Solução tampão de lise nuclear
 - Idêntico ao tampão lise citosólica excepto: 400 mM NaCl e 20% (v/v) glicerol e sem adição de Sacarose;
- Solução tampão RIPA (Extracção total)
 - 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 400 mM NaCl, 1%(v/v) Nonidet P-40, 0,25% (m/v) Na-desoxicolato e inibidores de proteases (*Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA*): 1 mM PMSF, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Benzamidina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina, todos adicionados de fresco;
- Solução tampão electroforese pH 8.3 (Laemmli (Laemmli 1970))
 - 25 mM Tris-HCl, 102 mM Glicina e 0,1% (m/v)SDS;
- Solução tampão transferência (Bjerrum e Schafer-Nielsen(Bjerrum & Schafer-Nielsen 1986))
 - 48 mM Tris-HCl, 39 mM Glicina, 0,0375% (m/v) SDS e 20% (v/v)metanol;
- Solução tampão de amostra (Loading Buffer) pH 6,8 **5X**
 - 160 mM Tris, 0,1% (v/v) β -Mercaptoetanol, 0,1% (v/v) Glicerol, 0,2% (v/v), 2% (m/v) SDS e 0,04% (m/v) Azul Bromofenol.
- Solução tampão de amostra de RNA
 - 100 mM EDTA, 50 % (v/v) glicerol, 0,5 % (m/v) azul de bromofenol.
- Solução tampão TAE (Tris-Acetato EDTA) pH 7,8
 - 400 mM Tris-HCl, 1 mM Acetato de Sódio, 1 mM EDTA.

V.II Composição Soluções

➤ Vermelho de Ponceau S

- Ponceau S 0,2%(m/v) , Ácido Tricloro Acético 3% (m/v) , Ácido Sulfofalicílico 3%(m/v);

➤ Solução Corante

- 0,25% (m/v) Azul Comassie R-250, 50% (v/v) Metanol e 10 %(v/v) Ácido Acético;

➤ Solução Descorante

- Forte: 50% (v/v) Metanol e 10% (v/v) Ácido Acético;
- Fraco: 10% (v/v) Metanol e 7% (v/v) Ácido Acético.

V.III Reagentes

O TEMED (N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina) e o PSA (Persulfato de Amónia) foram adquiridos à *PROMEGA*; O SDS (S-Dodecyl Sulfato de Sódio) e a Trisphina à *GIBCO™ Invitrogen*; a Acrilamida, Bis-Acrilamida, o Glicerol, o Di-Hidrogeno Fosfato de Potássio (KH_2PO_4) e o EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) à *Fluka*. O Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2), o Metanol, o Etanol, o Tween-20, o Cloreto de Sódio (NaCl), o Cloreto de Potássio (KCl), o Mono-Hidrogeno Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4), a Sacarose, o β -Mercaptoetanol, o Azul de Comassie R-250 e a Glicina à *Merck*. O DimetilSulfóxido (DMSO), o Tris, o Nonidet-P40, o Ditiotreitól (DTT) o Azul de Bromofenol, o Ácido Tricloro Acético, o Ácido Sulfofalicílico, o Ácido Acético, o desoxicolato de sódio e o Ponceau S à *Sigma-Aldrich*. A agarose à *SeaKem* e o *GreenSafe* à *Nzytech*.

