



UFSCAR - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**EFEITO DA MELATONINA NA PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO EM
CÉLULAS ERITRÓIDES K562**

Carla Peres de Paula*

*Bolsista: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

São Carlos
2020



UFSCAR - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



EFEITO DA MELATONINA NA PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO EM CÉLULAS ERITRÓIDES K562

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para a obtenção do título de Doutora.

Aluna: Carla Peres de Paula*

Orientador: Anderson Ferreira da Cunha

Coorientador: Marcos Antônio de Oliveira

*Bolsista: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

São Carlos
2020

de Paula, Carla Peres

Efeito da melatonina na proteção contra estresse oxidativo induzido em células eritróides K562 / Carla Peres de Paula -- 2020.
139f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Anderson Ferreira da Cunha

Banca Examinadora: Felipe Roberti Teixeira, Fernanda de Freitas Anibal, Danilo Grunig Humberto da Silva, Marcus Alexandre Finzi Corat

Bibliografia

1. Melatonina. 2. Estresse oxidativo. 3. Células eritróides. I. de Paula, Carla Peres. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325

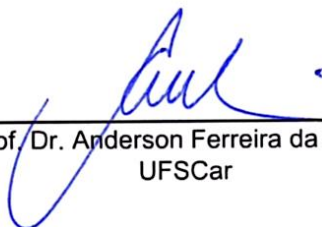


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Carla Peres de Paula, realizada em 06/03/2020:



Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar



Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar



Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
UNESP



Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat
UNICAMP

Dedico:
Aos meus pais por todo apoio e carinho sempre.
Ao meu namorado Pedro por me apoiar e acreditar
em mim mesmo quando eu não acreditava.
Vocês foram os pilares que me deram força nos
momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força durante os momentos difíceis e por iluminar meus passos durante essa caminhada. Agradeço meus pais e amigos pelo apoio, incentivo e preocupação diária, se não fosse por eles não estaria aqui. Ao meu namorado pelo apoio todos os dias, amor, dedicação e paciência que me dá força para continuar seguindo. Amo vocês.

Agradeço meus orientadores Anderson Ferreira da Cunha e Marcos Antônio de Oliveira pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pelo voto de confiança e pela grande ajuda.

Agradeço pela valiosa contribuição dos professores Iran Malavazzi, Adriana Santos Duarte e Cintia do Couto Mascarenhas para a elaboração desse trabalho.

Agradeço ao Dr. Danilo Gruning Humberto da Silva, primeiramente por ter me dado a oportunidade desenvolver essa pesquisa. Agradeço também pela imensa ajuda nas análises, ideias, e pela colaboração.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcus Corat pela colaboração durante a pesquisa com inibição gênica utilizando CRISPR, mesmo não tendo gerado frutos ainda eu valorizo todo o seu esforço em me ajudar e acredito que foi uma época de grande aprendizado.

Agradeço a professora Fernanda de Freitas Anibal pela gentil disponibilização do laboratório de parasitologia e pela ajuda. Agradeço também a todos os alunos do LAP em especial Débora Neris e Joice Rodolfo por toda a ajuda no início de tudo.

Agradeço a todos do LBGA pela ajuda, conselhos, amizade e por não me deixarem desistir mesmo quando tudo estava dando errado. Em especial gostaria de agradecer a Karina pela grande ajuda no Western Blotting.

Agradeço a banca examinadora pela disponibilidade em participar na avaliação do meu trabalho. À Universidade Federal de São Carlos, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à todos os funcionários do DGE.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

RESUMO

Os eritrócitos são células anucleadas que desempenham um papel extremamente importante, já que participam do transporte de oxigênio (O_2) para os tecidos. Alterações na estrutura ou funcionamento do eritrócito podem levar a diversas deficiências, como as anemias hemolíticas, as quais causam manifestações clínicas que podem levar ao aumento de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) agravando o quadro clínico do paciente. Diversos compostos vêm sendo estudados como terapia complementar em anemias hemolíticas a fim de minimizar os efeitos oxidativos causados por essas doenças, entretanto nenhum sucesso foi obtido até então. A melatonina é um hormônio que participa como regulador do ciclo do sono, e mais recentemente um papel como antioxidante vem sendo conferido também a este composto. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis efeitos antioxidantes diretos e indiretos da melatonina em células eritrocitárias, utilizando células eritróides K562 como um modelo biológico. Para tanto, avaliamos a expressão gênica e conteúdo proteico de diferentes enzimas antioxidantes em células K562 diferenciadas ou não pela adição de Hidroxiureia e Hemina frente o tratamento de melatonina (1nM e 1mM) quando induzidas ou não a estresse oxidativo (100 μ M de H_2O_2). Avaliamos também a viabilidade, diferenciação e nível de peroxidação lipídica nestas células. Nossos resultados mostraram que a administração da melatonina a 1nM levou ao aumento da sobrevivência das células K562 não diferenciadas quando expostas ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 , juntamente com a diminuição dos níveis de peroxidação lipídica nessas células. A expressão de RNAm das enzimas antioxidantes PRDX1 e PRDX2 foi aumentada quando administrada melatonina a 1mM na presença de H_2O_2 em células diferenciadas (RNAm de PRDX1 - 50% no dia 2 e 50% no dia 4; RNAm de PRDX2 - 100% no dia 2 e 66% no dia 4). A análise de conteúdo proteico também mostrou importantes efeitos da melatonina, cuja administração de 1mM aumentou a expressão de NRF2 (290% sem H_2O_2 , e 437% com H_2O_2) e das enzimas antioxidantes PRDX2 (20% sem H_2O_2 , e 57% com H_2O_2) e CAT (170% sem H_2O_2 , e 200% com H_2O_2) em células diferenciadas no dia 4. Neste contexto, a melatonina vem se mostrando um promissor agente terapêutico nesse tipo celular, modificando a expressão de importantes biomarcadores relacionados ao metabolismo redox eritrocitário e se mostrando potencialmente importante para novas terapias antioxidantes.

Palavras-chave: N-acetil-5-metoxitriptamina, estresse oxidativo, antioxidantes, anemias hemolíticas.

ABSTRACT

Erythrocytes are anucleated cells that play an extremely important role, since they participate in the transport of oxygen (O_2) to tissues. Changes in the structure or functioning of the erythrocyte can lead to several deficiencies, such as hemolytic anemias, as the main clinical causes that can lead to an increase in the production of Reactive Oxygen Species (ROS), aggravating the patient's clinical condition. Several compounds have been studied as complementary therapy in hemolytic anemias to end the oxidative effects caused by these diseases, but no success has been allowed until then. Melatonin is a hormone that participates as a regulator of the sleep cycle, and more recently a role as an antioxidant has also been given to this compound. In this context, the present study aimed to evaluate the direct and indirect antioxidant effects of melatonin on erythrocyte cells, using K562 erythroid cells as a biological model. Therefore, a genetic expression and protein content of different antioxidant enzymes is available in K562 cells, differentiated or not by the addition of hydroxyurea and hemin in the face of melatonin treatment (1nM and 1mM) when induced or without oxidative stress ($100\mu M H_2O_2$). Viability, differentiation and level of lipid peroxidation are also available in these cells. Our results show that the administration of 1nM melatonin leads to an increase in the amount of undifferentiated K562 cells when exposed to oxidative stress induced by H_2O_2 , in addition to decreasing the levels of lipid peroxidation in these cells. mRNA expression of the antioxidant enzymes PRDX1 and PRDX2 was increased when 1mM melatonin was administered in the presence of H_2O_2 in differentiated cells (*PRDX1* mRNA - 50% on day 2 and 50% on day 4; *PRDX2* mRNA - 100% on day 2 and 66% on day 4). An analysis of the protein content also showed important effects of melatonin, whose administration of 1mM increased the expression of NRF2 (290% without H_2O_2 , and 437% with H_2O_2) and of the antioxidant enzymes PRDX2 (20% without H_2O_2 and 57% with H_2O_2) and CAT (170% without H_2O_2 and 200% with H_2O_2) in differentiated cells on day 4. In this context, a melatonin has shown a promising therapeutic agent in this type of cell, modifying an expression of important biomarkers related to erythrocyte redox metabolism and showing itself potentially important for new antioxidant therapies.

Keywords: N-Acetyl-5-methoxytryptamine, oxidative stress, antioxidants, hemolytic anemias.

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Células Eritrocitárias e o processo de eritropoese	1
1.2 - Células Eritrocitárias e anemias hemolíticas	2
1.2.1 - Hemoglobinopatias	3
1.2.2 - Membranopatias.....	7
1.2.3 - Enzimopatias	9
1.3 – Estresse oxidativo nos eritrócitos	12
1.4 – Estresse oxidativo em doenças hematológicas	13
1.5 – Mecanismos de defesa contra estresse oxidativo em células eritrocitárias	15
1.6 – Melatonina	17
1.6.1 – Papel fisiológico da melatonina	17
1.6.2 – Mecanismo antioxidante indireto da Melatonina.....	21
1.6.3 - Melatonina no tratamento de doenças hemolíticas: uma perspectiva	23
1.7 - Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias	23
2.0 – JUSTIFICATIVA	27
3.0- OBJETIVOS	29
4.0 - METODOLOGIA	31
4.1 – Linhagens utilizadas	31
4.2 – Cultivo de células eritroleucêmicas K562	31
4.3 – Diferenciação de K562 em células com características eritróides e exposição ao agente protetor (melatonina) e estressor (H₂O₂)	32
4.3.1 - <i>Determinação de expressão de hemoglobina utilizando o método de benzidina</i>	33
4.3.2 - <i>Identificação de modificações morfológicas por citometria de fluxo, em K562 quando induzidas a diferenciação por hemina e hidroxauréia</i>	34
4.3.3 - <i>Contagem de células e determinação da viabilidade celular através de azul de tripan</i>	35
4.3.4 – <i>Análise de expressão gênica por PCR em tempo real</i>	35
4.3.5 – <i>Análise de expressão proteica pelo método de western blotting</i>	37
4.3.6 – <i>Análise de peroxidação lipídica pelo método de TBARS</i>	40
4.3.7 – <i>Análise de atividade enzimática</i>	40
4.4 – Créditos gráficos	41
5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 – Diferenciação de células K562 induzida pela adição de hemina combinada com hidroxauréia	43
5.2 - Teste de concentrações de H₂O₂	44
5.3 – Papel protetor de melatonina com e sem exposição de estresse induzido por H₂O₂	

5.4 – Análise da peroxidação lipídica em células K562 tratadas com melatonina e expostas a H₂O₂.....	47
5.5 - Efeito da melatonina na diferenciação de K562.....	50
5.6 – Análise de expressão gênica de agentes antioxidantes importantes em células eritrocitárias.....	52
5.7 – Análise de conteúdo proteico de agentes antioxidantes importantes em células eritrocitárias.....	56
5.7.1 - <i>Conteúdo proteico do dia 0.....</i>	57
5.7.2 - <i>Conteúdo proteico do dia 2.....</i>	59
5.7.3 - <i>Conteúdo proteico do dia 4.....</i>	61
5.8 – Análise da atividade enzimática de CAT, GR e G6PD em células K562 tratadas com melatonina e expostas a H₂O₂	66
5.9 – Hipóteses	68
6.0 – CONCLUSÕES.....	73
7.0 – BIBLIOGRAFIA	76
8.0 - APÊNDICES.....	84
8.1 – Apêndice A.....	84
8.2 - Apêndice B.....	86
8.3 – Apêndice C.....	92
8.4 – Apêndice D.....	98
8.5 – Apêndice E.....	107
8.6 – Apêndice F	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando a eritropoese em humanos.....	2
Figura 2 - Estrutura da molécula de hemoglobina HbA.....	3
Figura 3 – Glóbulos vermelhos normais x células falciformes.....	5
Figura 4 - Glóbulos vermelhos normais x Glóbulos vermelhos talassêmicos.....	7
Figura 5 - Representação esquemática da membrana eritrocitária.....	8
Figura 6 - Representação da hemólise e destruição dos esferócitos devido às anormalidades em sua membrana.....	9
Figura 7 - Esquema do metabolismo dos eritrócitos.....	11
Figura 8 - Representação esquemática dos eventos oxidativos em eritrócitos anêmicos.....	14
Figura 9 - Representação esquemática dos principais eventos antioxidantes em eritrócitos anêmicos.	16
Figura 10 – Via de síntese de melatonina a partir do aminoácido essencial triptofano	18
Figura 11 – Secreção de melatonina pela glândula pineal.....	19
Figura 12 – Cascata de reações da melatonina como um antioxidante direto.....	20
Figura 13 – Esquema representando a via NRF2-ARE na transcrição de genes que codificam a expressão de proteínas antioxidantes de fase II.....	22
Figura 14 – Morfologia geral de uma célula K562.....	24
Figura 15 - Cultivo de células K562.....	31
Figura 16 – Estrutura molecular do reagente benzidina e seu produto oxidado marrom.....	34
Figura 17 – Diferenciação de células K562 utilizando hemina e hidroxipuréia como indutores.....	44
Figura 18 – Gráfico de viabilidade de K562 diferenciada após 7 dias de cultivo.....	44
Figura 19 - Gráfico de viabilidade de K562 não diferenciada após 7 dias de cultivo.....	45
Figura 20 – Gráfico de viabilidade de K562 diferenciada e não diferenciada acompanhada durante 5 dias de cultivo com e sem indução de estresse oxidativo por 100µM de H ₂ O ₂	46
Figura 21 – Análise de peroxidação lipídica de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H ₂ O ₂ no dia 0.....	48
Figura 22 – Análise de peroxidação lipídica de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H ₂ O ₂ no dia 2 não diferenciado e dia 2 diferenciado.....	49
Figura 23 – Análise de peroxidação lipídica de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H ₂ O ₂ no dia 4 não diferenciado e dia 4 diferenciado.....	50
Figura 24 – Efeito da melatonina na diferenciação de células K562 quando induzidas a diferenciação utilizando hemina e hidroxipuréia como indutores.....	51
Figura 25 – Gráfico de Expressão relativa de <i>PRDX1</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	52
Figura 26 - Gráfico de Expressão relativa de <i>PRDX2</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	53
Figura 27 - <i>Heat map</i> representando os resultados da análise de PCR em tempo real (q-PCR) dos genes <i>PRDX1</i> , <i>PRDX2</i> , <i>PRDX6</i> , <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> , <i>GPX1</i> , <i>NRF2</i> , <i>KEAP1</i> e <i>APEX1</i> de células K562 não diferenciadas e diferenciadas nos dias 0, 2 e 4 quando tratadas ou não com melatonina (1nM e 1mM), expostas ou não a H ₂ O ₂ (100µM).....	55
Figura 28 – <i>Heat map</i> representando os resultados da análise de western blotting das proteínas <i>PRDX1</i> , <i>PRDX2</i> , <i>PRDX6</i> , <i>CAT</i> , <i>SOD1</i> , <i>GPX1</i> , <i>NRF2</i> , <i>KEAP1</i> e <i>APEX1</i> de células K562 não diferenciadas e diferenciadas nos dias 0, 2 e 4 quando tratadas ou não com melatonina (1nM e 1mM), expostas ou não a H ₂ O ₂ (100µM).....	57
Figura 29 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 0 para detecção de <i>APEX1</i> utilizando <i>GAPDH</i> como normalizador endógeno.....	58

Figura 30 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 0 para detecção de PRDX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes.	59
Figura 31 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 2 para detecção de CAT utilizando GAPDH como normalizador endógeno.....	60
Figura 32 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 2 para detecção de GPX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno.....	60
Figura 33 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 2 para detecção de GPX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno.....	61
Figura 34 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 2 para detecção de NRF2 utilizando GAPDH como normalizador endógeno.....	61
Figura 35 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de PRDX2 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western Blotting de duplicatas biológicas independentes.....	62
Figura 36 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de CAT utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes.....	62
Figura 37 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de PRDX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno.....	63
Figura 38 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de PRDX6 utilizando GAPDH como normalizador endógeno.....	63
Figura 39 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de NRF2 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes.....	64
Figura 40 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de KEAP1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes.....	65
Figura 41 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de APEX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes.....	65
Figura 42 – Análise de atividade enzimática de CAT, GR e G6PDH de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H ₂ O ₂ nos dias 0, 2 e 4.....	67
Figura 43 – Esquema representativo do proposto que acontece em células K562 expostas a H ₂ O ₂ e tratadas com melatonina no dia 0 do experimento.....	69
Figura 44 – Esquema representativo do proposto que acontece em células K562 expostas a H ₂ O ₂ e tratadas com melatonina no dia 2 do experimento.....	70
Figura 45 - Esquema representativo do proposto que acontece em células K562 expostas a H ₂ O ₂ e tratadas com melatonina no dia 4 do experimento.....	71
Figura B1 – Padronização dos <i>primers</i> PRDX1.....	88
Figura B2 - NTCs (<i>no-template controls</i>) PRDX1.....	89
Figura B3 – Teste de eficiência da reação para análise do gene PRDX1.....	90
Figura C1 - Gráfico de Expressão relativa de <i>PRDX1</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	92
Figura C2 - Gráfico de Expressão relativa de <i>PRDX2</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	93
Figura C3 - Gráfico de Expressão relativa de <i>PRDX6</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	93
Figura C4 - Gráfico de Expressão relativa de <i>CAT</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	94

Figura C5 - Gráfico de Expressão relativa de <i>SOD1</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	94
Figura C6 - Gráfico de Expressão relativa de <i>GPX1</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	95
Figura C7 - Gráfico de Expressão relativa de <i>KEAP1</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	96
Figura C8 - Gráfico de Expressão relativa de <i>NRF2</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	96
Figura C9 - Gráfico de Expressão relativa de <i>APEX1</i> em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento.....	97
Figura D1 – Análise do conteúdo proteico de PRDX1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	98
Figura D2 – Análise do conteúdo proteico de PRDX2 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	99
Figura D3 – Análise do conteúdo proteico de PRDX6 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	100
Figura D4 – Análise do conteúdo proteico de CAT realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	101
Figura D5 – Análise do conteúdo proteico de SOD1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	102
Figura D6 – Análise do conteúdo proteico de GPX1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	103
Figura D7 – Análise do conteúdo proteico de NRF2 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	104
Figura D8 – Análise do conteúdo proteico de KEAP1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	105
Figura D9 – Análise do conteúdo proteico de APEX1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes.....	106
Figura E1 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de PRDX1 de duplicatas biológicas independentes.....	108
Figura E2 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de PRDX2 de duplicatas biológicas independentes.....	109
Figura E3 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de PRDX6 de duplicatas biológicas independentes.....	110
Figura E4 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de CAT de duplicatas biológicas independentes.....	111
Figura E5 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de SOD1 de duplicatas biológicas independentes.....	112
Figura E6 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de GPX1 de duplicatas biológicas independentes.....	113
Figura E7 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de NRF2 de duplicatas biológicas independentes.....	114
Figura E8 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de KEAP1 de duplicatas biológicas independentes.....	115
Figura E9 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de APEX1 de duplicatas biológicas independentes.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indutores de diferenciação da linhagem eritroleucêmica K562.....	25
Tabela 2 – Tabela das condições testadas a cada dia do experimento.....	33
Tabela 3. Anticorpos utilizados na técnica de Western Blotting.....	39
Tabela B1. Sequências dos <i>primers</i> que foram utilizados nas reações de qRT-PCR.....	87
Tabela B2. Apresentação da concentração ideal de cada par de <i>primer</i> determinada durante a padronização e eficiência de cada reação para cada gene alvo.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

O₂ – Oxigênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
H₂O₂ – Peroxido de hidrogênio
PCR – *Polymerase chain reaction*
EPO – Eritropoetina
RNA_m - RNA mensageiro
Hb - Hemoglobina
HbA – Hemoglobina adulta (α2 β2)
HbF- Hemoglobina fetal (α2 γ2)
HbS - Hemoglobina S
PHHF - Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
RhAG – Glicoproteína associada a Rh
HS - Esferocitose hereditária
GSSG – Glutathiona oxidada
GSH - Glutathiona
GR- Glutathiona Redutase
G6PD - Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
NADPH- *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
O₂^{-•} - Ânion radical superóxido
•OH - Radical hidroxila
RO• - Radical alcóxila
ROO• - Radical peróxila
HOCl - Ácido hipocloroso
¹O₂ - Oxigênio singlete
ROOH - Hidroperóxidos orgânicos
O₃ - Ozônio
Hb (FeIII) ou MetHb – Mteahemoglobina
Fe – Ferro
Fe²⁺ - Ferro no estado ferroso
Fe³⁺ - Ferro no estado férrico
LOOH - Hidroperóxidos de lipídios
LOO• - Peroxila
LO• - Alcoxila
PRXs – Peroxirredoxinas
PRDXs – Peroxirredoxinas Humanas
PRDX1 – Peroxirredoxina 1 Humana
PRDX2 - Peroxirredoxina 2 Humana
PRDX6 - Peroxirredoxina 6 Humana
CAT - Catalase
SOD – Superóxido dismutase
GPX – Glutathiona peroxidase
Trx – Tiorredoxina
TrxR – Tiorredoxina Redutase
NRF2 - *Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2*
KEAP1- *Kelch-like ECH-associated protein 1*
APEX1/Ref-1 - *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1*
NFKB - Nuclear Factor kappa B
AP-1 - Activator Protein 1

sMAF - *Small Maf*
HO -1 - Hemoxigenase I
NQO1 - NADPH-quinona oxidase
BAC - β -Actina
FOXO3 – *Forkhead Box O3*
MKP5 – *MAP kinase phosphatase 5*
MKP1 – *MAP kinase phosphatase 1*
PTEN - *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*
Ca²⁺ - Cálcio
K⁺ - Potássio
AA-NAT - Enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase
ASMT - Enzima acetilserotonina-O-metiltransferase
CML - Leucemia Mielóide Crônica
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
SBF – Soro Bovino Fetal
DMSO – Dimetilsulfóxido
D0 – Dia zero
D1 – Dia um
D2 – Dia dois
D3 - Dia três
D4 – Dia quatro
PBS – Tampão fosfato salino
MDA – Malondilaldeído
FSC – *Forward Scatter*
SSC – *Side Scatter*
CHCl₃ - Clorofórmio
cDNA - DNA complementar
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
KCl – Cloreto de potássio
NaCl – Cloreto de sódio
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético
H₂O – Água
Rpm – Rotações por minuto
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Ct – Cycle threshold
NTCs - *No-template controls*
NP-40 - Nonidet P-40
DEPC – *Diethylpyrocarbonate*
SDS – *Sodium dodecyl sulfate*
kDa – Kilodáltons
DNA – Ácido desoxiribonucléico
RNA – Ácido ribonucléico
TBS – *Tris Buffered Saline*
TBS-T – *Tris Buffered Saline + Tween*
HRP – *Horseradish Peroxidase*
TBARS – *Thiobarnitric acid-reactive substances*
TMP – Tetrametoxipropano

1.0 – INTRODUÇÃO

1.0 – INTRODUÇÃO

1.1 – Células Eritrocitárias e o processo de eritropoese

As hemácias ou eritrócitos são células bastante abundantes, sendo consideradas as células presentes em maior quantidade no sangue periférico, representando cerca de 40-45% do volume sanguíneo total e mais de 90% dos elementos figurados¹. Esse tipo celular é produzido na medula óssea em humanos por um processo denominado eritropoese, este processo é extremamente complexo e envolve uma grande variedade de células em diferentes estágios.

O principal fator envolvido na eritropoese é a eritropoetina (EPO), um hormônio secretado pelos rins, que estimula a diferenciação de células-tronco hematopoéticas em proeritroblastos, os quais sofrerão modificações que resultarão na formação dos eritroblastos basófilos¹. A partir dessas células outros fatores são importantes para participarem da divisão celular, como a vitamina B12 e ácido fólico. Os eritroblastos basófilos dão origem aos eritroblastos policromatófilos, que tem como característica a elevada atividade de síntese de hemoglobina, com ativa participação de ferro. A partir dessa fase as células não se dividem mais e passam por um processo de amadurecimento no qual se transformam em eritroblastos acidófilos ou ortocromáticos, que se caracterizam pela redução do núcleo e alta concentração de hemoglobina. Após essa etapa, o núcleo é extrudido da célula gerando os reticulócitos, que são células anucleadas que ainda contêm resquícios de organelas como o retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos com RNA mensageiro (RNAm), permitindo a essas células alguma capacidade de síntese proteica (sendo que cerca de 10 a 20% da síntese de hemoglobina celular total completa-se nesta fase). Finalmente, os reticulócitos são lançados na circulação, onde serão maturados tornando-se eritrócitos maduros (hemácias) em um processo que leva de 1 a 2 dias¹. A representação esquemática desse processo denominado eritropoese está apresentado na figura 1.

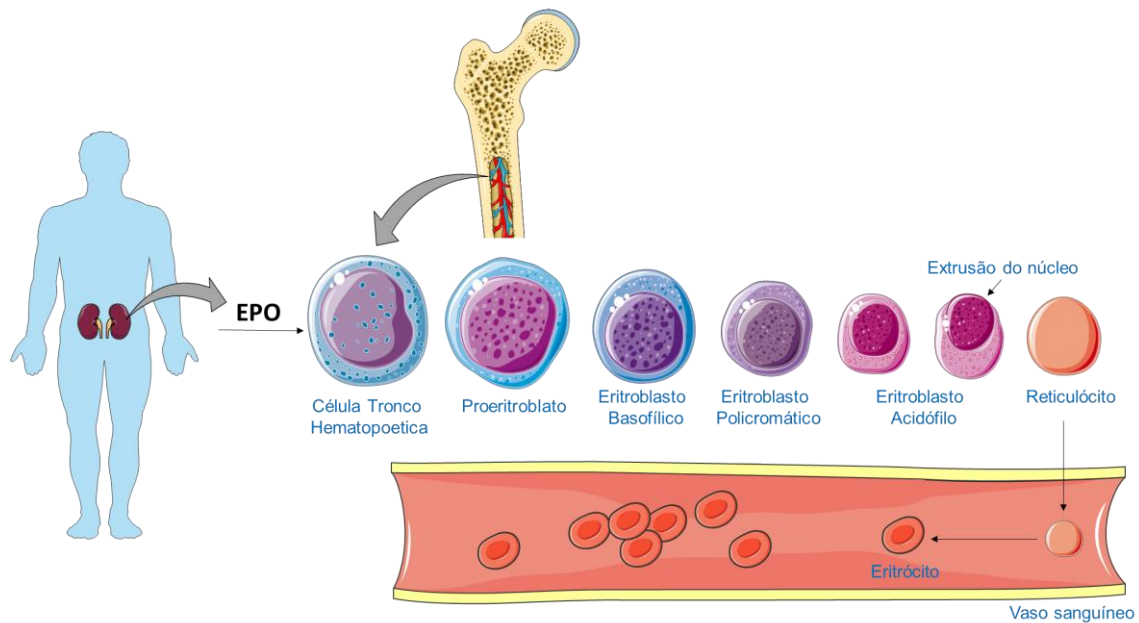


Figura 1 – Esquema representando a eritropoese em humanos. A eritropoetina (EPO) estimula a diferenciação de células-tronco hematopoéticas em proeritroblastos, os quais sofrerão várias modificações que resultarão na formação de reticulócitos, que são lançados na circulação e finalizam seu processo de maturação tornando-se eritrócitos maduros. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

1.2 - Células Eritrocitárias e anemias hemolíticas

Os eritrócitos representam o tipo celular sanguíneo mais abundante, e nos vertebrados constituem o principal meio de transporte de oxigênio dos pulmões/brânquias a todos os tecidos do corpo através do sangue¹. Células eritrocitárias maduras apresentam-se como um disco bicôncavo achatado com um diâmetro de 8 micrômetros e espessura de 2 micrômetros, tendo uma média de tempo de vida de 120 ± 20 dias². O constituinte citoplasmático mais abundante é a hemoglobina (95% das proteínas citoplasmáticas) e suas membranas são constituídas por 50% de proteínas, 40% de lipídeos e 10% de carboidratos³.

Por conta da ausência das organelas celulares particularmente o núcleo e a mitocôndria, células eritrocitárias perdem a habilidade de sintetizar aminoácidos e ácidos graxos e, portanto esse tipo celular possui uma capacidade limitada de metabolismo, suficiente apenas para sobreviver, e são continuamente removidas de circulação e substituídas por células novas formadas na medula óssea^{2,4}.

A estrutura molecular dos eritrócitos normais é extremamente importante para manter o funcionamento dessa célula, alterações ou falhas em um ou mais componentes dessa célula podem levar ao que chamamos de anemias hemolíticas. Esses defeitos podem dificultar o funcionamento dos eritrócitos e a proteção contra o estresse oxidativo nessa célula. As anemias

hemolíticas hereditárias não imunes, podem ser classificadas de acordo com o defeito principal em três grupos: Hemoglobinopatias, membranopatias e enzimopatias^{5,6}.

1.2.1 - Hemoglobinopatias

A proteína mais prevalente no eritrócito é a hemoglobina, representando aproximadamente 90% do total de proteínas nesse tipo de célula. A principal função da hemoglobina é absorver, transportar e distribuir o oxigênio para os diversos tecidos do organismo. Possui uma estrutura globular e quaternária, constituída de quatro subunidades iguais, duas a duas, compostas de dois pares de cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo um par denominado de cadeias tipo alfa e o outro de cadeias do tipo não-alfa ou beta. Sua estrutura é ligada a um átomo de ferro, a ferroprotoporfirina IX (grupo heme), que possui a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o oxigênio nos tecidos (Figura 2)^{7,8}.

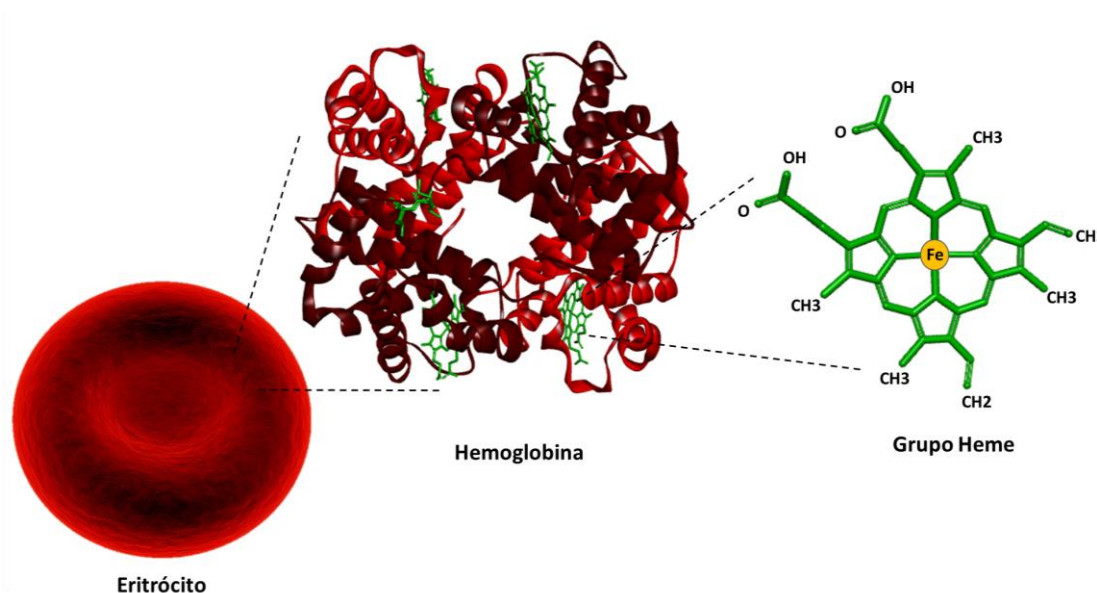


Figura 2 - Estrutura da molécula de hemoglobina HbA. A hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas do tipo alfa e duas do tipo beta, cada uma associada a um grupamento heme, contendo um átomo de ferro ao qual se liga o oxigênio de modo reversível. (Figura feita pela autora através do software gráfico *Discovery Studio 2019*).

A composição das cadeias de hemoglobina é alterada ontogeneticamente durante o desenvolvimento da vida, produzindo desse modo, diferentes tipos de hemoglobinas, as quais são compostas por diferentes combinações de cadeias polipeptídicas⁹. Durante o período embrionário são produzidos três tipos de hemoglobina: Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), presentes até a décima segunda semana do período embrionário. A hemoglobina fetal (HbF), presente principalmente no feto e que permanece na vida adulta em aproximadamente 1% da

população, contém duas cadeias α e duas cadeias γ e por fim, a hemoglobina adulta (HbA), que é a mais prevalente durante toda a vida, contém duas cadeias α e duas β ¹⁰.

Mutações que alteram a expressão dos genes da hemoglobina resultam em hemoglobinopatias, que representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária¹¹. Essas alterações representam um grupo heterogêneo de doenças genéticas, que em geral podem ser divididas em três grupos: Variantes estruturais (alteram a estrutura da proteína sem afetar sua taxa de síntese); Mudanças no ritmo de síntese, com supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias globínicas, que resultam em menor sobrevivência de eritrócitos e consequente anemia crônica¹²; E uma anomalia caracterizada por persistência na produção de cadeias γ durante a idade adulta, chamada Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) (grupo clinicamente benigno)¹¹⁻¹⁴.

Doença falciforme

A doença falciforme é uma doença genética autossômica recessiva hereditária que leva a uma polimerização da hemoglobina, que promove uma desidratação e uma modificação na morfologia dos glóbulos vermelhos, que assumem a forma de uma foice. Sua distribuição se correlaciona com as regiões endêmicas da malária, pois confere aos heterozigotos um efeito protetor contra a infecção por *Plasmodium falciparum*¹⁵.

Esta doença ocorre devido à substituição de uma única base de nitrogênio no códon 6 do gene da beta globina, onde uma adenina é substituída por uma timina (GAG \rightarrow GTG), resultando na substituição do ácido glutâmico pelo aminoácido valina. Essa substituição causa alterações estruturais na molécula de hemoglobina, culminando no aparecimento de uma hemoglobina anômala, denominada hemoglobina S (HbS)^{16,17}. Quando a HbS assume a forma desoxigenada, sua conformação molecular é modificada devido à presença de valina, que interage com o receptor de fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) da molécula adjacente de HbS. Essa interação de caráter hidrofóbico leva à formação de polímeros que, após sucessivos ciclos de oxigenação / desoxigenação, levam a célula a assumir a forma de foice¹⁸.

O processo de falcização resulta na deformação da membrana eritrocitária, altera a funcionalidade da bomba de sódio/potássio, levando a alterações de permeabilidade e desidratação celular que contribuem para a destruição prematura dessas células e a hemólise crônica o que leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequente dano oxidativo. As células falciformes tornam-se rígidas e subformáveis, o que aumenta a viscosidade sanguínea e favorece o processo de oclusão dos vasos (**Figura 3**)^{1,6}.

O fenômeno de vaso-oclusão é o principal evento fisiopatológico ligado à origem dos sinais e sintomas apresentados no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme, tais como crises algicas; crises hemolíticas; úlceras de membros inferiores; síndrome torácica aguda; seqüestro esplênico; priapismo; necrose asséptica de fêmur; retinopatia; insuficiência renal crônica; autoesplenectomia; acidente vascular cerebral, entre outros¹⁹.

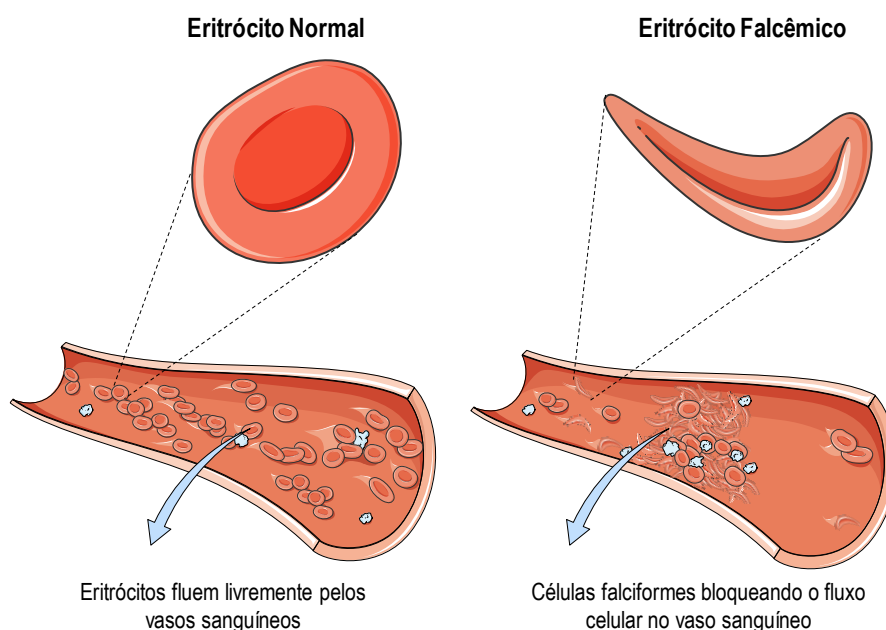


Figura 3 – Glóbulos vermelhos normais x células falciformes. Os glóbulos vermelhos normais são capazes de fluir livremente dentro dos vasos sanguíneos, enquanto os glóbulos vermelhos falciformes são anormalmente rígidos e malformados, o que aumenta a viscosidade do sangue e favorece o processo de oclusão dos vasos. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

Talassemias

As talassemias são um grupo de doenças hereditárias caracterizadas por supressão parcial ou total na síntese de uma ou mais subunidades das cadeias de globinas, levando ao acúmulo da cadeia cuja síntese é preservada. As cadeias em excesso são instáveis e se precipitam, causando alterações na membrana eritrocitária e sua destruição prematura (**Figura 4**). As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia cuja síntese é afetada e as mais comuns são as talassemias α e β ¹². A subprodução da hemoglobina diminui a capacidade de transporte de oxigênio dos eritrócitos e, mais importante, o excesso de subunidades de globina não emparelhadas precipita no folheto interno da membrana, formando corpos de inclusão que causam danos à membrana e morte celular prematura. A destruição intensa do precursor eritróide resulta

em eritropoese ineficaz. Os eritrócitos que atingem o sangue periférico são microcíticos e hipocrômicos e são rapidamente removidos pelo baço ou submetidos a hemólise na circulação, o que contribui para a anemia que caracteriza a doença^{6,20}.

A destruição dos eritrócitos estimula um aumento na síntese da eritropoietina, levando à expansão da medula óssea devido ao aumento da eritropoese. A expansão da medula espinhal causa várias complicações, como deformidades ósseas esqueléticas e faciais e doenças como osteoporose, enquanto intensa destruição de eritrócitos pode causar icterícia em pacientes com formas mais graves da doença^{9,21}.

Outro fator importante na fisiopatologia da talassemia é a sobrecarga de ferro, proveniente de várias fontes, como o ferro liberado pela hemólise dos glóbulos vermelhos, causando danos aos tecidos devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)²². Um importante efeito do grupo heme livre e do aumento de ERO liberados na circulação é promover a inflamação vascular através da ativação de NFκB (Nuclear Factor kappa B) e AP-1 (Activator Protein 1), que desencadeiam o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão. Isso resulta em maior adesão dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio, causando ativação e disfunção endotelial²³. O ferro livre atinge vários órgãos, principalmente coração, fígado, pâncreas e a glândula pituitária, causando danos aos tecidos em virtude da formação de ERO. A doença cardíaca decorrente desse mecanismo é a causa principal de morte nos portadores da talassemia maior²².

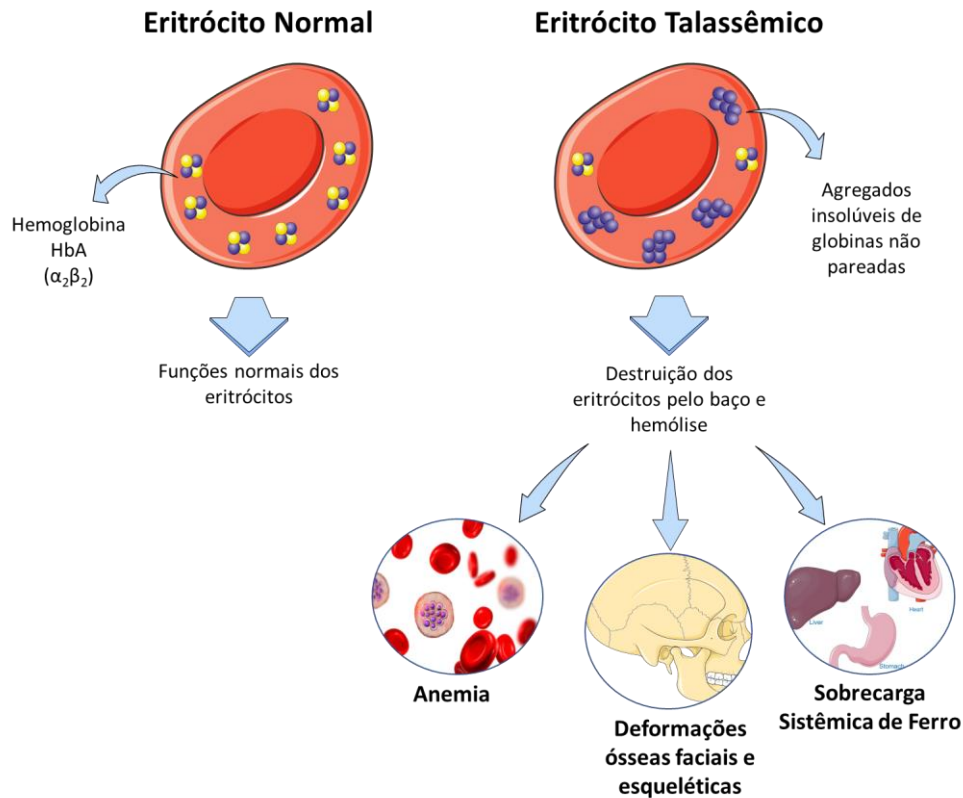


Figura 4 - Glóbulos vermelhos normais x Glóbulos vermelhos talassêmicos. Os glóbulos vermelhos normais são capazes de circular normalmente desempenhando seu papel no transporte de oxigênio, enquanto os glóbulos vermelhos talassêmicos são constantemente destruídos pelo baço ou sofrem hemólise devido à agregação de globina não emparelhada nas células. Esse evento causa anemia, deformidades esqueléticas e faciais e sobrecarga sistêmica de ferro. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

Persistência hereditária da HbF (PHHF)

Uma condição caracterizada por níveis elevados de HbF em indivíduos adultos, conhecida como persistência hereditária da HbF (PHHF), tem uma correlação estrita com uma melhora nas condições clínicas de pacientes com hemoglobinopatias, nas quais a beta globina é afetada. Com o aumento da expressão das cadeias γ e nesses pacientes durante a idade adulta, a proporção geral de células falciformes diminui, reduzindo a polimerização da hemoglobina falciforme desoxigenada e amenizando a carga de sintomas na doença falciforme. Nos pacientes β talassêmicos, a prevalência da produção das cadeias globínicas γ diminuem o acúmulo de globinas α diminuindo assim os danos oxidativos causados pelo acúmulo do ferro e o quadro clínico de anemia desses pacientes¹¹⁻¹⁴.

