

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2020.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Nayara Alves Chaves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos

Nayara Alves Chaves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de Genética Humana junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Orientador: Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP
2019

C512i

Chaves, Nayara Alves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos / Nayara Alves Chaves. -- São José do Rio Preto, 2019
99 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientadora: Claudia Regina Bonini Domingos

1. Bioquímica. 2. Genética humana. 3. Anemia falciforme. 4. Antioxidantes. 5. Bioenergética. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(s).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nayara Alves Chaves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de Genética Humana junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

BANCA EXAMINADORA

Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – IBILCE

Profa. Dra. Rejane Maira Góes
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – IBILCE

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São José do Rio Preto, 22 de fevereiro de 2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia (LHGDH), no Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental (LQBOA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto e no Instituto de Química e Biociências da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ricardo e Magda, por serem o meu ponto de referência, terem me orientado e apoiado em todas as decisões. Às minhas irmãs, Hellen e Carol, por serem as pessoas mais incríveis que eu conheço.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo fortalecimento e a oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pela confiança, dedicação e paciência durante todos esses anos. Obrigada por ter me acolhido desde a iniciação científica e por todas as oportunidades que me proporcionou. Sou grata pelo conhecimento compartilhado e pelas responsabilidades que colocou a minha frente.*

*Ao meu orientador, **Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva**, por acreditar em mim, me incentivar e ser um dos meus maiores exemplos de pesquisador. Obrigada pela paciência, pela persistência e por me ensinar sobre dedicação, honestidade e disciplina na ciência.*

*Ao Prof. Dr. **Marcelo de Freitas Lima**, por permitir a minha presença em seu laboratório durante as análises. Sou grata também a todos os outros colaboradores, **Dra. Sayuri Miyamoto, Dr. Luis Eduardo Soares Netto e Me. Thiago Geronimo Pires Alegria**, que juntamente com o Danilo possibilitaram a realização desse trabalho.*

*À **Jéssika Okumura, Lidiane Torres e Patrícia Nascimento** que me receberam e desenvolveram os meus conhecimentos básicos sobre pesquisa, responsabilidade e disciplina. Tenho um carinho particular por cada uma de vocês.*

*Aos que passaram pelo **LHGDH** e contribuíram de alguma forma para que a rotina ficasse mais leve e prazerosa. Vocês estarão sempre presentes nas minhas lembranças. **Édis Belini, Gisele Carrocini, Jéssika Okumura, Larissa Venâncio, Luis Felipe, Mariana Salvarani, Nathalia Rossigalli, Patrícia Nascimento e Renan Garcia.***

*Às meninas da salinha, **Camila Zucchini, Gabi Martins, Letícia Orlandini, Letícia Sybuia e Jéssika Okumura**, pela amizade e pelos momentos compartilhados. Sou grata a Deus por nossos caminhos terem se cruzado.*

*Aos mais novos no **LHGDH** que, apesar do pouco tempo de convívio, são extremamente importantes. Sou grata pelas colaborações no laboratório e pelos momentos compartilhados. **Ana Clara Albertin, Caroline Mocchi, Gabriela Castro, Flaviene Torres, Fernando Cornacini, Mariana Ishizava, Larissa Dias, Lucas Ramos, Pedro Arantes, Raphael Souza e Victoria Simões***

*Aos meus pais, **Ricardo e Magda** por comprarem os meus sonhos, acreditarem em mim e me encorajarem.*

*As minhas irmãs, **Hellen e Carol**, simplesmente por se importarem com minhas dores e por compartilharem as melhores risadas.*

*A meu namorado, **Dante**, por ser meu braço direito e meu melhor companheiro. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e por torcer pelo meu sucesso.*

*As minhas amigas da graduação **Amanda Ravazzi, Camila Viol, Lucélia e Thainá Canalli**, pelos anos de amizade, dedicação e companheirismo.*

A todos os professores e amigos da graduação e pós-graduação, pelo convívio e aprendizado.

*À **Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP)** pelo auxílio à pesquisa (118/2017).*

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

Hoje eu estou certo de que nós somos os senhores do nosso destino; de que a tarefa que foi colocada diante de nós não está acima das nossas forças; de que as dores e provações não estão acima da nossa resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada. ”
Winston Churchill