V.IV Script em Python para análise do perfil de imunofluorescência

```
# ver 1.0
```

```
#corrigido para se media de citosol
verde for igual a 0
```

```
#corrigido para distancia 50% ser em
ambos os lados ao msm tempo,
retirado divisao das d50% parciais
pk pode dar zero
```

```
#posto distancia do citosol em
funcao do perfil do verde, e do
vermelho
```

```
#ver 2.0
```

```
#corrigido d50% k estava a fazer
para o vermelho mesmo no verde
```

```
import sys
```

```
import os
```

```
def restart():
```

```
python=sys.executable
```

```
os.execl(python,python,
*sys.argv)
```

```

def abrir(fich): #abrir ficheiro

    #      fich=str(raw_input("Abrir
Fichheiro:"))#seleccionar ficheiro

    try:

        dados=open(fich,"rb")

        lins=dados.readlines()

        dados.close()

        return lins

    except IOError:

        print      ("Nao      encontra
ficheiro %s" %fich)

        a=raw_input("Sair/Restart?")

        a=a.upper()

        if a == "R":

            restart()

def importar():#obter      diferentes
colunas

    #fich=str(raw_input("Abrir
Fichheiro:"))#seleccionar ficheiro

    lins=abrir(fich)

    Red=[]

    Green=[]

    Blue=[]

    for lin in range(len(lins)):

        col=lins[lin].split("\t")

#entry=RGB(float(col[0]),float(col[1
]),float(col[2]),float(col[3]))

        R=float(col[1])

        G=float(col[2])

        B=float(col[3])

        Red.append(R)

        Green.append(G)

        Blue.append(B)

#remover background e definir od e
celula, nao esquecer remover 0 e
menor k 0!

        rback=0

        gback=0

        bback=0

        for i in Red[:15]:#defini o
background como a media dos
primeiros 15 pixeis

            rback+=i

        for i in Red[-15:]:

            rback+=i

        rback/=30

        for i in Green[:15]:

            gback+=i

        for i in Green[-15:]:

            gback+=i

        gback/=30

        for i in Blue[:15]:

            bback+=i

        for i in Blue[-15:]:

            bback+=i

        bback/=30

```

```

rback=int(rback)

rback=float(rback)

gback=int(gback)

gback=float(gback)

bback=int(bback)

bback=float(bback)

for i in range(len(Red)):

    Red[i]-=rback

    if Red[i]<=0:

        Red[i]=0#nao pode ser
        pop senao as listas passam a ter
        tamanhos diferentes, merda se for
        zero dps a media mais a frente e
        aldrabada

for i in range(len(Green)):

    Green[i]-=gback

    if Green[i]<=0:

        Green[i]=0

for i in range(len(Blue)):

    Blue[i]-=bback

    if Blue[i]<=0:

        Blue[i]=0

return Red, Green, Blue

def Nucleo():# definir inicio/fim
nucleo

    bd=[]

    intensid=importar()

    Blue=intensid[2]

        for i in range(1,len(Blue),1):
        #fazer derivada, atencao que indice
        passa a ser +2 para ref

            d=Blue[i]-Blue[i-1]

            bd.append(d)

        nuc=[]

        m=0

        i=0

        while i<len(bd):

            if bd[i]<bd[m]:

                m=i

                i+=1

            m+=2

        nuc.append(m)

        m=0

        i=0

        while i<len(bd):

            if bd[i]>bd[m]:

                m=i

                i+=1

            m-=2

        nuc.append(m)

        nuc.sort()#para ter a certeza
        que fica pela ordem correcta ja com
        ref certa (+2)

        return nuc

def ratio():

    #fich=str(raw_input("Abrir
    Ficheiro:"))#seleccionar ficheiro
    abrir

```

```

intensid=importar()
rcitcorr+=1

Red=intensid[0]

Green=intensid[1]

nucleo=Nucleo()

rnucleo=
range(nucleo[0],nucleo[1],1)
#definir intervalo nucleo

mednucr=0

mednucg=0

i=rnucleo[0]

for i in rnucleo:

    mednucr+=Red[i]

    i+=1

mednucr/=len(rnucleo)

i=rnucleo[0]

for i in rnucleo:

    mednucg+=Green[i]

    i+=1

mednucg/=len(rnucleo)

rcit=
range(0,nucleo[0],1)#citosol eskerdo

rcit+=range(nucleo[1],len(Red),1)#ad
d citosol direito escolhi veremlho
pk ate hj as imagens tem smp
vermelho

medcitg=0

rcitcorr=0

for i in rcit:

    if Green[i] !=0: #descartar
entradas zero pk dps a media era
aldrabada

        medcitg+=Green[i]

medcitg/=rcitcorr

medcitg/=rcitcorr

else:

    medcitg=1

ratio_nuc_citg=mednucg/medcitg

medcitr=0

rcitcorr=0

for i in rcit:

    if Red[i] !=0: #descartar
entradas zero pk dps a media era
aldrabada

        medcitr+=Red[i]

        rcitcorr+=1

medcitr/=rcitcorr

ratio_nuc_citr=mednucr/medcitr

#ratio=
[ratio_nuc_citr,ratio_nuc_citg]

percred=mednucr/(mednucr+medcitr)

percgreen=mednucg/(mednucg+medcitg)

#percent=[red,green]

#output=[mednucr,mednucg,medcitr,med
citg,ratio_nuc_citr,ratio_nuc_citg]

#return ratio #0 Red 1 Green

#return output

#return percent # red green