1.2.2 - Membranopatias

A membrana dos eritrócitos nada mais é do que uma estrutura bidimensional, composta por um citoesqueleto e uma bicamada lipídica acoplada, que controlam a força mecânica, a deformabilidade elástica e o estado de hidratação dessa célula¹. A bicamada lipídica é composta por vários tipos de fosfolípidios, esfingolípidos, colesterol e proteínas integrais. Já foi caracterizado mais de 50 proteínas transmembranares nos eritrócitos, algumas delas sendo proteínas transmembranares responsáveis pela definição dos vários antígenos dos grupos sanguíneos. As proteínas da membrana exibem função diversa, servindo como proteínas de transporte, proteínas de adesão envolvidas nas interações dos glóbulos vermelhos com outras células sanguíneas, células endoteliais e como receptores de sinalização^{1,24}.

Em relação ao papel estrutural, 2 complexos macromoleculares de proteínas trazem relevância direta à integridade estrutural da membrana: (1) complexo de anquirina e (2) complexo 4.1R. A anquirina se liga ao domínio citoplasmático da Banda 3 além de outras proteínas e à espectrina. De forma similar, a proteína 4.1R reforça a ligação entre espectrina e actina, permite a ligação entre espectrina e Glicoforina C (GPC) e liga-se à porção citoplasmática da banda 3²⁴. Ambos os complexos interagem com os tetrâmeros de espectrina do citoesqueleto, mantendo a forma e a função da membrana eritrocitária (**Figura 5**).

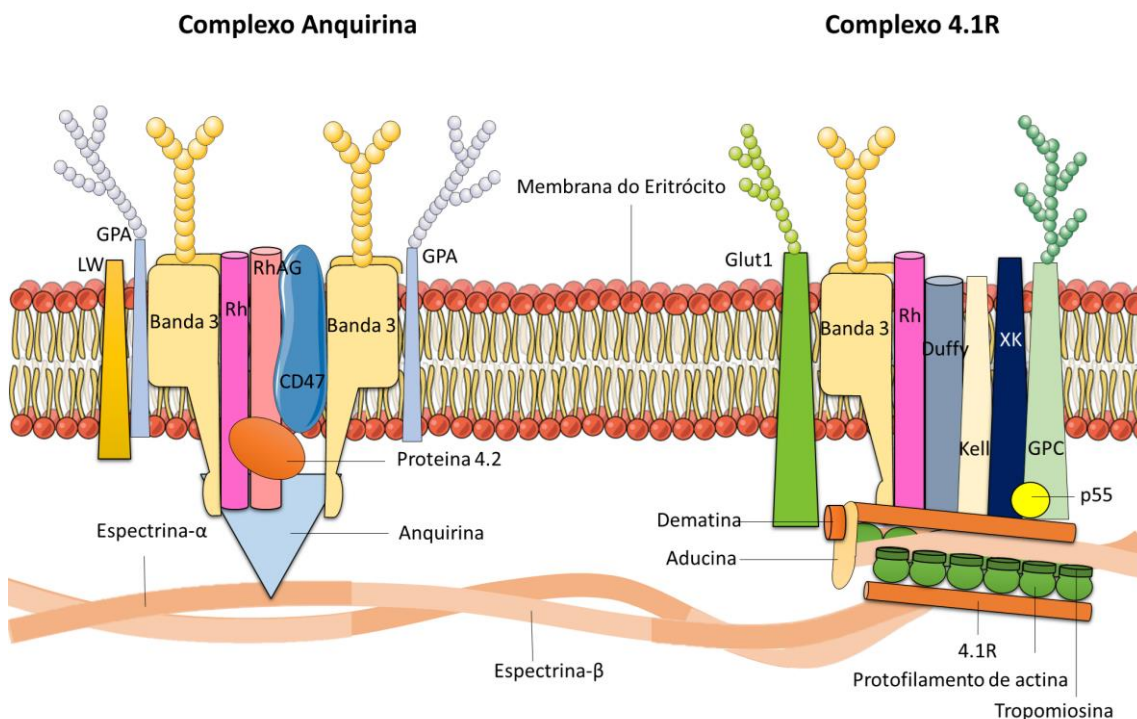


Figura 5 - Representação esquemática da membrana eritrocitária. A membrana é composta por uma bicamada lipídica anfifílica e várias proteínas transmembranares incorporadas a elas. Algumas dessas proteínas estão ancoradas a proteínas esqueléticas, como a espectrina através de dois complexos: complexo Anquirina e complexo 4.1R. Desempenhando importante papel na integridade da membrana eritrocitária (Figura feita pela autora).

Esferocitose hereditária (HS)

A síndrome de esferocitose hereditária (HS) é um defeito primário associado às proteínas da membrana eritrocitária. Este é o distúrbio hereditário da membrana plasmática mais comum no norte da Europa e na América do Norte ²⁵.

As anormalidades em proteínas de membrana, tais como anquirina, α e β -espectrina, banda 3 e proteína 4.2, levam à perda de área superficial da membrana em relação ao volume intracelular, o que causa a esfericidade do eritrócito. Estas deformações causam a fragilidade, vesiculação e perda de membrana dos eritrócitos (**Figura 6**)^{25,26}. Esses eventos acabam causando um aumento de produção de espécies reativas de oxigênio o que acarreta no dano oxidativo a biomoléculas, agravando o quadro clínico dos pacientes²⁷.

A manifestação clínica primária em pacientes com HS varia devido à gravidade do defeito na proteína da membrana ^{25,26}. Em geral, as manifestações incluem hemólise, palidez, icterícia, esplenomegalia, anemia, reticulocitose, esferócitos no esfregaço de sangue periférico e fragilidade osmótica positiva ²⁵.

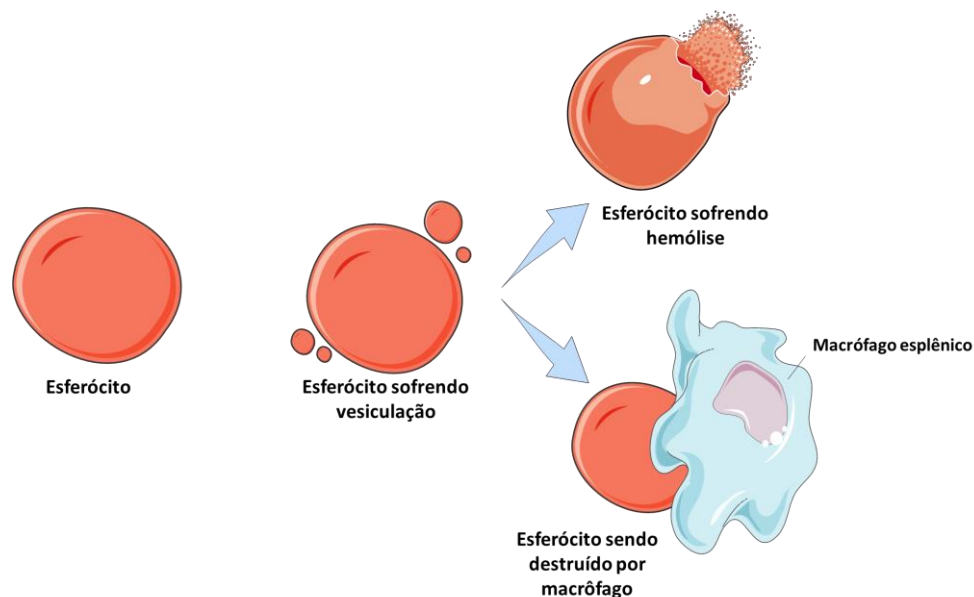


Figura 6 - Representação da hemólise e destruição dos esferócitos devido às anormalidades em sua membrana . (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

1.2.3 - Enzimopatias

Embora os eritrócitos maduros não possuam núcleo e mitocôndrias, essa célula apresenta uma via metabólica que, mesmo considerada limitada, é capaz de manter sua viabilidade durante 120 dias ²⁸. Múltiplas enzimas controlam as diferentes vias metabólicas em eritrócitos maduros, algumas inclusive são enzimas chave na manutenção desta célula ²⁸. Existem três vias metabólicas principais presentes em eritrócitos maduros, a via da glicólise anaeróbica (via de Embden-Meyerhof), a via das pentoses fosfatadas e a via metabólica oxirredutora (**Figura 7**). O defeito em uma ou mais enzimas presentes nessas ou outras vias pode levar a diferentes tipos de anemias ^{6,28,29}.

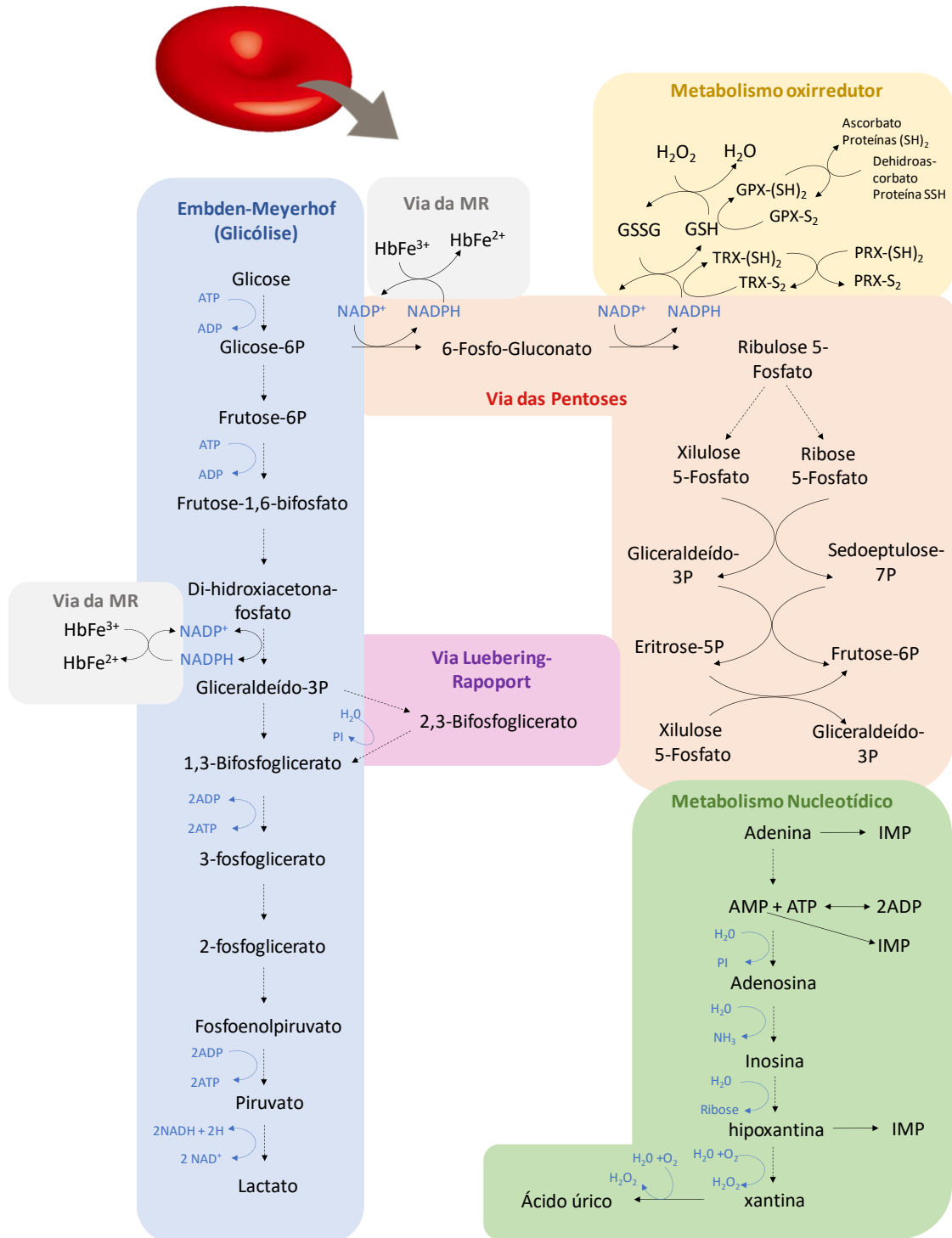


Figura 7 - Esquema do metabolismo dos eritrócitos. A via de Embden-Meyerhof (Glicólise) produz ATP, a via das pentoses fosfadas fornece à célula NADPH, o metabolismo oxirredutor protege a célula contra o estresse oxidativo, o metabolismo nucleotídico produz ácido úrico e participa da manutenção do ATP, a via Luebering-Rapoport é responsável pela produção de 2,3-Bisfosfoglicerato que regula a liberação de O₂ pelos eritrócitos nos tecidos, e a via da metahemoglobina redutase responsável pela redução da metahemoglobina em hemoglobina através do NADPH (Figura feita pela autora).

Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Esta é a deficiência enzimática humana mais prevalente, esta enzimopatia afeta centenas de milhões de pessoas e é herdada como característica recessiva ligada ao X. A maioria das mutações por deficiência de G6PD são mutações missense no gene *G6PD* localizadas no cromossomo X (banda X q28). Essas mutações resultam na diminuição ou falta de atividade enzimática da G6PD, uma enzima que catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfatadas, produzindo NADPH, crucial para a proteção das células contra o estresse oxidativo. Devido a isso, os eritrócitos deficientes em G6PD têm baixos níveis de GSH e são mais suscetíveis aos efeitos prejudiciais de espécies reativas de oxigênio acumuladas, resultando em hemólise^{30,31}. Apesar de pacientes com deficiência de G6PD serem assintomáticos em condições normais, eles apresentam um aumento no nível de espécies reativas de oxigênio que pode ser agravado com a ingestão de certas drogas oxidantes e alimentos como fava, ervilhas e corantes³².

1.3 – Estresse oxidativo nos eritrócitos

O balanço redox nos eritrócitos como qualquer outra célula é determinado através do equilíbrio entre a produção de agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Sendo os pró-oxidantes denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO). O termo espécies reativas de oxigênio é utilizado para designar espécies radicalares derivadas do oxigênio como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical alcóxila ($RO\cdot$), radical peróxila ($ROO\cdot$) e também espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete (1O_2) hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e ozônio (O_3)³³. Em baixos níveis fisiológicos, as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em processos celulares importantes como a sinalização intracelular^{34–36}. No entanto, quando essas espécies excedem a capacidade antioxidante das células, são responsáveis pela oxidação de biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, causando danos às organelas podendo levar à morte celular^{37–42}.

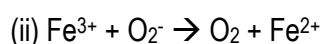
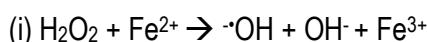
O papel fisiológico do eritrócito como transportador de oxigênio resulta em um ambiente celular extremamente oxidante, rico em oxigênio e hemoglobina (Hb) que contém um átomo de ferro em cada cadeia globínica. Devido a esse ambiente, os eritrócitos estão expostos a produção de agentes pró-oxidantes (ou ERO) e conseqüentemente estão sob estresse oxidativo constante.

A ligação do oxigênio ao ferro presente no eritrócito ocorre reversivelmente, durante esse processo, ocorre espontaneamente a auto-oxidação da hemoglobina [Hb (FeII) O_2] na metahemoglobina [Hb (FeIII)] e a liberação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)^{43–45}. Essa é a principal fonte de ERO nos eritrócitos, sendo que o ânion superóxido é capaz de atacar diretamente a membrana

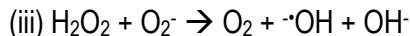
dos eritrócitos causando alterações nos lipídeos e na estrutura das proteínas⁴⁶. Uma vez que a concentração de hemoglobina no interior dos eritrócitos é bastante alta (cerca de 5mM), mesmo uma pequena parcela que sofre auto-oxidação pode gerar elevados níveis de ERO. A redução do O_2 em $O_2^{\cdot-}$ é acompanhada da oxidação do átomo de ferro da hemoglobina, formando a metahemoglobina [Hb (FeII)], a qual não é mais capaz de transportar O_2 ⁴⁷.

Através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser convertido a H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apesar de não ser uma molécula tão reativa, é capaz de oxidar tióis de proteínas proporcionando agregação e perda de atividade das mesmas. Além disso, o H_2O_2 pode reagir com metais como o ferro dando origem ao radical hidroxila ($\cdot OH$), o qual é extremamente reativo e ataca rapidamente as biomoléculas no local onde é formado. Este radical pode ser formado através da reação de Fenton e Harber-Weiss como descrito abaixo ³³:

Reação de Fenton



Reação de Harber-Weiss



O H_2O_2 pode ser gerado além da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, através de fontes extracelulares e entrar no eritrócito devido à alta permeabilidade de ERO na membrana dessa célula. Desta forma a hemoglobina está constantemente sob o efeito do H_2O_2 . Existem evidências que o aumento do H_2O_2 está diretamente relacionado com a peroxidação lipídica e hemólise do eritrócito ^{41,48}.

Os hidroperóxidos de lipídios (LOOH) são os produtos gerados pela peroxidação lipídica e sua decomposição resulta em produtos de maior reatividade e toxicidade, como os radicais peroxila (LOO^{\cdot}) ou alcóxila (LO^{\cdot}). Os lipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados estão entre os alvos mais susceptíveis à peroxidação lipídica. Nos eritrócitos, a peroxidação lipídica pode causar a polimerização dos componentes da membrana e o aumento da rigidez dos fosfolipídios da bicamada, levando à diminuição de sua deformabilidade, o que por sua vez aumenta a suscetibilidade destas células à hemólise^{49,50}.

1.4 – Estresse oxidativo em doenças hematológicas

O estresse oxidativo tem sido associado a diversos processos como o envelhecimento e ao agravamento de diversas doenças. Como já dito anteriormente as anemias hemolíticas apresentam respostas fisiológicas em comum, como o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) o que acaba agravando o quadro clínico do paciente.

Além da auto-oxidação da hemoglobina em metahemoglobina, existem outras fontes de ERO em um eritrócito anêmico. Essas fontes incluem a geração de ânion superóxido (O_2^-) pela NADPH oxidase, o acúmulo de heme devido ao excesso de cadeia da globina livre, a hemólise (que é o principal evento da anemia hemolítica) e a formação de hemicromos devido à precipitação da hemoglobina. Esses eventos levam a outros eventos oxidativos, como a degradação da banda 3 pelas Caspases, a interação dos hemicromos com a banda 3 levando à clusterização e dissociação da banda 3 das proteínas citoesqueléticas, a oxidação da proteína 4.1, actina e espectrina, resultando em interação prejudicada entre elas⁵¹ (Figura 8).

Essas respostas aumentam os danos celulares já presentes nesses pacientes, como danos à membrana e ao DNA, instabilidade celular e hemólise, agravados pelo acúmulo de ferro causado pela maioria dessas doenças^{1,29,42,52-56}.

Eventos oxidantes em eritrócitos anêmicos

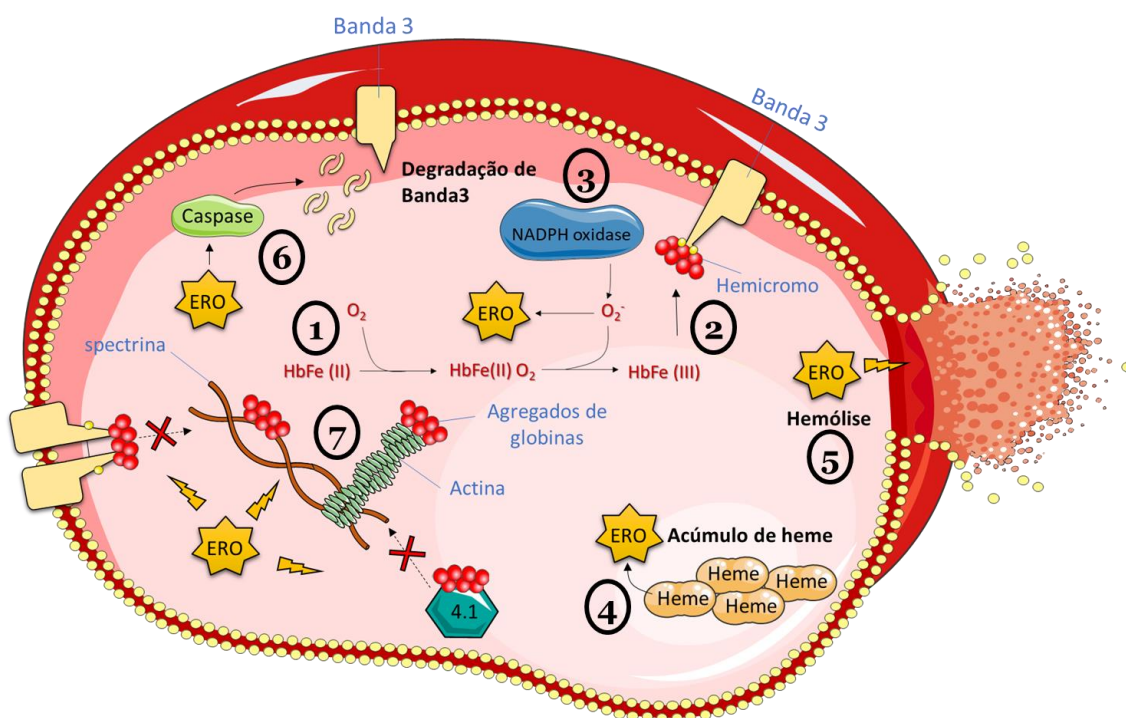


Figura 8 - Representação esquemática dos eventos oxidativos em eritrócitos anêmicos. As principais fontes de produção de ERO e os eventos oxidativos resultantes em um glóbulo vermelho anêmico. Os eventos oxidativos evidenciados na figura são: 1 - Auto-oxidação da hemoglobina em metahemoglobina; 2 - Formação de hemicromos

devido à precipitação da hemoglobina e interação com a proteína Banda-3; 3 - Geração de ânion superóxido (O_2^-) pela NADPH oxidase; 4 - Acúmulo de heme devido ao excesso de cadeia da globina livre; 5 – Comprometimento dos fosfolípidos e Hemólise; 6 - Degradação da banda 3 pelas Caspases; 7 - Oxidação da proteína banda-3, 4.1, actina e espectrina. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

1.5 – Mecanismos de defesa contra estresse oxidativo em células eritrocitárias

A produção intracelular de ERO é equilibrada por uma variedade de moléculas não enzimáticas de baixa massa molecular, entre elas piruvato, ascorbato (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), flavonóides, carotenóides e glutathiona (GSH)^{37,57,58}. Além disso, e mais importante, os eritrócitos dependem de um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui enzimas como Superóxido Dismutase (SOD), que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPX) e Peroxirredoxinas (PRXs) que catalizam a conversão de hidroperóxidos como o peróxido de hidrogênio em água (**Figura 9**)^{37,59}.

As enzimas GPXs removem o peróxido de hidrogênio de forma indireta, utilizando-o como substrato para a oxidação de glutathiona reduzida (GSH). A molécula GSH portanto tem um importante papel na eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Para que a atividade protetora da glutathiona seja mantida, ela precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, onde a Glutathiona redutase (GR) é responsável pela regeneração da Glutathiona (GSH), a partir da Glutathiona Oxidada (GSSG), na presença de NADPH (**Figura 9**)⁶⁰. Peroxirredoxinas também precisam ser regeneradas em um ciclo catalítico para manterem seu importante papel antioxidante. Nesse ciclo participam a enzima Tiorredoxina (Trx) que catalisa a redução de todas as isoformas de Peroxirredoxinas oxidadas (com exceção da isoforma 6) e Tiorredoxina Redutase (TrxR) que catalisa a redução de Trx a partir de elétrons doados por NADPH (**Figura 9**)⁶¹.

As peroxirredoxinas consistem em uma nova família emergente de enzimas antioxidantes capazes de catalisar a redução de hidroperóxidos através de cisteínas altamente reativas presentes em seus locais ativos. No eritrócito humano, a isoforma 2 de Peroxirredoxina (PRDX2) é a enzima antioxidante mais prevalente, sendo a terceira proteína mais expressa nesse tipo de célula e tem demonstrado uma importância fundamental na defesa em muitos tipos celulares, principalmente nos eritrócitos^{59,62}.

PRDX2 foi inicialmente caracterizada como uma proteína associada à membrana já que se liga reversivelmente a parede da membrana e está ligada na regulação do canal de Ca^{2+}/K^+ ^{63,64}. Estudos realizados recentemente demonstraram que a expressão da PRDX2 se mostrou mais alta em eritrócitos de humanos e ratos com β -talassemia, uma doença caracterizada pela

diminuição ou ausência da cadeia β da hemoglobina que leva ao acúmulo de cadeias livres de α -globina e altos níveis de ERO^{65,20,63,66-68}.

Um estudo interessante de De Franceschi *et al.* demonstrou que durante a eritropoese na β -talassemia as espécies reativas de oxigênio parecem aumentar a expressão da PRDX2, que tem um papel multifatorial dentro dos eritrócitos. Além de atuar como uma enzima antioxidante, PRDX2 pode translocar-se para a membrana através da ligação ao domínio citoplasmático da banda 3, provavelmente para proteger a banda 3 e suas proteínas associadas contra danos oxidativos^{65,69,70}.

Além disso, também foi demonstrado que a PRDX2 funciona como chaperona molecular da hemoglobina, tanto durante a eritropoese, mantendo seu enovelamento adequado quanto após a maturação, evitando sua desnaturação. Além disso, a PRDX2 liga-se ao heme livre com alta afinidade, possivelmente para impedir as ações oxidativas desse grupamento^{65,71}. Os principais eventos antioxidantes presentes em eritrócitos anêmicos estão apresentados na figura 9.

Eventos antioxidantes em eritrócitos anêmicos

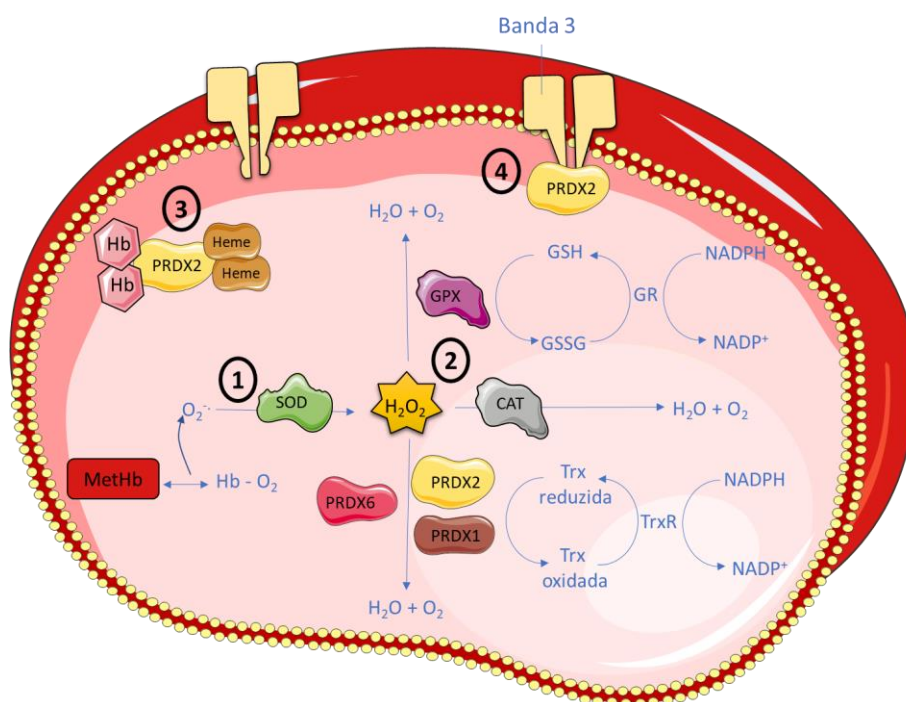


Figura 9 - Representação esquemática dos principais eventos antioxidantes em eritrócitos anêmicos. Os principais eventos antioxidantes presentes em eritrócitos acometidos por anemias hemolíticas incluem a atividade de enzimas antioxidantes importantes: 1 - Remoção de $O_2^{\cdot -}$ pela enzima SOD com formação de H_2O_2 ; 2 - Remoção de H_2O_2 por CAT, GPX, PRDX2, PRDX1 e PRDX6; 3 - Atuação de PRDX2 ligando-se a hemoglobina e grupamento heme livre para impedir suas ações oxidativas; e 4 - Ligação de PRDX2 à proteína banda 3 impedindo sua oxidação. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

Como visto anteriormente as anemias hemolíticas em geral causam diversas manifestações em comum, dentre elas o aumento de produção de ERO. No caso da deficiência de G6PD os indivíduos apresentam uma diminuição de NADPH uma molécula essencial na via antioxidante da célula, o que acarreta diretamente no aumento do estresse oxidativo. Em outros casos como a anemia falciforme, a falcisação da hemoglobina acarreta em hemólise e vaso-oclusão que levam ao acúmulo de ferro e consequente aumento do estresse oxidativo. Já nas talassemias, a falta/diminuição na produção de globinas acarreta na precipitação das globinas produzidas e consequente acúmulo de ferro, além disso pacientes com talassemias muitas vezes necessitam de transfusões recorrentes o que leva ao aumento do acúmulo de ferro e consequente maior estresse oxidativo^{5,51,72}.

Frente a isso, atualmente vem sendo avaliada a ação moléculas antioxidantes para desenvolvimento de terapias antioxidantes em indivíduos acometidos por anemias hemolíticas. Neste contexto, diferentes agentes terapêuticos foram e estão sendo testados atualmente como suplementação ao tratamento dessas anemias. Por exemplo, em anemia falciforme já foi testada a ação de moléculas como ficocianobilina, ácido fólico em altas doses, ácido lipóico, e *N*-acetilcisteína, entretanto a aplicação clínica desses compostos como suplemento terapêutico mostrou-se limitada, uma vez que esses não apresentam efeitos antioxidantes significativos *in vivo*, provavelmente por conta de sua baixa solubilidade^{73,74}.

Atualmente colaboradores do nosso grupo de pesquisa vem estudando a implicação da melatonina neste mesmo sentido, como um tratamento adjuvante a fim de minimizar os efeitos causados por espécies reativas de oxigênio em pacientes com anemias hemolíticas. Da Silva *et al.* 2014 demonstrou que a administração da melatonina em eritrócitos falcêmicos protegia essas células de danos oxidativos⁷⁵.

1.6 – Melatonina

1.6.1 – Papel fisiológico da melatonina

Melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio secretado principalmente pela glândula pineal, sendo também reportado como fonte desse hormônio a retina, medula óssea, plaquetas, pele, linfócitos, cerebelo e trato intestinal de espécies de vertebrados⁷⁶.

Melatonina é principalmente sintetizada pelos pinealocitos através do aminoácido triptofano que é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano-5-hidroxilase, então ele é descarboxilado pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase formando serotonina. A partir daí, a

serotonina é transformada em melatonina através da ação de duas enzimas presentes na glândula pineal: a serotonina é primeiro acetilada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) formando N-acetilserotonina, que então é metilado pela enzima acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT) formando finalmente a melatonina (**Figura 10**) ⁷⁶.

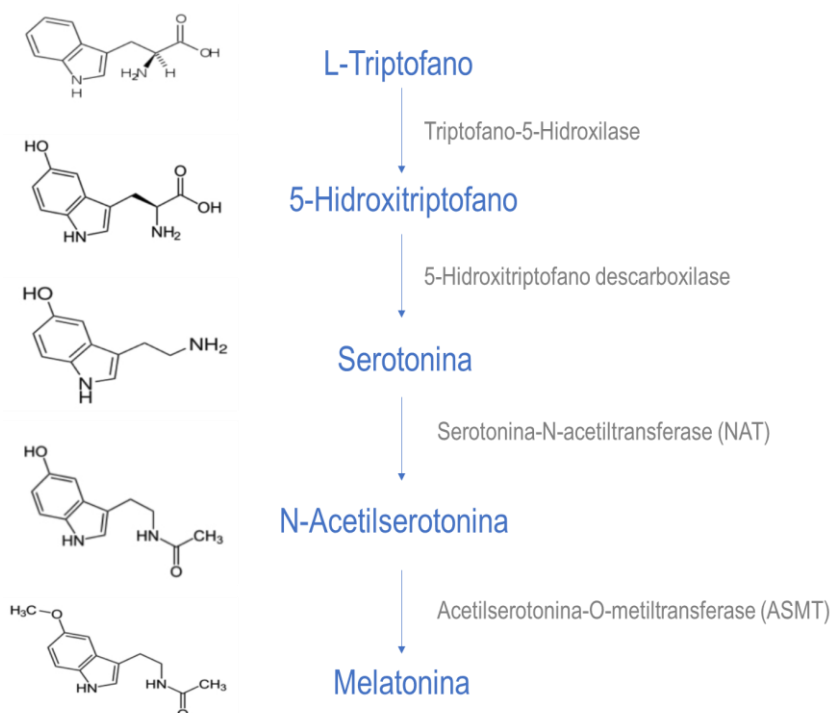


Figura 10 – Via de síntese de melatonina a partir do aminoácido essencial triptofano. (Adaptado de Bravo *et.al.* 2012⁷⁷).

A síntese de melatonina bem como sua secreção é controlada pelo ciclo diário, sendo ativada no escuro e inibida pela luz (**Figura 11**) ⁷⁸. A informação luminosa é transmitida da retina para a glândula pineal. Em humanos a secreção desse hormônio se inicia logo após o pôr do sol e alcança um pico no meio da noite, então sua secreção vai diminuindo gradativamente a partir da metade da noite ^{76,79}. Além da concentração de melatonina variar com o ciclo circadiano, ela também varia com a idade do indivíduo, bebês secretam uma quantidade mínima de melatonina até os 3 meses de idade ⁸⁰. A secreção da melatonina aumenta e apresenta um ciclo circadiano conforme o crescimento da criança, com 3 anos de idade a criança já apresenta um ritmo de produção de melatonina estabelecido. O pico de produção de melatonina noturna se dá entre os 20-40 anos de idade, depois disso a secreção desse hormônio vai decaindo progressivamente ^{76,79,80}.

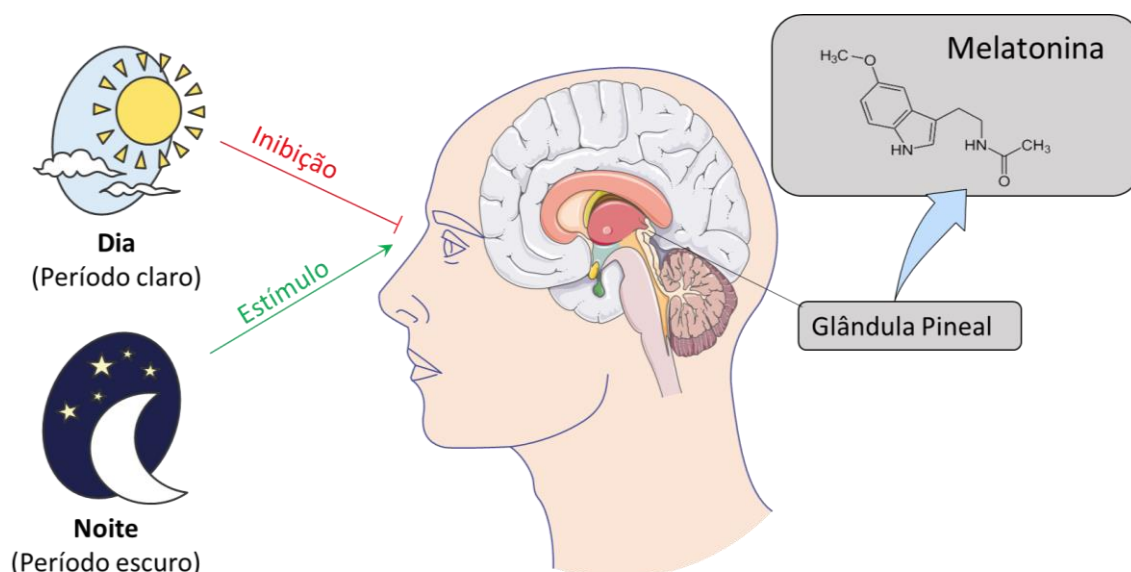


Figura 11 – Secreção de melatonina pela glândula pineal. A exposição da luz à retina transmite uma resposta para a glândula pineal através do núcleo supraquiasmático (no hipotálamo) e inibe a secreção de melatonina, já o período escuro estimula a secreção desse hormônio. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

Como mais conhecido papel biológico, a melatonina regula o ciclo circadiano como o ritmo de sono, ritmo neuroendócrino e temperatura do corpo ⁷⁹. Mas esse hormônio também está envolvido em diversos papéis importantes como desenvolvimento fetal, reprodução, pressão sanguínea, regulação cardiovascular, sistema imune e função antioxidante ⁷⁶.

Recentemente a melatonina e seus derivados tem sido amplamente estudados pelo seu papel direto e indireto como antioxidante⁸¹. Como mecanismo direto a melatonina está envolvida na detoxificação de oxidantes pela transferência de elétrons, transferência de hidrogênio e formação de aduto (intermediário na reação entre melatonina e o agente oxidante)^{82,83}. Diferentes de outras moléculas antioxidantes que agem em uma proporção 1:1 com a espécie oxidante, a melatonina funciona em cascata, sendo que seus derivados (C-3-OHM[•], C-3-OHM, MEL⁺⁺, AFMK, AMK, entre outros) também tem ação antioxidante. Desta forma, uma molécula de melatonina é capaz de neutralizar 4 ou mais espécies reativas (**Figura 12**)⁸⁴. Além de agir diretamente, a melatonina pode atuar indiretamente, estimulando enzimas antioxidantes⁸⁵, suprimindo enzimas pró-oxidantes⁸⁶ e melhorando funções mitocondriais reduzindo assim a formação de oxidantes ^{85,87}.

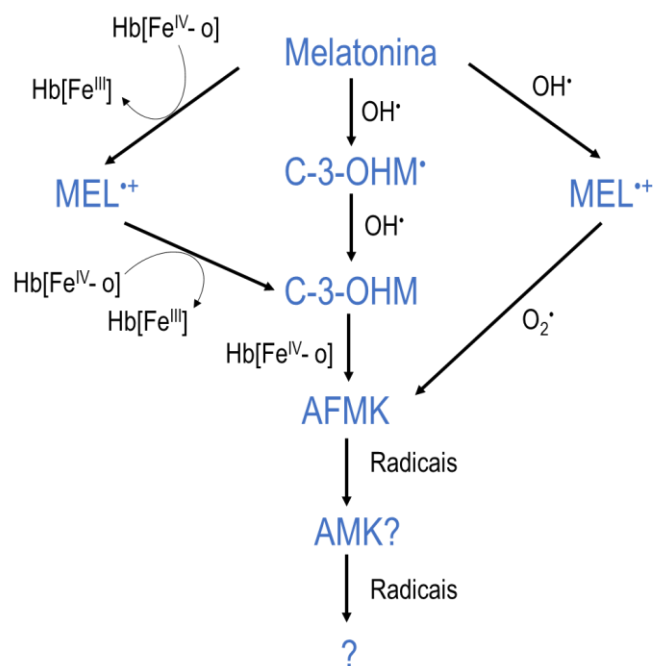


Figura 12 – Cascata de reações da melatonina como um antioxidante direto. Cascata de ação da melatonina e seus derivados C-3-OHM· (radical 3-hidroximelatonina cíclico), C-3-OHM (3-hidroximelatonina cíclica), MEL·+ (radical cátion melatoninil), AFMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina), AMK (N-acetil-5-metoxiquinuramina) (Adaptado de Tan *et al.* 2002⁸⁴).

Apesar do importante papel antioxidante da melatonina, alguns estudos tem demonstrado que esse composto ocasionalmente produz ERO. Em células Jurkat, MOLT-4, CMK e cultura de modelo de Alzheimer, concentrações altas de melatonina (>1mM) promoveram a geração de ERO e aumento da citotoxicidade que em alguns casos levou a apoptose⁸⁸⁻⁹¹. Particularmente em células tumorais, a melatonina pode produzir elevados níveis de ERO, em células HL-60 por exemplo, 1mM de melatonina causa o aumento da citotoxicidade e atividade das caspases 9 e 3 levando as células à apoptose⁹¹. Em modelos de cultura de alzheimer, a administração de melatonina a 1mM pode levar ao aumento de HO-1 a tal ponto que o ferro ativo resultante da clivagem do heme causa danos oxidativos nessas células⁸⁸. Para K562 já foi demonstrado anteriormente que a concentração de melatonina necessária para levar a célula à apoptose deve ser maior que 1mM⁸⁹, apesar de controversamente já ter sido observado a redução da viabilidade de células K562 quando administrado melatonina a 1mM após 16hs de tratamento⁹¹.

Quando testado concentrações <10µM de melatonina nesses tipos celulares houve pouco ou nenhum aumento de ERO⁸⁹. Esses dados de uma forma geral demonstraram que o efeito pró ou antioxidante da melatonina depende do tipo celular, da dose administrada e do tempo de incubação. Entretanto, podemos observar que os efeitos citotóxicos e indutores da produção de ERO se limitam à células tumorais ou linhagens de modelo de Alzheimer quando administradas concentrações altas de melatonina (>1mM).

1.6.2 – Mecanismo antioxidante indireto da Melatonina

A melatonina apresenta além de sua atividade direta como antioxidante, uma atividade indireta como antioxidante, através do estímulo de expressão de enzimas antioxidantes. Apesar dos mecanismos envolvidos no aumento da expressão de enzimas antioxidantes induzido pelo tratamento de melatonina não ser totalmente conhecido, estudos recentes têm fornecido informações que contribuem para melhor compreender essa via.

KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), um sensor de estresse oxidativo, se liga a Ubiquitina ligase (Cul3- Rbx1) e à NRF2 (*Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2*) um fator de transcrição para enzimas antioxidantes. Em condições normais de não estresse, NRF2 é ubiquitinado pelo complexo KEAP1-Cul3-Rbx1 e degradado pelo proteassoma. Já em condições de estresse oxidativo, KEAP1 e o complexo KEAP1-Cul3-Rbx1 se desligam de NRF2. NRF2 neste caso se acumula no citoplasma e migra para o núcleo onde age como um fator de transcrição ativando o promotor Elemento de resposta antioxidante (ARE), juntamente com seu heterodímero obrigatório, a proteína *Small Maf* (sMAF). A via NRF2-ARE leva a transcrição de diversas proteínas antioxidantes de fase II, como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPX), Hemoxigenase I (HO-1), NADPH-quinona oxidase (NQO1), sulfirredoxina (Srx), Tiorredoxina Redutase (Txnrd), Peroxiredoxina (PRDX), Glutathione-S-transferase (GST) além de estimular a transcrição de γ -Globina (Esquema representado pela **Figura 13**)⁹².