RESUMO

Os eritrócitos humanos são células únicas, altamente abundantes e uma das mais especializadas no organismo humano. A principal função dessas células consiste no transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões aos tecidos e o transporte de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões por meio da molécula de hemoglobina (Hb). Apesar de relativamente estável, essa proteína pode se auto oxidar em metahemoglobina (MetHb) e gerar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é um importante gatilho do processo oxidativo. Além de fontes endógenas, os eritrócitos são expostos a uma série de estressores ao longo da circulação. Apesar disso, a fim de prevenir ou atenuar o estresse oxidativo gerado, essas células são equipadas com um sistema antioxidante eficaz e autossustentável, intimamente relacionado com as vias da glicólise, das pentoses fosfato, da metahemoglobina redutase (MetHb redutase) e dos nucleotídeos, as quais contribuem para a manutenção do balanço redox e energético nos eritrócitos. Entretanto, algumas condições podem sobrecarregar esse mecanismo de defesa citado, como a anemia falciforme (AF). Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar biomarcadores do metabolismo redox, glicolítico, via das pentoses fosfato, via da metHb redutase e metabolismo de nucleotídeos, a fim de melhor compreender como as células falciformes lidam com a ruptura da homeostase metabólica, buscando marcadores de lesão oxidativa mais específicos para AF e novos e promissores antioxidantes para futuras investigações como terapia alternativa. Para isso, rigorosos critérios de exclusão foram adotados para obtenção dos grupos estudados, os quais foram compostos por 10 indivíduos sem hemoglobinopatias e 10 pacientes com AF. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram processadas para separação do plasma e preparação dos hemolisados específicos. Posteriormente, foram avaliados biomarcadores bioquímicos por métodos espectrofotométricos, cromatográficos e por imunomarcação. Diante disso, foi confirmado que os eritrócitos falciformes sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante, levando a uma capacidade antioxidante deficiente que contribuiu significativamente para a hemólise. Dentre os antioxidantes avaliados, destaca-se a ergotioneína que apresentou redução de 2 vezes na AF, e correlações com os marcadores do metabolismo dos eritrócitos, configurando uma promissora alternativa terapêutica antioxidante para o tratamento da AF. Foi avaliado um marcador específico de oxidação de colesterol (ChAld) e, que também é um importante mediador de respostas inflamatórias, o qual apresentou níveis pelo menos duas vezes maiores nos pacientes. Finalmente, foi observado que as células falciformes parecem escapar ou de alguma forma alterar o mecanismo de deslocamento entre a glicólise e a via das pentoses fosfato bem descrita para eritrócitos saudáveis, mantendo ambas as vias reguladas positivamente.

Palavras-chave: metabolismo eritrocitário, hemoglobina S, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Red blood cells (RBCs) are unique, highly specialized and the most abundant cells in the human organism. Their primary function is transportation of the respiratory gases, oxygen (O₂) and carbon dioxide (CO₂) between lungs and tissues through the hemoglobin (Hb). Although relatively stable, this protein can auto oxidize in methahemoglobin (MetHb) and generate the superoxide radical (O₂ • -), which is an important trigger of the oxidative process. In addition to endogenous sources, erythrocytes are exposed to a number of stressors along the circulation. Despite this, in order to prevent or attenuate the oxidative stress generated, these cells are equipped with an effective and self-sustaining antioxidant system, closely related to the glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP), metHb reductase pathway and nucleotide metabolism, which contribute to the maintenance of redox and energetic balance in erythrocytes. However, some conditions may overload this defense mechanism, such as sickle cell anemia (SCA). Thus, this study aimed to evaluate biomarkers of redox metabolism, glycolysis, PPP, metHb reductase pathway and nucleotide metabolism, in order to better understand how sickle cells deal with the rupture of metabolic homeostasis, seeking lesion markers more specific for SCA and promising antioxidants, for investigations as alternative therapy. For this, were adopted strict exclusion criteria to obtain the studied groups, which were composed of 10 individuals without hemoglobinopathies and 10 patients with SCA. Immediately after collection, the blood samples were processed for plasma separation and preparation of the specific hemolysates. Subsequently, biochemical biomarkers were evaluated by spectrophotometric, chromatographic and immunolabeling methods. In view of this, it was confirmed that sickle cells overloads the antioxidant defense system, leading to a deficient antioxidant capacity that contributed significantly to the hemolysis. Among the antioxidants evaluated, ergotionein showed a reduction of 2-fold in SCA, and correlations with markers of erythrocyte metabolism, forming a promising alternative antioxidant therapy for the treatment of SCA. A specific cholesterol oxidation marker (ChAld) was evaluated, which is also an important mediator of inflammatory responses, which presented at least two-fold higher levels in the patients. Finally, it has been observed that sickle cells appear to escape or otherwise alter the mechanism of displacement between glycolysis and the well described phosphate pentoses pathway for healthy erythrocytes, keeping both pathways up-regulated.

Keywords: erythrocyte metabolism, hemoglobin S, antioxidant capacity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoiese.....	21
Figura 2. Representação da estrutura de uma molécula de Hb adulta.....	22
Figura 3. Efluxo de ON das membranas eritrocitária.....	23
Figura 4. Oxidação do colesterol.....	24
Figura 5. Eventos oxidativos intracelulares e mecanismos de proteção.....	29
Figura 6. Estimava de nascimentos de indivíduos com AF.....	31
Figura 7. Complicações clínicas na AF.....	32
Figura 8. Alterações genéticas na Hb.....	34
Figura 9. Polímero da Hb S e deformação na membrana	34
Figura 10. Mecanismo de isquemia/reperfusão e nucleotídeos.....	39
Figura 11. Fluxograma das metodologias empregadas.....	51
Figura 12. Separação metabólica de eritrócitos falciformes e normais.....	54
Figura 13. Resistência osmótica, marcadores de hemólise e enzima de membrana eritrocitária alterada em AF.....	55
Figura 14. Marcadores de estresse oxidativo plasmáticos.....	56
Figura 15. Padrão de consumo de antioxidantes em células falciformes.....	57
Figura 16. Prx2 reduzida e oxidada em pacientes com AF.....	58
Figura 17. Padrão aumentado de marcadores metabólicos em pacientes com AF.....	59
Figura 18. Níveis de nucleotídeos e metabólitos de adenina.....	60
Figura 19. Relações entre os nucleotídeos da adenina.....	61
Figura 20. Efeitos da proteção antioxidante contra hemólise.....	62
Figura 21. Efeitos da proteção antioxidante contra o produto de oxidação.....	63
Figura 22. Interdependência do metabolismo dos eritrócitos.....	64
Figura 23. Interdependência de antioxidantes e metabólito de nucleotídeos.....	64
Figura 24. Interdependência do ChAld, metabolismo dos eritrócitos e marcador de hemólise.....	65
Figura 25. Conclusões sintetizadas.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do grupo de estudo (AF)	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
AEC	Carga energética de adenina
AF	Anemia Falciforme
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Ch	Colesterol
ChAld	3 β -hidroxi-5 β -hidroxi-B-norcholestano-6 β -carboxaldeído
CSec	Hidroxi-5-oxo-5,6-secocolestan-6-al
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzoico)
desoxiHb	Hb desoxigenada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERT	Ergotioneína
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GLM	<i>General Linear Models</i> (Teste estatístico)
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GST	Glutaciona-S-transferase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfodesidrogenase
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina adulta ou Hemoglobina A
<i>HBB</i>	Gene da beta globina