```

```

    output=[mednucr,
mednucg, ratio_nuc_citr, ratio_nuc_cit
g, percred, percgreen]

```

```

    return output #mednucr mednucg
razao nuc/cit r e g percentagem r e
g

```

```

def distancia_50():

```

```

    intensid=importar()

```

```

    Red=intensid[0]

```

```

    Green=intensid[1]#fazer verde

```

```

    nucleo=Nucleo()

```

```

    rcitesq=
range(0,nucleo[0],1)#citosol esquerdo

```

```

    if len(Red)> len(Green):

```

```

    rcitdir=range(nucleo[1],len(Red),1)

```

```

    else:

```

```

    rcitdir=range(nucleo[1],len(Green),1
)#citosol direito

```

```

    red_citesq=0

```

```

    red_citdir=0

```

```

    for i in rcitesq:

```

```

        red_citesq+=Red[i]

```

```

    for i in rcitdir:

```

```

        red_citdir+=Red[i]

```

```

    red_distesq=0#ter atencao que
num de pixel e a partir do nucleo
que esta a direita

```

```

    red_distdir=0

```

```

    red_citesqp=0#pixel 50%

```

```

    red_citdirp=0

```

```

    i=0

```

```

    while red_citesqp *2 <
red_citesq:

```

```

        red_distesq=nucleo[0]-i

```

```

        red_citesqp+=Red[i]

```

```

        i+=1

```

```

        i=nucleo[1]#esta a dar erro na %
50% por nao devia comecar no zero
mas no nucleo[1]

```

```

        while red_citdirp *2 <
red_citdir:

```

```

            red_distdir=i-nucleo[1]

```

```

            red_citdirp+=Red[i]

```

```

            i+=1

```

```

    green_citesq=0

```

```

    green_citdir=0

```

```

    for i in rcitesq:

```

```

        green_citesq+=Green[i]

```

```

    for i in rcitdir:

```

```

        green_citdir+=Green[i]

```

```

    green_distesq=0#ter atencao que
num de pixel e a partir do nucleo
que esta a direita

```

```

    green_distdir=0

```

```

    green_citesqp=0#pixel 50%

```

```

    green_citdirp=0

```



```

red_disttotal=0

green_disttotal=0

i=0

while green_citesq *2 <
green_citesq:

    green_distesq=nucleo[0]-i

    green_citesq+=Green[i]

    i+=1

i=nucleo[1]

while green_citdirp *2 <
green_citdir:

    green_distdir=i-nucleo[1]

    green_citdirp+=Green[i]

    i+=1

#red_distesq/=float(len(rcitesq))
#por distancia em percentagem pk
tamanho de recta pode variar

#red_distdir/=float(len(rcitdir))

#green_distesq/=float(len(rcitesq))

#green_distdir/=float(len(rcitdir))

#distancia 50% em ambos os lados

red_cittotal=red_citesq+red_citdir

green_cittotal=green_citesq+green_citdir

red_cittotalp=0#pixel 50%

green_cittotalp=0

i=0

a=nucleo[1]#esta a dar erro na %
50% por nao devia comecar no zero
mas no nucleo[1]

while red_cittotalp *2 <
red_cittotal:

    red_disttotal=nucleo[0]-i

    red_disttotal+=a-nucleo[1]

    red_disttotal/=2

    red_cittotalp+=Red[i]

    red_cittotalp+=Red[a]

    i+=1

i=0

a=nucleo[1]#esta a dar erro na %
50% por nao devia comecar no zero
mas no nucleo[1]

while green_cittotalp *2 <
green_cittotal:

    green_disttotal=nucleo[0]-i

    green_disttotal+=a-nucleo[1]

    green_disttotal/=2

    green_cittotalp+=Green[i]

    green_cittotalp+=Green[a]