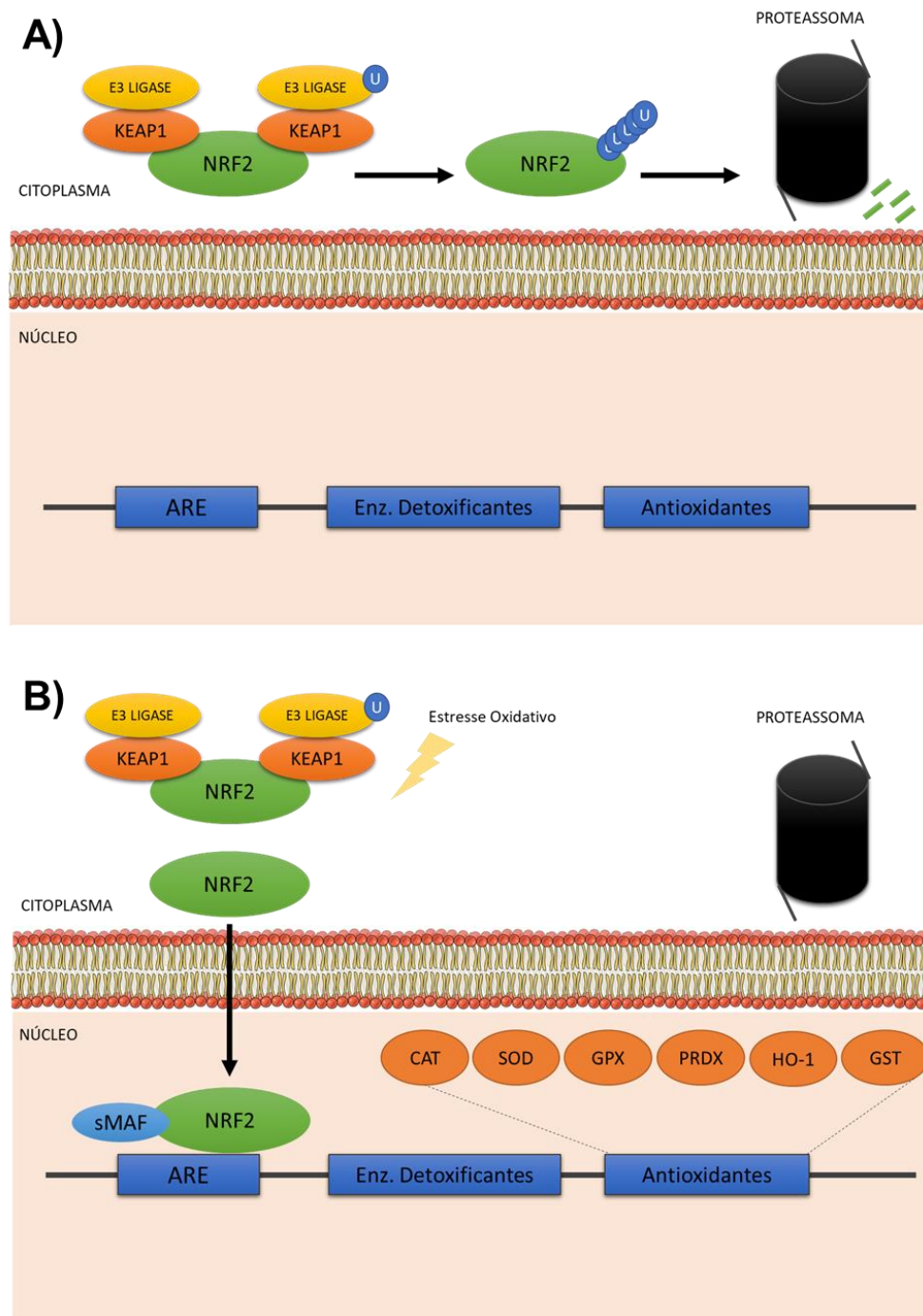


Figura 13 – Esquema representando a via NRF2-ARE na transcrição de genes que codificam a expressão de proteínas antioxidantes de fase II. (A) Via NRF2-ARE em condições normais de não estresse oxidativo, onde ocorre uma transcrição de genes antioxidantes. (B) Via NRF2-ARE em condições de estresse oxidativo, onde ocorre o acúmulo de NRF2 no citoplasma, que se transloca para o núcleo e promove a transcrição de genes antioxidantes (Figura feita pela autora).

Estudos anteriores demonstraram que melatonina aumenta níveis celulares de NRF2 em diversos modelos de estresse oxidativo, de forma semelhante à inativadores do proteassoma. Portanto tem sido proposto que a melatonina pode modular a atividade de enzimas antioxidantes

através da via NRF2-ARE inativando a ação do proteossoma aumentando consequentemente os níveis de NRF2 no citoplasma e núcleo ⁹².

1.6.3 - Melatonina no tratamento de doenças hemolíticas: uma perspectiva

Como já dito, diversos estudos vêm demonstrando a necessidade da utilização de medicamentos antioxidantes adicionais ao tratamento de anemias hemolíticas a fim de diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo. Alguns compostos vem sendo estudados para esse fim porém sua aplicação clínica mostrou-se limitada por não apresentarem efeitos antioxidantes significativos *in vivo* provavelmente por apresentarem baixa solubilidade ⁹³.

Visto isso, a melatonina vem se mostrando um promissor alvo de estudos nesse sentido, uma vez que essa molécula apresenta uma alta solubilidade e sua administração *in vitro* é capaz de proteger o eritrócito da hemólise oxidativa, prevenir a peroxidação lipídica, aumentar dos níveis de GSH e outros componentes redox eritrocitários ⁹⁴⁻⁹⁶. Além disso tem sido demonstrado que mesmo em altas concentrações, sua administração como medicamento é segura, sendo que efeitos colaterais mínimos foram reportados em humanos, como dor de cabeça, tontura e náuseas ⁹⁷. Ainda assim, os mecanismos envolvidos nessa proteção ao eritrócito pela melatonina, bem como o seu significado clínico ainda precisam ser melhor compreendidos.

1.7 - Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias

A linhagem de células K562 foi inicialmente estabelecida através de efusão pleural de uma paciente de 53 anos com Leucemia Mielóide Crônica (CML) em 1975 por Lozzio & Lozzio ⁹⁸. Estudos demonstraram que K562 sintetiza hemoglobinas do tipo fetal e embrionária e que essa síntese é fortemente aumentada pelo tratamento com hemina, hidroxiuréia entre outros agentes (**Tabela 1**). Além do aumento da hemoglobina principalmente do tipo fetal (HbF), outras modificações importantes são observadas, como aumento do tamanho celular e modificações morfológicas como alteração no formato e aparecimento de vesículas celulares⁹⁹⁻¹⁰³. Adicionalmente à presença de hemoglobina, as células K562 tem algumas características em comum com células eritróides humanas, como Glicoproteínas de superfície ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Diante desses achados, a linhagem K562 foi classificada como uma linhagem eritroleucêmica, equivalente a um precursor de células eritróides e megacariocíticas ¹⁰⁷.

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm utilizado a célula K562 como modelo biológico *in vitro* para reproduzir as características de células eritróides ou megacariocíticas, auxiliando a elucidar os mecanismos ainda não conhecidos nesses tipos celulares ^{68,108-110}. Esta plasticidade torna as células K562 excelentes modelos experimentais envolvendo o estudo de células eritróides, o que é de fundamental importância para o entendimento de doenças hemolíticas.

As células K562 possuem um diâmetro de aproximadamente 20µm, possuem um citoplasma escasso sem grânulos, núcleo central e dois ou mais nucléolos proeminentes ¹⁰⁶ (**Figura 14**).

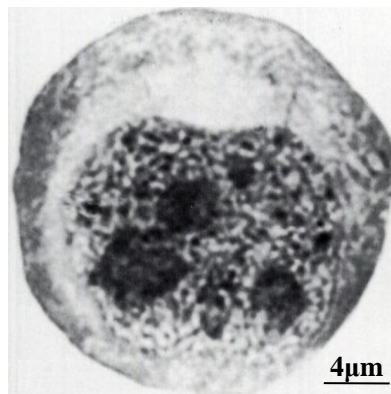


Figura 14 – Morfologia geral de uma célula K562. Podem ser observados seus nucléolos proeminentes e ausência de grânulos no citoplasma (Modificado de Koeffler & Golde, 1980 ¹⁰⁶).

Tabela 1 - Indutores de diferenciação da linhagem eritroleucêmica K562 (atualizado a partir de Tsiftosuglou *et. al.*, 2003¹¹¹)

Agentes indutores	Fenótipo terminal da diferenciação
5 – Azacytidina	Eritróide
5-FU	Eritróide
Ácido butírico	Eritróide
Antraciclina	Eritróide
Apicidina	Eritróide
Ara-C	Eritróide
Buritrato de sódio	Eritróide/megariocítico
Cis-platina	Eritróide
Cromomicina	Eritróide
Guanina, guanosina e dGTP	Eritróide
Éster de forbol (PMA, TPA)	Megacariocítico
Hemina	Eritróide
Herbimicina	Eritróide
HMBA	Eritróide/megacariocítico
Hidroxiuréia	Eritróide
Mitramicina	Eritróide
PA	Eritróide
PMEA	Eritróide
Resveratrol	Eritróide
Tallimustina	Eritróide
Tiazofurina	Eritróide
Vitamina B12	Eritróide

Estudos realizados por colaboradores do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma eficácia na diferenciação de células K562 utilizando os indutores hemina e hidroxiuréia combinados¹¹².

2.0 – JUSTIFICATIVA

2.0 – JUSTIFICATIVA

Como visto anteriormente as anemias hemolíticas em geral causam diversas manifestações clínicas, dentre elas o aumento de produção de ERO. No caso da deficiência de G6PD os indivíduos apesar de normalmente serem assintomáticos apresentam a diminuição de NADPH que acarreta diretamente no aumento do estresse oxidativo. Em outros casos como a anemia falciforme, a falcização da hemoglobina acarreta em hemólise e vaso-oclusão entre outras manifestações que levam ao acúmulo de ferro e consequente aumento do estresse oxidativo. Já nas talassemias, a falta/diminuição na produção de globinas acarreta a precipitação das globinas produzidas normalmente que se agregam e destroem as hemácias, além disso pacientes com talassemias muitas vezes necessitam de transfusões recorrentes. Estes mecanismos de destruição de hemácias e transfusão leva ao aumento do acúmulo de ferro nas células e tecidos levando a maiores níveis de produção de ERO e consequentemente estresse oxidativo^{5,51,72}. Esses fatos, levou a estudos recentes utilizando diferentes moléculas antioxidantes conhecidas como vitamina C e Vitamina E como tratamento adjuvante para minimizar os efeitos causados pelo aumento do estresse oxidativo nessas doenças. Entretanto nenhum avanço foi dado uma vez que esses agentes não apresentaram um papel antioxidante *in vivo*.

Diante disso, colaboradores do nosso grupo de pesquisa vem estudando a implicação do uso de melatonina, como um antioxidante para tratamento adjuvante de indivíduos com anemias hemolíticas. Isso nos levou a necessidade de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no papel de melatonina como um antioxidante em um modelo biológico de células eritróides.

3.0 - OBJETIVOS

3.0- OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da melatonina na proteção contra estresse oxidativo em células eritroleucêmicas k562 como um modelo biológico eritrocitário.

Objetivos específicos

- (1) Avaliar o papel de diferentes concentrações de melatonina na viabilidade de células K562 diferenciadas e não diferenciadas com Hemina e Hidroxiureia quando expostas ou não a estresse oxidativo induzido por H₂O₂;
- (2) Avaliar a expressão gênica de antioxidantes diante o tratamento com melatonina, com ou sem a indução de estresse por H₂O₂;
- (3) Avaliar a produção proteica de antioxidantes diante o tratamento com melatonina, com ou sem a indução de estresse por H₂O₂;
- (4) Avaliar o nível de peroxidação lipídica diante o tratamento com melatonina, com ou sem a indução de estresse por H₂O₂.
- (5) Avaliar a atividade enzimática de importantes enzimas antioxidantes diante o tratamento com melatonina, com ou sem a indução de estresse por H₂O₂.

4.0 – METODOLOGIA

4.0 - METODOLOGIA

4.1 – Linhagens utilizadas

Linhagem de célula eritroleucêmica

K562 – Célula com características eritróides derivada de paciente com leucemia mieloide crônica em fase blástica (ATCC, Philadelphia, USA).

4.2 – Cultivo de células eritroleucêmicas K562

A linhagem celular K562 foi obtida pelo banco de células ATCC, Philadelphia, USA e gentilmente cedida pela Dra. Adriana Duarte do Laboratório de Biologia Molecular da Unicamp.

K562 são células que proliferam em suspensão e após se adaptarem ao meio, dobram de número a cada 24 horas e apresentam-se como aglomerados celulares em formato de “cacho de uva” (**Figura 15**)^{104,107}.

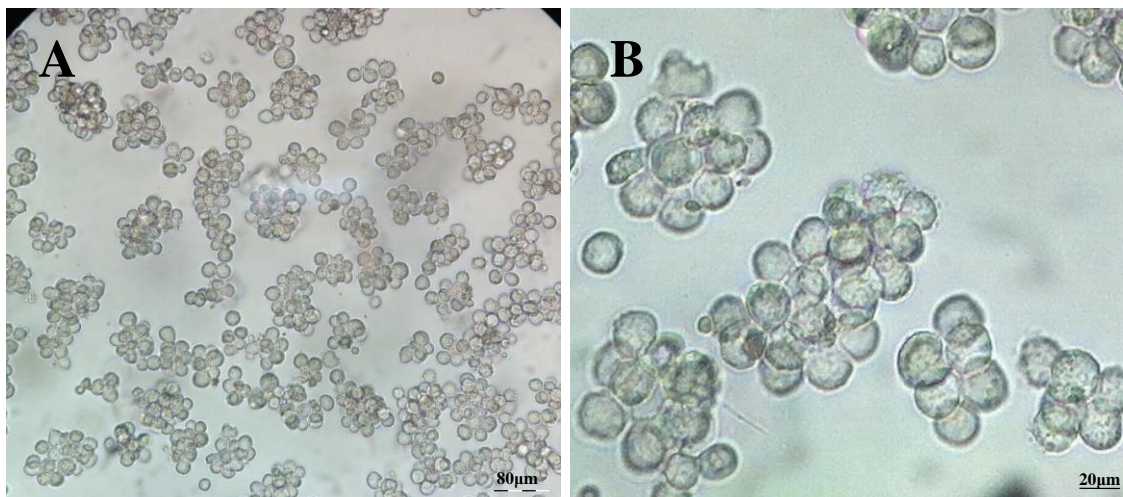


Figura 15 – Cultivo de células K562. (A) Células em suspensão de aproximadamente 20µm que foram aglomerados celulares em forma de “cachos de uva” (aumento 20X). (B) detalhe para a formação de aglomerados (aumento 40X) (Fotos da autora).

Foi utilizado o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), o qual é considerado um excelente meio de cultivo para diferentes células como HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC e K562 entre outras. A cultura celular foi mantida em frascos de poliestireno em estufa a 37°C com

atmosfera de 5% de CO₂. Ao meio foi adicionado antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e fungicida anfotericina B (0,25µg/ml).

Foi utilizado o Soro Bovino Fetal (SBF) como complemento do meio de cultura, este contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. De 2 em 2 dias, aproximadamente, as células foram observadas quanto a sua confluência, número, morfologia e possíveis contaminações, adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal e trocando-o quando julgar necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação de células mortas) (**detalhes em Apêndice A**).

4.3 – Diferenciação de K562 em células com características eritróides e exposição ao agente protetor (melatonina) e estressor (H₂O₂)

O experimento foi realizado em duas replicatas biológicas independentes. No dia 0 do experimento, 2-3x10⁶ células/ml (100% viáveis e 70-80% confluentes) foram dispostas em garrafas de poliestireno em um volume final de 10ml de cultura, e induzidas à diferenciação através da adição de Hemina (50µM) e Hidroxiuréia (100µM), sendo que culturas não diferenciadas foram utilizadas como forma de comparação.

A cada dia, foi feito o tratamento das amostras com a melatonina a fim de estimular o papel protetor desse composto e então induzido ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. Dessa forma, foram administradas 2 concentrações de melatonina (1nM e 1mM) além do controle (sem adição de melatonina), e incubadas em estufa a 37°C/ 5% de CO₂ por 1 hora. Após o tratamento das células com melatonina foi realizado o tratamento com o agente estressor peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 100µM além do controle (sem adição de H₂O₂). Após a administração do agente estressor, as culturas foram incubadas em estufa a 37°C/ 5% de CO₂ por mais 1 hora.

Tanto o tratamento com a melatonina quanto com o H₂O₂ foi realizado todos os dias (D₀, D₁, D₂, D₃ e D₄), sendo que as amostras foram coletadas após 1 hora da administração do agente estressor (H₂O₂), inclusive no D₀. As condições testadas estão especificadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Tabela das condições testadas a cada dia do experimento.

Não diferenciadas	Diferenciadas
K562 Controle	K562 Controle
K562 Controle + 100µM de H ₂ O ₂	K562 Controle + 100µM de H ₂ O ₂
K562 Mel. 1nM	K562 Mel. 1nM
K562 Mel. 1nM + 100µM de H ₂ O ₂	K562 Mel. 1nM + 100µM de H ₂ O ₂
K562 Mel. 1mM	K562 Mel. 1mM
K562 Mel. 1mM + 100µM de H ₂ O ₂	K562 Mel. 1mM + 100µM de H ₂ O ₂

O experimento foi acompanhado durante 5 dias (D₀, D₁, D₂, D₃ e D₄). A cada dia, o material foi coletado e lavado com PBS 1X e o pellet celular foi então utilizado para as seguintes análises:

- (A) Determinação da expressão de hemoglobina através do método de benzidina ¹¹³, realizado apenas no último dia do experimento (D₄);
- (B) Identificação de modificações morfológicas por citometria de fluxo, em K562 quando induzidas a diferenciação por hemina e hidroxiuréia, realizado apenas no último dia do experimento em células Controle (Não tratadas com melatonina e H₂O₂);
- (C) Contagem de células e determinação da viabilidade celular através de azul de tripan, realizado todos os dias do experimento (D₀, D₁, D₂, D₃ e D₄);
- (D) Análise de expressão gênica por PCR em tempo real, realizado em 3 dias do experimento (D₀, D₂ e D₄);
- (E) Análise de expressão proteica pelo método de western blotting, realizado em 3 dias do experimento (D₀, D₂ e D₄);
- (F) Análise de peroxidação lipídica pelo método de MDA, realizado em 3 dias do experimento (D₀, D₂ e D₄);
- (G) Análise de atividade enzimática de CAT, GR e G6PD, realizado em 3 dias do experimento (D₀, D₂ e D₄).

4.3.1 - Determinação de expressão de hemoglobina utilizando o método de benzidina

Para determinação da expressão de hemoglobinas induzidas pela adição de hemina (50µM) e Hidroxiuréia (100µM), foi utilizado o método colorimétrico de benzidina ¹¹³. Esse método é amplamente utilizado na literatura para detectar hemoglobina em amostras. O método de benzidina baseia-se na catálise da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio

pela hemoglobina presente na amostra. O oxigênio formado oxida a benzidina, alterando sua estrutura fazendo com que fique com coloração marrom (**Figura 16**).

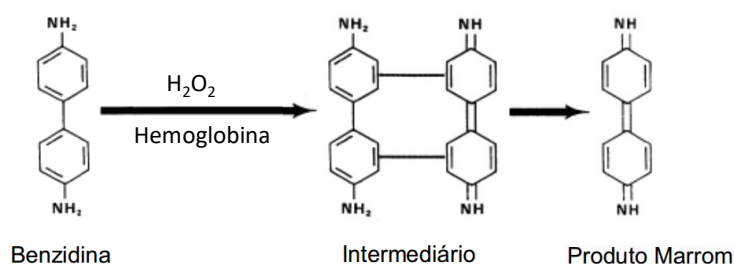


Figura 16 – Estrutura molecular do reagente benzidina e seu produto oxidado marrom (Adaptado de ¹¹⁴).

As células em solução foram centrifugadas e o precipitado celular foi ressuspenso em 1ml de PBS 1X. Em um tubo eppendorf foi adicionado 100µl da solução contendo as células, 10µl de benzidina e 50µl de H_2O_2 . Os eppendorfs foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 25 minutos. A solução foi pipetada em uma lâmina, adicionada uma lamínula sobre a gota e observado imediatamente ao microscópio de luz. Células diferenciadas têm a capacidade de expressar hemoglobina a qual é corada pelo corante benzidina e aparecem com uma coloração marrom escura. Essas células são comparadas às células não diferenciadas que aparecem com uma cor transparente, muitas vezes levemente marrom, por conta da expressão basal de hemoglobina em células não diferenciadas.

4.3.2 - Identificação de modificações morfológicas por citometria de fluxo, em K562 quando induzidas a diferenciação por hemina e hidroxiuréia

As células K562 controle (não tratadas com melatonina e H_2O_2) diferenciadas pelo estímulo de hemina combinada com hidroxiuréia no dia 4 de diferenciação, foram avaliadas quanto a mudanças morfológicas quando comparadas a células não diferenciadas, para tanto foi utilizado um gráfico de FSC (tamanho celular) vs. SSC (complexidade celular).

Após 5 dias de diferenciação, as células foram coletadas, lavadas com PBS 1X e finalmente, o tamanho e a morfologia dessas células foi determinado por citometria de fluxo no citômetro de fluxo ACCURI C6 (BD) por meio da análise de 20.000 eventos e os dados foram avaliados com o programa *BD CSampler*.

4.3.3 - Contagem de células e determinação da viabilidade celular através de azul de tripan

Para calcular a viabilidade celular, foi utilizado o reagente azul de tripan (Trypan Blue), na concentração final de 0,1%. Este reagente não atravessa membranas íntegras e assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul.

Dessa forma células viáveis aparecem com coloração branco/transparente enquanto que células mortas ou danificadas apresentam uma coloração azul. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a proporção entre o número de células vivas e mortas nos forneceu uma porcentagem da viabilidade celular.

4.3.4 – Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

Extração de RNA

Para obtenção do RNA de células K562 utilizou-se o método de extração a partir do reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente as amostras contendo células K562 ressuspendidas em TRIzol® foram descongeladas no gelo, e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 200µL de clorofórmio (CHCl₃) e a mistura foi agitada por 15 segundos, e então foi realizada nova incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Foi adicionado 500µl de isopropanol, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido pela centrifugação por 10 minutos a 15.000g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1ml de etanol 75% gelado, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000g à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspendido em água livre de RNase e incubado a 42°C por 10 minutos.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

Primeiramente, a fim de retirar possíveis contaminações com moléculas de DNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase seguindo as orientações do fabricante. Para o tratamento foi utilizado 1,0µg de RNA, foi adicionado 1,0µl da enzima *DNaseI* (1 u/µl) (Fermentas, ThermoScientific), 1,0µl *DNaseI reaction buffer* com MgCl₂ 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl₂ 20mM, KCl 500mM) e a reação foi completada para um volume final de 10µl.

A reação foi incubada por 30 minutos à 37°C e foi paralisada com a adição de 1,0µl de EDTA 50mM seguida pela incubação por 10 minutos a 65°C.

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA tratado com *DNaseI*, através da reação de transcrição reversa, usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) seguindo as orientações do fabricante. A cada amostra de RNA tratado, foi adicionado 2,0 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix (100 mM de cada), 2,0 µl de 10X RT Random *Primers*, 1,0 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1,0 µl de inibidor de RNase completando com 3,2 µl de H₂O livre de nuclease.

A síntese de cDNA foi realizada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e paralisada através de incubação a 85°C por 5 minutos.

Real-Time PCR (qPCR)

A técnica é baseada no monitoramento óptico da fluorescência do produto de PCR ciclo a ciclo e pode ser usada na quantificação da expressão gênica. Alíquotas de cDNA foram usadas como molde da PCR. Foram utilizados *primers* construídos especificamente para os genes de interesse *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX6*, *SOD1*, *CAT*, *GPX1*, *NRF2*, *KEAP1*, *APEX1* (**Detalhes no Apêndice B**), e como controle, *primers* para amplificação do gene *β-ACTINA* (*BAC*) que foi testado anteriormente quanto a sua aplicação como endógeno, não mostrando variação entre as condições testadas. A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) onde utilizamos o reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os *primers* foram desenhados através do programa "*Primer Express*" (Applied Biosystems). A quantificação dos resultados foi realizada conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Após a síntese do *primer*, realizamos a padronização da concentração de cada *primer*, partimos para a elaboração da curva de eficiência da reação, a qual deve apresentar o valor de R² mais próximo possível de 1 (100%) (**Detalhes em Apêndice B**).

4.3.5 – Análise de expressão proteica pelo método de western blotting

A fim de avaliar o conteúdo proteico de células K562 não diferenciadas e diferenciadas quando expostas ao agente protetor (Melatonina) e agente estressor (H₂O₂) foi realizada a técnica de Western Blotting.

Extração e quantificação de proteínas

Os pellets das culturas foram previamente congelados em freezer -80°C na presença do inibidor de protease 1X (*cOmplete tablets mini EDTA-free easypack*).

Para a extração das proteínas totais, o pellet celular foi descongelado no gelo, e homogeneizado. Foi acrescentado 300µl de solução de lise (NP-40 1%, NaCl 150mM e TRIS-HCl 50mM pH 8,0), o extrato celular foi agitado, e incubado no gelo por 30 minutos para permitir a ação detergente do reagente NP-40. Após o tempo de incubação o extrato foi centrifugado (20 minutos/12.000g/4°C) a fim de separar a porção insolúvel da porção solúvel contendo as proteínas totais.

As proteínas foram quantificadas no espectrofotômetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio- Rad) de acordo com o método de Lowry ¹¹⁵. Após estabelecer a mesma concentração de proteínas para todas as amostras (50µg/poço), foram adicionados a elas tampão desnaturante *Laemmli* (100 mM tris-HCl pH6.8, 4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 0,2% de azul de bromofenol, 500mM de DTT) e estas foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 5 min.

Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel SDS-PAGE expostas a condições desnaturantes e redutoras. Os géis de poliácridamida utilizados na eletroforese possuíam 4 % (gel de entrada) e 12% (gel de separação), com 1,5 mm de espessura. Foram adicionados 50µg de proteína por poço.

A corrida foi realizada a 100 volts, em um tempo de aproximadamente 2 horas. (*The Mini Trans-Blot cell* - Bio- Rad). O tampão de corrida utilizado era composto por Trisma base (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1g%).

Ao gel de eletroforese foi adicionado o marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific), a fim de possibilitar a identificação por peso molecular das proteínas de interesse.

Transferência gel-membrana

Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol, SDS 0,1%) por 20 minutos, a membrana e os filtros de transferência também foram incubados no tampão citado acima por 5 minutos.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio- Rad) a 100 Volts durante 1 hora e 45 minutos pelo método submerso (Mini Trans-Blot® Cell– Bio-Rad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 3 horas com 9% p/v de leite desnatado em TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=8, contendo 0,1% v/v de Tween 20). Ao fim do bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T por 4X de 5 minutos cada.

Incubação com o anticorpo primário e secundário

Após a lavagem, a membrana foi incubada com os anticorpos primários (**Tabela 3**) a 4°C, sob agitação, overnight. Após incubação com anticorpo primário a membrana foi novamente lavada com TBS-T por 4X de 5 min. cada e incubada com anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP (**Tabela 3**) por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão TBS-T.

Após incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada novamente utilizando o tampão TBS-T por 4X de 5 minutos cada.

Tabela 3. Anticorpos utilizados na técnica de Western Blotting.

Anticorpo	Tipo	Reatividade	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
Primários					
Anti- PRDX1	Monoclonal	Human	Rabbit	1: 7.000	Cell signaling
Anti- PRDX2	Monoclonal	Human	Mouse	1: 7.000	Abnova
Anti- PRDX6	Monoclonal	Human	Mouse	1: 7.000	Abnova
Anti- CAT	Monoclonal	Human	Rabbit	1:7.000	Cell signaling
Anti- SOD1	Monoclonal	Human	Rabbit	1:7.000	Thermo fisher
Anti- GPX1	Monoclonal	Human	Rabbit	1:7.000	Abnova
Anti- NRF2	Monoclonal	Human	Rabbit	1:7.000	Cell signaling
Anti-KEAP1	Monoclonal	Human	Rabbit	1:7.000	Cell signaling
Anti- APEX1	Monoclonal	Human	Rabbit	1:7.000	Cell signaling
Anti- GAPDH	Policlonal	Human/Dog/mouse	Goat	1: 7.000	Biorbyt
Secundários					
Goat anti-Mouse IgG (HRP)	Policlonal	Mouse	Goat	1: 10.000	Sigma
Mouse anti-Rabbit IgG (HRP)	Policlonal	Rabbit	Mouse	1: 10.000	Sigma

Revelação da membrana

A membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent - GE Healthcare) o qual contém Luminol e Peróxido de hidrogênio. A enzima HRP reage com o peróxido de hidrogênio liberando O₂ que oxida o luminol liberando energia em forma de fóton que pode ser detectada através de um aparelho detector quimioluminescente. As bandas foram visualizadas e fotografadas usando o aparelho ChemiDoc da Bio-Rad, por curtos intervalos de tempo para obtenção de uma imagem adequada.

Para as análises dos dados foi utilizado o programa ImageJ (*National Institutes of Health, Maryland, EUA*), o qual gera valores numéricos a partir dos pixels da imagem de cada banda proteica. O programa gera picos que representam as regiões de maior densidade óptica e utiliza equações integrais simples para transformar os picos em valores numéricos. Para normalizar cada amostra foram utilizados os dados da proteína GAPDH e então a amostra Controle sem H₂O₂ foi usada como normalizador para analisar o aumento ou diminuição da expressão da proteína de interesse, sendo que valores acima de 1 significam aumento na expressão e valores abaixo de 1 significam diminuição na expressão.

4.3.6 – Análise de peroxidação lipídica pelo método de TBARS

Uma das formas de se avaliar o nível de biomoléculas oxidadas a partir de uma cultura celular, é através da técnica de TBARS. O estresse oxidativo gera produtos de oxidação de biomoléculas, sendo o malondialdeído (MDA), produto secundário da oxidação lipídica, o mais estudado na avaliação da peroxidação lipídica. A quantidade de MDA dentre outras biomoléculas oxidadas é mensurada através da obtenção de um cromógeno de alta absorvidade molar quando complexado com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo essa técnica amplamente conhecida como TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*)^{116,117}.

Para análise de peroxidação lipídica, o pellet celular foi lavado com PBS 1X, e às células foi adicionado um volume 10x de água Milli-Q, para criar uma situação hipotônica e conseqüente rompimento das células, então as amostras foram vortexadas por 5 minutos finalizando a lise celular. Às amostras foi adicionado 300µl do reagente TBA 0,4% (40 mg em 10 ml de HCl 0,2 M), e incubadas a 90°C por 40 minutos e então foram colocadas no gelo por 2-3 minutos. Então, às amostras foi adicionado 1ml de álcool n-butílico, agitado e centrifugado (5.000rpm/5 minutos). Em seguida, dessas amostras foi coletado no mínimo 700µl do sobrenadante para a leitura a 532 em espectro fotômetro¹¹⁸.

Para a curva padrão foi utilizado o reagente tetrametoxipropano (TMP), em concentrações de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 e 2.5nmol/ml¹¹⁷.

4.3.7 – Análise de atividade enzimática

Para análise de atividade enzimática, o pellet celular foi lavado com PBS 1X, às células foi adicionado um volume 10x de água Milli-Q e foram vortexadas durante 5 minutos para lise celular. Então os lisados foram submetidos a análise por espectrofotometria para determinar a atividade enzimática de CAT, GR e G6PD:

Atividade enzimática de CAT

A atividade de CAT é determinada através da detecção da taxa de decomposição de H_2O_2 pela própria enzima. A velocidade da decomposição do H_2O_2 é observada através do decréscimo da absorbância a 240nm¹¹⁹.

Atividade enzimática de GR

A atividade de GR foi acompanhada através da oxidação de NADPH a 340nm em uma reação contendo 150mM de GSSG e 6mM de NADPH. Nessa reação a enzima GR reduz o conjugado GSSG utilizando os elétrons provindos do NADPH, que se torna oxidado¹²⁰.

Atividade enzimática de G6PD

O teste consistiu em mensurar a taxa de redução de $NADP^+$ a NADPH pela enzima G6PD na presença de glicose-6-fosfato. Essa redução é acompanhada por espectrômetro a 340nm.

4.4 – Créditos gráficos

Para a construção de quase todas as figuras feitas pela autora, foram utilizados os componentes ilustrativos disponíveis no site <https://smart.servier.com>, livres para uso acadêmico mediante devida citação (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Diferenciação de células K562 induzida pela adição de hemina combinada com hidroxiuréia

A fim de avaliar o efeito da hemina combinada com hidroxiuréia na diferenciação de células K562 foi realizada uma análise de produção de hemoglobinas através do método de benzidina¹¹³, e a análise de modificações morfológicas através de citometria de fluxo.

A diferenciação das células K562 tratadas com hemina e hidroxiuréia foi acompanhada durante 5 dias (Dia 0, Dia 1, Dia 2, Dia 3 e Dia 4). Sendo que no dia 4 é possível observar a produção de hemoglobinas evidenciada pela coloração marrom quando incubadas com benzidina e H₂O₂ (**Figura 17-A**). Adicionalmente as células foram avaliadas quanto a mudanças morfológicas quando tratadas com hemina e hidroxiuréia comparadas a células controle, para tanto foi utilizado um gráfico de FSC (tamanho celular) vs. SSC (complexidade celular). Como pode ser observado na figura 17-B, a administração de hemina e hidroxiuréia foi responsável por promover alterações morfológicas nas células quando comparadas a células não tratadas, é possível observar um aumento do tamanho celular simultâneo ao aumento de sua complexidade.

As alterações morfológicas de K562 apresentadas nesse trabalho quando induzidas à diferenciação pela hemina juntamente com hidroxiuréia corroboram com as modificações morfológicas já descritas na literatura para outros compostos ou mesmo hemina e hidroxiuréia separadamente. Em geral é observado o aumento da produção de hemoglobina F (HbF) e aumento do volume celular juntamente com a complexidade celular podendo ser observado a presença de células com diferentes formas (forma de pêra, circular, células com vesiculosidades entre outras formas)⁹⁹⁻¹⁰³.

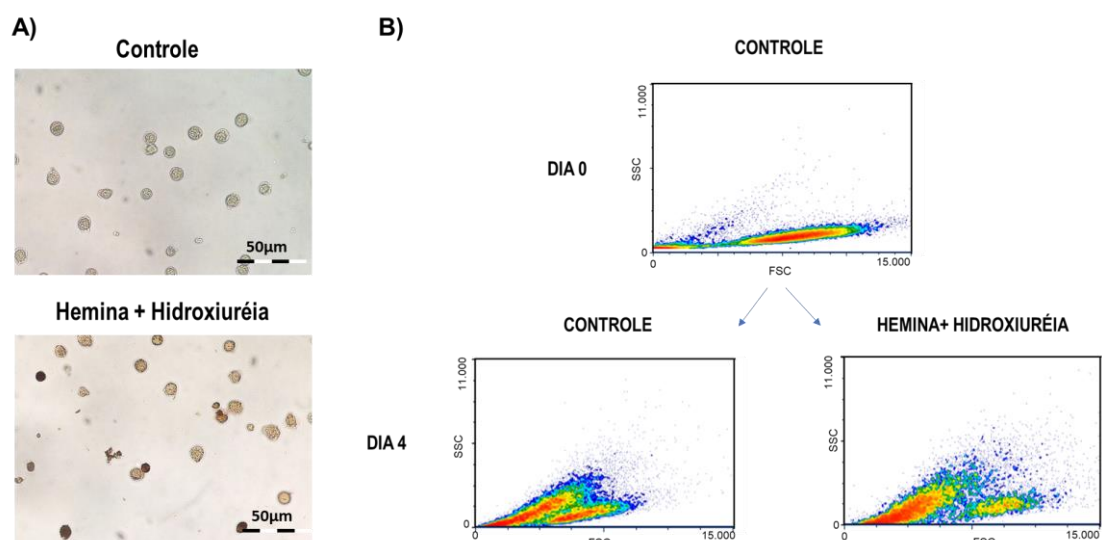


Figura 17 – Diferenciação de células K562 utilizando hemina e hidroxiuréia como indutores. (A) Fotomicroscopia de células K562 não diferenciadas e diferenciadas. **(B)** Análise do tamanho e complexidade celular [FSC (X) vs. SSC (Y) em gráficos de densidade] de células K562 durante 5 dias tratadas com hemina e hidroxiuréia. Células não tratadas foram usadas como controle.

5.2 - Teste de concentrações de H₂O₂

Inicialmente foi realizado um teste para determinar as concentrações de peróxido a serem utilizadas nos experimentos. Utilizamos como teste as concentrações de 0 (controle), 10µM, 100µM, 200µM, 300µM, 400µM e 1000µM administrados todos os dias durante 7 dias em células K562 diferenciadas (Figura 18).

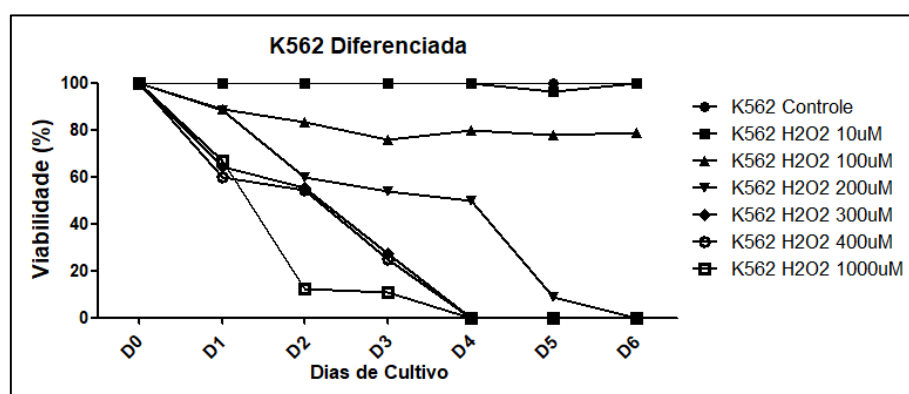


Figura 18 – Gráfico de viabilidade de K562 diferenciada após 7 dias de cultivo. Com a administração diária de H₂O₂ nas concentrações de 0 (controle), 10µM, 100µM, 200µM, 300µM, 400µM e 1000µM.

A partir dos resultados observados no gráfico apresentado pela Figura 15, podemos observar que as concentrações de H₂O₂ 0 (controle) e 10µM se mostraram não tóxicas às células K562 diferenciadas, uma vez que a viabilidade se manteve próxima a 100%. Já a concentração de 100µM se mostrou um pouco tóxica às células, já que sua viabilidade diminuiu para 80%

durante os 7 dias. As concentrações de 300 μ M, 400 μ M e 1000 μ M se mostraram tóxicas às células, já que essas morreram a partir do dia 4. Já a concentração de 200 μ M se mostrou letal apenas a partir do dia 6.

Já para as células K562 não diferenciadas (**Figura 19**) foi realizado um experimento utilizando as concentrações de 0 (controle), 100 μ M e 200 μ M de H₂O₂ administrados todos os dias durante 7 dias. Com isso podemos observar que a concentração de 100 μ M de H₂O₂ se mostrou tóxica para as células não diferenciadas já a partir do dia 2, mas não letal. Já a concentração de 200 μ M de H₂O₂ também foi tóxica desde o início de sua administração, sendo letal a partir do dia 5.

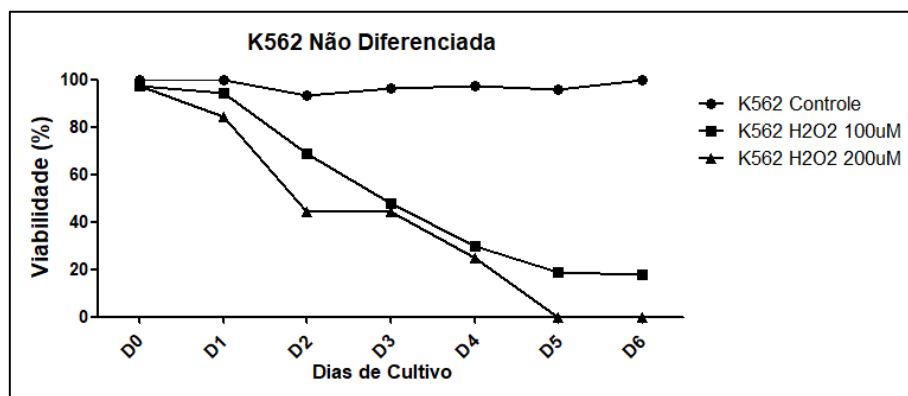


Figura 19 – Gráfico de viabilidade de K562 não diferenciada após 7 dias de cultivo. Com a administração diária de H₂O₂ nas concentrações de 0 (controle), 100 μ M e 200 μ M.

De uma forma geral podemos observar que as células K562 não diferenciadas se mostraram mais sensíveis a administração de H₂O₂ do que as células K562 diferenciadas. Uma vez que o objetivo desse trabalho é avaliar o papel protetor da melatonina contra o estresse induzido por H₂O₂, decidimos utilizar a concentração de 100 μ M acima testada, que se mostrou tóxica, mas não totalmente letal tanto para K562 diferenciada quanto não diferenciada.

5.3 – Papel protetor de melatonina com e sem exposição de estresse induzido por H₂O₂

Para avaliar o papel protetor da melatonina em células K562 diferenciadas e não diferenciadas foram utilizadas as concentrações fisiológicas (1nM) e farmacológicas (1mM) de melatonina¹²¹, induzidas ou não por estresse oxidativo mediado pela administração de 100 μ M de H₂O₂ como descrito na metodologia. A viabilidade das células foi acompanhada todos os dias

durante 5 dias e os resultados dos experimentos realizados em duplicatas biológicas independentes são apresentados na figura 20.