Hb Ferril	HbFe(IV)=O
Hb S	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-ECD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico
HU	Hidroxiureia
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta (proteína)
IL-6	Interleucina-6 (proteína)
IL-8	Interleucina-8 (proteína)
LCR	Região controladora do locus
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metahemoglobina
MTBE	Éter metil- <i>tert</i> -butílico
MPs	Micropartículas
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
OCTN1	Transportador intestinal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OxiFerrilHb	•HbFe(IV)=O
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
PFK-1	Fosfofrutocinase-1
pH	Potencial Hidrogênio
PS	Fosfatidilserina

Prx	Peroxirredoxina
REF	Grupo referência
RFLP	Restrição de polimorfismo de fragmento único
SM	Esfingomielina
SOD	Superóxido Dismutase
VIP	Projeção de variáveis importantes
VCAM 1	Molécula de adesão celular vascular-1
TAC	Capacidade antioxidante total
tBOOH	Hidroperóxido de <i>terc</i> -butil
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNB	5-tio-2-nitrobenzoico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa (proteína)
TRx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase
TrxS ₂	Tiorredoxin oxidada
Trx (SH) ₂	Tiorredoxina reduzida
UHPLC-PDA	Cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a um detector de fotodiodo
XD	Xantina Desidrogenase
XO	Xantina Oxidase
2,3-BFG	2,3-bifosfoglicerato
4- HNE	4-hidroxi-2-nonenal

SÍMBOLOS

ζ	Gene zeta
α	Gene alfa
ϵ	Gene épsilon
δ	Gene delta
β	Gene beta
<i>g</i>	Giros

LISTAS DE FÓRMULAS QUÍMICAS

CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Molécula de água
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaOH	Hidróxido de sódio
ON	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Radical ânion Superóxido
¹ O ₂	Oxigênio molecular singlete
O ₃	Ozônio
•OH	Radical Hidroxila
Fe	Ferro

UNIDADES

cm	Centímetros
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitro
L	Litros
M	Molar
mg/mL	Miligramas por mililitros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

nm	Nanômetro
ng/μL	Nanogramas por microlitros
U	Unidade
U/L	Unidades por litro
U/mL	Unidades por mililitros
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Eritrócito Humano.....	21
1.1.1	Hemoglobina Humana.....	22
1.1.2	Membrana Eritrocitária Normal	22
1.1.3	Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Normais.....	25
1.1.4	Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Normais	26
1.1.5	Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos normais	30
1.2	Eritrócito Falciforme	31
1.2.1	Hemoglobina S (Hb S).....	32
1.2.2	Membrana Eritrocitária Falcêmica.....	35
1.2.3	Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Falcêmicos	36
1.2.4	Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Falcêmicos.....	37
1.2.5	Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos falcêmicos.....	38
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos.....	41
3	MATERIAL E MÉTODO.....	43
3.1	Casuística	43
3.2	Metodologia	44
3.2.1	Casuística e preparo de hemolisados.....	44
3.2.2	Marcadores de hemólise e de integridade de membrana.....	46
3.2.3	Antioxidantes	47
3.2.4	Enzimas e subprodutos metabólicos e quantificação de proteínas	49
3.2.5	Marcadores de lesão oxidativa	49
3.3	Análises Estatísticas	52
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Separação metabólica de células falciformes e normais	54
4.2	Grau de hemólise e enzima da membrana eritrocitária	54
4.3	Marcadores de estresse oxidativo.....	55
4.4	Enzimas e subprodutos metabólicos	58
4.5	Principais associações de biomarcadores relacionadas à homeostase metabólica	61
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES.....	74
7	REFERÊNCIAS	77
8	ANEXOS.....	92
8.1	ANEXO A - Técnicas citológicas, eletroforéticas e cromatográfica para identificação da Hb S e caracterização dos haplótipos β^S	92

8.2	Anexo B: Parecer consubstanciado do CEP.....	96
-----	--	----

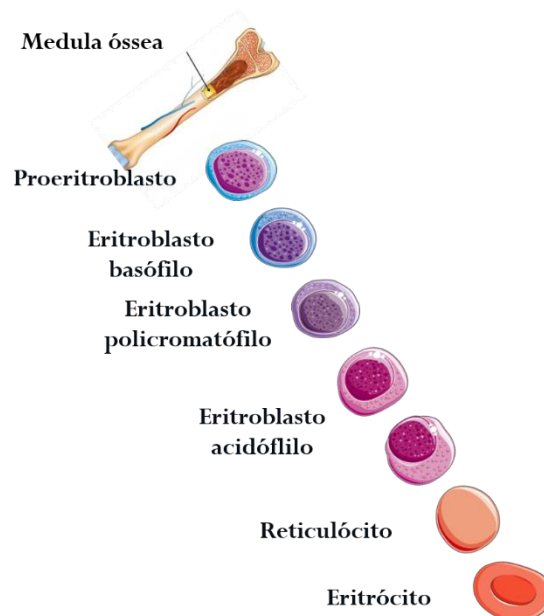
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eritrócito Humano