```

```

i+=1

redlen=float(len(rcitesq))+float(len
(rcitdir))

greenlen=float(len(rcitesq))+float(l
en(rcitdir))

red_disttotal/=redlen

green_disttotal/=greenlen

distancia=[red_distesq,red_distdir,g
reen_distesq,green_distdir,red_distt
otal,green_disttotal]

return distancia # red esq
direito verde esq direito total red
verde

def salvar():

    #fich=str(raw_input("Abrir
Ficheiro:"))#seleccionar ficheiro
abrir # so funciona se posto fora

    nucleo=Nucleo() #0 inicio 1 fim

    razao=ratio() #mednucr mednucg
    razao nuc/cit r e g percentagem r e
    g

    dist=distancia_50() # Red 0 esq
    1 dir Green 2 esq 3 dir Total 4 red
    5 green

    resultados

#resultados=str(raw_input("Salvar
Ficheiro:"))#seleccionar ficheiro
salvar

cabec=True

try:

    salva=open(resultados,"rb")

```

```

salv=salva.readlines()

if salv ==[]:

    cabec=False

    salva.close()

except IOError:#caso ficheiro
nao existir

    cabec=False

    salvar=open(resultados,"ab")

if cabec ==False:

    salvar.write("Ficheiro \t
Nuc Inic\t Nucleo fim\t Media Nuc
RED\t Media Nuc Green\t razao
nuc/cit Red\t razao nuc/cit Green\t
Percentagem Red Nuc \t Percentagem
Green Nuc\t Percentagem50 red esq\t
Percentagem50 red dir\t
Percentagem50 Green esq\t
Percentagem50 Green dir\t
Percentagem2 50% Red\t Percentagem2
50% Green\n")

    cabec=True

if cabec==True:

    salvar.write("%s\t %f\t %f\t
%f\t %f\t %f\t %f\t %f\t %f\t
%f\t %f\t %f\t %f\t %f\n" %(fich,
nucleo[0], nucleo[1], razao[0],
razao[1], razao[2], razao[3],
razao[4], razao[5],dist[0], dist[1],
dist[2], dist[3], dist[4],dist[5]))

    salvar.close()

    #salvar.write("File%s\t, %f\t,
%f\t, %f\t,%f\n" %(fich, nucleo[0],
nucleo[1], razao[0], razao[1]))

#import sys

#fich=str(raw_input("Abrir
Fichheiro:"))

ficheiro=raw_input("Abrir
Fichheiro:")

```

```

resultados=str(raw_input("Salvar
Ficheiro:"))#seleccionar    ficheiro
salvar

ficheiro.replace(" ", "")

fic=ficheiro.split(",")

for          i          in
range(int(fic[0]),int(fic[1])+1,1):

    fich=str(i)

```

```

salvar()

print ("Analisado ficheiro %s
com sucesso" %i)

#salvar(sys.argv[1])

raw_input("enter para sair")#nao
fechar linha comandos:P

```

VI REFERÊNCIAS

- Aleksunes, L.M. et al., 2008. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicology and applied pharmacology*, 226(1), pp.74-83.
- Antunes, F. & Cadenas, E., 2000. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS letters*, 475(2), pp.121-6.
- Apel, K. & Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, pp.373-99.
- Bedard, K. & Krause, K.-heinz, 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), pp.245-313.
- Bjerrum, O.J. & Schafer-Nielsen, 1986. C. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. In W. Chemie, ed. *Analytical electrophoresis*. pp. 315-317.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248-54.
- Brigelius-Flohé, R. & Flohé, L., 2011. Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. *Antioxidants & redox signaling*, 15(8), pp.1-139.
- Ding, Y. et al., 2008. Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *The American journal of pathology*, 172(6), pp.1529-41.
- Dröge, W. & Dro, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), pp.47-95.
- F. Antunes & Cadenas, E., 2001. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free radical biology & medicine*, 30(9), pp.1008-18.
- Flattery-O'Brien, J., Collinson, L.P. & Dawes, I.W., 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *Journal of general microbiology*, 139(3), pp.501-7.
- Folmer, V. et al., 2008. H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(4), pp.1141-7.