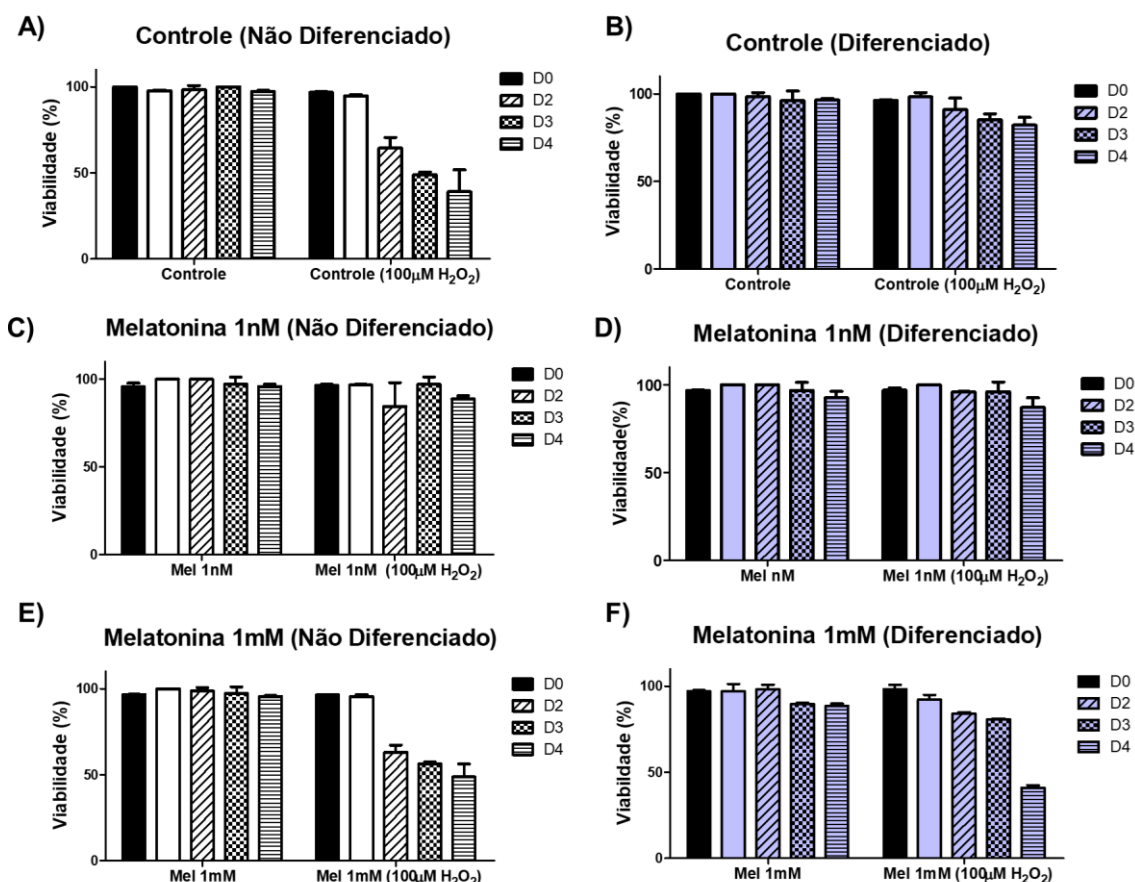


Figura 20 - Gráfico de viabilidade de K562 diferenciada e não diferenciada acompanhada durante 5 dias de cultivo com e sem indução de estresse oxidativo por 100µM de H₂O₂. (A) Viabilidade de K562 não diferenciada e sem tratamento de melatonina. **(B)** Viabilidade de K562 diferenciada e sem tratamento de melatonina **(C)** Viabilidade de K562 não diferenciada e com tratamento de 1nM de melatonina. **(D)** Viabilidade de K562 diferenciada e com tratamento de 1nM de melatonina. **(E)** Viabilidade de K562 não diferenciada e com tratamento de 1mM de melatonina. **(F)** Viabilidade de K562 diferenciada e com tratamento de 1mM de melatonina.

Em células não diferenciadas, podemos observar que a administração de 1nM de melatonina (**Figura 20-C**) levou à um evidente aumento da viabilidade das células K562 não diferenciadas quando comparada à não administração de melatonina (Controle não diferenciado) (**Figura 20-A**), quando induzido o estresse pela adição de 100µM de H₂O₂. Esse resultado nos mostra um importante papel protetor da melatonina contra o estresse oxidativo em células K562. Quando administrado melatonina a 1mM observamos um leve aumento da viabilidade quando comparado com a condição controle (**Figura 20-E**), entretanto não podemos afirmar que nessa condição a melatonina teve um papel protetor como na concentração de 1nM. Este resultado corrobora com a literatura onde é descrito que em alguns tipos celulares, a melatonina em concentrações menores que 10µM se comporta como antioxidante direta e indiretamente (como

discutido na introdução), enquanto que em altas concentrações (>1mM) ela pode não apresentar papel antioxidante, ou ter esse papel diminuído ⁸⁸⁻⁹¹.

Outro fato importante a ser notado é que ao comparar a viabilidade das células K562 não diferenciadas não tratadas com melatonina (Controle diferenciado) (**Figura 20-A**) às diferenciadas não tratadas com melatonina (**Figura 20-B**) podemos observar um evento muito interessante, as células diferenciadas induzidas com 100µM de H₂O₂ conseguem manter a viabilidade durante os 5 dias acima de 80%, enquanto que as células não diferenciadas tem sua viabilidade afetada pela adição do H₂O₂, chegando a aproximadamente 25-30% no último dia de experimento. Esse fato importante já é conhecido na literatura, e se deve pela produção de agentes antioxidantes em K562 durante a diferenciação induzida por hemina¹²². Nesse caso a indução de agente antioxidantes protege as células K562 da oxidação induzida pelo H₂O₂.

Quanto às células K562 diferenciadas e tratadas com 1nM de melatonina (**Figura 20-D**), também observamos um perfil de viabilidade acima de 80% durante todo o experimento, igualando-se ao perfil observado nas células K562 diferenciadas não tratadas com melatonina (**Figura 20-B**). Diferente do observado em células K562 diferenciadas e tratadas com 1mM de melatonina (**Figura 20-F**) quando induzido o estresse oxidativo (100µM de H₂O₂) onde sua viabilidade foi diminuída para aproximadamente 50%. Neste cenário, a melatonina em concentrações fisiológicas (1nM) se comportou como um antioxidante direta ou indiretamente, já que a viabilidade de células K562 diferenciada se manteve à 80% como no Controle. Enquanto que concentrações farmacológicas de melatonina (1mM) não teve comportamento antioxidante e parece ter tido um efeito contrário, já que diminui a viabilidade de K562 quando induzido o estresse oxidativo, o que também corrobora com a literatura que descreve que em alguns tipos celulares, a melatonina em altas concentrações (>1mM) pode apresentar uma ação pró-oxidante ⁸⁸⁻⁹¹.

Apesar de neste cenário a melatonina ter demonstrado um possível papel pró-oxidante, já foi demonstrado que mesmo em altas concentrações, a melatonina não apresenta efeitos colaterais importantes quando utilizada como medicamento ⁹⁷. Além disso o aumento de produção de agentes oxidantes não necessariamente possui um efeito danoso, uma vez que esses agentes participam na regulação de importantes vias metabólicas na célula.

5.4 – Análise da peroxidação lipídica em células K562 tratadas com melatonina e expostas a H₂O₂

Os compostos produzidos pela peroxidação lipídica atuam como biomarcadores e os métodos de quantificação destes marcadores se mostraram eficientes como um modo de avaliar

o estresse oxidativo em determinadas amostras. Uma das formas de se avaliar a peroxidação lipídica é através da determinação dos produtos de degradação secundários como o malondialdeído (MDA). O MDA tem sido amplamente utilizado como marcador para estresse oxidativo, e pode ser quantificado através de uma técnica conhecida como TBARS (*Thiobarbituric acid-reactive substances*). Essa técnica se baseia no fato de alguns produtos da peroxidação lipídica como o MDA serem reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e poderem ser quantificados em uma amostra biológica^{116,117}.

Para estimar o grau de estresse oxidativo, a concentração de MDA foi avaliada de células K562 tratadas com melatonina (1nM e 1mM) e expostas a H₂O₂ (100μM) quando comparadas com células controle. Os resultados obtidos para o dia 0, dia 2 não diferenciado, dia 2 diferenciado, dia 4 não diferenciado e dia 4 diferenciado estão apresentados nos gráficos abaixo.

Os resultados obtidos para as análises do dia 0 apresentado no gráfico da figura 21 podemos observar que os níveis de peroxidação lipídica ficam em torno de 0 nmol/ml (MDA) demonstrando que a exposição do agente protetor e estressor ainda não tiveram um efeito tão visível na modulação do estresse oxidativo.

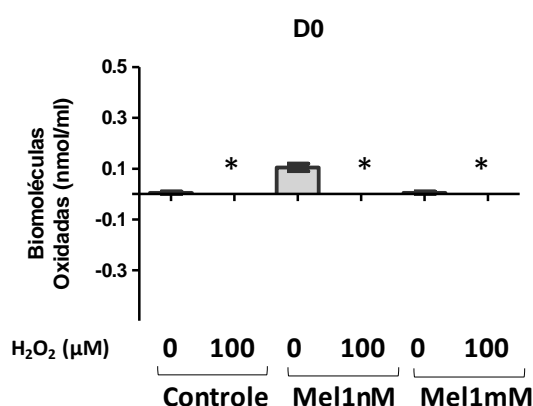


Figura 21 – Análise de peroxidação lipídica de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H₂O₂ no dia 0. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). * Limite de análise inferior ao detectável.

No dia 2, podemos observar que células não diferenciadas também não há uma mudança tão clara nos níveis de peroxidação lipídica (**Figura 22-A**), mas podemos observar um aumento da peroxidação lipídica ao adicionarmos 1mM de melatonina na presença do H₂O₂, uma vez que já é conhecido que a melatonina em alguns casos pode apresentar um papel pró-oxidante, aqui podemos estar vendo este efeito. Entretanto em células diferenciadas percebemos que a adição de H₂O₂ nas células controle aumentam os níveis de peroxidação lipídica e que a adição de

melatonina a 1nM e 1mM diminuem drasticamente esses níveis (**Figura 22-B**). Demonstrando que a melatonina nas duas concentrações analisadas em células diferenciadas no dia 2 diminuiu os níveis de estresse oxidativo em células K562 quando expostas ao agente estressor H₂O₂ e mesmo quando não exposta a esse agente.

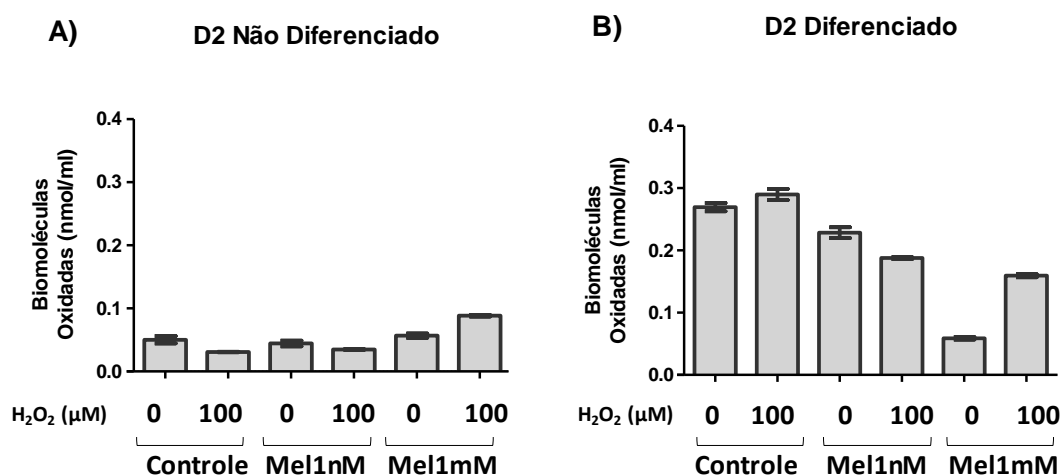


Figura 22 – Análise de peroxidação lipídica de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H₂O₂ no dia 2 não diferenciado e dia 2 diferenciado. (A) Análise de peroxidação lipídica de células K562 não diferenciadas no dia 2. (B) Análise de peroxidação lipídica de células K562 diferenciadas no dia 2. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Os resultados obtidos para as análises do dia 4, nos mostram que em células não diferenciadas a adição de melatonina a 1nM e 1mM foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica principalmente quando adicionado o agente estressor H₂O₂ (**Figura 23-A**). Esses dados corroboram com os resultados obtidos da viabilidade de células K562 apresentados na seção 5.2 onde a adição de melatonina a 1nM e 1mM em células K562 no dia 4 não diferenciadas aumenta a viabilidade de K562.

E em células diferenciadas no dia 4 percebemos que houve uma diminuição dos níveis de peroxidação lipídica apenas na adição de melatonina a 1nM com e sem a adição de H₂O₂ (**Figura 23-B**), entretanto a adição de melatonina a 1mM acompanhada pela adição do agente estressor H₂O₂ aumentam os níveis de peroxidação lipídica (**Figura 23-B**). Esses dados também corroboram com os dados obtidos com as análises de viabilidade de K562 apresentado na seção 5.2, onde a viabilidade de K562 é aumentada pela adição de melatonina a 1nM e 1mM em células não diferenciadas no dia 4 e a 1nM em células diferenciadas, sendo que a adição de melatonina a 1mM em células diferenciadas no dia 4 parece ter um papel pró-oxidante nesse modelo celular aumentando os níveis de peroxidação lipídica e diminuindo a viabilidade de K562 quando exposta ao H₂O₂.

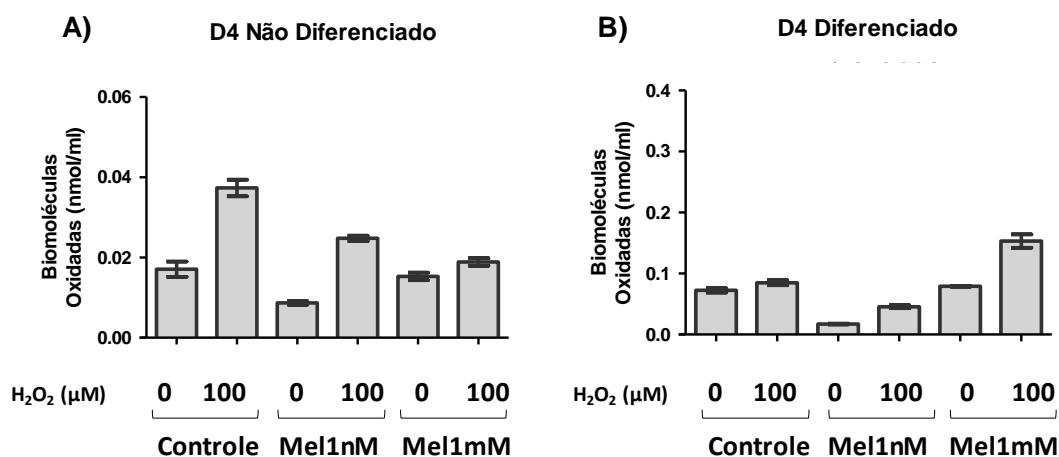


Figura 23 – Análise de peroxidação lipídica de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H₂O₂ no dia 4 não diferenciado e dia 4 diferenciado. (A) Análise de peroxidação lipídica de células K562 não diferenciadas no dia 4. (B) Análise de peroxidação lipídica de células K562 diferenciadas no dia 4. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (± SEM).

Esses resultados de peroxidação lipídica nos mostram que a melatonina foi capaz de diminuir os níveis de estresse oxidativo em células K562 mesmo quando expostas a uma concentração de 100μM do agente estressor H₂O₂ principalmente em condições como no dia 2 em células diferenciadas e no dia 4 em células não diferenciadas.

A falta de alterações claras no nível de estresse oxidativo em células não diferenciadas no dia 2 ainda é um fator curioso, uma vez que os dados de viabilidade apresentados na seção 5.2 nos mostraram que a melatonina tanto a 1nM quanto 1mM foi capaz de aumentar a viabilidade de K562 quando expostas ao agente estressor H₂O₂, portanto esse fato nos leva a acreditar que outras vias que não a antioxidante possam estar sendo influenciadas pela adição da melatonina que auxiliam na sobrevivência dessa célula quando exposta ao agente estressor. De fato, experimentos adicionais são necessários para elucidar o papel da melatonina nessas condições.

5.5 - Efeito da melatonina na diferenciação de K562

Como dito anteriormente, após 5 dias de experimento foi realizado o teste de diferenciação das células através do método de benzidina ¹¹³ e as células diferenciadas foram contadas em câmara de Neubauer.

Foi possível observar que as células K562 não expostas ao agente estressor H₂O₂ tiveram uma diferenciação de aproximadamente 100% tanto com quanto sem tratamento de melatonina (1nM e 1mM) (**Figura 24**), sendo que em células não tratadas com melatonina e expostas ao

agente estressor H_2O_2 houve uma diminuição da diferenciação para 90%. Interessantemente, e mais importante, podemos verificar que o tratamento de 1nM de melatonina e 100 μ M de H_2O_2 diminui a diferenciação das células K562 para aproximadamente 30%. Já foi demonstrado que a hemina induz a transcrição de um Elemento de resposta antioxidante (ARE) que é responsável pela indução de uma bateria de genes antioxidantes de fase II induzido por estresse oxidativo ¹²³. Ou seja, de uma forma complexa, a diferenciação de K562 induzida por hemina depende da ação de agentes oxidantes, e a expressão de agentes antioxidantes durante essa fase inibe ou diminui a diferenciação. Esse fato interessante nos leva a supor que a melatonina esteja agindo como um agente antioxidante, neutralizando os efeitos de uma concentração não letal de H_2O_2 (100 μ M) e também diminuindo a diferenciação desta célula.

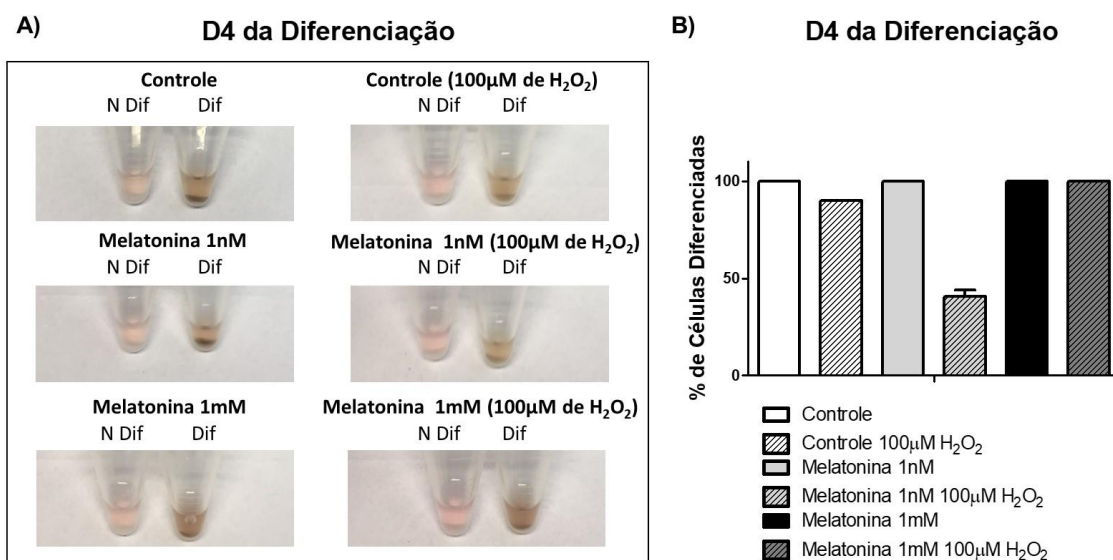


Figura 24 – Efeito da melatonina na diferenciação de células K562 quando induzidas a diferenciação utilizando hemina e hidroxipuréia como indutores. (A) Fotografia do pellet celular de células K652 diferenciadas e não diferenciadas tratadas ou não com melatonina 1nM e 1mM, expostas ou não a 100 μ M de H_2O_2 . **(B)** Gráfico de porcentagem de células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

Este dado inédito nos mostra a ação da melatonina em doses fisiológicas na diferenciação de células K562 induzida por hemina e hidroxipuréia. Uma vez compreendido que a melatonina à 1nM tem um papel claro na sobrevivência de células K562 expostas a estresse oxidativo induzido por H_2O_2 (100 μ M) (**seção 5.3**) e que nestas condições ela parece inibir a diferenciação celular através de um papel antioxidante (**seção 5.5**), nos parece importante compreender melhor os mecanismos envolvidos na ação da melatonina nesse tipo celular. Para isso partimos para a

determinação do papel indireto da melatonina na expressão gênica e conteúdo proteico de componentes presentes em vias antioxidantes do eritrócito.

5.6 – Análise de expressão gênica de agentes antioxidantes importantes em células eritrocitárias

Como visto anteriormente, a melatonina e seus derivados tem sido amplamente estudados pelo seu papel direto e indireto como antioxidante. Como via indireta, já foi demonstrado que a melatonina é capaz de influenciar a expressão gênica de diferentes enzimas antioxidantes ⁸⁵. Foi primeiramente descrito por Antolin *et al.* que a melatonina causa o aumento de RNAm de *SOD1*, *SOD2* e *GPX1* em hamsters ¹²⁴.

Diante disso, avaliamos a expressão de RNAm de algumas das enzimas antioxidantes moduladas pela via NRF2-ARE frente ao tratamento com melatonina a fim de verificar se esta é capaz de modular a expressão dessas enzimas em células K562. Foi analisado então a expressão de RNAm através de PCR em tempo real de *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX6*, *CAT*, *SOD1* e *GPX1* (Detalhes em Apêndice C).

Foi possível verificar em células K562 diferenciadas quando tratadas com melatonina a 1mM um aparente aumento na expressão do RNAm de *PRDX1*, que codifica uma proteína antioxidante extremamente importante, que vem sendo reconhecida também como uma importante enzima na sinalização redox^{125,126}. Esse aumento pode ser observado nos dias 2 e 4 da diferenciação quando as células foram expostas ao agente estressor H₂O₂ (100µM) (Figura 25).

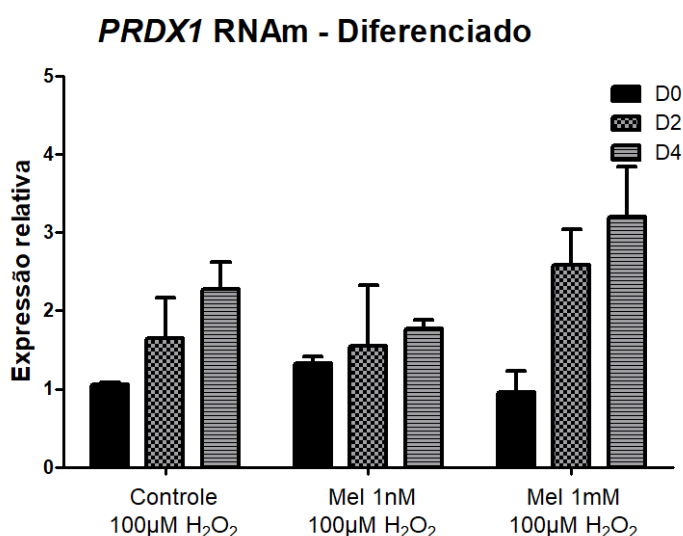


Figura 25 - Gráfico de Expressão relativa de *PRDX1* em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. Gráfico de expressão de *PRDX1* em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β -Actina (*BAC*) como

endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Controle não tratada com H₂O₂ no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (± SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

Além do aumento na expressão de *PRDX1*, também observamos em células K562 diferenciadas quando tratadas com melatonina a 1mM um aparente aumento na expressão do RNAm de *PRDX2*, que codifica uma proteína antioxidante extremamente importante. Esse aumento também foi observado nos dias 2 e 4 da diferenciação quando as células foram expostas ao agente estressor H₂O₂ (100µM) (**Figura 26**).

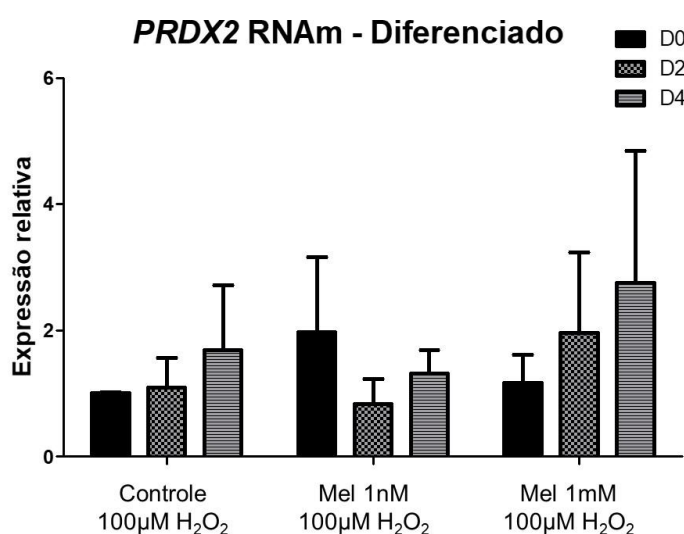


Figura 26 - Gráfico de Expressão relativa de *PRDX2* em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. Gráfico de expressão de *PRDX2* em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β -Actina (*BAC*) como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Controle não tratada com H₂O₂ no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (± SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

Também foi analisada a expressão de RNAm de *KEAP1* que codifica uma proteína responsável pelo controle de NRF2 no citoplasma, bem como a expressão de *NRF2* que codifica o fator de transcrição responsável pela indução da expressão de importantes enzimas antioxidantes como discutido anteriormente. Adicionalmente foi analisada a expressão de RNAm de *APEX1/Ref-1* (*Apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1*) que codifica uma proteína multifuncional, relacionada ao reparo do DNA, à regulação transcricional e recentemente tem sido relacionada a inibição da função da proteína NRF2 (**Detalhes em Apêndice C**). Dessa forma podemos avaliar a expressão do RNAm do fator de transcrição que estimula a expressão dos antioxidantes acima avaliados e avaliar a expressão do RNAm de dois importantes inibidores da atividade de NRF2.

Os dados obtidos com essas análises não apontaram nenhuma alteração importante no nível de RNAm desses genes importantes para a via NRF2-ARE.

Um dado interessante observado nas análises de expressão gênica, foi o aumento do nível de RNAm dos genes que codificam enzimas antioxidantes, em células K562 diferenciadas quando comparadas às não diferenciadas. Já foi descrito na literatura, que enzimas antioxidantes são reguladas por diversos fatores indutores de estresse oxidativo ⁸⁵, uma vez que a diferenciação de K562 mediada por hemina depende de agentes oxidantes, essas células apresentam um aumento na expressão de enzimas antioxidantes como um mecanismo compensatório para combater os danos gerados por essas moléculas que podem ser danosas em altas concentrações ¹²³. Esse evento foi evidente nos resultados obtidos, foi possível observar um aumento da expressão de RNAm de *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX6* e *SOD1* em células diferenciadas nos dias 2 e 4 quando comparados à condição não diferenciada como pode ser observado no *heat map* apresentado na Figura 27.

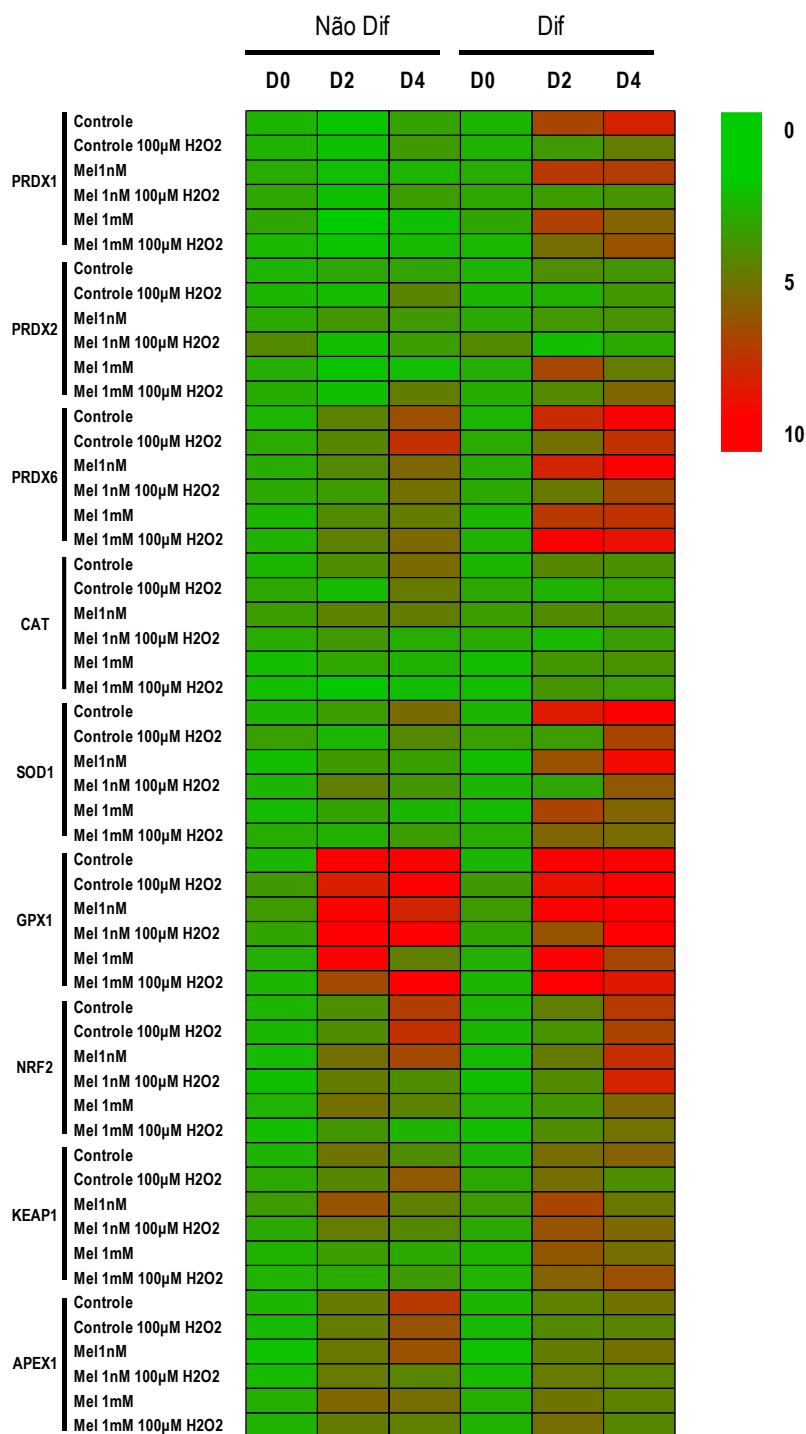


Figura 27 - Heat map representando os resultados da análise de PCR em tempo real (q-PCR) dos genes *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX6*, *CAT*, *SOD1*, *GPX1*, *NRF2*, *KEAP1* e *APEX1* de células K562 não diferenciadas e diferenciadas nos dias 0, 2 e 4 quando tratadas ou não com melatonina (1nM e 1mM), expostas ou não a H₂O₂ (100µM). Os níveis de expressão dos genes são apresentados usando valores de *fold-change*, e a escala de cores estão mostradas na parte superior do *heat map* que foi gerado pelo programa Excel. Os resultados são apresentados na forma de média e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

5.7 – Análise de conteúdo proteico de agentes antioxidantes importantes em células eritrocitárias

A expressão de RNAm não necessariamente representa nível de proteínas em uma célula, diversas modificações pós transcricionais podem ocorrer antes de se codificar uma proteína além de outros fatores relacionados ao estado da célula também determinarem o conteúdo proteico encontrado. Por isso foi avaliado o conteúdo proteico das células K562 a fim de verificar a influência da administração de melatonina na produção de proteínas antioxidantes PRDX1, PRDX2, PRDX6, CAT, SOD1, GPX1, além das proteínas envolvidas na via NRF2-ARE (NRF2 e KEAP1) e a proteínas recentemente conhecida como inibidora de NRF2, a APEX1.

Assim como para a expressão de RNAm, o conteúdo proteico de importantes proteínas antioxidantes como PRDX1, PRDX2, PRDX6, CAT e SOD1 se mostrou aumentado nos dias 2 e 4 na condição onde as células estavam diferenciadas (**Figura 28**). Esse dado mais uma vez corrobora com a literatura onde já foi descrito o aumento de importantes enzimas antioxidantes durante e após a diferenciação de células K562 quando induzido por hemina.

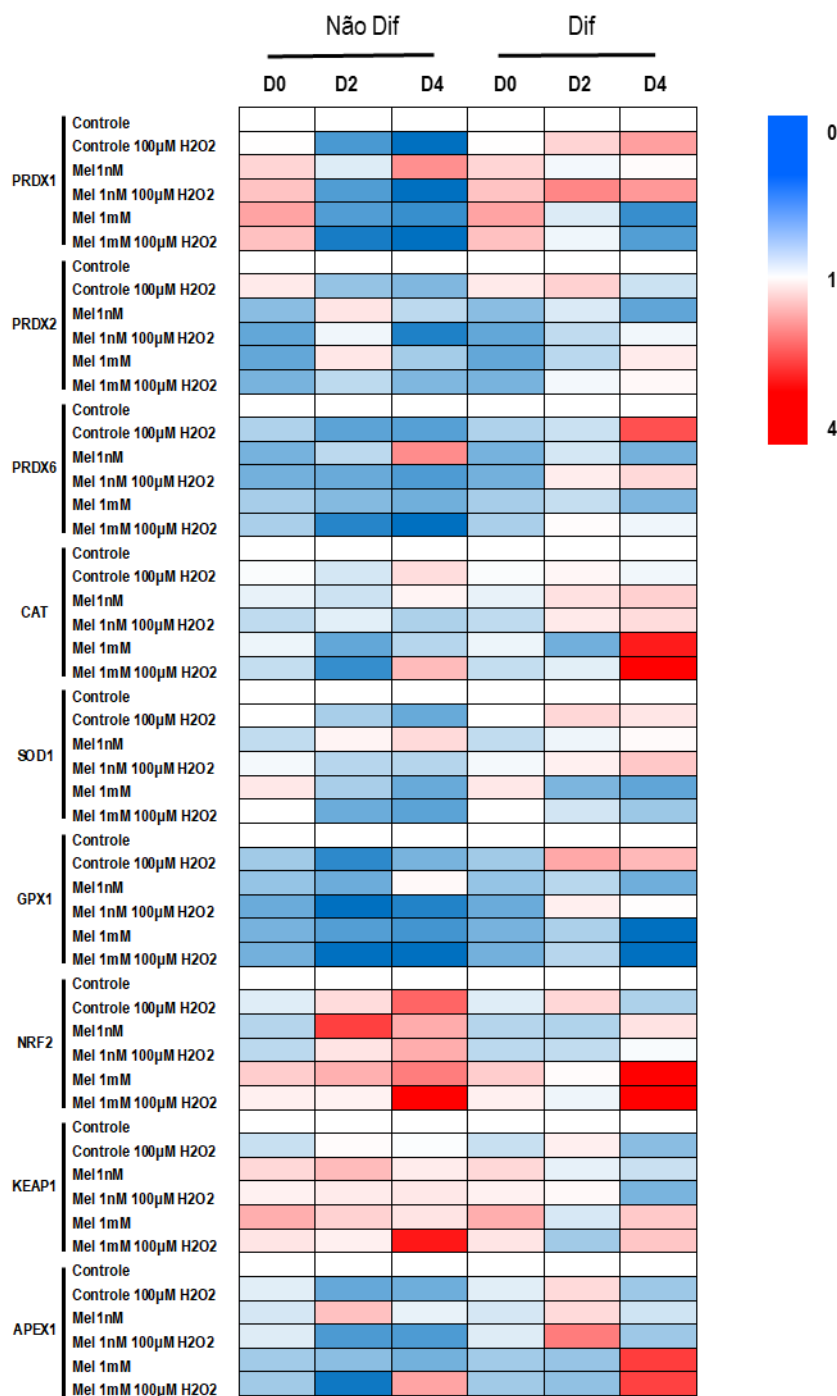


Figura 28 - Heat map representando os resultados da análise de western blotting das proteínas PRDX1, PRDX2, PRDX6, CAT, SOD1, GPX1, NRF2, KEAP1 e APEX1 de células K562 não diferenciadas e diferenciadas nos dias 0, 2 e 4 quando tratadas ou não com melatonina (1nM e 1mM), expostas ou não a H₂O₂ (100µM). Os níveis de conteúdo proteico são apresentados usando valores de *fold-change*, e a escala de cores estão mostradas na parte superior do *heat map* que foi gerado pelo programa Excel. Os resultados são apresentados na forma de média e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

5.7.1 - Conteúdo proteico do dia 0

Os resultados da análise de conteúdo proteico de células K562 no dia 0 (**Apêndice D e Apêndice E**) nos mostraram que a melatonina teve pouco efeito no conteúdo das proteínas avaliadas. Podemos observar diminuição no conteúdo proteico de APEX1 quando administrada melatonina 1mM (**Figura 29**).

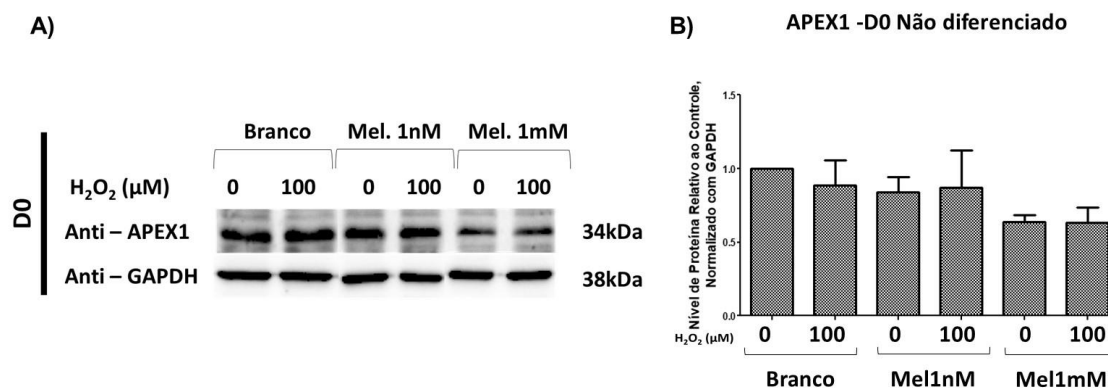


Figura 29 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 0 para detecção de APEX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Entretanto podemos verificar um aumento da expressão de PRDX1, uma importante enzima antioxidante, na administração de melatonina (1nM e principalmente 1mM) sem e com indução de estresse oxidativo (H₂O₂ 100μM) (**Figura 30**). Essa enzima, além de ter um papel já bem conhecido como antioxidante, vem sendo reconhecida como uma importante enzima envolvida na sinalização celular. PRDX1 regula a transdução de sinal através de alterações na oxidação tiol de suas cisteínas. Hopkins *et al.* 2018 demonstrou que PRDX1 é um parceiro de ligação do fator de transcrição FOXO3. O estresse oxidativo elevado causa a formação de dissulfetos ente PRDX1 e FOXO3, o que facilita a localização nuclear de FOXO3 e transcrição de genes em resposta ao estresse oxidativo¹²⁷. Além dessa relação com FOXO3, já foi identificado que o estresse oxidativo promove a oxidação de PRDX1 que causa a dissociação de PRDX1 e MKP1 e aumenta a associação e atividade de MKP5 regulando assim a senescência¹²⁶. Da mesma forma um mecanismo similar foi descrito para PRDX1 e PTEN, controlando a tumorigênese¹²⁵. Portanto esse aumento do conteúdo proteico de PRDX1 pode ser um fator importante para a sinalização celular quando administrado melatonina.

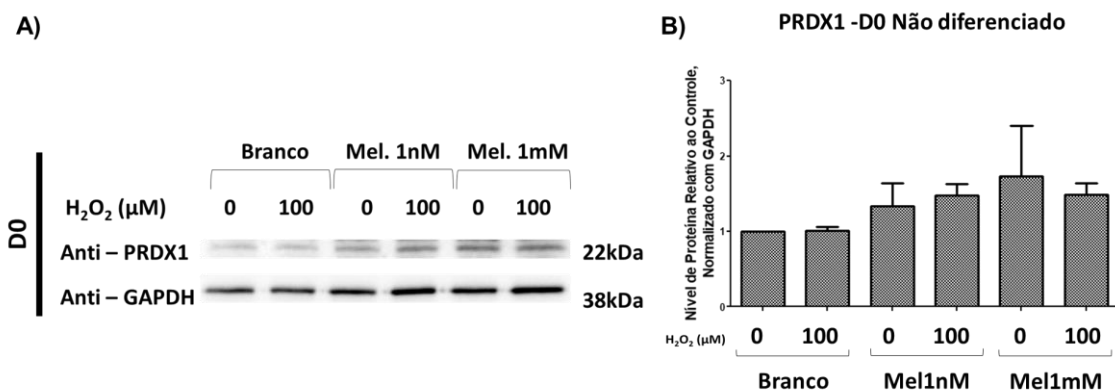


Figura 30 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 0 para detecção de PRDX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

5.7.2 - Conteúdo proteico do dia 2

Os resultados da análise de conteúdo proteico de células K562 no dia 2 tanto em células não diferenciadas como em células diferenciadas (**Detalhes em Apêndice D e Apêndice E**) nos mostrou uma diminuição da expressão de importantes proteínas antioxidantes como CAT (**Figura 31**) e GPX1 (**Figura 32 e Figura 33**), na presença de melatonina a 1nM e 1mM. Sendo que somente foi possível a observação de um aumento do conteúdo proteico NRF2 no dia 2 em células não diferenciadas quando tratadas com melatonina (1nM e 1mM) sem adição de H₂O₂ (**Figura 34**). Esse dado nos parece interessante uma vez que essa diminuição do conteúdo proteico de importantes enzimas antioxidantes foi acompanhada de um aumento na viabilidade de células K562 quando tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas ao agente estressor H₂O₂ (seção 5.2). Esse nos parece um indício de que a melatonina possa estar tendo um papel como antioxidante de forma direta, promovendo a sobrevivência das células quando exposta a um estresse oxidativo.