Os eritrócitos humanos são células únicas, altamente especializadas e uma das mais abundantes no organismo humano (Pandey e Rizvi, 2011). Em indivíduos adultos saudáveis, o número destas na circulação excede $4 \times 10^{12}/L$, o que corresponde, aproximadamente, a um quarto do total de células presentes no corpo humano (Foller *et al.*, 2008). Sendo assim, em indivíduos com 5 L de sangue, mais de 10^{11} eritrócitos são produzidos e removidos a cada dia (Lang *et al.*, 2012). Essas células são produtos de um processo de maturação iniciado na medula óssea, onde as células-tronco hematopoiéticas originam proeritroblastos, os quais diferenciam-se em eritroblastos basófilos. Estes dão origem aos eritroblastos policromatófilos, os quais possuem alta atividade de atividade de síntese de hemoglobina (Hb) e ferro. Posteriormente, há transformação em eritroblastos acidófilos, nos quais há redução do núcleo e alta concentração de Hb. Em seguida, o núcleo é extrudido da célula dando origem aos reticulócitos, que possuem ainda resquícios de organelas como retículo endoplasmático, mitocôndrias e entre outros. Finalmente, os reticulócitos são lançados na circulação e maturados em eritrócitos maduros, os quais possuem alta concentração de Hb em seu interior. (Pandey e Rizvi, 2011) (Yawata, 2003). A figura 1 ilustra o processo de eritropoiese.

Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoiese.

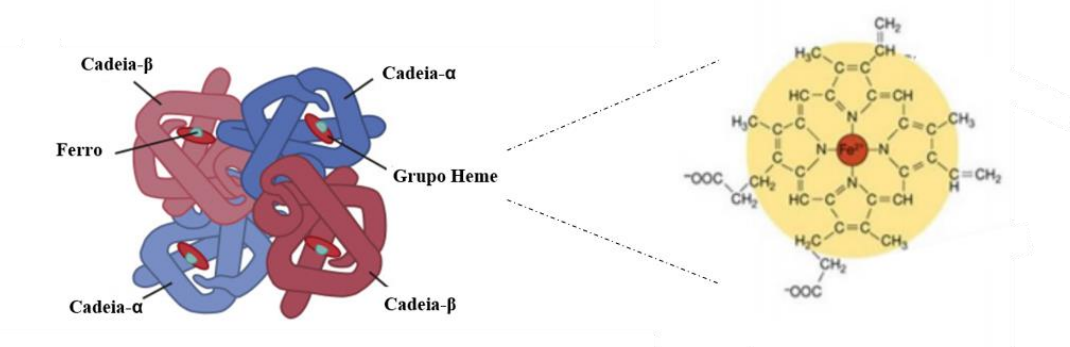


As células-tronco hematopoiéticas são diferenciadas em proeritroblastos, os quais sofrerão várias modificações que resultarão na formação do eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos/acidófilos, sucessivamente. Posteriormente, o núcleo é eliminado da célula originando os reticulócitos, os quais se tornam eritrócitos maduros e permanecem na circulação por aproximadamente 120 dias. (Figura: elaborada pelo autor).

1.1.1 Hemoglobina Humana

A principal função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões aos tecidos e o transporte de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões, além de exercerem um papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-base (Steinberg e Sebastiani, 2012). A proteína responsável por esse transporte é a Hb, a qual possui uma estrutura globular tetramérica com peso molecular de 64.458 Daltons e representa, aproximadamente, 90% do peso seco da célula vermelha (Aslan, 2000; Pandey e Rizvi, 2011). A estrutura desse tetrâmetro conta com quatro subunidades constituídas de duas frações: uma proteica e uma prostética, sendo a primeira composta por quatro cadeias globínicas, duas são do tipo alfa (α ou ζ) e duas do tipo beta (β , δ , $G\gamma$, $A\gamma$ ou ϵ) (Sankaran e Weiss, 2015; Diepstraten e Hart, 2019). Enquanto que, o grupamento prostético é constituído pelo grupo heme, o qual possui o átomo de ferro (Fe) na forma bivalente (Fe^{2+}), que possui alta afinidade ao átomo de O_2 (Figura 2) (Manca e Masala, 2008; Schechter, 2008). Após ocorrer o acúmulo de Hb no eritrócito, ele adquire o formato de disco bicôncavo, o qual é mantido por uma eficiente organização estrutural da membrana (Yawata, 2003).

Figura 2. Representação estrutural da molécula de Hb adulta.



A Hb humana é um tetrâmero formado por duas cadeias globínicas do tipo α e duas do tipo β , associada a elas, tem-se o grupamento heme, o qual contém um átomo de ferro (Fe^{2+}) que se liga o O_2 e, permite seu transporte dos pulmões aos tecidos. Fonte: (Adaptado de DIEPSTRATEN, S. e HART, A., 2018).