- Fourquet, S. et al., 2010. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *The Journal of biological chemistry*, 285(11), pp.8463-71.
- Gershoni, J.M. & Palade, G.E., 1983. Protein blotting: principles and applications. *Analytical biochemistry*, 131(1), pp.1-15.
- Giorgio, M. et al., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), pp.722-8.
- Giudice, A., Arra, C. & Turco, M.C., 2010. *Transcription Factors* P. J. Higgins, ed., Totowa, NJ: Humana Press.
- Grácio, D., 2011. *Papel do H₂O₂ na resistência adquirida ao cancro: alterações na organização das biomembranas*, Tese de Mestrado da Universidade de Lisboa (submetido).
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 5), pp.1147-50.
- Holland, R. & Fishbein, J.C., 2010. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxidants & redox signaling*, 13(11), pp.1749-61.
- Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry*, 77(217), pp.755-76.
- Itoh, K et al., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development*, 13(1), pp.76-86.
- Jain, A.K. & Jaiswal, A.K., 2007. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *The Journal of biological chemistry*, 282(22), pp.16502-10.
- Jain, A.K., Bloom, D.A. & Jaiswal, A.K., 2005. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *The Journal of biological chemistry*, 280(32), pp.29158-68.
- Jones, D P, 2010. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *Journal of internal medicine*, 268(5), pp.432-48.
- Jones, Dean P & Go, Y.-M., 2011. Mapping the cysteine proteome: analysis of redox-sensing thiols. *Current opinion in chemical biology*, 15(1), pp.103-12.
- Jung, K.-A. & Kwak, M.-K., 2010. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), pp.7266-91.
- Kamata, H. & Hirata, H., 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular signalling*, 11(1), pp.1-14.

- Kang, K.W. et al., 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Molecular pharmacology*, 62(5), pp.1001-10.
- Karapetian, R.N. et al., 2005. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Molecular and cellular biology*, 25(3), pp.1089-99.
- Kaspar, J.W. & Jaiswal, A.K., 2010. An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *The Journal of biological chemistry*, 285(28), pp.21349-58.
- Kawai, Y. et al., 2010. Acetylation-Deacetylation of the Transcription Factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) Regulates its Transcriptional Activity and Nucleo-cytoplasmic Localization. *The Journal of biological chemistry*, 286(9), pp.7629 -7640.
- Kitteringham, N.R. et al., 2010. Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *Journal of proteomics*, 73(8), pp.1612-31.
- Klaassen, C.D. & Reisman, S. a, 2010. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicology and applied pharmacology*, 244(1), pp.57-65.
- Klomsiri, C., Karplus, P.A. & Poole, L.B., 2011. Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxidants & redox signaling*, 14(6), pp.1065-77.
- Kobayashi, A. et al., 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *American Society for Microbiology*, 24(16), pp.7130-7139.
- Kobayashi, M. et al., 2009. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Molecular and cellular biology*, 29(2), pp.493-502.
- Korn, S.H. et al., 2001. Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of IkappaB kinase. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), pp.35693-700.
- Kwak, M.-K. & Kensler, T.W., 2010. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicology and applied pharmacology*, 244(1), pp.66-76.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-5.
- Lee, J, Dawes, I.W. & Roe, J.H., 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 1(1 995), pp.3127-32.

- Lee, O.-H. et al., 2007. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *The Journal of biological chemistry*, 282(50), pp.36412-20.
- Leiser, S.F. & Miller, R. a, 2010. Nrf2 signaling, a mechanism for cellular stress resistance in long-lived mice. *Molecular and cellular biology*, 30(3), pp.871-84.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B. & Poli, G., 2010. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacology & therapeutics*, 128(2), pp.336-74.
- Li, W. & Kong, A.-N., 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular carcinogenesis*, 48(2), pp.91-104.
- Li, W. et al., 2010. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic acids research*, 38(3), pp.778-88.
- Li, W., Yu, S.-W. & Kong, A.-N.T., 2006. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *The Journal of biological chemistry*, 281(37), pp.27251-63.
- Li, X. et al., 2004. Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *The Journal of biological chemistry*, 279(52), pp.54750-8.
- Liu, G.-H., Qu, J. & Shen, X., 2008. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(5), pp.713-27.
- Luo, L. et al., 2004. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(12), pp.4293-301.
- Lushchak, V.I., 2010. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 153(2), pp.175-190.
- Ma, Q., 2010. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacology & therapeutics*, 125(3), pp.376-93.
- Martin, D. et al., 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *The Journal of biological chemistry*, 279(10), pp.8919-29.
- Matias, A.C. et al., 2007. Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H₂O₂. *Free radical biology & medicine*, 43(10), pp.1458-65.
- McMahon, M. et al., 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-