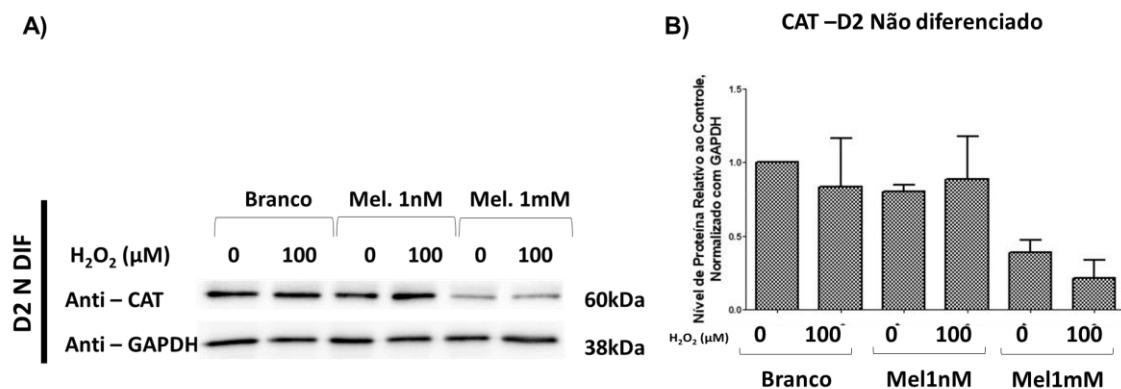


Figura 31 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 2 para detecção de CAT utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

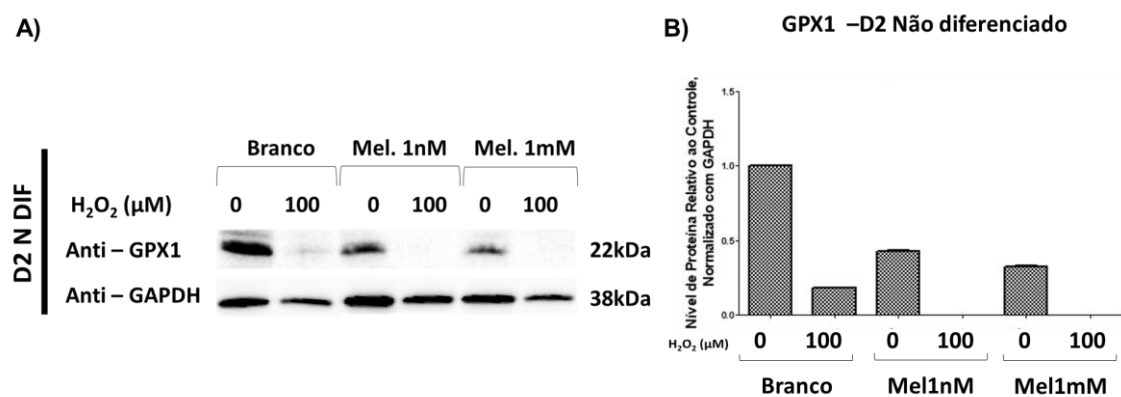


Figura 32 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 2 para detecção de GPX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

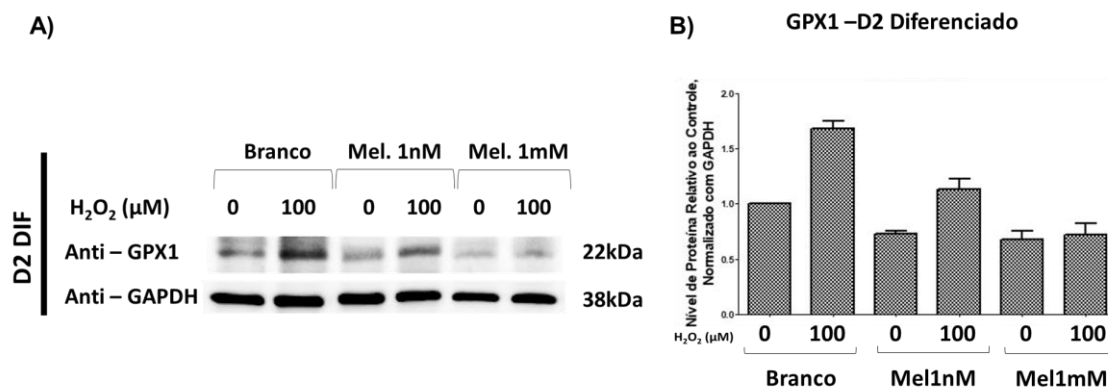


Figura 33 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 2 para detecção de GPX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

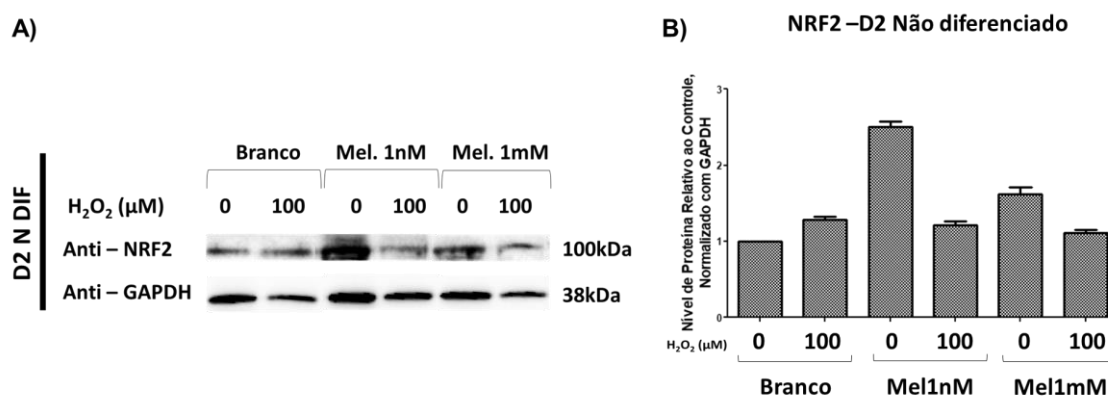


Figura 34 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas no dia 2 para detecção de NRF2 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

5.7.3 - Conteúdo proteico do dia 4

Já os resultados da análise de conteúdo proteico de células K562 no dia 4 em células não diferenciadas e diferenciadas nos mostrou importantes efeitos da melatonina a 1nM e 1mM no conteúdo de importantes proteínas (**Detalhes em Apêndice D e Apêndice E**). Foi possível observar um aumento do conteúdo proteico de PRDX2 em células K562 diferenciadas no D4 na condição de 1mM de melatonina quando comparadas ao controle (**Figura 35**).

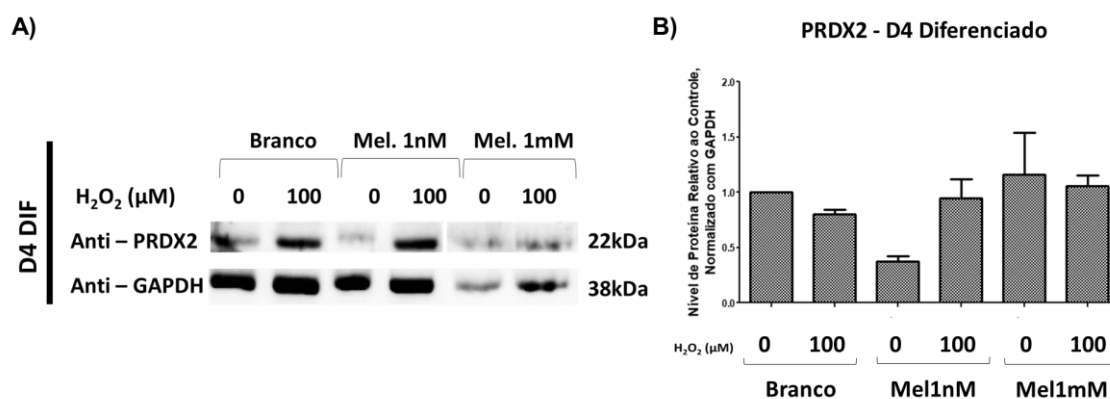


Figura 35 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de PRDX2 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Além do aumento do conteúdo da proteína PRDX2 também foi possível verificar um aumento do conteúdo da proteína CAT, em células K562 diferenciadas no D4 na condição de 1mM de melatonina com e sem adição de H₂O₂ (**Figura 36**).

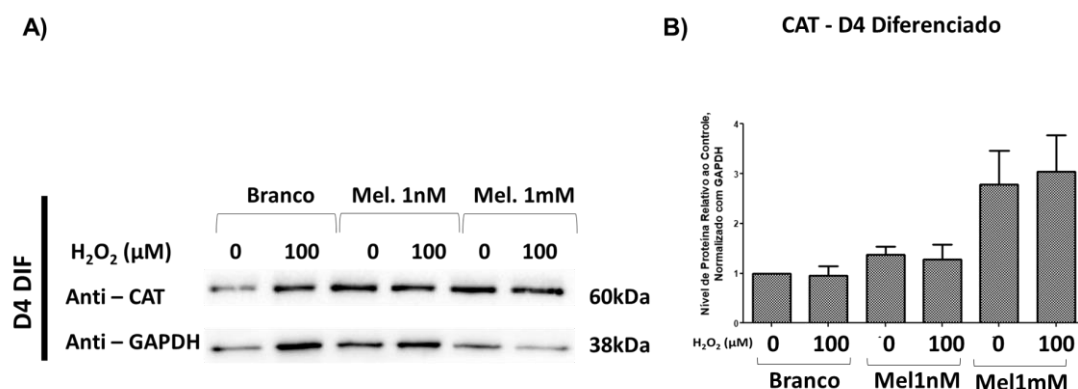


Figura 36 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de CAT utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar os gráficos foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Apesar do aumento de importantes enzimas antioxidantes como a PRDX2 e CAT, também observamos a diminuição do conteúdo proteico de PRDX1 (**Figura 37**) e PRDX6 (**Figura 38**) em células K562 diferenciadas no dia 4. Essas duas isoformas de Peroxirredoxinas estão envolvidas em processos importantes para a célula, a PRDX1 além de apresentar um papel antioxidante, como dito anteriormente também participa da sinalização redox da célula^{125,128}. Já a PRDX6 além

do papel de peroxidase, possui um importante papel como fosfolipase A₂, que diminui o estresse oxidativo através do auxílio do reparo da membrana celular através da redução de fosfolípidos peroxidados¹²⁹.

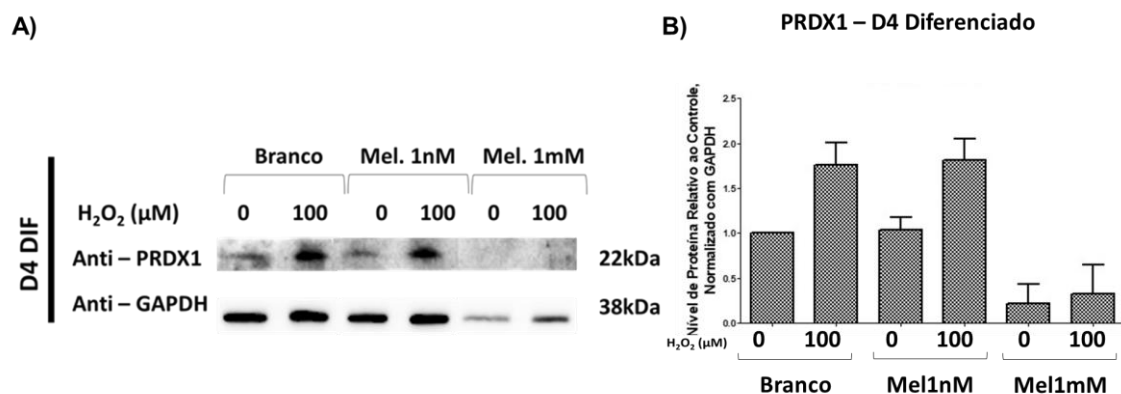


Figura 37 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de PRDX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar os gráficos foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

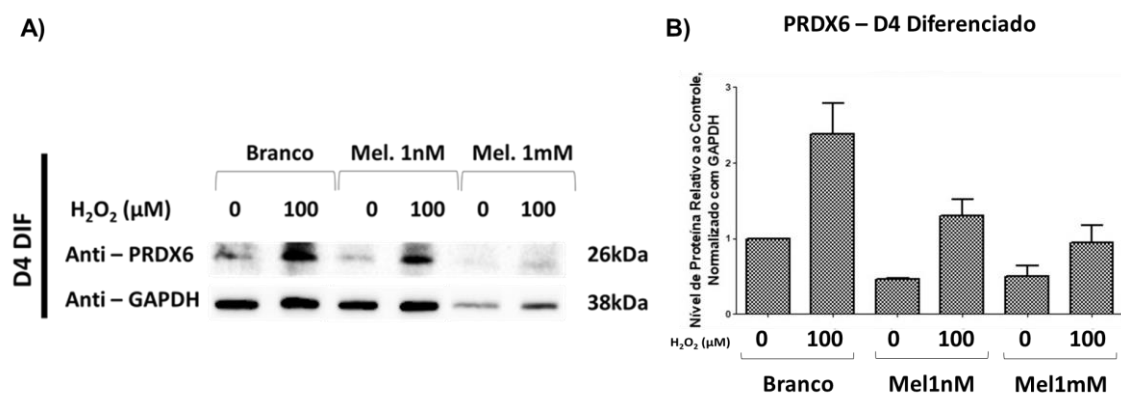


Figura 38 - (A) Western Blotting das amostras de K562 diferenciadas no dia 4 para detecção de PRDX6 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar os gráficos foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Além do aumento do conteúdo proteico das enzimas antioxidantes PRDX2 e CAT, nas mesmas condições foi possível verificar o aumento do conteúdo proteico do fator de transcrição NRF2. Também em células diferenciadas e não diferenciadas no D4 na condição de 1mM de melatonina podemos observar um aumento do conteúdo proteico de NRF2 (**Figura 39**). Este

resultado nos parece extremamente importante uma vez que o aumento do conteúdo proteico do fator de transcrição NRF2 deve estar diretamente relacionado ao aumento do conteúdo proteico de PRDX2 e CAT que são enzimas antioxidantes com um papel protetor importante em células eritróides.

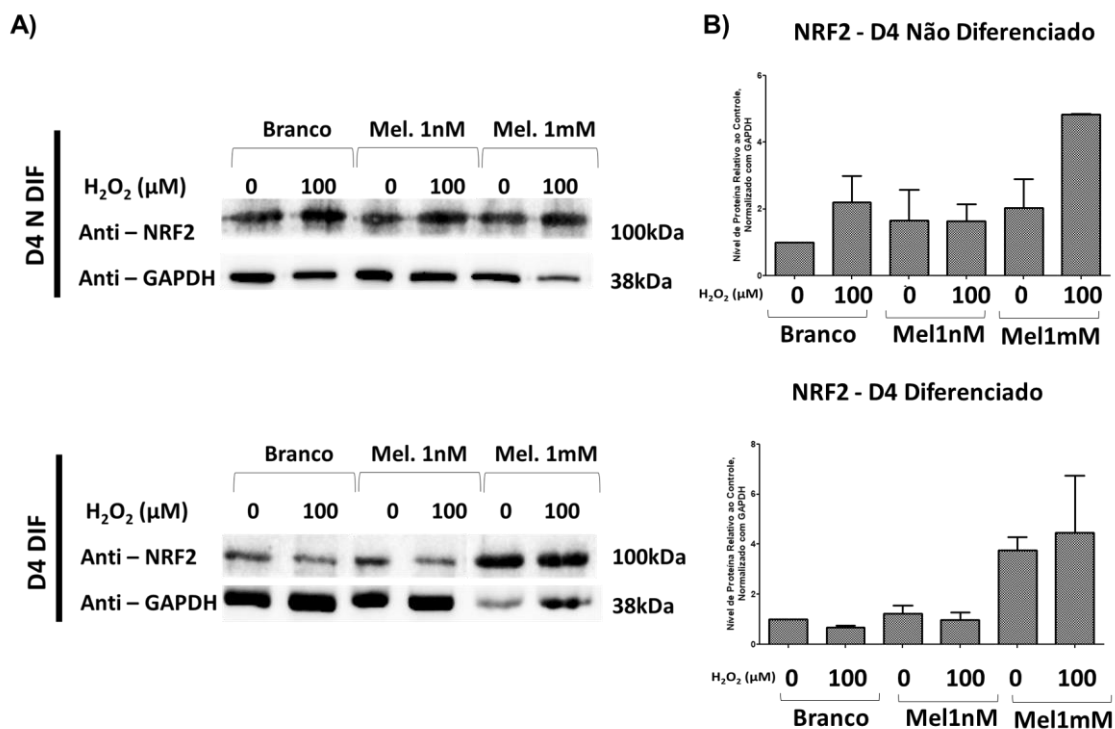


Figura 39 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de NRF2 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar os gráficos foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Além de avaliar o conteúdo proteico de importantes enzimas antioxidantes e do fator de transcrição que ativa sua transcrição em condições de estresse oxidativo, também avaliamos o conteúdo proteico da proteína KEAP1 que como falado anteriormente é responsável pela manutenção de NRF2 no citosol e avaliamos também o conteúdo proteico de APEX1 uma proteína que tem sido vista recentemente como inibidora da atividade de NRF2. Dessa forma foi possível avaliar o conteúdo de duas importantes proteínas responsáveis pela inibição de NRF2 como um fator transcricional.

Interessantemente observamos em células K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 quando tratadas com 1mM de melatonina, um aumento tanto de KEAP1 (Figura 40) quanto de APEX1 (Figura 41) nas mesmas condições onde observamos o aumento de NRF2.

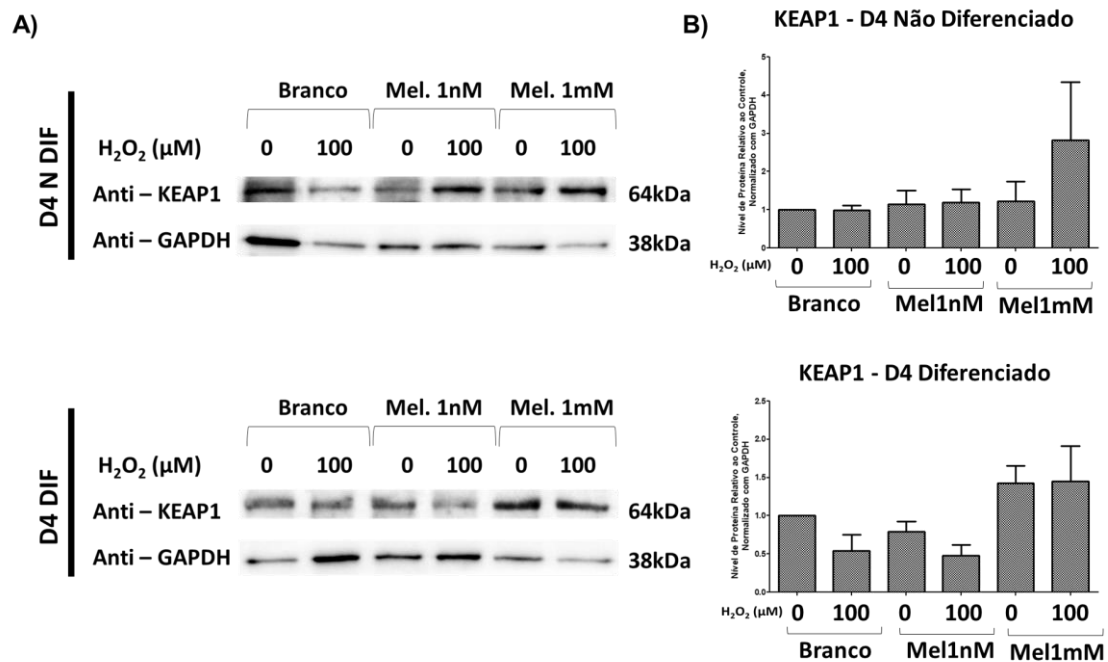


Figura 40 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de KEAP1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar os gráficos foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

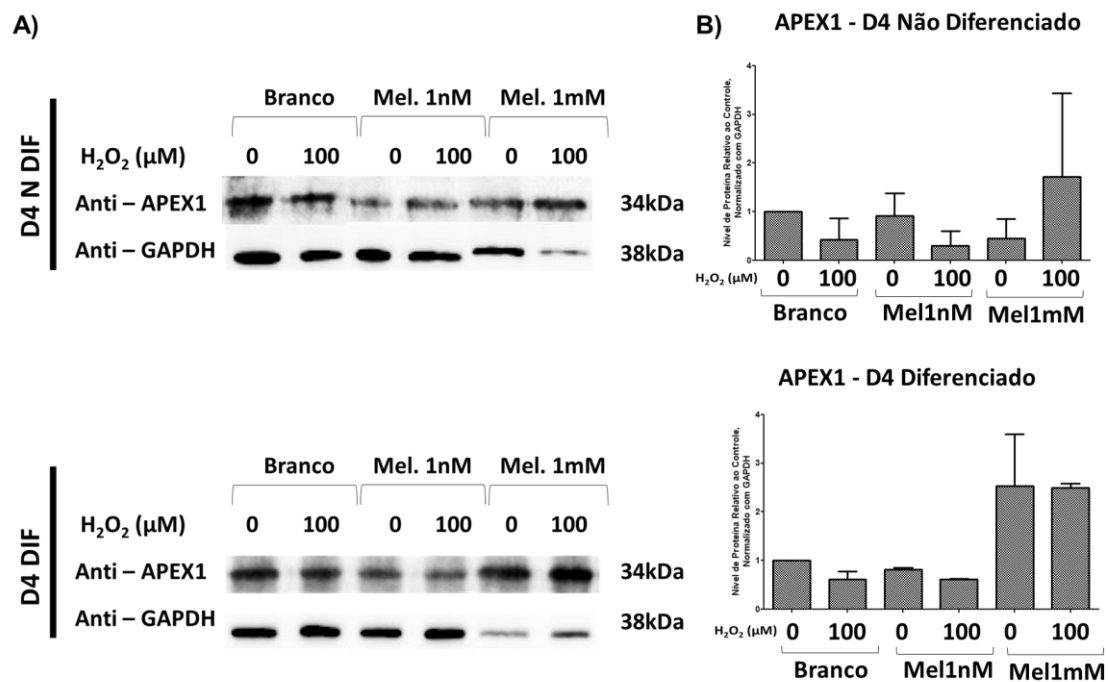


Figura 41 - (A) Western Blotting das amostras de K562 não diferenciadas e diferenciadas no dia 4 para detecção de APEX1 utilizando GAPDH como normalizador endógeno. (B) Gráficos gerados a partir dos dados de western blotting de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar os gráficos foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando

comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM).

Esse resultado indica que a atividade do fator de transcrição NRF2 pode estar sendo em parte inibida pelo aumento das proteínas KEAP1 que o mantem no citosol e de APEX1 que inibe a sua atividade, apesar de seu conteúdo estar aumentado. Mesmo assim o fator de transcrição foi capaz de aumentar o conteúdo das enzimas antioxidantes PRDX2 e CAT.

5.8 – Análise da atividade enzimática de CAT, GR e G6PD em células K562 tratadas com melatonina e expostas a H₂O₂

Realizamos uma análise preliminar da atividade enzimáticas de algumas enzimas envolvidas na via antioxidante do eritrócito. A Catalase (CAT) por ser uma importante linha de defesa antioxidante do eritrócito e por ter apresentado o conteúdo proteico aumentado nas análises realizadas nesse trabalho (**Figura 36**) foi analisada quanto sua atividade enzimática em células K562 quando tratadas com melatonina (1nM e 1mM) e expostas ao estressor H₂O₂ (100 μ M) em células não diferenciadas (**Figura 42-A**) e em células diferenciadas (**Figura 42-B**).

Foi também avaliada a atividade enzimática da enzima GR (Glutathione redutase). Essa enzima, como o nome já diz esta é uma importante enzima envolvida na redução da molécula Glutathione (GSH) quando na forma oxidada (GSSG). A molécula GSH é um tri-peptídeo envolvido na via antioxidante do eritrócito participando de forma importante na proteção contra o estresse oxidativo nessa célula juntamente com seu redutor biológico a enzima GR. Portanto foi avaliada a atividade enzimática de GR em células K562 quando tratadas com melatonina (1nM e 1mM) e expostas ao estressor H₂O₂ (100 μ M) em células não diferenciadas (**Figura 42-C**) e em células diferenciadas (**Figura 42-D**).

Finalmente foi avaliada a atividade enzimática da enzima G6PD, uma importante enzima que participa da primeira etapa da via das pentoses no eritrócito. Como discutido anteriormente na introdução, essa via é a grande responsável pela produção de NADPH a partir de NADP⁺, tem uma função essencial no metabolismo antioxidante do eritrócito uma vez que fornece elétrons para reduzir importantes enzimas e moléculas antioxidantes como por exemplo a GSH. Portanto, foi avaliada a atividade enzimática de G6PD em células K562 quando tratadas com melatonina (1nM e 1mM) e expostas ao estressor H₂O₂ (100 μ M) em células não diferenciadas (**Figura 42-E**) e em células diferenciadas (**Figura 42-F**).

Em geral os resultados indicam uma diminuição na atividade de CAT, GR e G6PD quando administrada a melatonina a 1nM e 1mM comparando com a condição controle em todas as situações analisadas. Apesar de já ter sido demonstrado previamente que a melatonina é capaz de aumentar a atividade enzimática de importantes enzimas antioxidantes como GPX e SOD⁸⁵. Da Silva, D.G.H. *et al.*⁷⁵ demonstrou que essas enzimas tem uma atividade reduzida quando administrada melatonina combinada com N-acetilcisteína em uma suspensão de eritrócitos falcêmicos.

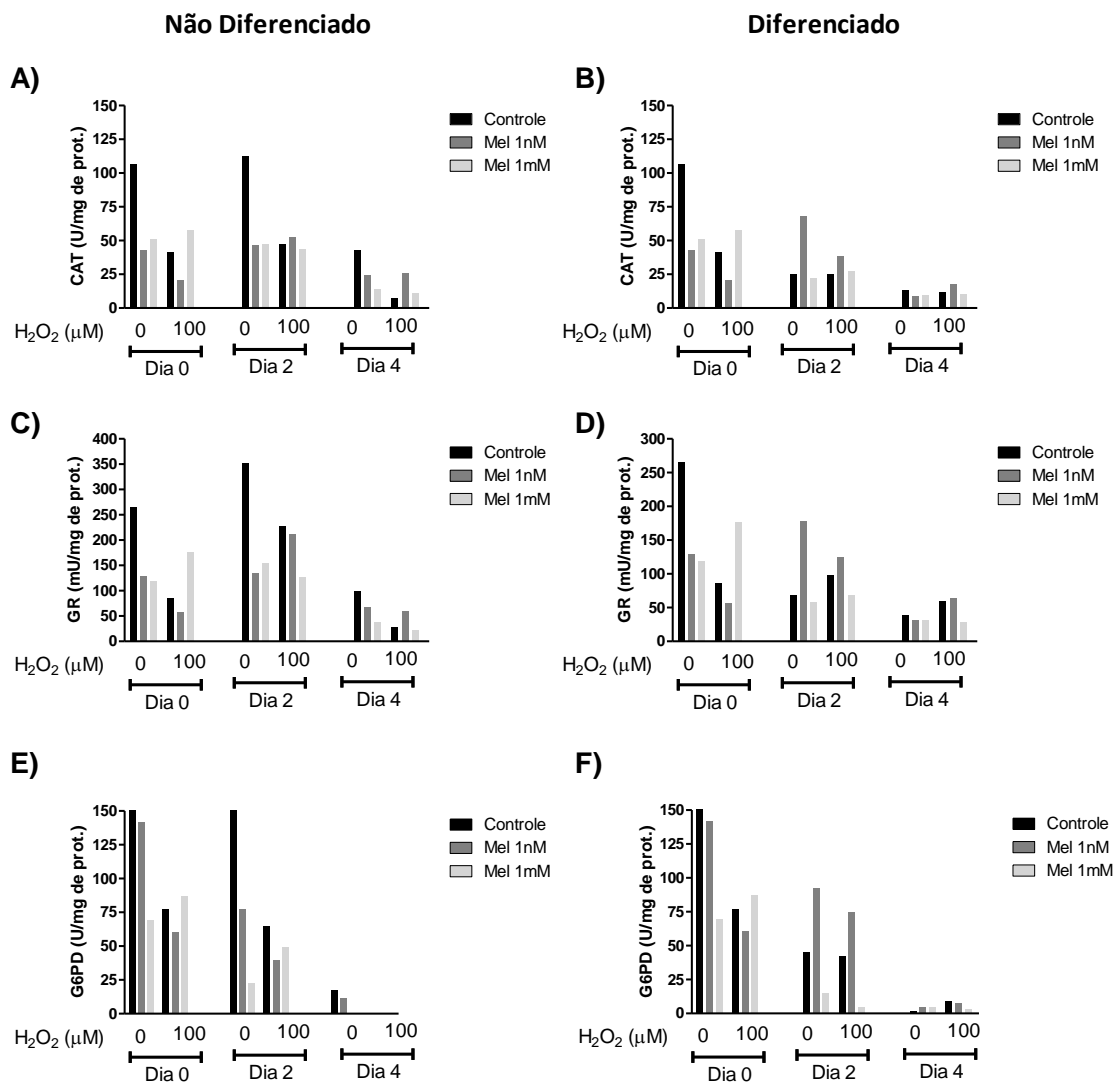


Figura 42 – Análise de atividade enzimática de CAT, GR e G6PD de células K562 tratadas com melatonina a 1nM e 1mM e expostas a H₂O₂ nos dias 0, 2 e 4. (A) Análise da atividade enzimática de CAT de células K562 não diferenciadas. **(B)** Análise da atividade enzimática de CAT de células K562 diferenciadas. **(C)** Análise da atividade enzimática de GR de células K562 não diferenciadas. **(D)** Análise da atividade enzimática de GR de células K562 diferenciadas. **(E)** Análise da atividade enzimática de G6PD de células K562 não diferenciadas. **(F)** Análise da atividade enzimática de G6PD de células K562 diferenciadas.

5.9 – Hipóteses

Nossos dados sugerem que a melatonina é capaz de proteger as células K562 quando expostas a um agente estressor como o peróxido de hidrogênio ($100\mu\text{M}$ de H_2O_2) principalmente na concentração de 1nM . A melatonina foi capaz de aumentar a viabilidade, bem como diminuir a peroxidação lipídica dessas células quando expostas ao estressor, esse dado inédito nos mostra que essa molécula bem conhecida como um hormônio regulador do sono tem um papel importante como um antioxidante nesse tipo celular.

Já sabemos que a melatonina tem um papel antioxidante importante, e pode atuar de forma direta através do ataque as espécies reativas de oxigênio neutralizando seus efeitos danosos, bem como, de forma indireta através do estímulo de enzimas antioxidantes supostamente pela via NRF2-ARE.

Um fator importante de se ressaltar é que os dados apresentados nesse trabalho nos mostraram que a adição de melatonina apesar de auxiliar na sobrevivência da célula e diminuir o estresse oxidativo somente teve alterações significativas no nível proteico no dia 4 de diferenciação (principalmente em células diferenciadas na presença de 1mM de melatonina).

Esse dado nos levou a hipotetizar que no dia 0 do experimento quando não observamos alterações a nível de viabilidade celular, estresse oxidativo e regulação do conteúdo proteico em células K562, a melatonina estaria atuando como um antioxidante de forma direta neutralizando as espécies reativas de oxigênio que ainda não tiveram um papel tão danoso (como visto na condição controle sem adição de melatonina) (**Figura 43**).

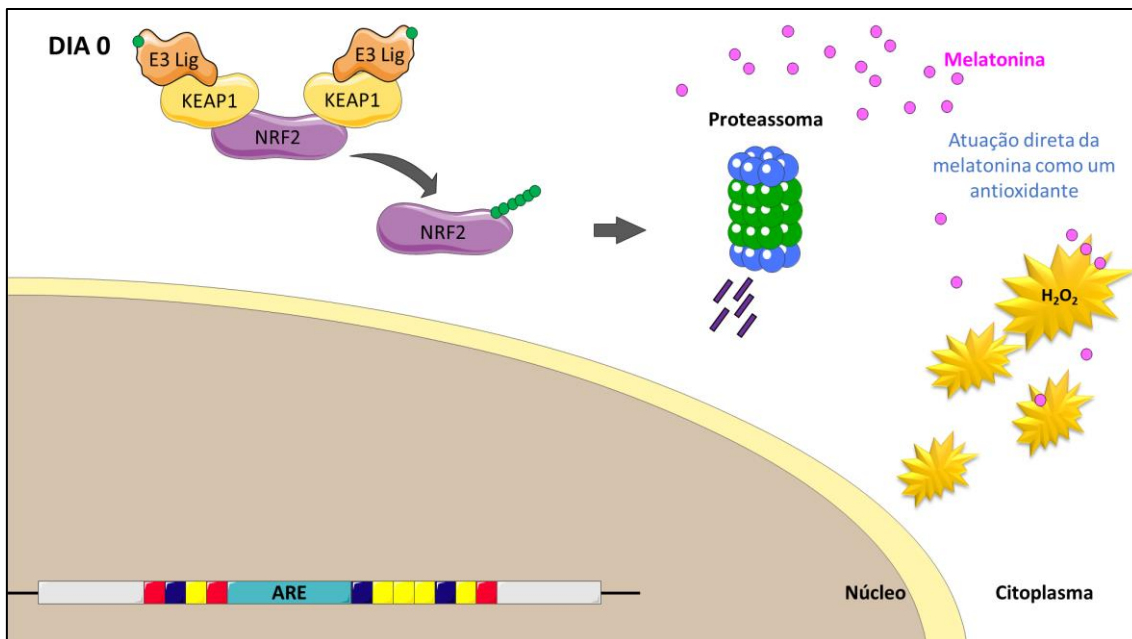


Figura 43 – Esquema representativo do proposto que acontece em células K562 expostas a H₂O₂ e tratadas com melatonina no dia 0 do experimento. A melatonina no dia 0 entra ativamente na célula e apesar da presença do H₂O₂ os danos celulares ainda não são tão intensos, portanto, propomos que a melatonina esteja atuando diretamente como um antioxidante impedindo os danos celulares de ERO. Enquanto que o fator de transcrição é degradado pelo proteassoma ficando em concentrações basais na célula. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

No dia 2 do experimento, nas condições onde houve aumento da viabilidade e diminuição do estresse oxidativo, mas não houve alterações significativas no nível proteico de enzimas antioxidantes, nossa hipótese seria que a melatonina possivelmente estaria agindo mais ativamente como um antioxidante de forma direta, atacando as espécies reativas de oxigênio neutralizando seus efeitos danosos a célula que já poderiam estar causando grandes danos às células como ocorre na condição controle onde não é adicionada a melatonina. Além disso, foi possível observar o aumento do RNAm de *PRDX1* e *PRDX2*, e por isso, propomos que a melatonina esteja nesse momento iniciando um papel como antioxidante indireto, inibindo a ação do proteassoma e permitindo que parte do conteúdo de NRF2 possa atuar como fator de transcrição (**Figura 44**).

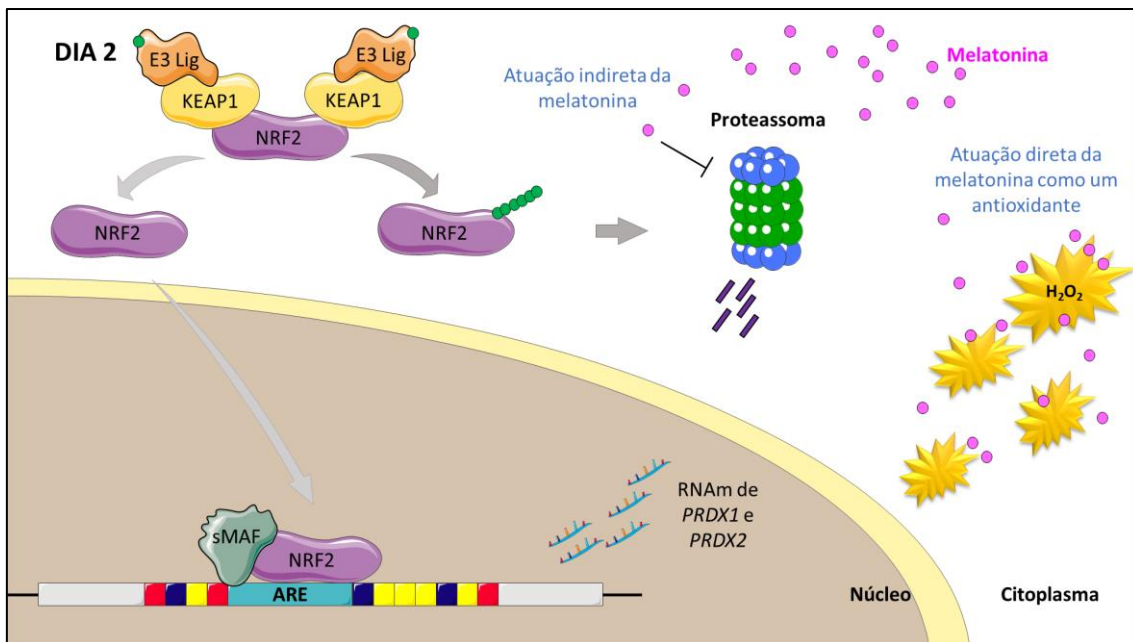


Figura 44 – Esquema representativo do proposto que acontece em células K562 expostas a H_2O_2 e tratadas com melatonina no dia 2 do experimento. A melatonina no dia 2 entra ativamente na célula e a presença do H_2O_2 já demonstra claramente os danos celulares em células controles, mas não vemos aumentos significativos de enzimas antioxidantes. Portanto, propomos que a melatonina esteja principalmente atuando diretamente como um antioxidante impedindo os danos celulares de ERO, entretanto a melatonina estaria iniciando um papel antioxidante indiretamente aumentando a expressão gênica e *PRDX1* e *PRDX2*. O fator de transcrição em parte é degradado pelo proteassoma e parte possivelmente já esteja atuando como um fator de transcrição iniciando um aumento do RNAm dessas enzimas. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

Já no dia 4, do experimento quando vemos o aumento de importantes enzimas antioxidantes como CAT e PRDX2 frente ao tratamento com melatonina, nesse momento nossa hipótese é que a melatonina esteja atuando como um antioxidante de forma indireta, aumentando o conteúdo proteico de NRF2 (um fator de transcrição que estimula a produção de enzimas antioxidantes) através da inibição do proteassoma, isso foi evidenciado pelo aumento do conteúdo proteico de NRF2 no dia 4 na presença de melatonina a 1mM. Dessa forma, a inibição do proteassoma permite que o NRF2 se transloque para o núcleo agindo como um fator de transcrição para enzimas antioxidantes como CAT e PRDX2 que atuam ativamente no ataque ao H_2O_2 (**Figura 45**). Além do aumento do conteúdo proteico de CAT e PRDX2 observamos também o aumento do RNAm de *PRDX1* e *PRDX2* no dia 4 quando adicionado melatonina a 1mM e H_2O_2 em células diferenciadas, o que corrobora mais uma vez para o papel da melatonina como um antioxidante indireto nesse cenário.

Apesar de nessas condições termos observado um aumento das proteínas KEAP1 que é responsável por manter NRF2 no citoplasma e de APEX1 que é conhecido como um importante inibidor da atividade de NRF2, esse fator de transcrição foi capaz de aumentar os níveis proteicos

de duas importantes enzimas, a CAT que é considerada uma frente de defesa antioxidante, e a PRDX2 que é a terceira proteína mais presente no eritrócito e tem importantes papéis como antioxidante, chaperona molecular da hemoglobina e protetora da proteína de membrana do eritrócito a Banda 3.

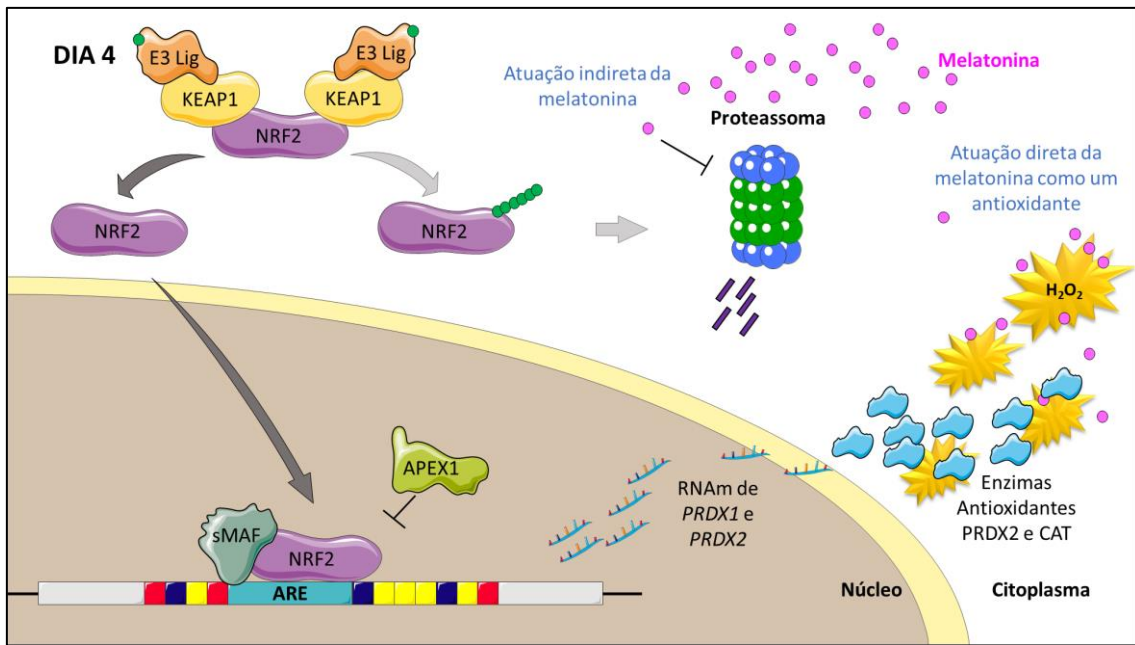


Figura 45 - Esquema representativo do proposto que acontece em células K562 expostas a H₂O₂ e tratadas com melatonina no dia 4 do experimento. A melatonina no dia 4 entra ativamente na célula (sendo que a presença do H₂O₂ já demonstra os efeitos danosos em células controle) e atua indiretamente aumentando a expressão gênica e PRDX1 e PRDX2, e o conteúdo proteico de NRF2, CAT e PRDX2. Portanto, propomos que a melatonina esteja atuando diretamente como um antioxidante impedindo os danos celulares de ERO mas mais importante ela estaria atuando como um antioxidante de forma indireta, inibindo a atividade do proteassoma o que facilita a translocação do NRF2 para o núcleo atuando como uma fator de transcrição aumentando a produção de CAT e PRDX2. Também propomos que nesse momento a proteína KEAP1 e APEX1 estejam atuando inibindo em parte a atividade de NRF2. (Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>)).

6.0 – CONCLUSÕES

6.0 – CONCLUSÕES

De uma forma geral, podemos concluir que os resultados apresentados nesse trabalho nos mostram um papel importante da melatonina tanto com um antioxidante diretamente neutralizando os efeitos oxidantes de H_2O_2 como indiretamente estimulando a produção de importantes enzimas antioxidantes como CAT e PRDX2 através do aumento do conteúdo proteico de NRF2.