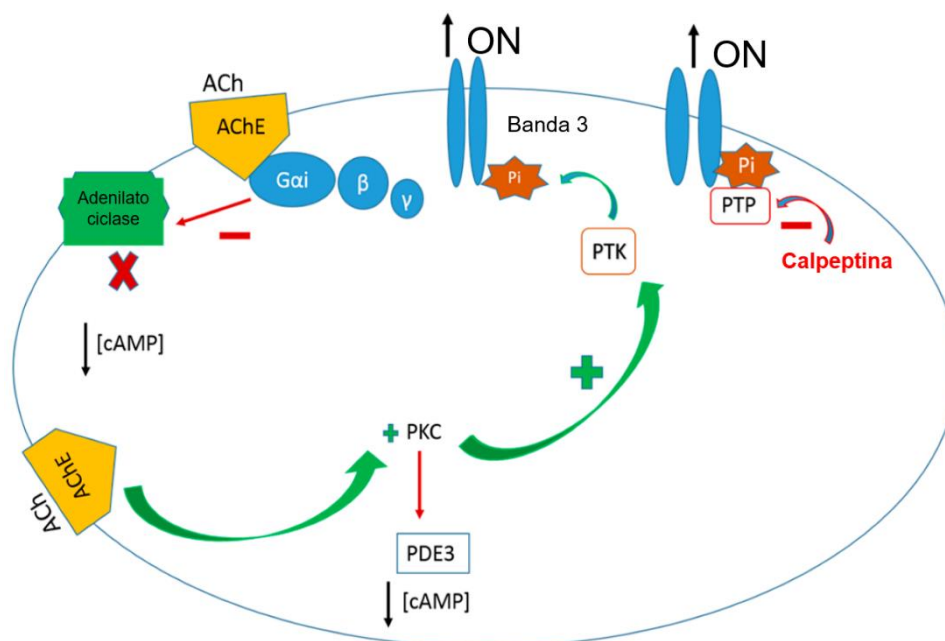
1.1.2 Membrana Eritrocitária Normal

A composição e organização estrutural da membrana do eritrócito permite que ele sofra grandes deformações reversíveis enquanto mantém sua integridade estrutural, durante seu tempo de vida, aproximadamente 120 dias (Mohandas e Gallagher, 2008) (Yawata, 2003). Essa membrana é constituída por uma mistura complexa de proteínas,

lipídios, água e carboidratos, sendo o primeiro, o principal componente (39,5%), seguido por lipídios (35,1%), água (19,5%) e, finalmente, carboidratos (5,8%) (Farg e Alagawany, 2018). As proteínas de membrana são altamente específicas e possuem certa heterogeneidade, dentre elas destaca-se as proteínas transportadoras, tais como: proteína da banda 3, aquaporina 1, Glut1, cotransportador de K-Cl, Canal de Gardos, dentre outras (Mohandas e Gallagher, 2008). Além disso, destaca-se uma importante enzima de membrana do eritrócito humano – acetilcolinesterase (AChE) (Wright e Plummer, 1973; Gupta, 2017).

Estudos têm evidenciado que a atividade desta enzima diminui com o envelhecimento do eritrócito, indicando aumento na disponibilidade de acetilcolina (ACh), o que influencia no metabolismo dos eritrócitos e o transporte de O₂ (Mesquita *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003). Além disso, muitos trabalhos atribuíram à ACh um papel significativo em eventos eritrocitários, relacionados ao metabolismo do óxido nítrico (ON) (Eluwa, 1990; Carvalho *et al.*, 2004). Saldanha e colaboradores (2017) relataram que o complexo enzimático ACh-AChE pode ativar a proteína cinase C (PKC), que fosforila a proteína tirosina-cinase (PTK), e esta, por sua vez, fosforila a proteína da banda 3 da membrana, que se torna capaz de receber ON em seu grupo tiol, permitindo o efluxo de ON dos eritrócitos, como ilustrado na figura 3 (Saldanha, 2016; 2017).

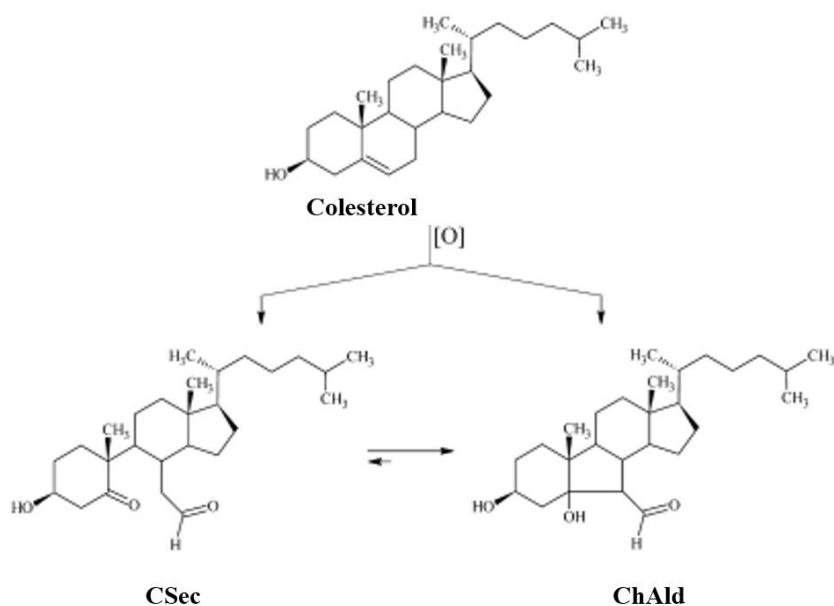
Figura 3. Efluxo de ON das membranas eritrocitárias.



O complexo enzimático ACh/AChE ativa a proteína cinase C, que fosforila a proteína tirosina-cinase e esta, por sua vez, fosforila a proteína da banda 3. Dessa forma, a proteína da banda 3 torna-se capaz de eliminar ON da célula. Fonte: (SALDANHA *et al.*, 2017).