- insensitive Neh6 degron. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), pp.31556-67.
- Mishina, N.M. et al., 2011. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxidants & redox signaling*, 14(1), pp.1-7.
- Ning, J.-lin, Mo, L.-wen & Lai, X.-nan, 2010. Low- and high-dose hydrogen peroxide regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2. *Chinese medical journal*, 123(8), pp.1063-9.
- Nioi, P. et al., 2005. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*, 25(24), pp.10895-906.
- Niture, S.K., Jain, A.K. & Jaiswal, A.K., 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *Journal of cell science*, 122(Pt 24), pp.4452-64.
- Niture, S.K. et al., 2010. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and applied pharmacology*, 244(1), pp.37-42.
- Noble, R.W. & Gibson, Q.H., 1970. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry*, 245(9), pp.2409-13.
- de Oliveira-Marques, V. et al., 2007. A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(6), pp.3893-902.
- Oliveira-Marques, V. et al., 2009. Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants & redox signaling*, 11(9), pp.2223-43.
- Pedroso, N. et al., 2009. Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free radical biology & medicine*, 46(2), pp.289-98.
- Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P., 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 7(2), pp.97-110.
- Pi, J. et al., 2007. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free radical biology & medicine*, 42(12), pp.1797-806.
- Piccirillo, S. et al., 2009. Redox mechanisms involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance versus p53-dependent apoptosis in adenocarcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(40), pp.27721-33.
- Pimstone, N.R. et al., 1971. Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *The Journal of clinical investigation*, 50(10), pp.2042-50.

- Purdom-Dickinson, S.E. et al., 2007. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Molecular pharmacology*, 72(4), pp.1074-81.
- RIGGS, J.L. et al., 1958. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *The American journal of pathology*, 34(6), pp.1081-97.
- Rasband, W.S (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U., 1997. ImageJ.
- Roebuck, K.A. et al., 1995. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *The Journal of biological chemistry*, 270(32), pp.18966-74.
- Rajo, A.I., Sagarra, M.R.D. & Cuadrado, A., 2008. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *Journal of neurochemistry*, 105(1), pp.192-202.
- Salazar, M. et al., 2006. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *The Journal of biological chemistry*, 281(21), pp.14841-51.
- Sardana, M.K., Sassa, S. & Kappas, a, 1982. Metal ion-mediated regulation of heme oxygenase induction in cultured avian liver cells. *The Journal of biological chemistry*, 257(9), pp.4806-11.
- Shen, G. & Kong, A.-N., 2009. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 30(7), pp.345-55.
- Shibata, T. et al., 2008. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13568-73.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), pp.291-5.
- Sousa-Lopes, a et al., 2004. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS letters*, 578(1-2), pp.152-6.
- Srivastava, K.K. et al., 1993. Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo hepatocytes. Demonstration of acquired refractoriness to heme. *European journal of biochemistry / FEBS*, 213(3), pp.909-17.
- Sun, Z., Chin, Y.E. & Zhang, D.D., 2009. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Molecular and cellular biology*, 29(10), pp.2658-72.

- Sun, Z. et al., 2007. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Molecular and cellular biology*, 27(18), pp.6334-49.
- Surh, Y.-J., Kundu, J. & Na, H.-K., 2008. Nrf2 as a Master Redox Switch in Turning on the Cellular Signaling Involved in the Induction of Cytoprotective Genes by Some Chemopreventive Phytochemicals. *Planta Medica*, 74(13), pp.1526-1539.
- Tkachev, V.O., Menshchikova, E.B. & Zenkov, N.K., 2011. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Moscow)*, 76(4), pp.407-422.
- Veal, E. a, Day, A.M. & Morgan, B. a, 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular cell*, 26(1), pp.1-14.
- Velichkova, M. & Hasson, T., 2005. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Molecular and cellular biology*, 25(11), pp.4501-13.
- Wang, X.-J. et al., 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29(6), pp.1235-43.
- Zhang, D.D., 2010. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 13(11), pp.1623-6.
- Zmijewski, J.W. et al., 2007. Exposure to hydrogen peroxide diminishes NF-kappaB activation, IkappaB-alpha degradation, and proteasome activity in neutrophils. *American journal of physiology. Cell physiology*, 293(1), pp.C255-66.