Apesar de alguns dados desse trabalho terem apontado a melatonina a 1mM como um composto pró-oxidante por exemplo no dia 4 da diferenciação na presença de H_2O_2 , onde houve aumento da peroxidação lipídica e diminuição da viabilidade de células K562, não podemos descartar as características únicas do modelo biológico utilizado. Apesar de a K562 ser amplamente utilizada com esse fim, ela é uma célula de linhagem tumoral, sendo que já foi comprovado que a melatonina pode apresentar um efeito pró-oxidante em células de origem tumorais^{89,91}. Além disso, o experimento realizado com esse modelo biológico apresentava diversas variáveis que podem ter influenciado algumas análises, como por exemplo a adição de hemina e hidroxiuréia, que são os compostos utilizados para a diferenciação de K562, esses compostos podem ter influenciado os resultados de forma a mascarar certos efeitos protetivos da melatonina. A hemina é uma molécula rica em ferro e como visto na introdução, o ferro está diretamente envolvido na reação de Fenton e Herber Weiss, que gera moléculas oxidantes danosas podendo ter aumentado os níveis oxidativos da célula dificultando a ação da melatonina^{130,131}.

Além disso já foi demonstrado que a enzima CAT media a formação de Óxido nítrico (NO) na presença de hidroxiuréia e H_2O_2 ¹³². O NO é um importante mensageiro molecular tendo importantes funções como a vasodilatação (o que o torna um medicamento muito utilizado no tratamento da anemia falciforme), entretanto altos níveis de NO podem ser tornar tóxicos¹³³. Nos experimentos realizados com o modelo biológico K562 que utiliza a hidroxiuréia como um indutor de sua diferenciação, talvez a presença de hidroxiuréia juntamente com o aumento da proteína CAT induzido pela melatonina podem ter gerados altos níveis de NO podendo ter se tornado tóxico para a célula explicando o aumento da peroxidação lipídica e diminuição da viabilidade celular no dia 4 da diferenciação quando administrado melatonina a 1mM na presença de H_2O_2 .

Os dados de atividade enzimática apresentados nesse trabalho apesar de serem preliminares por se tratar de apenas uma replicata biológica, nos mostrou uma diminuição da atividade de CAT, GR e G6PD similarmente ao encontrado por Da Silva, D.G.H. *et al.*⁷⁵ em suspensão de eritrócitos falcêmicos quando tratados com melatonina combinada com N-

acetilcisteína. Entretanto, uma vez que o modelo utilizado nesse estudo possui diversas variáveis como indução da diferenciação por hemina e hidroxiuréia, talvez sejam necessários outros marcadores de estresse oxidativo a ser analisados nesse modelo biológico.

Apesar desses fatos, podemos concluir que a melatonina (tanto a 1nM quanto 1mM) foi capaz de apresentar um papel antioxidante direta e indiretamente em um modelo de células eritróide, nos levando a acreditar que essa molécula se mostrou promissora para sua utilização como terapia coadjuvante no tratamento de anemias hemolíticas. Como o uso de melatonina já foi comprovado como segura, com mínimos efeitos colaterais quando administrado em humanos⁹⁷, esse fato torna-a ainda mais promissora para esse fim. Testes adicionais são necessários para concluir melhor esse papel da melatonina, como por exemplo testes em culturas de células CD34⁺ ou até mesmo modelos de ratos acometidos por anemias hemolíticas o que pode auxiliar a elucidar duvidas ainda existentes.

7.0 – BIBLIOGRAFIA

7.0 – BIBLIOGRAFIA

1. Zago, M. A., Falcão, R. P. & Pasquini, R. *Hematologia, Fundamentos e Prática*. (2004).
2. Sivilotti, M. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicol Rev* **23**, 169–88 (2004).
3. Kakhniashvili, D. G., Bulla, L. a & Goodman, S. R. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 501–9 (2004).
4. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 2–12 (2010).
5. Dhaliwal, G., Cornett, P. A. & Tierney, L. M. Hemolytic Anemia. *Am. Fam. Physician* **69**, 2599–2606 (2004).
6. Alaarg, A., Schiffelers, R. M., Van Solinge, W. W. & Van Wijk, R. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Front. Physiol.* **4**, 1–15 (2013).
7. Perutz, M. F. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5-Å resolution obtained by x-ray analysis. *Nature* **185**, 416–422 (1960).
8. Zago, M. A. & Pasquini, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. (2004).
9. Weatherall, D. J. RELATIONSHIPS IN MONOGENIC DISEASE : LESSONS FROM THE THALASSAEMIAS. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 245–255 (2001).
10. Tang, Y. *et al.* Cluster specific regulation pattern of upstream regulatory elements in human α - and β -globin gene clusters. *Exp. Cell Res.* **314**, 115–122 (2008).
11. Bunn, H. F. & Forget, B. G. Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects. *W.B. Saunders Co.* 690 (1986).
12. Sonati, M. F. & Costa, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J. Pedía* **84**, 40–51 (2008).
13. Bertholo, J. C. & Moreira, H. W. Focalização isoelétrica a identificação das hemoglobinas. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **42**, 163–168 (2006).
14. Watanabe, A. M. Prevalência de anemia falciforme no estado do Paraná. (Universidade Federal do Paraná, 2007).
15. TAYLOR, S. M., PAROBK, C. M. & FAIRHURST, R. M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 457–468 (2012).
16. Serjeant, G. R. & Serjeant, B. E. *Sickle Cell Disease*. (1997).
17. Steinberg, M., Forget, B. G., Higgs, D. R. & Nagel, R. L. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. *J. R. Soc. Med.* **11**, 602–603 (2001).
18. GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **39**, (2003).
19. BALLAS, S. K. & MOHANDAS, N. Pathophysiology of vaso- occlusion. *Hematol. Clin. North Am.* **10**, 1221–1239 (1996).
20. Olivieri, B. O. *et al.* Oxidative Damage and Erythrocyte Membrane Transport Abnormalities in Thalassemias. *Am. Soc. Hematol.* **84**, 315–320 (1994).
21. Weatherall, D. Disorders of globin synthesis: the thalassemias. in *Williams hematology* 633–666 (2006).

22. URBINATI, F., MADIGAN, C. & MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies – part II: thalassaemias. *Rev. Mol. Med* **8**, 1–26 (2006).
23. Frenette, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 101–106 (2002).
24. Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood* **112**, 3939–3948 (2008).
25. Gallagher, P. G. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 1349–1362 (2013).
26. Ciepiela, O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann. Transl. Med.* **6**, 339–339 (2018).
27. Caprari, P., Bozzi, A., Ferroni, L., Strom, R. & Salvati, A. M. Oxidative erythrocyte membrane damage in hereditary spherocytosis. *Biochem Int.* **26**, 265–74 (1992).
28. Zago, M. A., Falcão, R. & Pasquini, R. *Hematologia, Fundamentos e Prática.* (2004).
29. Zago, M. & Pinto, A. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **29**, 207–214 (2007).
30. Luzzatto, L. & Seneca, E. G6PD deficiency: A classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *Br. J. Haematol.* **164**, 469–480 (2014).
31. de Castro, S. M., Weber, R., Matte, Ú. & Giugliani, R. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients from the southern Brazilian city of Porto Alegre, RS. *Genet. Mol. Biol.* **30**, 10–13 (2007).
32. Elyassi, C. A. R. & Rowshan, M. H. H. Perioperative Management of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Patient: A Review of Literature. *Anesth. Prog.* **56**, 86–91 (2010).
33. HALLIWELL, J. & GUTTERIDGE, M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press (2007).
34. Dickinson, B. C. & Chang, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* **7**, 504–511 (2012).
35. Bartz, R. R. & Piantadosi, C. a. Clinical review: oxygen as a signaling molecule. *Crit. Care* **14**, 234 (2010).
36. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* **194**, 7–15 (2011).
37. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
38. Neill, J. S. O. & Reddy, A. B. Circadian Clocks in Human Red Blood Cells. *Nature* **469**, 498–503 (2011).
39. Alfadda, A. a & Sallam, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 936486 (2012).
40. Kumar, H. *et al.* The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 10478–504 (2012).
41. Fibach, E. & Rachmilewitz, E. A. Iron overload in hematological disorders. *Press. Medicale* **46**, e296–e305 (2017).
42. Rice-evans, C., Omorphos, S. C. & Baysal, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochemistry* **237**, 265–269 (1986).
43. Low, F. M., Hampton, M. B. & Winterbourn, C. C. Peroxiredoxin 2 and Peroxide Metabolism

- in the Erythrocyte. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1621–1629 (2008).
44. Wallace, W., Maxwell, J. & Caughey, W. The mechanisms of hemoglobin autoxidation. Evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions. *Biochem Biophys Res Commun* **57**, 1104–1110 (1974).
 45. Johnson, R. M., Goyette, G., Ravindranath, Y. & Ho, Y. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* **39**, 1407–1417 (2005).
 46. Claster, S., Quintanilha, A. & Lubin, B. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood* **64**, 1079–1084 (1984).
 47. Johnson, R. M., Goyette, G., Ravindranath, Y. & Ho, Y.-S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1407–17 (2005).
 48. Fibach, E. & Rachmilewitz, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemias. *Curr. Protoc. Mol. Med.* **8**, 609–619 (2008).
 49. Girotti, A. W. TRANSLOCATION AS A MEANS OF DISSEMINATING LIPID HYDROPEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE AND EFFECTOR ACTION. *Free Radic Biol Med* **44**, 956–968 (2008).
 50. Gutteridge, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* **41**, 1819–28 (1995).
 51. Voskou, S., Aslan, M., Fanis, P., Phylactides, M. & Kleanthous, M. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* **6**, 226–239 (2015).
 52. Lazarte, S. S. *et al.* Foxo3 gene expression and oxidative status in beta-thalassemia minor subjects. *Rev Bras Hematol Hemoter* **39**, 115–121 (2017).
 53. Klings, E. S. & Farber, H. W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir. Res.* **2**, 280–285 (2001).
 54. Queiroz, R. F. & Lima, E. S. Oxidative stress in sickle cell disease. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **35**, 16–7 (2013).
 55. Hebbel, R. P., Eaton, J. W., Balasingam, M. & Steinberg, M. H. Spontaneous Oxygen Radical Generation by Sickle Erythrocytes. *J. clin. Invest.* **70**, 1253–1259 (1982).
 56. Chirico, E. N. & Pialoux, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* **64**, 72–80 (2012).
 57. Kemp, M., Go, Y.-M. & Jones, D. P. Non-equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* **44**, 921–937 (2009).
 58. Traber, M. G. & Stevens, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1000–1013 (2012).
 59. Poole, L. B., Hall, A. & Nelson, K. J. Overview of Peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr Protoc Toxicol* 1–20 (2012). doi:10.1002/0471140856.tx0709s49.Overview
 60. Prabhakar, R., Vreven, T., Morokuma, K. & Musaev, D. G. Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: a density functional study. *Biochemistry* **44**, 11864–71 (2005).
 61. Holmgren, A. *et al.* Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375–7 (2005).

62. Rhee, S. G. & Woo, H. A. Multiple Functions of Peroxiredoxins : Peroxidases , Sensors and Regulators of the Intracellular. *Antioxid. Redox Signal.* **00**, 1–14 (2011).
63. Matte, A. *et al.* Peroxiredoxin-2 expression is increased in β -thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 457–466 (2012).
64. Lee, T. *et al.* Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* **101**, 5033–5038 (2013).
65. Franceschi, L. De *et al.* Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in β -thalassemic erythropoiesis. *Haematologica* **96**, 1595–1604 (2011).
66. Galanello, R. & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 11 (2010).
67. Dietz, K.-J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1129–59 (2011).
68. De Franceschi, L. *et al.* Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in β -thalassemic erythropoiesis. *Haematologica* **96**, 1595–604 (2011).
69. Franceschi, L. De *et al.* Oxidative Stress and Beta -Thalassemic Erythroid Cells behind the Molecular Defect. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–10 (2013).
70. Matte, A. *et al.* Peroxiredoxin-2 expression is increased in β -thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **49**, 457–466 (2010).
71. Stuhlmeier, K. *et al.* Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem.* **270**, 334–41 (2003).
72. Çimen, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* **390**, 1–11 (2008).
73. McCarty, M. F. Potential utility of full-spectrum antioxidant therapy, citrulline, and dietary nitrate in the management of sickle cell disease. *Med. Hypotheses* **74**, 1055–1058 (2010).
74. Darlow, B. A. *et al.* Vitamin C supplementation in very preterm infants: A randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **90**, 117–122 (2005).
75. Da Silva, D. G. H., Ricci, O., De Almeida, E. A. & Bonini-Domingos, C. R. Potential utility of melatonin as an antioxidant therapy in the management of sickle cell anemia. *J. Pineal Res.* **58**, 178–188 (2015).
76. Tordjman, S. *et al.* Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 434–443 (2017).
77. Bravo, R. *et al.* Assessment of the intake of tryptophan-enriched cereals in the elderly and its influence on the sleep-wake circadian rhythm. *Antropol. Port.* **29**, 113–120 (2012).
78. Karasek, M. & Winczy, K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol* **57**, 19–39 (2006).
79. Zhdanova, I. V, Lynch, H. J. & Wurtman, R. J. Melatonin : A Sleep-Promoting Hormone. *Sleep* **20**, 899–907 (1997).
80. Sadeh, A. Sleep and Melatonin in Infants: A Preliminary Study. *Sleep* **20**, 185–191 (1997).
81. Zhang, H. M. & Zhang, Y. Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J. Pineal Res.* **57**, 131–146 (2014).
82. Galano, A., Tan, D. X. & Reiter, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A

- physicochemical examination. *J. Pineal Res.* **51**, 1–16 (2011).
83. Galano, A., Tan, D. X. & Reiter, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* **54**, 245–257 (2012).
 84. Tan, D. *et al.* Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 181–97 (2002).
 85. Rodriguez, C. *et al.* Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **36**, 1–9 (2004).
 86. Bettahi, I. *et al.* Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* **20**, 205–210 (1996).
 87. Acuña-Castroviejo, D. *et al.* Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* **30**, 65–74 (2001).
 88. Clapp-Lilly, K. L. *et al.* Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* **12**, 1277–1280 (2001).
 89. Büyükcavci, M. *et al.* Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: Relation with its pro-oxidant effect. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **20**, 73–79 (2006).
 90. Wölfler, A. *et al.* Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Lett.* **502**, 127–131 (2001).
 91. Bejarano, I. *et al.* Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: Relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **108**, 14–20 (2010).
 92. Vriend, J. & Reiter, R. J. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol. Cell. Endocrinol.* **401**, 213–220 (2015).
 93. Vichinsky, E. Emerging 'A' therapies in hemoglobinopathies: agonists, antagonists, antioxidants, and arginine. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr.* **2012**, 271–275 (2012).
 94. Tesoriere, L. *et al.* Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: New insights into the radical-scavenging activity. *J. Pineal Res.* **27**, 95–105 (1999).
 95. Krokosz, A., Grebowski, J., Szweda-Lewandowska, Z., Rodacka, A. & Puchala, M. Can melatonin delay oxidative damage of human erythrocytes during prolonged incubation? *Adv. Med. Sci.* **58**, 134–142 (2013).
 96. Chakravarty, S. & Rizvi, S. Circadian modulation of sodium-potassium ATPase and sodium - proton exchanger in human erythrocytes: in vitro effect of melatonin. *Cell Mol Biol* **57**, 80–86
 97. Andersen, L., Gögenur, I., Rosenberg, J. & Reiter, R. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig.* **36**, 169–175 (2016).
 98. Carmen, B., Lozzio, B. & Lozzio, B. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with positive philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321–335 (1975).
 99. Malik, Z., Chitayat, S. D. & Langzam, Y. HEMIN DEPENDENT MORPHOLOGICAL MATURATION AND ENDOGENOUS PORPHYRIN SYNTHESIS BY K562 LEUKEMIC CELLS. *cancer Lett.* **41**, 203–209 (1988).
 100. Zhang, C. H. U., Guo, L., Mu, D. A. N., Gong, J. & Chen, J. Induction of apoptosis and erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia K562 cells by low concentrations of lidamycin. 475–482 (2019). doi:10.3892/or.2018.6849

101. Hietakangas, V. *et al.* Erythroid Differentiation Sensitizes K562 Leukemia Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Downregulation of c-FLIP. **23**, 1278–1291 (2003).
102. Iyamu, E. W., Adunyah, S. E., Elford, H. L., Fasold, H. & Turner, E. A. Trimidox-Mediated Morphological Changes during Erythroid Differentiation Is Associated with the Stimulation of Hemoglobin and F-Cell Production in Human K562 Cells. **764**, 759–764 (1998).
103. Isoda, H. *et al.* Chemico-Biological Interactions Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.* **220**, 269–277 (2014).
104. Lozzio, B. B. & Lozzio, C. B. Properties and usefulness of the original K562 Human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* **3**, 363–370 (1979).
105. Anderson, L. C., Nilsson, K. & Gahmberc, C. G. K562- a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* **23**, 143–147 (1979).
106. Koefler, P. & Golde, D. W. Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. *Bloo* **56**, 344–351 (1980).
107. Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G. & Feliu, a. S. A Multipotential Leukemia Cell Line (K-562) of Human Origin. *Exp. Biol. Med.* **166**, 546–550 (1981).
108. Alves, L. R. *et al.* Heme-Oxygenases during Erythropoiesis in K562 and Human Bone Marrow Cells. *PLoS One* **6**, 1–9 (2011).
109. Kawasaki, N., Morimoto, K., Tanimoto, T. & Hayakawa, T. Control of Hemoglobin Synthesis in Erythroid Differentiating K562 Cells I. Role of Iron in Erythroid Cell Heme Synthesis. **328**, 289–294 (1996).
110. Chenais, B., Andriollo, M., Guiraud, P., Belhoussine, R. & Jeannesson, P. Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. (2009).
111. Tsiftoglou, A., Pappas, L. & Vizirianakis, L. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol. Ther.* **10**, 257–290 (2003).
112. Peretti De Albuquerque Wobeto, V. *et al.* PIPKII α is widely expressed in hematopoietic-derived cells and may play a role in the expression of alpha- and gamma-globins in K562 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **393**, 145–153 (2014).
113. Rowley, P., Ohlsson-Wilhelm, B., Farley, B. A. & LaBella, S. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp Hematol* **9**, 32–37 (1981).
114. Yamabe, S., Nakataa, H. & Yamazakia, S. π Complexes in benzidine rearrangement. *Org. Biomol. Chem* **7**, 4631–4640 (2009).
115. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L. & Randall, R. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275 (1951).
116. Landau, G., K.Kodali, V., D.Malhotra, J. & J.Kaufman, R. Detection of Oxidative Damage in Response to Protein Misfolding in the Endoplasmic Reticulum. in *Methods in Enzymology* 231–250 (2013).
117. Dasgupta, A. & Klein, K. Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory. *Antioxidants Food, Vitam. Suppl.* 19–40 (2014).
118. Esterbauer, H. & Zollern, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 197–203 (1989).
119. Beutler, E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. *Ann Intern Med* **83**, (1975).

120. SIES, H., KOCH, O. & MARTINO, E. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett* **103**, 287–290 (1979).
121. Hardeland, R. *et al.* Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* **3**, 350–384 (2011).
122. Iwasaki, K., Mackenzie, E. L., Hailemariam, K., Sakamoto, K. & Tsuji, Y. Hemin-Mediated Regulation of an Antioxidant-Responsive Element of the Human Ferritin H Gene and Role of Ref-1 during Erythroid Differentiation of K562 Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2845–2856 (2006).
123. Iwasaki, K., MacKenzie, E. L., Hailemariam, K., Sakamoto, K. & Tsuji, Y. Hemin-Mediated Regulation of an Antioxidant-Responsive Element of the Human Ferritin H Gene and Role of Ref-1 during Erythroid Differentiation of K562 Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2845–2856 (2006).
124. Antolín, I. *et al.* Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* **10**, 882–90 (1996).
125. Cao, J. *et al.* Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *EMBO J.* **28**, 1505–1517 (2009).
126. Turner-Ivey, B. *et al.* Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer. *Oncogene* **32**, 5302–5314 (2014).
127. Hopkins, B. L. *et al.* A Peroxidase Peroxiredoxin 1-Specific Redox Regulation of the Novel FOXO3 microRNA Target let-7. *Antioxidants Redox Signal.* **28**, 62–77 (2018).
128. Nassour, H. *et al.* Peroxiredoxin 1 interacts with and blocks the redox factor APE1 from activating interleukin-8 expression. *Sci. Rep.* **6**, 1–17 (2016).
129. Manevich, Y. & Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1422–1432 (2005).
130. Nagy, K., Gabriella, P., László, B. & Imre, Z. Involvement of fenton reaction products in differentiation induction of KS62 Human Leukemia cells. *Pergamon* **19**, 203–212 (1995).
131. Circu, M. L. & Aw, T. Y. REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELLULAR REDOX SYSTEMS AND APOPTOSIS. *Free Radic Biol Med* **48**, 749–762 (2011).
132. Huang, J., Kim-Shapiro, D. B. & King, S. B. Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Med. Chem.* **47**, 3495–3501 (2004).
133. Flora Filho, R. & Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **46**, 265–271 (2000).
134. Bustin, S. a *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).

8.0 - APÊNDICES

8.0 - APÊNDICES

8.1 – Apêndice A

Detalhes da cultura celular

Preparação de meio RPMI

O meio RPMI 1640 foi originalmente desenvolvido para cultura de células leucêmicas humanas em suspensão. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) é considerado um excelente meio de cultivo para diferentes células como HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC e K562 entre outras. O meio RPMI contém vermelho fenol como indicador de pH, o agente redutor glutamina e altas concentrações de vitaminas. Adicionalmente contem biotina e vitamina B12, os quais não são encontrados em outros meios como DMEM. Além disso, o meio RPMI contem as vitaminas inositol e colina em altas concentrações. RPMI não contém proteínas, lipídios ou fatores de crescimento, necessitando de suplementação, comumente é realizada a suplementação com 10% de soro bovino fetal. Esse meio necessita também a adição de bicarbonato de sódio (2 g/L) como sistema de tampão e um ambiente de 5-10% CO₂ para manter o pH fisiológico.

Para preparar 1L de meio RPMI (RPMI-1640 Medium - SIGMA), dilui-se o conteúdo de 1 sachê contendo 10,4g de meio em pó em aproximadamente 950ml de água deionizada, foi adicionado 2g de bicarbonato de sódio e misturado até que estivesse bem diluído. O pH foi ajustado para aproximadamente 7,2, foi adicionado antibióticos (penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml) e fungicida (anfotericina 0,25µg/ml) e então o volume foi completado para 1L utilizando água deionizada. O meio foi filtrado utilizando membrana de 0,22µm em sistema estéril e armazenado em vidro autoclavado na geladeira por no máximo 1 mês.

Descongelamento das células K562

Antes de descongelar as células os materiais necessários são colocados no fluxo e deixados 30 minutos expostos à luz UV. O meio RPMI e o soro bovino fetal foram retirados da geladeira e do freezer respectivamente e deixados até atingir temperatura ambiente. Dentro do fluxo foi preparado 5 ml de meio RPMI suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) em um falcon e colocado em frasco de cultura celular de 50 ml.

Em seguida o tubo criopreservante contendo as células a serem descongeladas foi colocado por 5 minutos no gelo. Então o conteúdo do tubo foi despejado dentro de um frasco de cultura de 50 ml com o meio utilizando uma pipeta. O descongelamento das células é geralmente realizado de forma rápida, dessa forma minimiza os danos às células. Apesar de todo o cuidado durante o congelamento e descongelamento esses processos são danosos para as células e,

portanto, ao descongelar as células, devem ser colocadas em meio de cultivo com uma concentração de 20% de soro bovino fetal por um dia. O soro bovino fetal é um complemento do meio de cultura, contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. Após o descongelamento foi utilizado 20% de soro por um dia a fim de promover um meio ambiente rico para a recuperação ao estresse causado durante o congelamento e descongelamento das células.

O frasco foi então identificado e deixado por um dia em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células foram observadas em microscópio invertido para verificar a confluência e o meio é trocado a fim de diminuir a concentração de soro bovino fetal, que induziria a diferenciação e retirar o DMSO (solução criopreservante) o qual é tóxico à célula.

As células foram centrifugadas com rotor swing por 5 minutos, a uma rotação de 600g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso em aproximadamente 10 ml de meio RPMI fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após ressuspenso as células o conteúdo foi colocado novamente no frasco de cultivo e deixado em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

De 2 em 2 dias aproximadamente as células foram observadas quanto a sua confluência, número, morfologia e possíveis contaminações, adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal e trocando-o quando julgar necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação de células mortas).

Congelamento de células K562

Após alguns dias de cultivo, aproximadamente 1 semana, congelamos uma parte das células. Primeiramente, foi preparada a solução criopreservante (DMSO 10% e soro bovino fetal 90%). O conteúdo do cultivo celular foi colocado em um tubo cônico de 15 mL e centrifugado com rotor swing por 5 minutos, a uma rotação de 600g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso com a o volume desejado de solução criopreservante para um número de células de 2x10⁶ células/ml. A solução foi adicionada gelada de 1 em 1 ml e homogeneizado com cuidado. Após ressuspenso, o conteúdo foi aliquoteado em tubos criopreservantes com um volume de aproximadamente 1ml contendo 2x10⁶ células/ ml. Os tubos foram armazenados em freezer -80 por 12-24 horas e transferidos para o nitrogênio líquido.

8.2 - Apêndice B

Padronização dos primers de qCR

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) permite a detecção e quantificação de fragmentos de DNA e RNA em tempo real com alta sensibilidade e especificidade, a quantificação desses ácidos nucleicos é feita de forma precisa e com maior reprodutibilidade que a técnica convencional já que determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado Cycle threshold (C_T). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Essa técnica é extremamente sensível e como os valores são medidos na fase exponencial de amplificação, qualquer variável pode significar um resultado não confiável, por isso vários cuidados devem ser tomados para a realização de um experimento confiável e eficiente que minimize a possibilidade de conclusões erradas ¹³⁴.

A eficiência das reações de amplificação por qPCR depende de diversos fatores, tais como o cuidado com a pipetagem, a qualidade e integridade das amostras de cDNA, desenho dos *primers*, condições de termociclagem, qualidade e quantidade dos reagentes e tamanho do produto da amplificação. Por isso as condições específicas para cada experimento necessitam ser padronizadas.

O desenho dos *primers* é um dos principais fatores limitantes para a eficiência da técnica de PCR em tempo real e precisa seguir uma série de regras. Por isso os *primers* que foram utilizados nesse estudo foram desenhados a fim de apresentar temperatura de anelamento ideal entre 58 e 60° para eficiência do ciclo padrão de termociclagem, os *primers* foram desenhados para uma região localizada entre dois exons, evitando a amplificação de gDNA por eventual contaminação e além disso foram desenhados evitando-se a possibilidade de formação de homodímeros, heterodímeros e “*hairpin*” entre os *primers*. A sequência dos *primers* referentes aos genes que foram analisados através da técnica de qPCR estão apresentadas na **Tabela B1**.

Tabela B1. Sequências dos primers que foram utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
Beta Actina (BAC)	5'-CAAGCAGGAGTATGACGAGTC-3'	5'-GCCATGCCAATCTCATCTTG-3'
Peroxirredoxina 1 (PRDX1)	5'-TGTAATGACCTCCCTGTTGG-3'	5'-TATCACTGCCAGGTTTCCAG-3'
Peroxirredoxina 2 (PRDX2)	5'-CTGTTAATGATTGCCTGTGGG -3'	5'-TGGGCTTAATCGTGTCAGT-3'
Peroxirredoxina 6 (PRDX6)	5'-CACGACTTTCTGGGAGACT-3'	5'-GGGCAATCAACTTAACATTCCTC-3'
Catalase (CAT)	5'-TGAATGAGGAACAGAGGAAACG-3'	5'-GTACTTGCCAGAAGAGCCTG-3'
Superoxido Dismutase 1 (SOD1)	5'-GGGCAAAGGTGGAATGAAG-3'	5'-CAGCTAGCAGGATAACAGATGAG-3'
Glutathiona Peroxidase (GPX1)	5'-TTCCAGACCATTGACATCGAG-3'	5'-CACCTCATAGATGAAAACCCC-3'
Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (NRF2)	5'-GCTACGTGATGAAGATGGAAAAC-3'	5'-AGCTCAGAAAAGGTCAAATCCTC-3'
Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)	5'-AACAGAGACGTGGACTTTCG-3'	5'-GTGTCTGTATCTGGGTCGTAAC-3'
Apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 (APEX1)	5'-ACAGCAAGATCCGTTCCAAG -3'	5'-GCTTATTTCCAGGCTCAAAG -3'

Além do desenho, a quantidade de *primer* a ser usada é outro fator essencial que interfere na eficiência das reações. É importante que seja utilizada uma combinação de concentração de *primers foward* e *reverse* mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra, que forneçam o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), a maior amplificação na fase exponencial (maior ΔR_n , que corresponde à variação de fluorescência) e que forme a menor quantidade de dímeros de *primers*.

Após a síntese, realizamos a padronização da concentração dos *primers* utilizando uma amostra de cDNA de células K562. Para tal, utilizamos as seguintes concentrações de *primers foward* e *reverse* respectivamente para verificar a melhor combinação de concentração (100/100, 100/150, 100/300, 150/100, 150/150, 150/300, 300/100, 300/150, 300/300 nM). Para cada par de *primer* foi verificada a combinação de concentração que apresentasse a maior amplificação (maior taxa de fluorescência) e menor formação de dímeros, utilizando a menor concentração de *primers* possível. As concentrações utilizadas para cada gene estão descritas na Tabela B2.

Na **Figura B1**, está exemplificada a curva de amplificação da padronização do *primer* da PRDX1, a qual apresentou sua melhor amplificação nas concentrações 300F/300R nM. Na **Figura**

B1 A podemos observar todas as curvas de amplificação, na parte (**Figura B1 B**) observamos a curva da concentração escolhida (Seta preta) e na parte (**Figura B1 C**) observamos a curva de *melting* da concentração escolhida, a qual apresentou a maior fluorescência, menor formação de dímeros.



Figura B1 – Padronização dos primers PRDX1. A) A padronização do *primer* da PRDX1 demonstrou entre todas as curvas para as diferentes concentrações de *primers*, que a melhor combinação de concentração foi 300F/300R nM, C) destacado em cor laranja e apontada pela seta preta. C) A qual apresentou maior emissão de fluorescência, menor formação de dímeros de *primer* na menor concentração possível. Como pode ser visto na curva de *melting*, o pico único aparece próximo a 81°C mostrando a especificidade da amplificação, onde picos em temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou formação de dímeros.

Adicionalmente, podemos observar que os NTCs (*no-template controls*) não apresentaram amplificação, nem formação de dímeros (**Figura B2**).

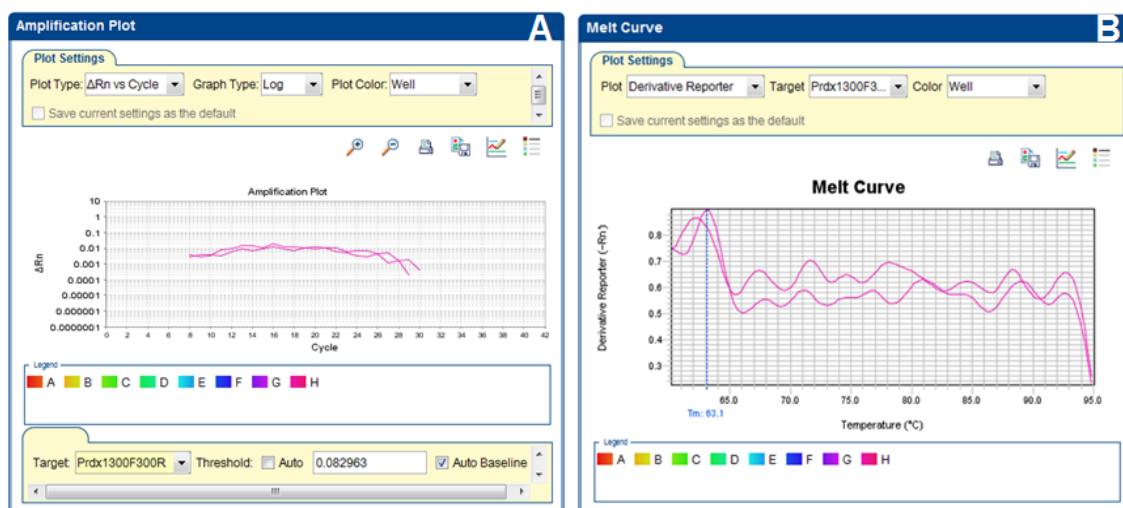


Figura B2 - NTCs (no-template controls) PRDX1. A) A ausência de amplificação no controle negativo indica que não há contaminação do *primer*. **B)** A Curva de *melting* confirmando a ausência de contaminantes.

Após a determinação da melhor concentração dos *primers* partimos para a elaboração da curva de eficiência da reação. Uma vez que os valores são medidos na fase exponencial de amplificação, qualquer variável pode significar um resultado não confiável, e a reação não se torna eficiente, por isso é realizada a curva para determinar a eficiência da reação, que para ser considerado eficiente, deve apresentar valor de eficiência entre 95 – 105%, quanto mais próximo de 100% mais eficiente é a reação. Foram realizadas diluições seriadas de 1:5 partindo de uma amostra de cDNA à 200ng utilizando as mesmas concentrações de *primers* determinadas previamente. Como a amplificação é exponencial, deve haver uma diferença de 3,32 Cts na amplificação de cada uma das diluições e ao traçarmos uma reta relacionando a potência da diluição e o Ct obtemos a curva da eficiência do *primer*, a qual deve apresentar o valor de R² mais próximo de 1 (100%) (**Figura B3 A e Figura B3 B**).

A curva de *melting* também foi analisada para verificar a formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico. Depois de obtidos e analisados os parâmetros citados é determinado um *threshold* que será utilizado nas análises posteriores (**Figura B3 C**).



Figura B3 – Teste de eficiência da reação para análise do gene PRDX1. Foram realizadas diluições seriadas de 1:5 partindo de uma amostra de cDNA à 200ng e as concentrações de *primers* determinadas previamente. Como a amplificação é exponencial, podemos observar como esperado, uma diferença de 3,32 Cts na amplificação de cada uma das diluições seriadas realizadas (A). Ao traçarmos uma reta relacionando a potência da diluição (abscissas) e o Ct (ordenadas), obtivemos a chamada curva de eficiência do *primer*, a qual deve apresentar o valor de R² mais próximo possível de 1 (100%) (B), no caso da PRDX1 e de todos os outros genes de interesse as curvas de eficiência apresentaram uma eficiência maior que 95%. O pico único que aparece na figura da curva de *melting* (C) próximo a 82°C mostra a especificidade da amplificação, onde picos à temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou ocorrência de dímeros.

Abaixo, na **Tabela B2** estão apresentados os valores da concentração de cada par de *primer* que se demonstraram ser ideais na padronização e os valores da eficiência de cada reação. Nossos dados apresentaram uma eficiência maior que 95% para todas as reações o que é bem próximo do ideal (100%), este valor é o suficiente para dizer que as reações de qPCR são eficientes, reproduzíveis e consequentemente os resultados são confiáveis.

Tabela B2. Apresentação da concentração ideal de cada par de *primer* determinada durante a padronização e eficiência de cada reação para cada gene alvo.

<i>Primer</i>	Concentração (F/R) nM	<i>Threshold</i>	Eficiência (%)
BAC	300/150	0,098701	101,311
SOD1	150/150	0,058913	96,576
GPX1	300/150	0,070705	96,5
CAT	150/300	0,122229	101,923
PRDX1	300/300	0,060659	95,439
PRDX2	300/300	0,096587	95,195
PRDX6	100/100	0,107838	98,96
NRF2	150/150	0,058913	96,087
KEAP1	300/300	0,101843	98,695
APEX1	150/300	0,099955	108,254

8.3 – Apêndice C

Detalhes do PCR em tempo real de todos os genes analisados

Avaliação da expressão de RNAm que codificam importantes enzimas antioxidantes moduladas pela via NRF2-ARE frente ao tratamento com melatonina a fim de verificar se esta é capaz de modular a expressão dessas enzimas em células K562. Foi analisado então a expressão de RNAm através de PCR em tempo real de *PRDX1* (Figura C1), *PRDX2* (Figura C2), *PRDX6* (Figura C3), *CAT* (Figura C4), *SOD1* (Figura C5) e *GPX1* (Figura C6).

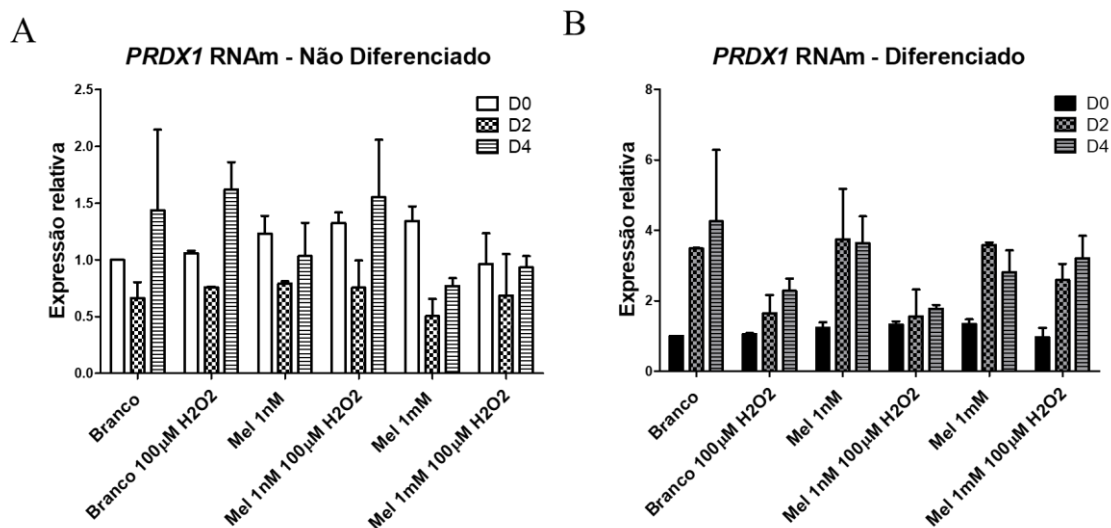


Figura C1 - Gráfico de Expressão relativa de *PRDX1* em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de *PRDX1* em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de *PRDX1* em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

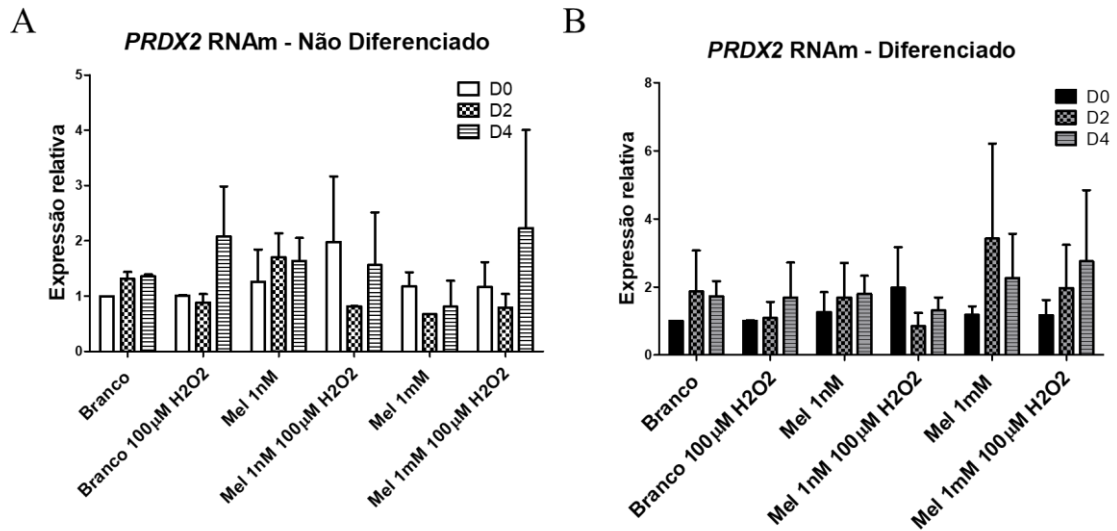


Figura C2 - Gráfico de Expressão relativa de *PRDX2* em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de *PRDX2* em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de *PRDX2* em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

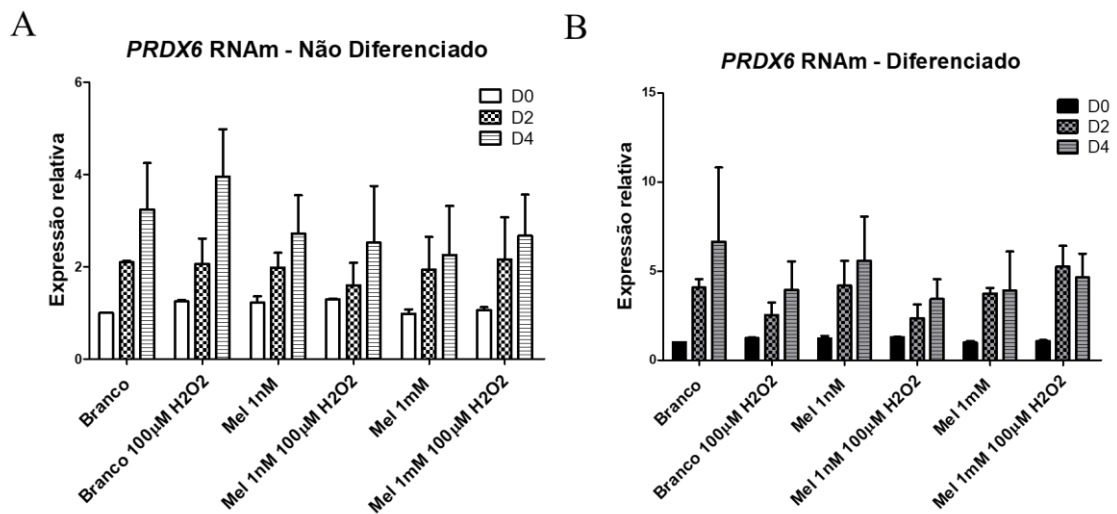


Figura C3 - Gráfico de Expressão relativa de *PRDX6* em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de *PRDX6* em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de *PRDX6* em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

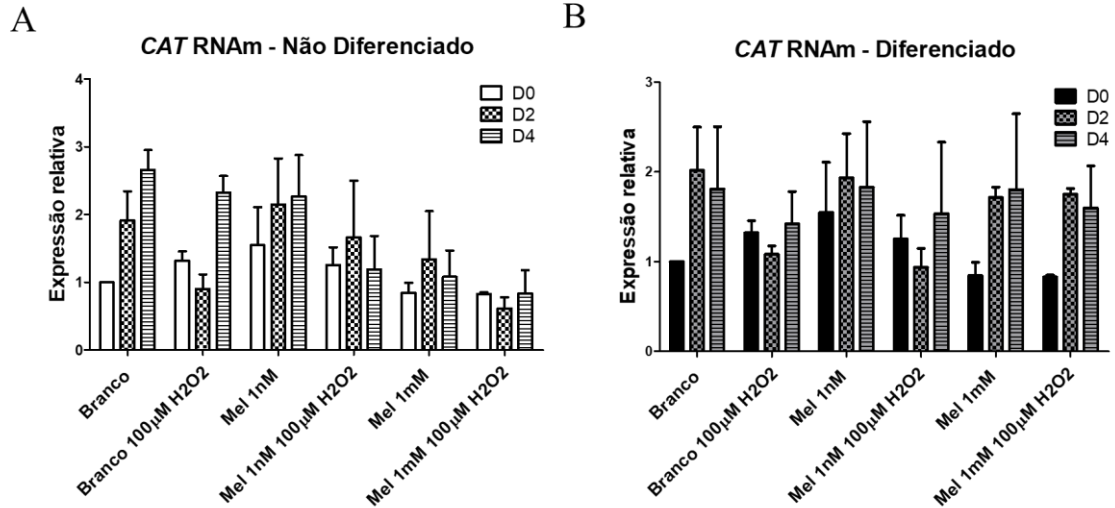


Figura C4 - Gráfico de Expressão relativa de CAT em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de CAT em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de CAT em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

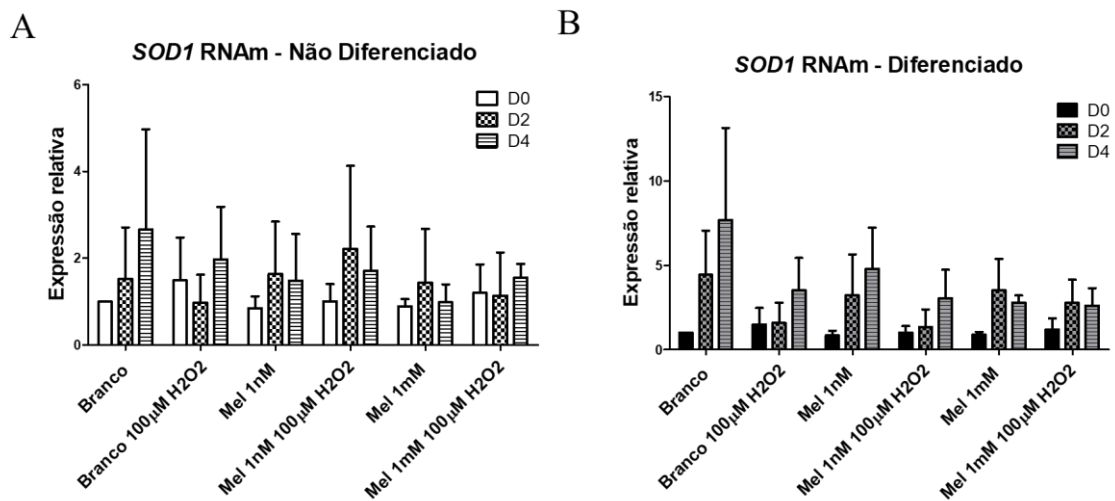
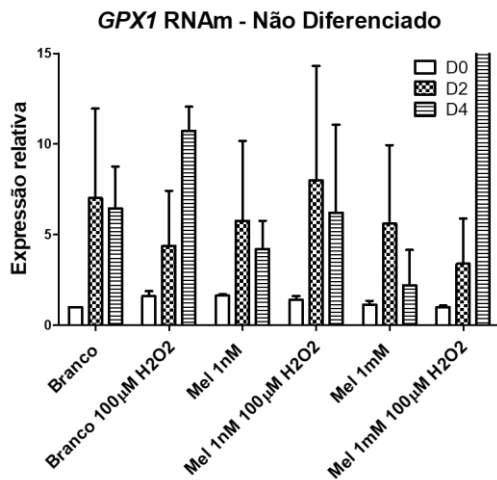


Figura C5 - Gráfico de Expressão relativa de SOD1 em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de SOD1 em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de SOD1 em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

A



B

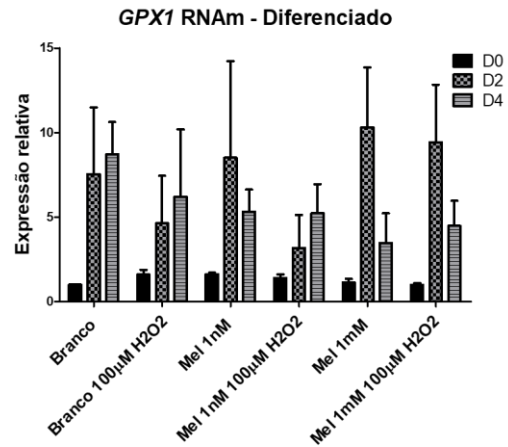


Figura C6 - Gráfico de Expressão relativa de GPX1 em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de GPX1 em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de GPX1 em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

Também foi analisada a expressão de RNAm de *KEAP1* (**Figura C7**) que codifica uma proteína responsável pelo controle de NRF2 no citoplasma, bem como a expressão de *NRF2* (**Figura C8**) que codifica o fator de transcrição responsável pela indução da expressão de importantes enzimas antioxidantes como discutido anteriormente. Adicionalmente foi analisada a expressão de RNAm de *APEX1/Ref-1* (*Apurinic/apirimidinic endonuclease 1/redox factor-1*) (**Figura C9**) que codifica uma proteína multifuncional, relacionada ao reparo do DNA, à regulação transcricional e recentemente tem sido relacionada a inibição da função da proteína NRF2. Dessa forma podemos avaliar a expressão do RNAm do fator de transcrição que estimula a expressão dos antioxidantes acima avaliados e avaliar a expressão do RNAm de dois importantes inibidores da atividade de NRF2.