Além de proteínas, a membrana conta ainda com um sistema lipídico eficiente e extremamente importante para manutenção da célula (Kulig *et al.*, 2016). Com relação a esses componentes, destaca-se o colesterol, o qual exerce um importante papel na fluidez e organização das biomembranas (Kucuk, 1992). Entretanto, as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem promover a oxidação desse componente e gerar uma série de produtos oxidativos, como hidroperóxidos, epóxidos, cetonas e aldeídos (Kulig *et al.*, 2016; Pataj *et al.*, 2016). Nos últimos anos, tem-se evidenciado a formação de aldeídos de colesterol, como o hidróxi-5-oxo-5,6-secocolestan-6-al (CSec) e o produto de sua reação aldólica: 3β-hidroxi-5β-hidroxi-B-norcholestan-6β-carboxaldeído (ChAld). Esses são formados, principalmente, durante a oxidação do colesterol mediada por ozônio (O₃) e oxigênio molecular singlete (¹O₂) (Miyamoto, 2003). A figura 4 representa as estruturas químicas dos aldeídos de colesterol citados.

Figura 4. Oxidação do colesterol.



A oxidação não enzimática do colesterol, favorecida pela ação de ERO pode gerar o produto CSec e seu derivado por uma reação aldólica, ChAld. Fonte: (GENARO-MATOS et al,2013).

Outros importantes componentes da membrana lipídica são os fosfolipídios, os quais são distribuídos assimetricamente ao longo da bicamada lipídica, com os fosfolipídios amino (fosfatidilserina [PS] e fosfatidiletanolamina [PE]) no interior e fosfolipídios contendo colina (fosfatidilcolina [PC] e esfingomiéline [SM]) externamente (Wood, 1996). Essa assimetria lipídica é uma propriedade disseminada das membranas eucarióticas e desempenha um papel crítico na interação normal da célula com seu ambiente externo (Yawata, 2003). Uma vez que essas interações propiciam elasticidade,

flexibilidade e deformidade, que são fundamentais para a manutenção da integridade estrutural e conferem ao eritrócito a capacidade de deformação durante a passagem por capilares pequenos, bem como a restauração da sua forma bicôncava normal, sem perda de integridade da membrana celular (Pandey e Rizvi, 2011; Farag e Alagawany, 2018). Entretanto, essa interação entre os componentes de membrana pode ser danificada, resultando em modificações na membrana e consequente diminuição na funcionalidade e sobrevivência dos eritrócitos (Mohandas e Gallagher, 2008).

As modificações na membrana dos eritrócitos podem ser ocasionadas por auto oxidação de Hb instáveis, as quais alteram a estrutura e função da membrana e podem gerar hemicromos – produtos da desnaturação oxidativa da Hb (Voskou *et al.*, 2015). Esses produtos possuem alta afinidade pelo domínio citoplasmático da banda 3 e medeiam a sua reticulação oxidativa através de ligações dissulfeto (Pantaleo *et al.*, 2008). Além disso, em condições de estresse oxidativo, após a oxidação da banda 3, as tirosinas cinases fosforilam o domínio citoplasmático da banda 3, o que resulta na dissociação das proteínas do citoesqueleto e formação de micropartículas (Pantaleo *et al.*, 2008).

Situações de estresse oxidativo podem ainda, alterar proteínas do citoesqueleto, como a espectrina – um dos principais alvos das ERO – sua oxidação ocasiona o rompimento na interação com outras proteínas do citoesqueleto, como a actina e a proteína 4.1 (Shinar, 1989). Diante disso, a estabilidade da membrana e sua interação com o citoesqueleto se torna prejudicada e acarreta o aumento da fragilidade na membrana da célula (Ney, 1990). Essas fontes oxidativas podem ainda prejudicar a homeostase catiônica, por meio de elevadas concentrações de Ca^{2+} , ativação do Canal de Gardos, eliminação de K^+ e consequente remoção de água (Mohandas e Gallagher, 2008). De maneira semelhante, espécies pró-oxidantes podem interferir na atividade do cotransportador K-Cl, acarretando a eliminação de K^+ , entrada de Cl^- e água, o que resulta na ruptura da membrana celular e hemólise (Ney, 1990; Mohandas e Gallagher, 2008). Além das ERO, uma série de outros componentes oxidantes podem interferir na homeostase eritrocitária (Yawata, 2003).

1.1.3 Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Normais

Dentre as fontes oxidantes para o eritrócito normal, destaca-se o processo de desnaturação oxidativa da Hb, que embora a sua forma oxigenada [$\text{Hb}(\text{FeII})\text{O}_2$] seja considerada relativamente estável, a mesma pode se auto oxidar em metahemoglobina (metHb) [$\text{Hb}(\text{FeIII})$] e gerar radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o qual é um importante gatilho do

processo oxidativo (Aslan, 2000; Pandey e Rizvi, 2011; Voskou *et al.*, 2015; Carrell, 1975). Dessa forma, o processo de auto oxidação da Hb é quase inteiramente responsável pelas ERO dentro dos eritrócitos, além disso, a auto oxidação da glutathiona reduzida (GSH), juntamente com a da Hb são, provavelmente, as maiores fontes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) endógenas (Benfeitas *et al.*, 2014) (Voskou *et al.*, 2015).