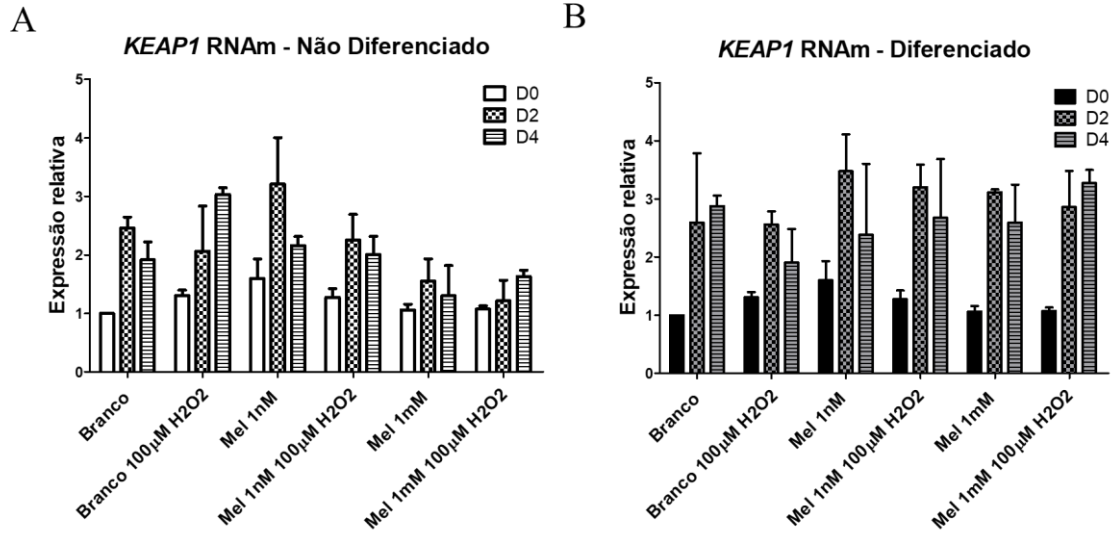


Figura C7 - Gráfico de Expressão relativa de KEAP1 em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de KEAP1 em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de KEAP1 em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

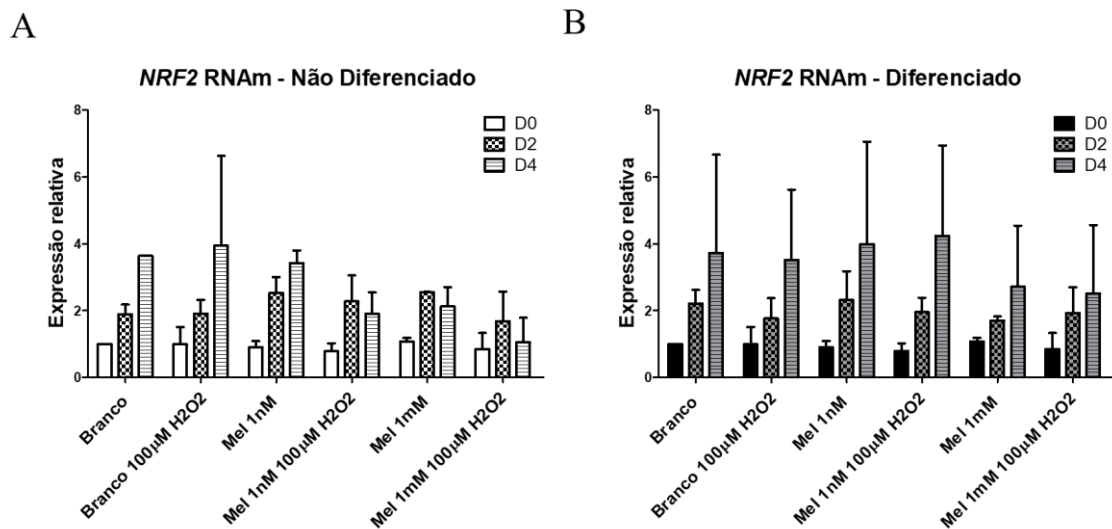


Figura C8 - Gráfico de Expressão relativa de NRF2 em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de NRF2 em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de NRF2 em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

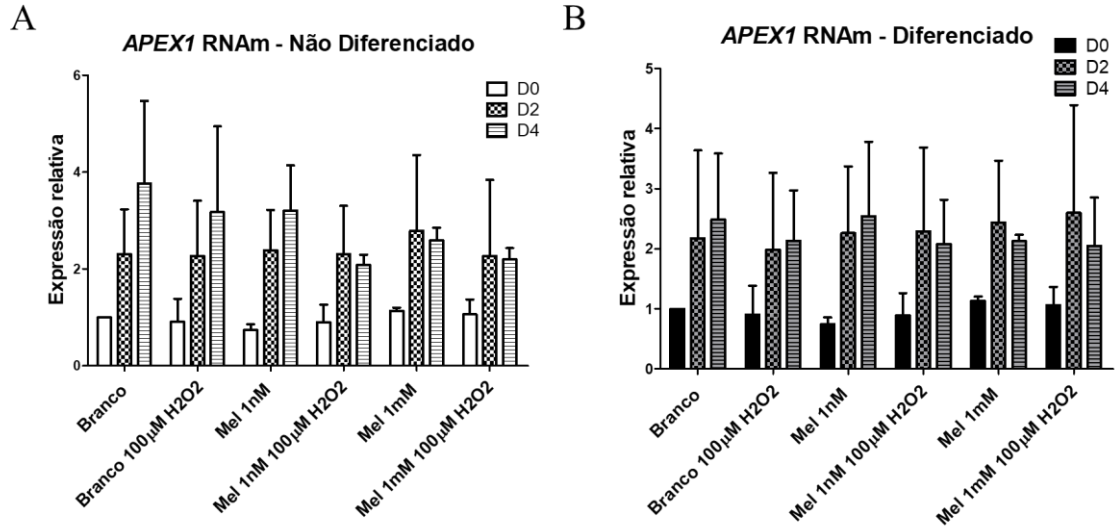


Figura C9 - Gráfico de Expressão relativa de *APEX1* em células K562 diferenciadas após 5 dias de experimento. (A) Gráfico de expressão de *APEX1* em células K562 não diferenciadas. (B) Gráfico de expressão de *APEX1* em células K562 diferenciadas. Foi utilizado o gene da β Actina como endógeno e os valores representam o aumento (> 1) ou diminuição (< 1) da expressão de RNAm quando comparado a amostra controle (Branco/ tratado com $0\mu\text{M}$ de H_2O_2 no dia 0 da diferenciação). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

8.4 – Apêndice D

Detalhes do western blotting de todas as proteínas analisadas

Avaliação do conteúdo proteico de importantes enzimas antioxidantes moduladas pela via NRF2-ARE frente ao tratamento com melatonina a fim de verificar se esta é capaz de modular a expressão dessas enzimas em células K562. Foi analisado então o conteúdo proteico através de western blotting de PRDX1 (Figura D1), PRDX2 (Figura D2), PRDX6 (Figura D3), CAT (Figura D4), SOD1 (Figura D5) e GPX1 (Figura D6).

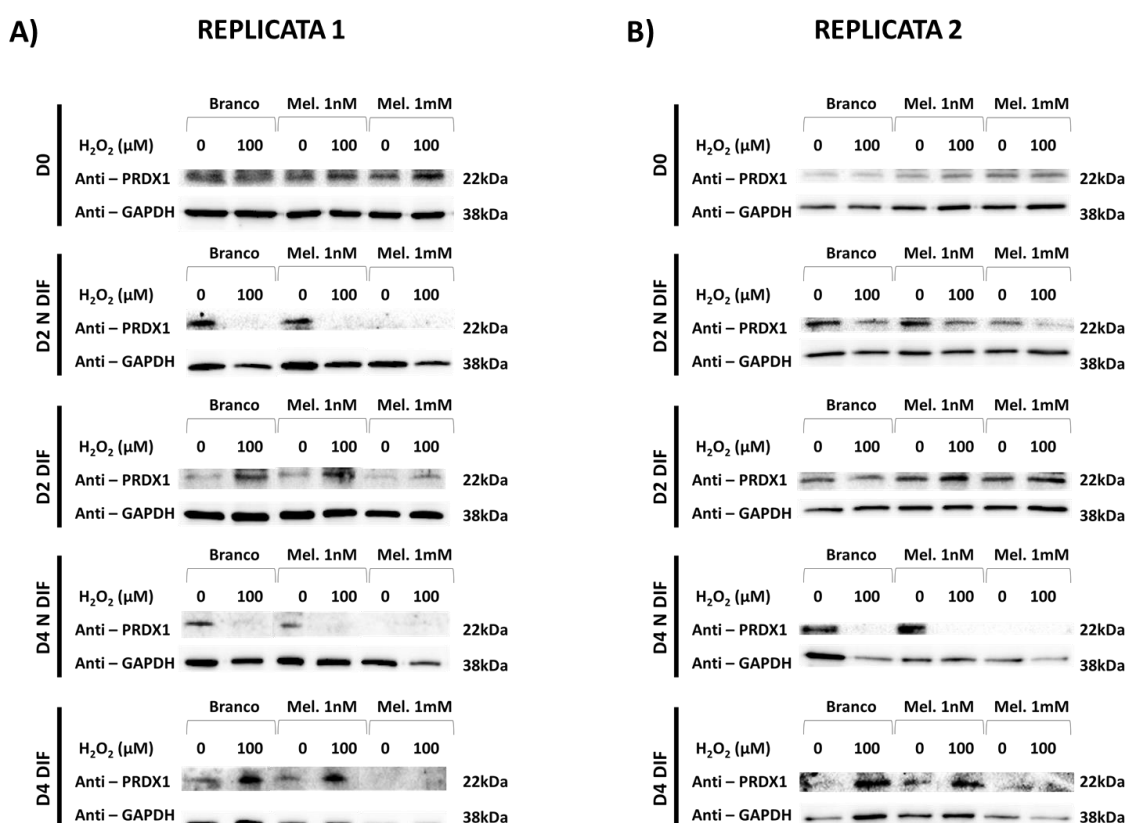


Figura D1 – Análise do conteúdo proteico de PRDX1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de PRDX1, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. **(B)** Figura do conteúdo proteico de PRDX1, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

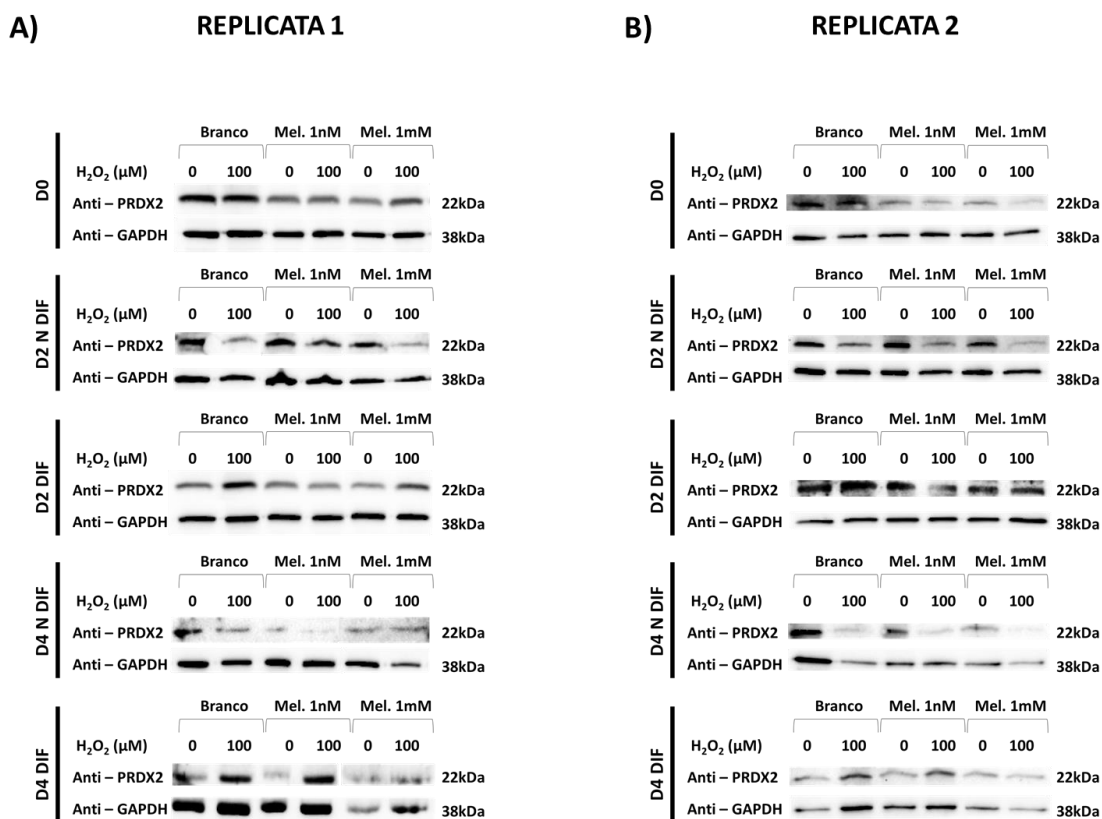


Figura D2 – Análise do conteúdo proteico de PRDX2 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de PRDX2, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. (B) Figura do conteúdo proteico de PRDX2, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

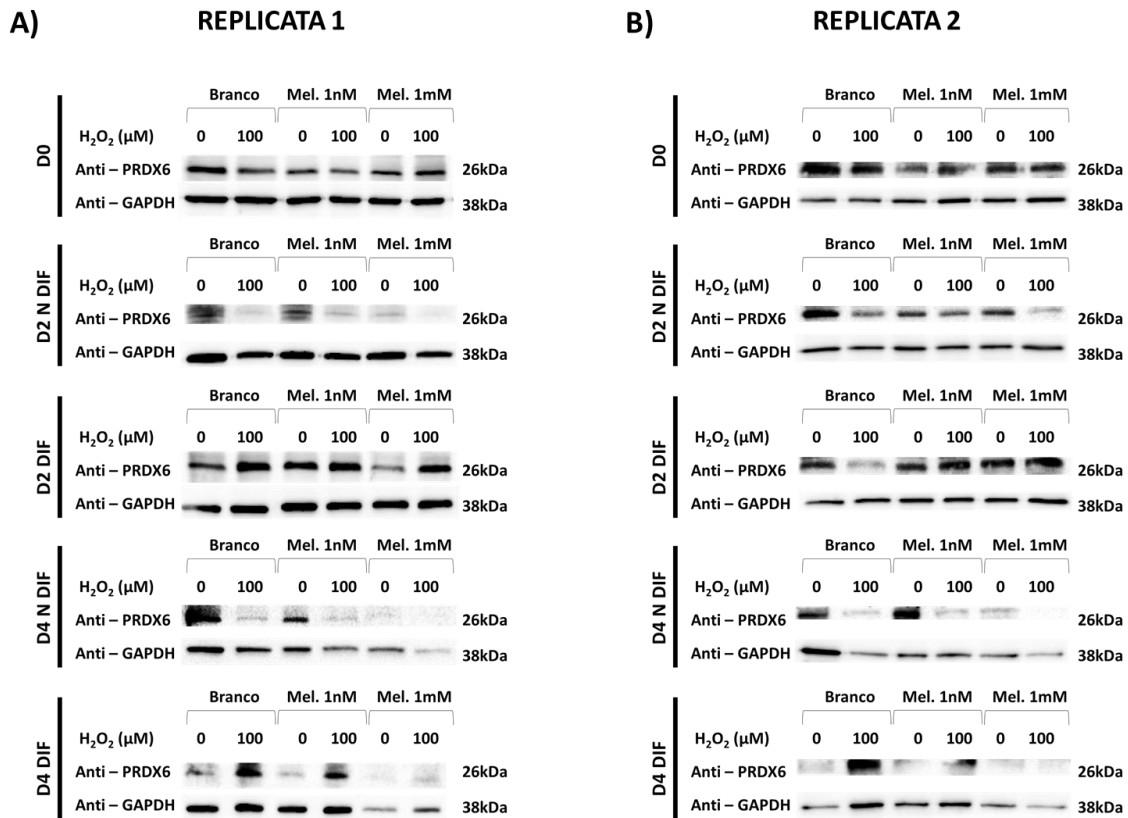


Figura D3 – Análise do conteúdo proteico de PRDX6 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de PRDX6, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. (B) Figura do conteúdo proteico de PRDX6, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

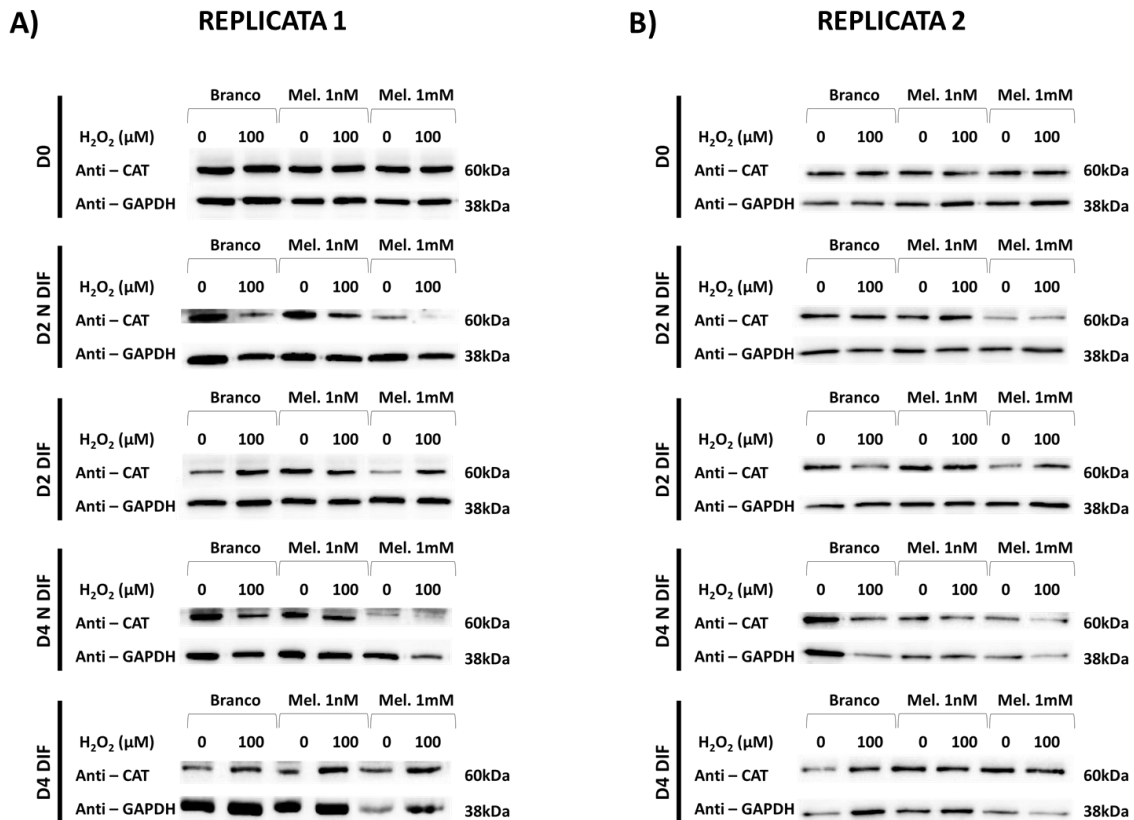


Figura D4 – Análise do conteúdo proteico de CAT realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de CAT, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. (B) Figura do conteúdo proteico de CAT, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

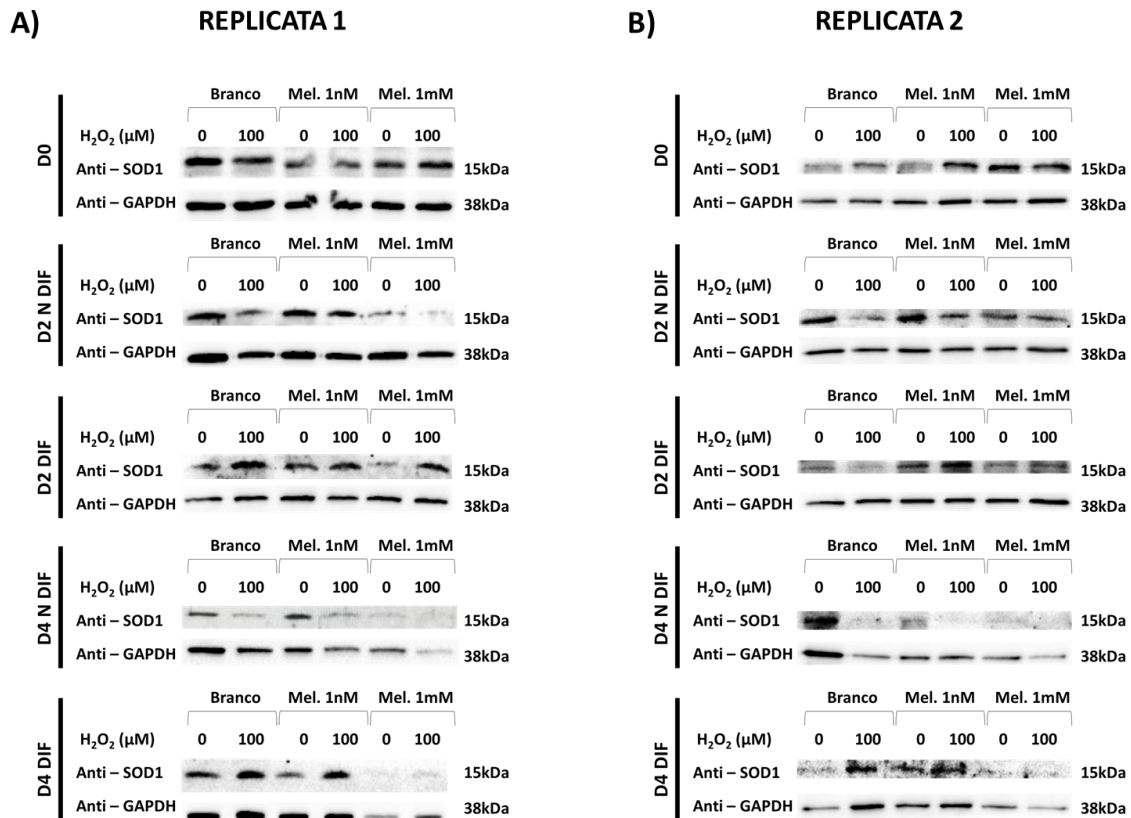


Figura D5 – Análise do conteúdo proteico de SOD1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de SOD1, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. (B) Figura do conteúdo proteico de SOD1, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

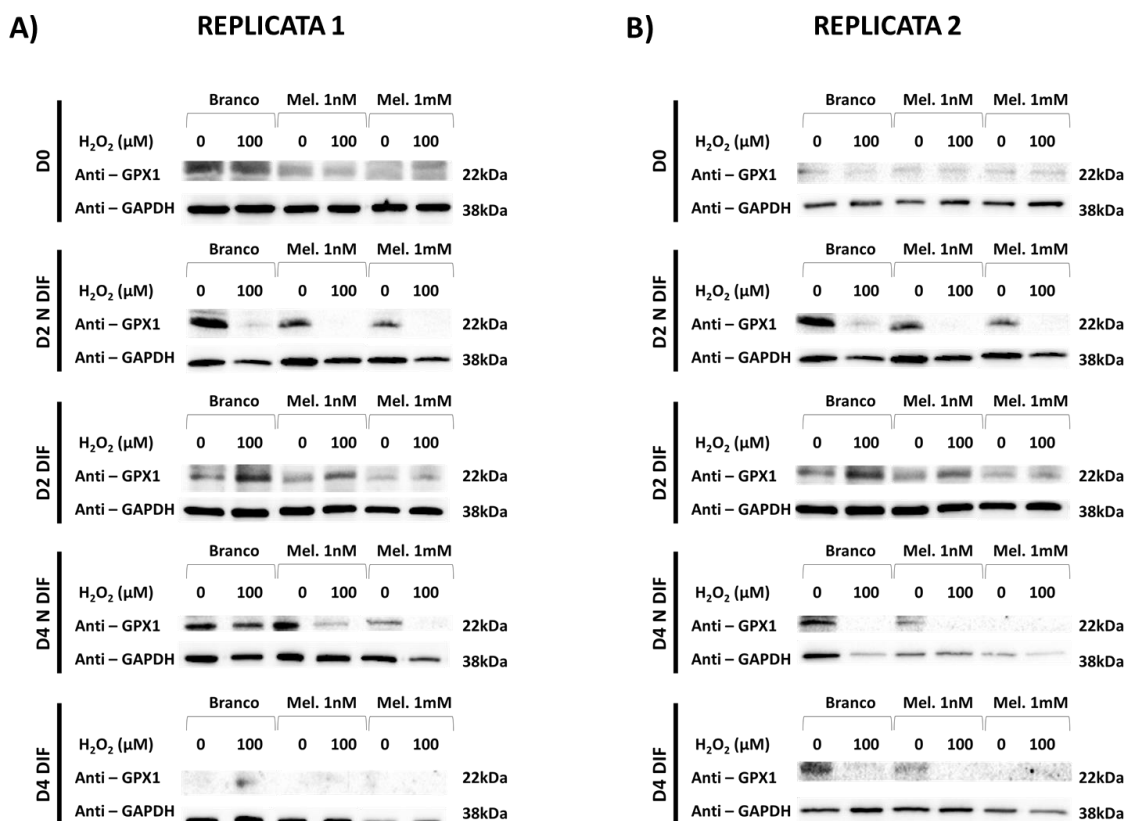


Figura D6 – Análise do conteúdo proteico de GPX1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de GPX1, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. (B) Figura do conteúdo proteico de GPX1, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

Também foi analisado o conteúdo proteico de das proteínas KEAP1 (**Figura D7**) uma proteína responsável pelo controle de NRF2 no citoplasma, bem como a expressão de NRF2 (**Figura D8**) um fator de transcrição responsável pela indução da expressão de importantes enzimas antioxidantes como discutido anteriormente. Adicionalmente foi analisado conteúdo proteico de APEX1/Ref-1 (Apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1) (**Figura D9**) uma proteína multifuncional, relacionada ao reparo do DNA, à regulação transcricional e recentemente tem sido relacionada a inibição da função da proteína NRF2. Dessa forma podemos avaliar o conteúdo proteico do fator de transcrição que estimula a expressão dos antioxidantes acima avaliados e de dois importantes inibidores da atividade de NRF2.

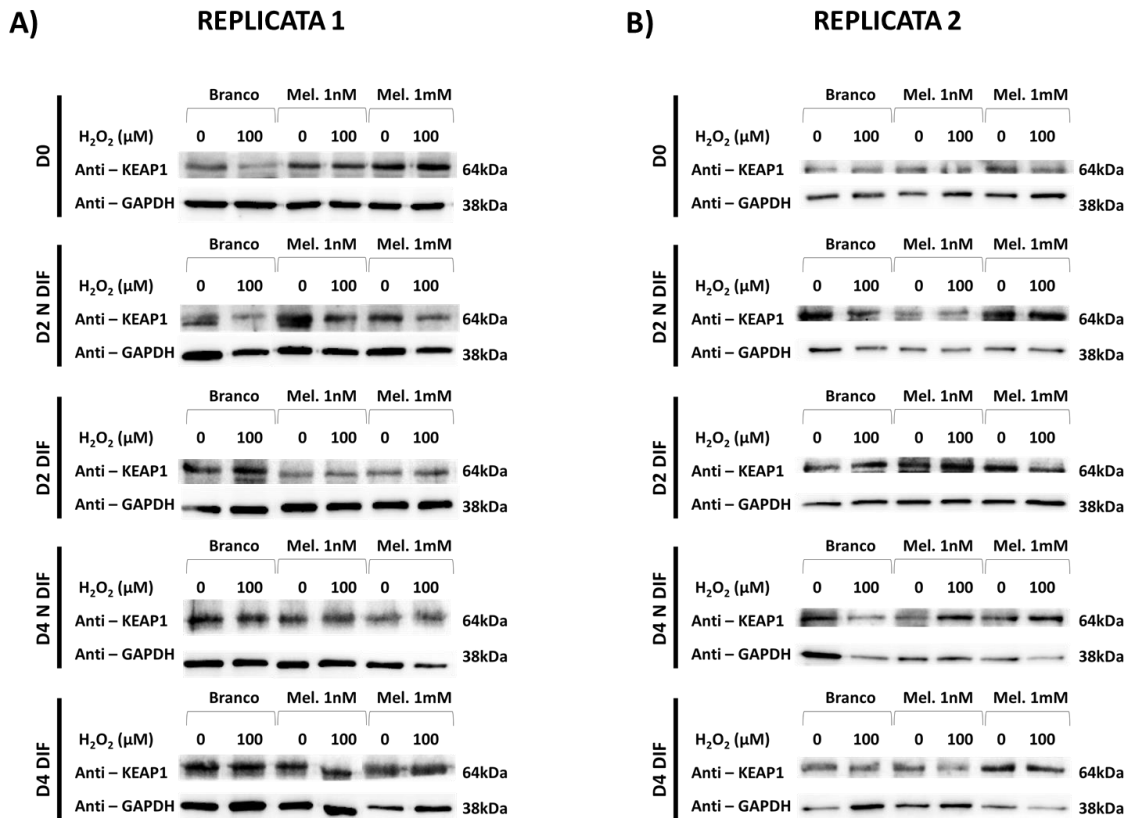


Figura D8 – Análise do conteúdo proteico de KEAP1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de KEAP1, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. (B) Figura do conteúdo proteico de KEAP1, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

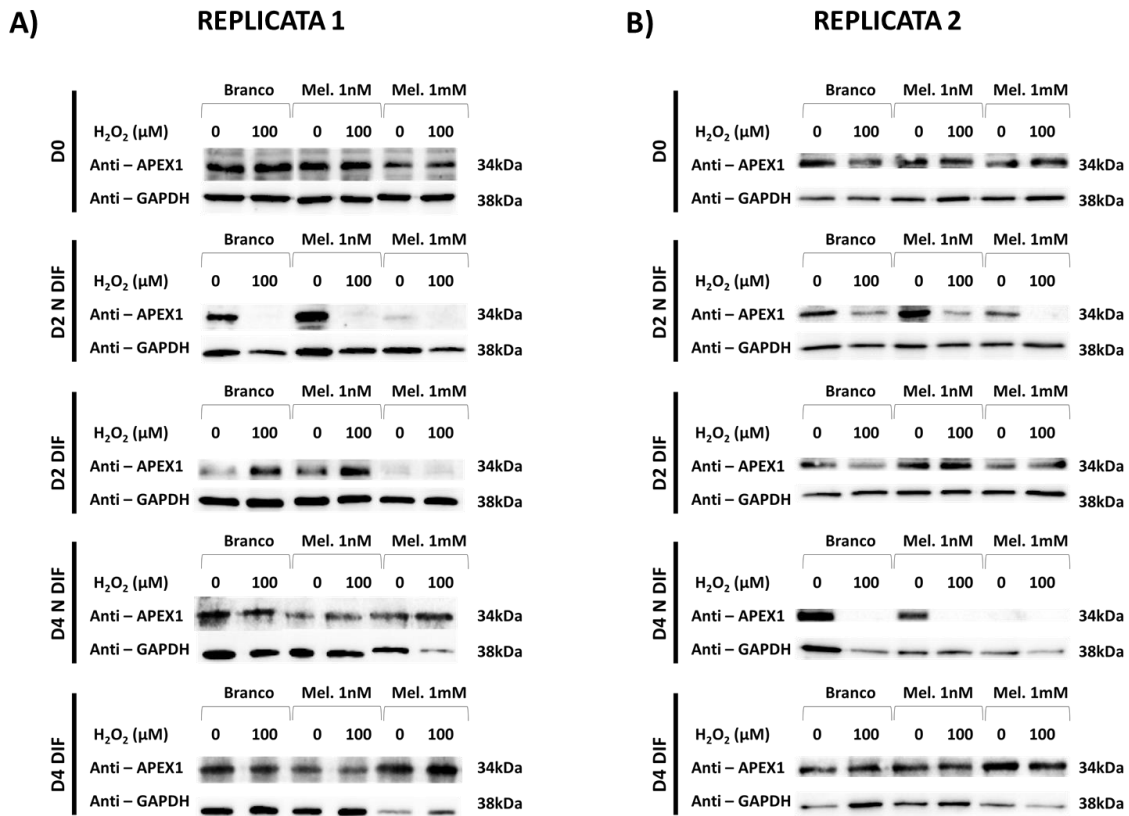


Figura D9 – Análise do conteúdo proteico de APEX1 realizado através de western blotting de duas duplicatas biológicas independentes. As figuras apresentam as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. (A) Figura do conteúdo proteico de APEX1, da replicata 1 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. **(B)** Figura do conteúdo proteico de APEX1, da replicata 2 apresentando as análises dos dias 0, dia 2 e dia 4 de células não diferenciadas e diferenciadas. Foi utilizado a proteína GAPDH como endógeno. Os resultados são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

8.5 – Apêndice E

Detalhes dos gráficos gerados a partir do western blotting

Foram gerados gráficos a partir da avaliação do conteúdo proteico das proteínas envolvidas na via NRF2-ARE realizado por western blotting. As análises foram feitas a partir do programa ImageJ o qual quantifica os pixels de cada imagens de western blotting gerando valores apresentados como Unidades Arbitrárias, sendo que os valores maiores que 1 (>1) representam o aumento de conteúdo proteico e valores menores que 1 (<1) diminuição do conteúdo proteico quando comparadas a amostras do Controle (Não tratado com melatonina e não exposto a H₂O₂) a cada dia do experimento. O gráfico é expresso através de uma média ± SEM das duplicatas biológicas independentes: PRDX1 (**Figura E1**), PRDX2 (**Figura E2**), PRDX6 (**Figura E3**), CAT (**Figura E4**), SOD1 (**Figura E5**), GPX1 (**Figura E6**), NRF2 (**Figura E7**), KEAP1 (**Figura E8**) e APEX1 (**Figura E9**).

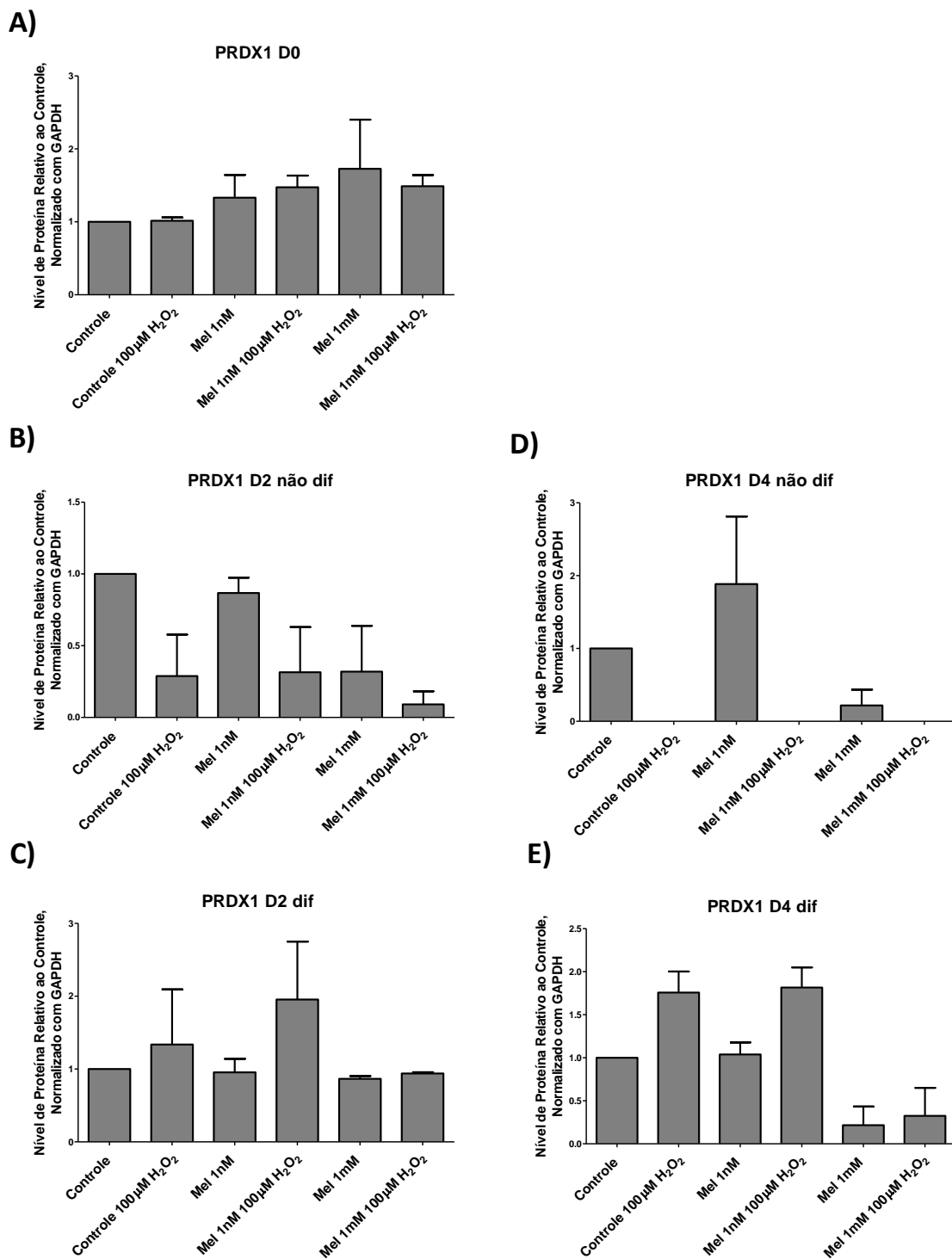


Figura E1 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de PRDX1 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

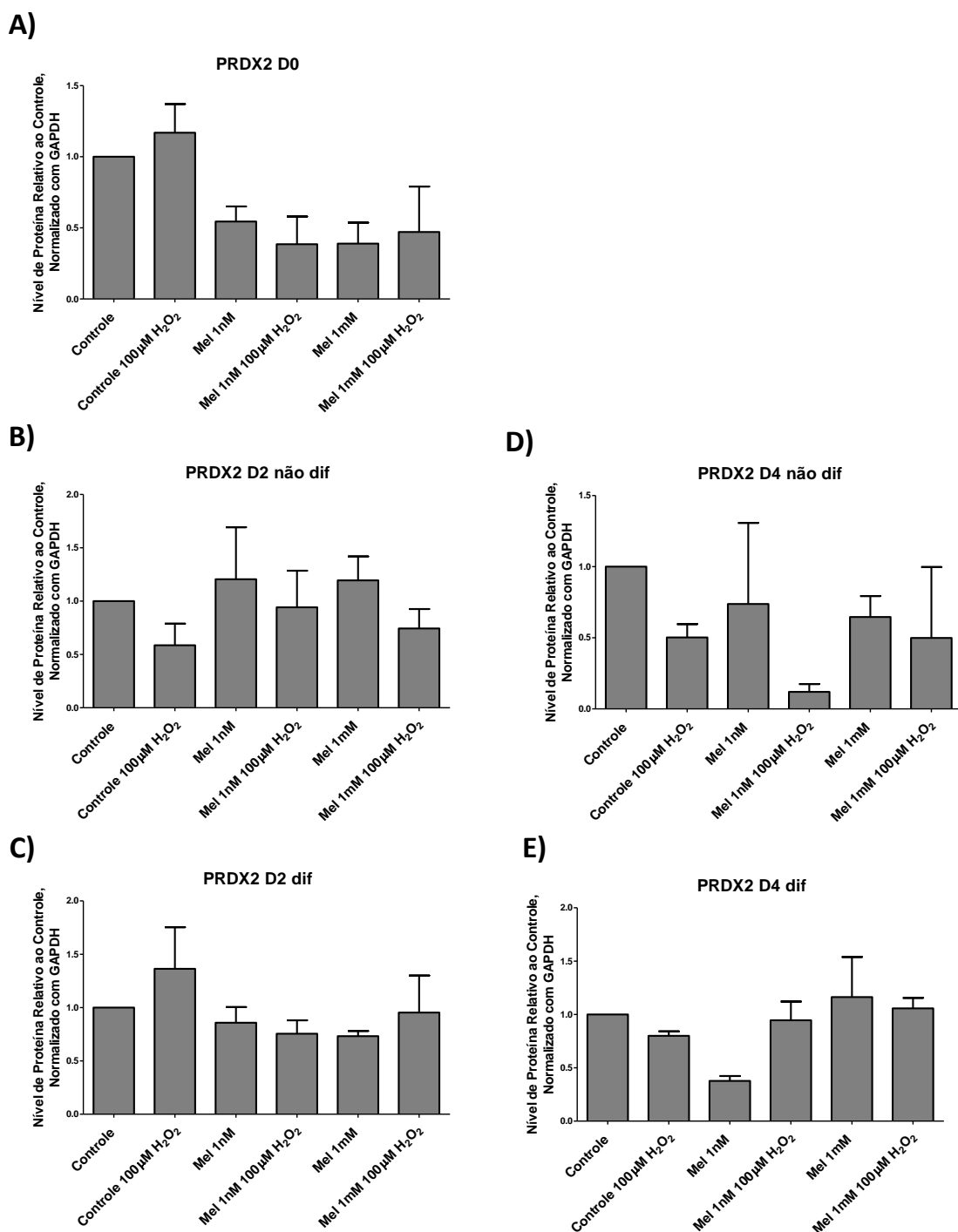


Figura E2 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de PRDX2 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

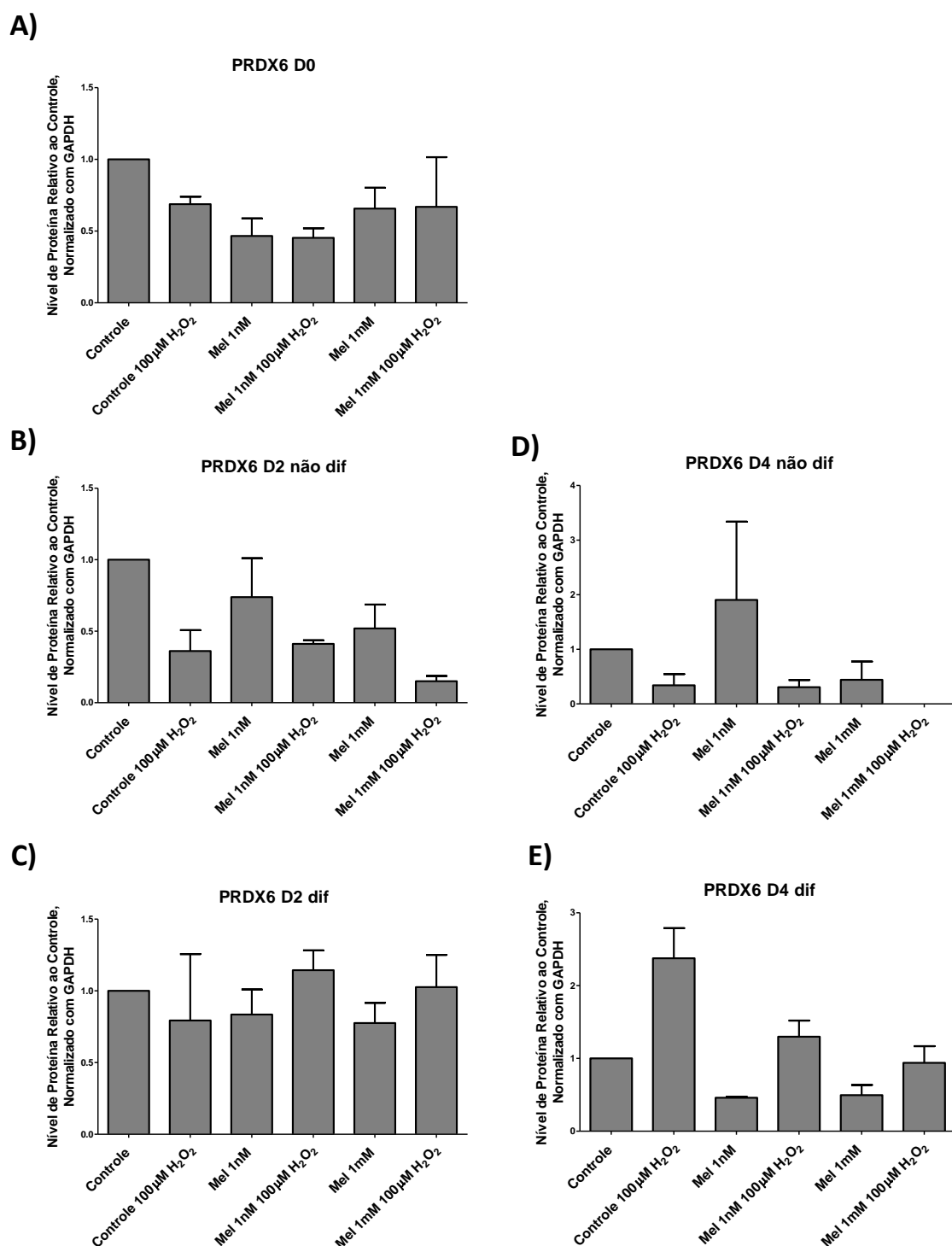


Figura E3 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de PRDX6 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

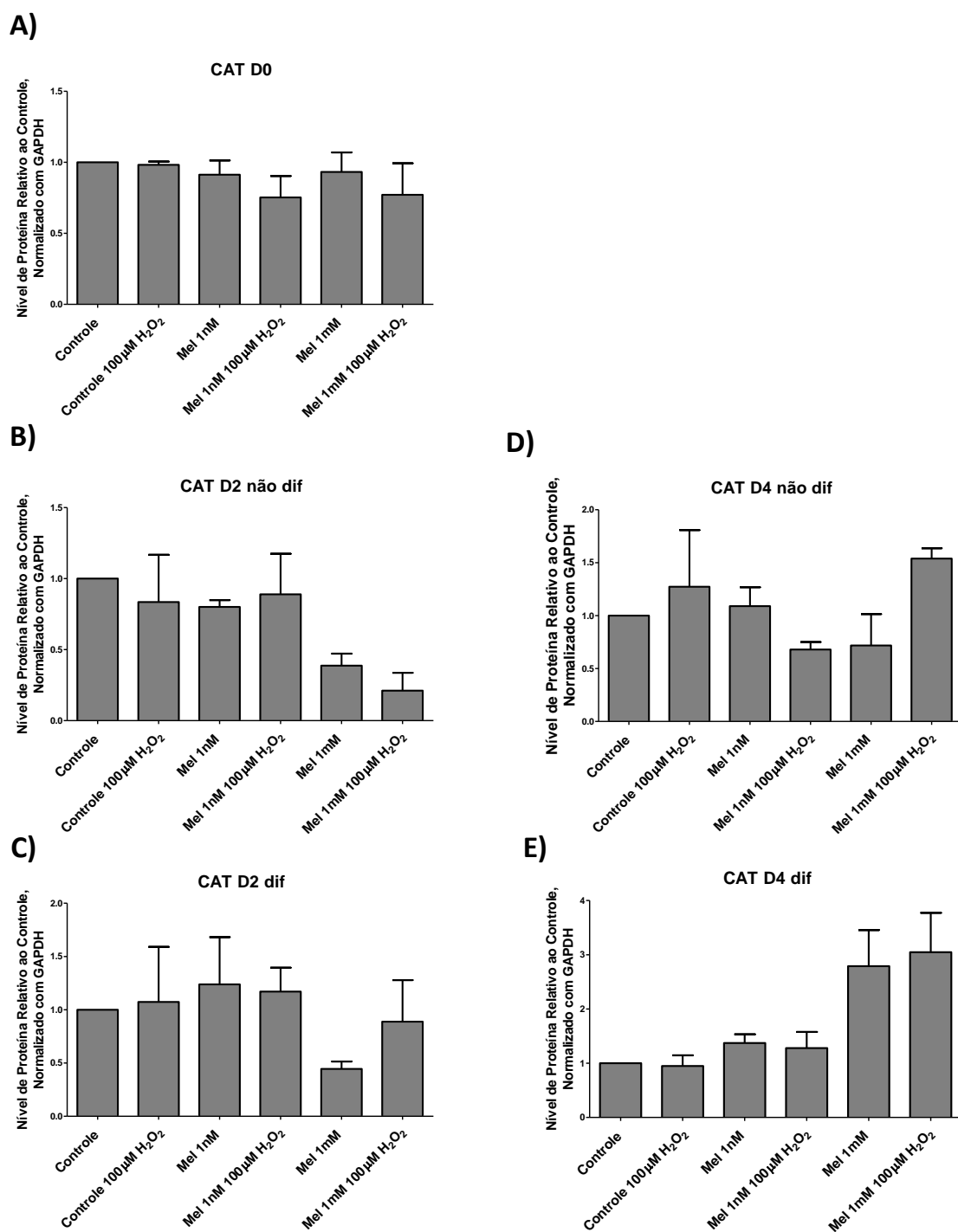


Figura E4 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de CAT de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

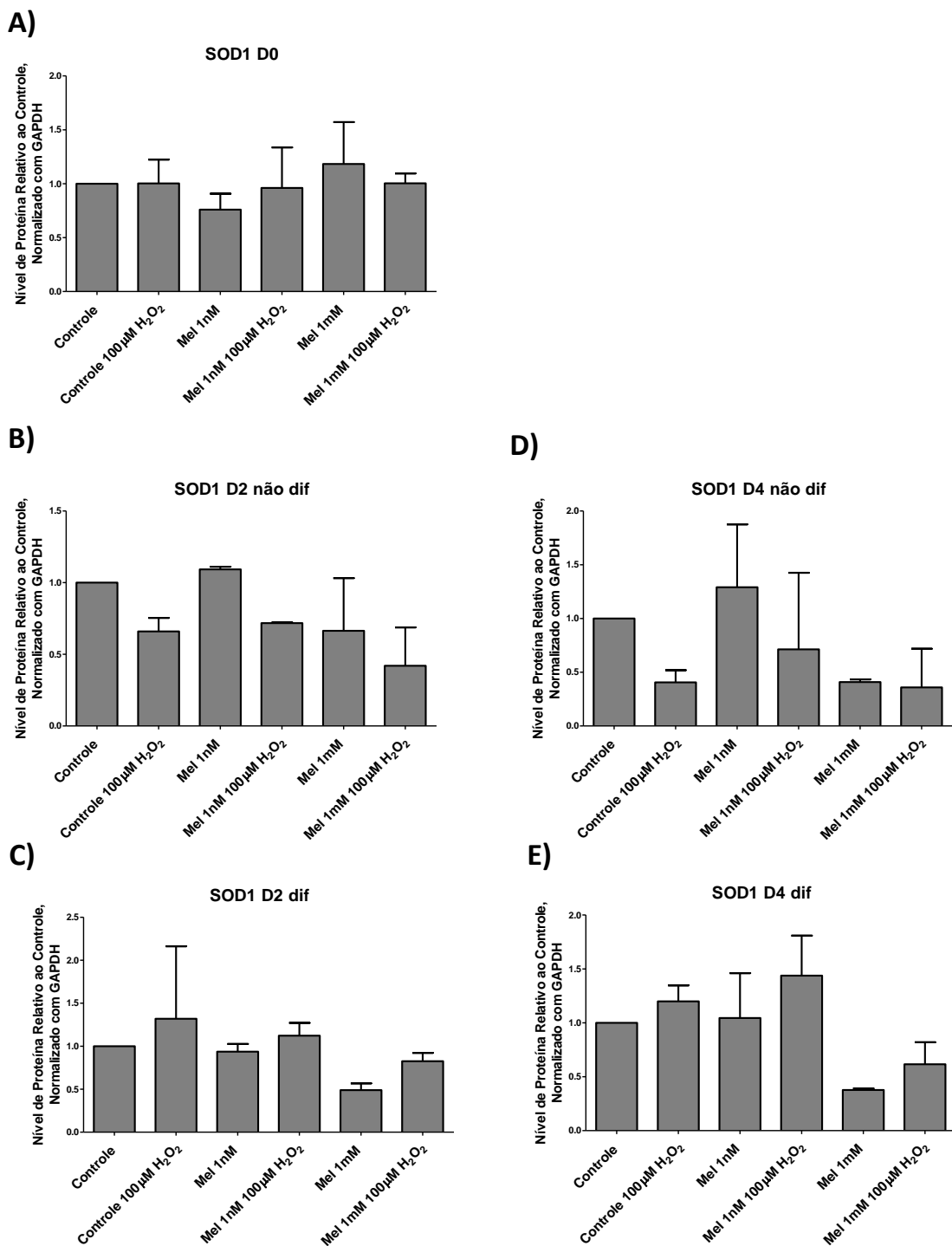


Figura E5 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de SOD1 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

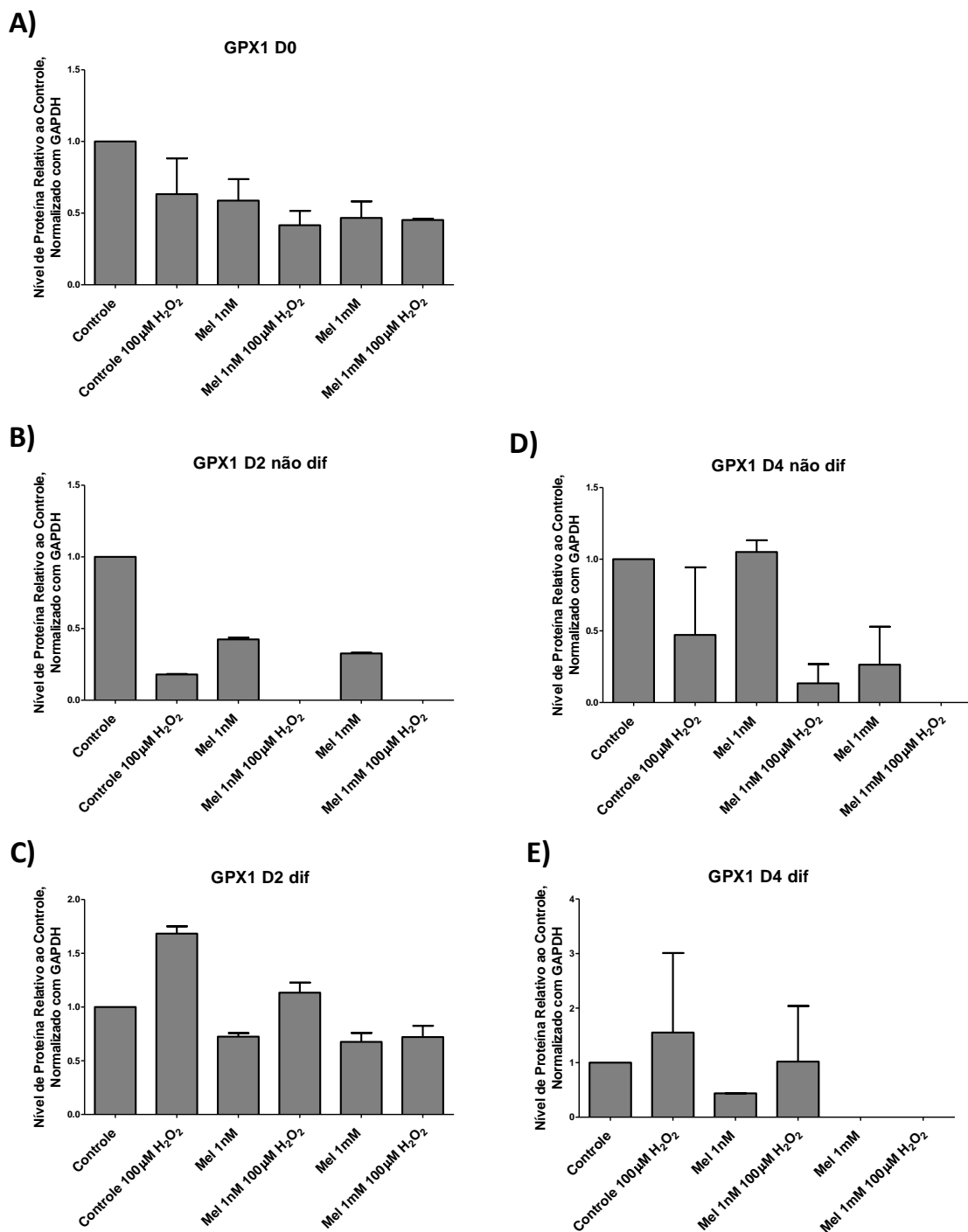


Figura E6 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de GPX1 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

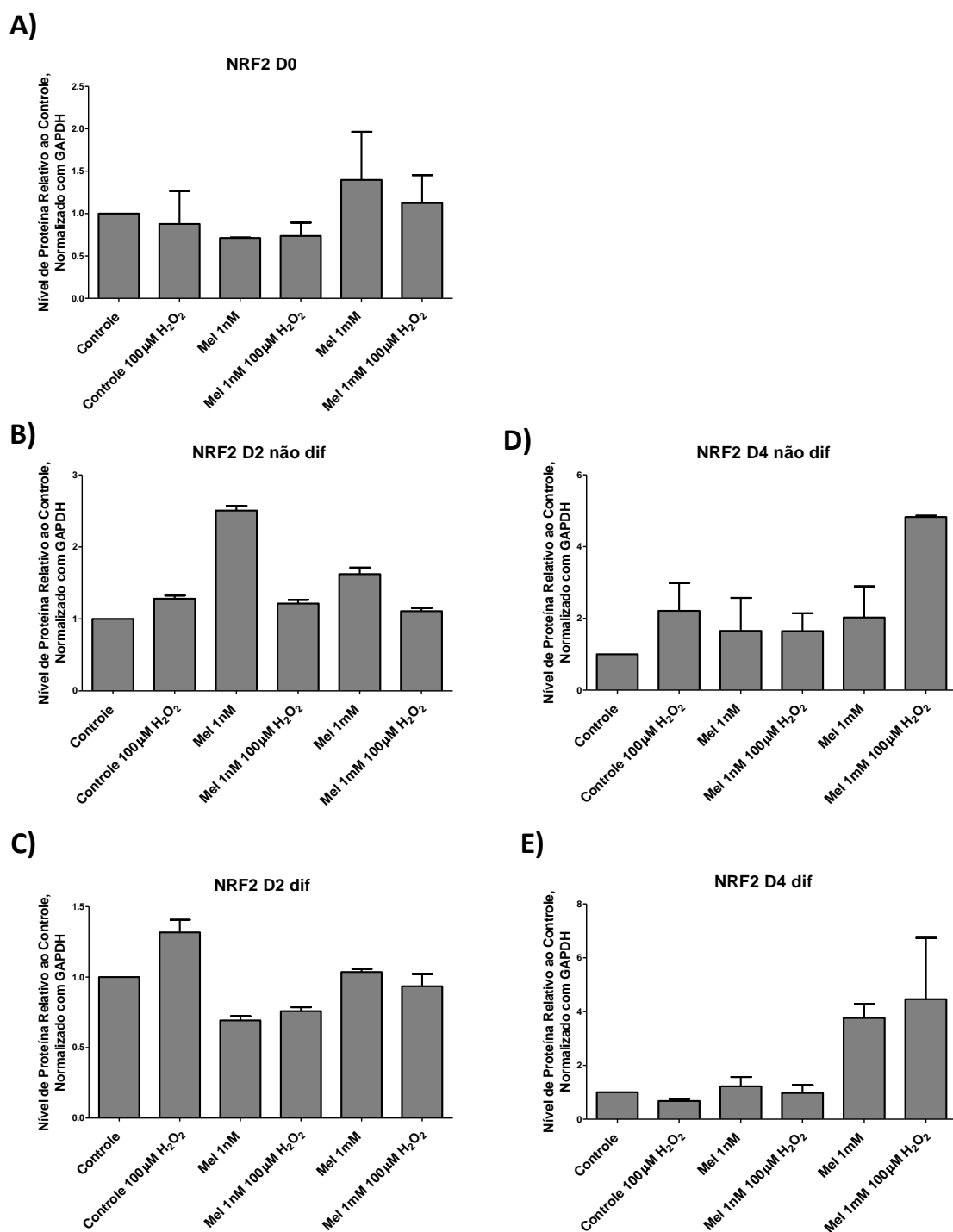


Figura E7 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de NRF2 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

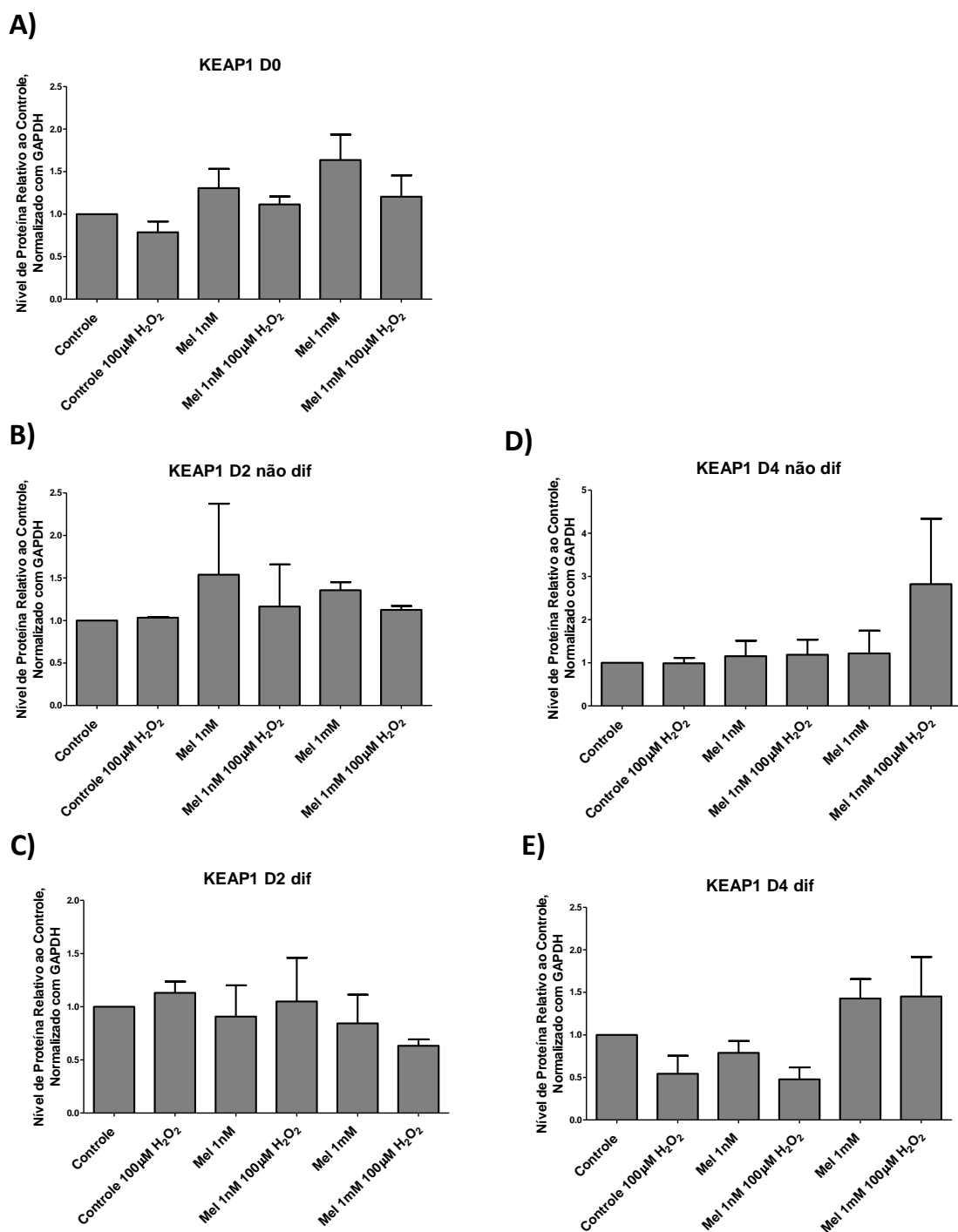


Figura E8 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de KEAP1 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

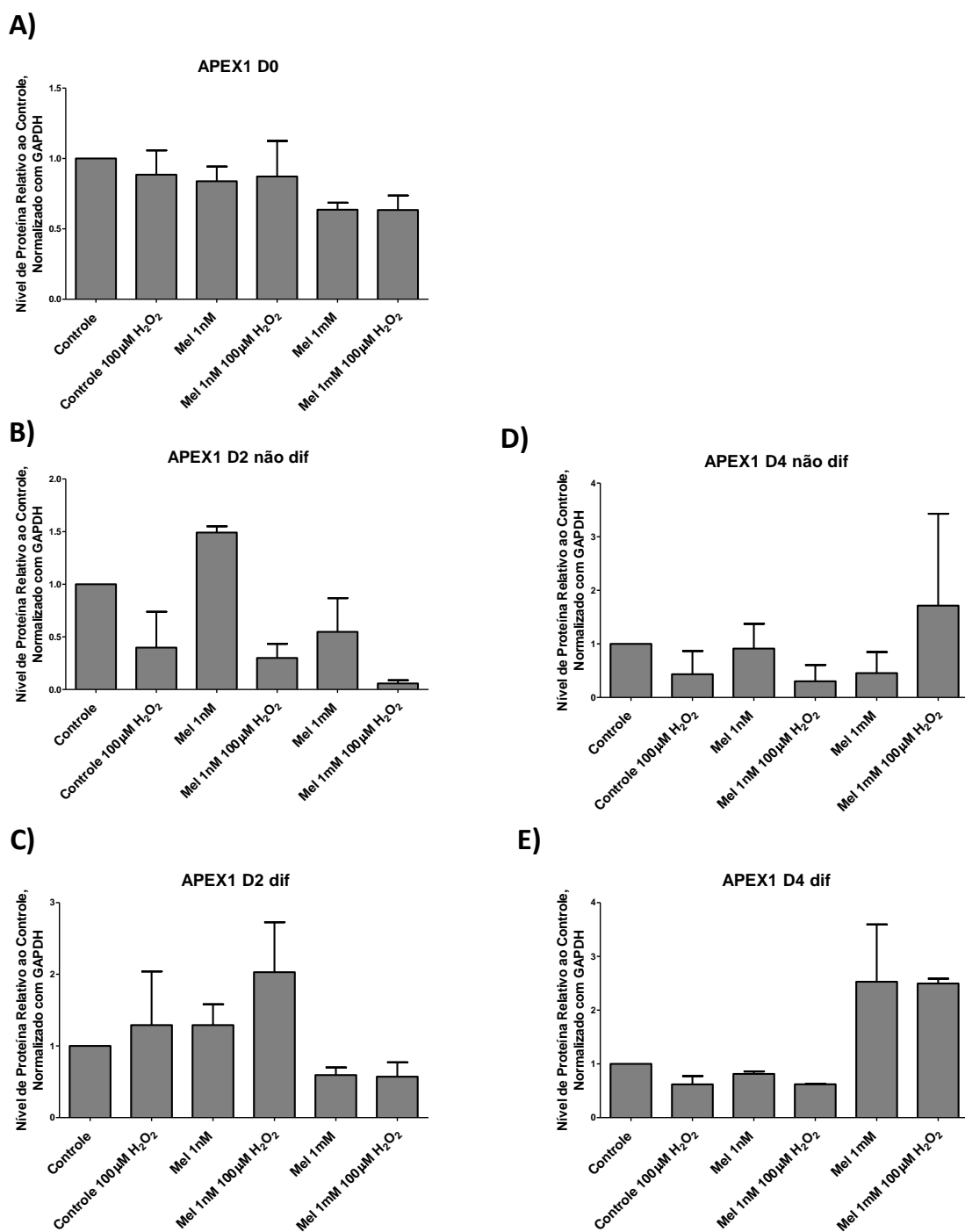


Figura E9 - Gráfico gerado a partir dos dados de western blotting de APEX1 de duplicatas biológicas independentes. As análises realizadas para gerar o gráfico foram feitas a partir do programa ImageJ o qual gera valores apresentados como unidades arbitrárias, onde valores acima de 1 representam aumento da expressão e valores abaixo de 1 representam diminuição da expressão quando comparados à amostra controle (Controle não tratado com H₂O₂). **(A)** Amostras do dia 0; **(B)** Amostras do dia 2 não diferenciadas; **(C)** Amostras do dia 2 diferenciadas; **(D)** Amostras do dia 4 não diferenciadas e **(E)** Amostras do dia 4 diferenciadas. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão (\pm SEM) e são representativos de duas replicatas biológicas independentes.

8.6 – Apêndice F

Artigos em preparação e submetidos e aceitos para publicação

Artigo 1 – Effect of melatonin on oxidative stress protection in erythrocytic cells k562. Artigo em preparação.

Artigo 2 - Peroxiredoxins in hemolytic diseases: Far beyond the antioxidant role. Artigo de Revisão em fase final de preparação.

Peroxiredoxins in hemolytic diseases: Far beyond the antioxidant role

Carla Peres de Paula[§], João Pedro Maia de Oliveira da Silva[#], Karen Simone Romanello[#], Iran Malavazi[#] & Anderson Ferreira da Cunha[#]

[§] Department of Genetics and Evolution, Biotechnology Graduate Program (PPGBiotec), Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brazil.

[#] Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed: peresdepaula@gmail.com and anderf2611@gmail.com

ABSTRACT

The erythrocytes are extremely important cells, since they participate in the transport of oxygen (O₂) to tissues. Changes in the structure or functioning of the erythrocyte can lead to several deficiencies, such as hemolytic anemias, which cause several clinical manifestations that can lead to increased ROS production, worsening the patient's clinical condition. Oxidative stress is an aggravating factor in these diseases. There are important lines of defense that fight the damage caused by oxidizing molecules. Among the antioxidant molecules, the enzyme Peroxiredoxin stands out, because of its high decomposition power of hydrogen peroxide. Due to this, the Peroxiredoxins seem to be one of the main lines of defense in erythrocytes, especially when affected by hemolytic anemias. In addition to this important role, peroxiredoxins have other important roles in anemic erythrocytes. Which will be detailed in this review article.

**Biological and Antitumoral Activity of Polypyridyl Iron(III) Complexes
Containing Long Alkyl Chains**

by

Marcelo Melotti^a, Matheus S. S. Paqui^a, André L. Amorim^b, Carla P. de Paula^c, Marina C. Rocha^c, Iran Malavazi^c, Anderson Cunha^c, Francielli S. Santana^d, Ronny R. Ribeiro^d, Rogério A. Gariani^a, Samuel R. Mendes^a, and Fernando R. Xavier^{a*}

^aDepartamento de Química, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville – SC, Brazil. CEP 89219-710; ^bUniversidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil. CEP 88040-900; ^cDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, Brazil. CEP 13565-905; ^dUniversidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brazil. CEP 81530-900; *Corresponding author: fernando.xavier@udesc.br

Abstract

A polypyridyl ligand functionalized with a long alkyl chain (L^{C10}) was prepared. Reaction of L^{C10} with selected iron salts of different stoichiometries formed two metal complexes: $[Fe(L^{C10})(Cl)_3]$ (**1**) and $[Fe(L^{C10})_2](ClO_4)_3 \cdot 5H_2O$ (**2**), which were fully characterized by a suite of physicochemical methods. The interaction between these two iron complexes and salmon sperm DNA was monitored spectrophotometrically in the UV region and binding constants (K_b) were estimated. Docking studies were performed using the PatchDock[®] server. Both complexes had their biocide activity confirmed against selected microorganisms: Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria, *A. fumigatus* and *S. cerevisiae* with expressive values of MBC and IC_{50} . Finally, the

Artigo 4 - Digestion of Intact Gluten Proteins by Bifidobacterium Species: Reduction of Cytotoxicity and Proinflammatory Responses. Publicado na revista *Agricultural and food chemistry*.

vn * | ACSJCA | JCA11.2.5208/W Library-x64 | manuscript.3f (RS.0.3:5004 | 2.1) 2020/02/05 13:43:00 | PROD-WS-118 | rq_1613055 | 3/27/2020 14:24:58 | 18 | JCA-DEFAULT

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

pubs.acs.org/JAFC

Article

**1 Digestion of Intact Gluten Proteins by *Bifidobacterium* Species:
2 Reduction of Cytotoxicity and Proinflammatory Responses**

3 Natália Ellen Castilho de Almeida,* Franciele Grego Esteves, José Roberto Aparecido dos Santos-Pinto,
4 Carla Peres de Paula, Anderson Ferreira da Cunha, Iran Malavazi, Mario Sergio Palma,
5 and Edson Rodrigues-Filho*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01421>



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

6 **ABSTRACT:** Celiac disease (CD) is a chronic illness characterized by an inflammatory process triggered by gluten protein intake.
7 Recent evidence has suggested that the lower relative abundance of bifidobacteria in the intestinal lumen may be associated with CD.
8 Herein, we assessed the effect of the *Bifidobacterium* species *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*,
9 *Bifidobacterium animalis* alone, and also a *Bifidobacterium* consortium on the digestion of intact gluten proteins (gliadins and
10 glutenins) and the associated immunomodulatory responses elicited by the resulting peptides. The cytotoxicity and proinflammatory
11 responses were evaluated through the activation of NF- κ B p65 and the expression of cytokines TNF- α and IL-1 β in Caco-2 cell
12 cultures exposed to gluten-derived peptides. The peptides induced a clear reduction in cytotoxic responses and proinflammatory
13 marker levels compared to the gluten fragments generated during noninoculated gastrointestinal digestion. These results highlight
14 the possible use of probiotics based on bifidobacteria as a prospective treatment for CD.

15 **KEYWORDS:** *bifidobacteria, gluten proteins, gluten-derived peptides, toxicity, immunomodulatory response, celiac disease*

Artigo 5 - Expression patterns of peroxiredoxin genes in bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. Submetido para publicação na revista *Science of the Total Environment*.

Expression patterns of peroxiredoxin genes in bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles

Robson Seriani¹, Carla Peres de Paula², Anderson Ferreira da Cunha², Marcos Antonio de Oliveira³, Paloma Gava Krempel⁴, Daniela Perroni Frias¹, Monique Matsuda⁴, Elnara Marcia Negri¹, Paulo Hilário Nascimento Saldiva¹, Thais Mauad¹ and Mariangela Macchione¹

1- Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM05), Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil – FMUSP - Av. Dr. Arnaldo 455, 1º andar, sala 1150, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP:01246-903, Brazil. Tel.: +55 11 30618520

2- Genetic and Evolution Department – Federal University of São Carlos – UFSCar - Av. Washington Luiz Km 235 – Monjolinho - 13565-905 - Sao Carlos, SP - Brasil

3- Biosciences Institute - Coastal Campus – São Paulo State University - Structural and Functional Molecular Biology – UNESP - Praça Infante Dom Henrique s/nº Bairro: Parque Bitaru – CEP 11330-900 - São Vicente.

4- Laboratory for Investigations in Ophthalmology (LIM-33), University of São Paulo Medical School São Paulo, Brazil – FMUSP - Dr. Arnaldo 455, 5º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP:01246-903, Brazil.

Artigo 6 - SFM1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is involved in ribosomal RNA biogenesis.
Submetido para a revista *Brazilian Journal of Microbiology*.

***SFM1* gene from *Saccharomyces cerevisiae* is involved in
ribosomal RNA homeostasis**

Paula Aryane Huang^{1#}; Carla Peres de Paula ^{2#}; Samarina Rodrigues Wlodarczyk¹;
Anderson Ferreira Cunha ²; Gisele Monteiro ^{*1}

Funding Source: this work was supported by São Paulo Research Foundation - FAPESP
(Grants 2009/01303-1; 2015/07749-2, 2013/24024-6, 2012/50064-2) and National
Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

¹ Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo – SP, 05434-070, Brazil

² Department of Genetic and Evolution, Center of Biological Sciences and Health,
Federal University of São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP, 13565-205, Brazil

* Corresponding author: smgisele@usp.br. Address: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B16,
Cidade Universitária - 05508-000, São Paulo/SP, Brazil. Phone: 55-11-3091-3862 -
Fax: 55-11-3815-6386.

These authors contributed equally to this work.

Artigo 7 - Glutaredoxin-like protein (GLP) - a Novel Bacteria Sulfurtransferase that Protects Cells Against Cyanide and Oxidative Stresses. Publicado na revista *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Applied Microbiology and Biotechnology
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10491-5>

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY



Glutaredoxin-like protein (GLP)—a novel bacteria sulfurtransferase that protects cells against cyanide and oxidative stresses

Carla Peres de Paula¹ · Melina Cardoso dos Santos¹ · Carlos A. Tairum¹ · Carlos Alexandre Breyer¹ ·
Guilherme Toledo-Silva² · Marcos Hikari Toyama³ · Gustavo Maruyama Mori⁴ · Marcos Antonio de Oliveira¹

Received: 27 October 2019 / Revised: 14 February 2020 / Accepted: 20 February 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The pathogen *Xylella fastidiosa* belongs to the *Xanthomonadaceae* family, a large group of Gram-negative bacteria that cause diseases in many economically important crops. A predicted gene, annotated as glutaredoxin-like protein (*glp*), was found to be highly conserved among the genomes of different genera within this family and highly expressed in *X. fastidiosa*. Analysis of the GLP protein sequences revealed three protein domains: one similar to monothiol glutaredoxins (Grx), an Fe-S cluster and a thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese domain (Tst/Rho), which is generally involved in sulfur metabolism and cyanide detoxification. To characterize the biochemical properties of GLP, we expressed and purified the *X. fastidiosa* recombinant GLP enzyme. Grx activity and Fe-S cluster formation were not observed, while an evaluation of Tst/Rho enzymatic activity revealed that GLP can detoxify cyanide and transfer inorganic sulfur to acceptor molecules in vitro. The biological activity of GLP relies on the cysteine residues in the Grx and Tst/Rho domains (Cys³³ and Cys²⁶⁶, respectively), and structural analysis showed that GLP and GLP^{C266S} were able to form high molecular weight oligomers (> 600 kDa), while replacement of Cys³³ with Ser destabilized the quaternary structure. In vivo heterologous enzyme expression experiments in *Escherichia coli* revealed that GLP can protect bacteria against high concentrations of cyanide and hydrogen peroxide. Finally, phylogenetic analysis showed that homologous *glp* genes are distributed across Gram-negative bacterial families with conservation of the N- to C-domain order. However, no eukaryotic organism contains this enzyme. Altogether, these results suggest that GLP is an important enzyme with cyanide-decomposing and sulfurtransferase functions in bacteria, whose presence in eukaryotes we could not observe, representing a promising biological target for new pharmaceuticals.

Keywords Glutaredoxin (Grx) · Reactive oxygen species (ROS) · Glutaredoxin-like protein (GLP) · Thiosulfate sulfurtransferase/Rhodanese (Tst/Rho) · *Xylella fastidiosa*

Carla Peres de Paula and Melina Cardoso dos Santos contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10491-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marcos Antonio de Oliveira
mao@clp.unesp.br

¹ Laboratory of Structural Molecular Biology, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil

² Laboratory of Biomarkers of Aquatic Contamination and Immunochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³ Laboratory of Functional and Structural Characterization of Toxins of Venomous and Poisonous Animals, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil

⁴ Molecular Ecology Laboratory, Biosciences Institute, UNESP - São Paulo State University, São Vicente, SP, Brazil