Além da Hb, o Fe e o heme são agentes altamente oxidantes na célula, uma vez que o Fe na forma livre ou ligado ao heme e Hb, pode atuar nas reações de Fenton e Haber-Weiss, gerando o radical hidroxila ($\bullet OH$) altamente reativo (Ferreira *et al.*, 2008). As reações de oxidação promovidas pelo heme ocorrem, principalmente, devido a sua capacidade de interagir com lipídios e proteínas de membrana (Belcher, 2010; Voskou *et al.*, 2015). Esse processo de peroxidação lipídica e oxidação proteica podem resultar em desorganização lipídica e deformidade celular, o que pode prejudicar a passagem dos eritrócitos pelos capilares e então resultar em um transporte de O_2 ineficiente aos tecidos (Pries, 1996). Além disso, a desorganização lipídica pode acarretar no rompimento da assimetria dos fosfolipídios e assim, a exposição de PS à membrana externa, sinalizando que elas podem ser removidas por macrófagos (Mohandas e Gallagher, 2008).

Além das fontes endógenas de espécies oxidantes, durante o período de vida dos eritrócitos, eles são expostos a diferentes estressores ao longo do sistema circulatório (Foller *et al.*, 2008). Em média, as células vermelhas do sangue percorrem a medula renal mais de uma vez por hora, onde sofrem choque osmótico; e são expostas a uma variedade de xenobióticos presentes na circulação (Lang, 2005; Pandey e Rizvi, 2011; Perrone *et al.*, 2012). A cada minuto, os eritrócitos passam pelos pulmões, onde podem sofrer com estresse oxidativo, acarretado pelo desequilíbrio entre fontes oxidantes e antioxidantes (Foller *et al.*, 2008). Ainda, os eritrócitos atravessam por microcapilares, muitas vezes menores que os mesmos, onde sua arquitetura é drasticamente alterada (Van Wijk e Van Solinge, 2005).

1.1.4 Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Normais

A fim de prevenir ou atenuar o estresse oxidativo gerado na célula, os eritrócitos são equipados com um sistema antioxidante eficaz e autossustentável que os possibilita eliminar radicais livres, fornecendo proteção antioxidante, enzimática e não enzimática (Silva, D. G. *et al.*, 2013; Van Zwieten *et al.*, 2014). O sistema de defesa enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), que permite que o radical $O_2\bullet^-$ proveniente da auto oxidação da Hb seja dismutado em O_2 e H_2O_2 . Por sua vez, a catalase (CAT) neutraliza o

H₂O₂, transformando-o em H₂O e O₂ (Van Zwieten *et al.*, 2014). Outra enzima que contribui para a redução de lipo- e hidroperóxidos orgânicos é a glutathiona peroxidase (GPx), usando GSH como cofator (Mannervik, 1987). A GSH também atua como cofator das glutathiona-S-transferases (GST) na desintoxicação de xenobióticos (Van Zwieten *et al.*, 2014). Além disso, este tiol protege importantes proteínas da membrana contra a oxidação, como a espectrina (Carrell, 1975), favorecendo a manutenção da integridade e flexibilidade da membrana eritrocitária (Carrell, 1975). É também uma parte integrante do *pool* de grupo sulfidrila que mantém a Hb em seu estado reduzido (Aslan, 2000).

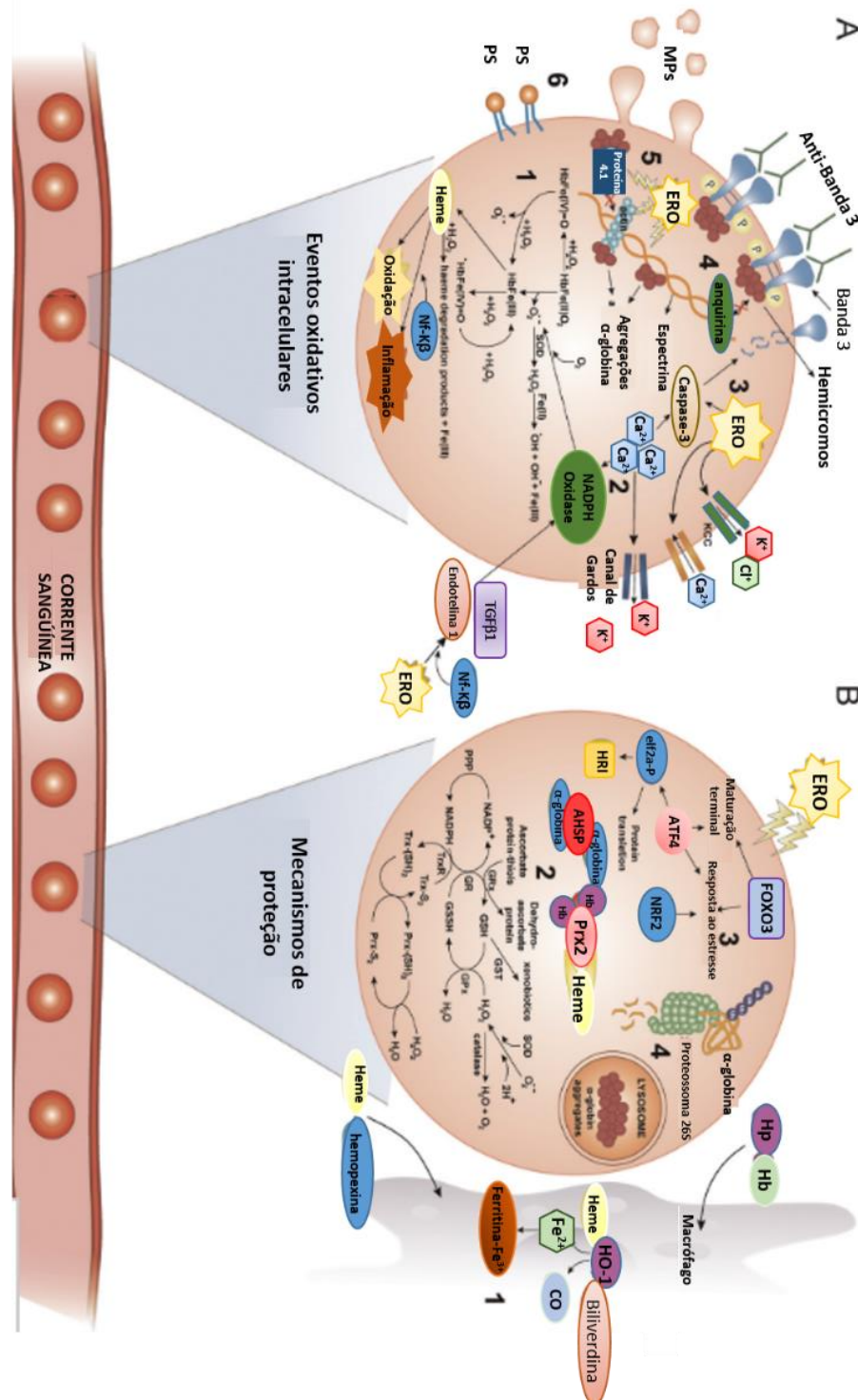
Sob condições associadas à geração excessiva de oxidantes, podem ser gerados altos níveis de dissulfeto de glutathiona (GSSG), passíveis de externalização para evitar possível citotoxicidade. Este mecanismo pode ser responsável pela diminuição dos níveis de GSH nos eritrócitos (Lang, 2005; Foller *et al.*, 2008). No entanto, o GSSG pode ser revertido para sua forma reduzida pela ação da glutathiona redutase (GR), a qual usa o NADPH, como agente redutor (Lang, 2005; Foller *et al.*, 2008; Perrone *et al.*, 2012). Da mesma forma, a tiorredoxina redutase (TrxR) usa NADPH da via das pentoses fosfato para reduzir a tiorredoxina oxidada (TrxS₂) à sua forma ditiol (Trx (SH)₂), sendo esta última responsável pela redução das peroxirredoxinas (Prxs) (Reiter *et al.*, 2002; Perrone *et al.*, 2012).

As Prxs caracterizam-se por serem antioxidantes capazes de reduzir H₂O₂, hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito, devido à presença de um resíduo de cisteína altamente reativo presente em seu sítio catalítico (Low *et al.*, 2008; Rhee, 2016). Nos mamíferos existem seis isoformas de Prxs, as quais podem ser encontradas no citosol (Prx 1-2 e 4-6), complexo de Golgi (Prx 1-4), mitocôndria (Prx 3 e Prx 5), peroxissomo (Prx 5) e no núcleo (Prx 1) (Wood Z, 2003). Destas, a Prx 2 é a terceira proteína mais abundante nos eritrócitos e um dos principais agentes citoprotetores eritrocitários contra o estresse oxidativo (Rhee, 2016). Em condições de altas concentrações de peróxido, as Prx 2 tornam-se superoxidadas, o que pode resultar na perda da função de peroxidase dessas enzimas, visto que, a TrxR não pode reduzir estes intermediários (Jang *et al.*, 2004). Sabe-se ainda que, a Prx2 pode transcolar-se para a membrana através da ligação ao domínio citoplasmático da banda 3, provavelmente, a fim de proteger a banda 3 e as proteínas associadas contra danos oxidativos (Matte *et al.*, 2013).

Outro antioxidante importante para os eritrócitos é a ergotioneína (ERT), a qual é o segundo tiol mais abundante nos eritrócitos, devido à presença de um transportador de membrana (OCTN1), que possibilita a entrada de ERT nos eritrócitos (Kobayashi *et al.*,

2004; Paul e Snyder, 2010; Kuypers, 2014). Esse aminoácido possui ação antioxidante na eliminação de radicais livres e outras atividades citoprotetoras (Paul e Snyder, 2010). Os mamíferos obtém a ERT exclusivamente por meio da dieta, sendo alguns fungos e bactérias os únicos organismos conhecidos por sintetiza-la (Cheah e Halliwell, 2012). A figura 5 ilustra os principais eventos oxidativos intracelulares, bem como os mecanismos de proteção nos eritrócitos.

Figura 5. Eventos oxidativos intracelulares e mecanismos de proteção.



A desnaturação oxidativa da Hb resulta na produção de ERO, heme livre e Fe, este age como um reagente na reação de Fenton e Haber-Weiss para geração de $\bullet\text{OH}$. Já o grupamento heme livre, promove reações de oxidação e possui um efeito pró-inflamatório. As ERO promovem ainda a oxidação da proteína 4.1, actina e espectrina, resultando em danos na interação de membrana, além disso pode ocorrer a exposição de PS, que acarreta ruptura na organização da membrana (A). Diante dos danos gerados pelas ERO e outras fontes oxidativas, a célula conta com um eficiente sistema antioxidante (B). Fonte: (Adaptado de VOSKOU et al, 2015).

1.1.5 Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos normais

Além do sistema antioxidante, os eritrócitos contam com um sistema eficiente de geração de energia, o qual depende unicamente da degradação anaeróbica da glicose através da via glicolítica, gerando adenosina trifosfato (ATP), NADH e piruvato, este no caso dos eritrócitos será convertido em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Davidson Wd, 1972). O ATP obtido da glicólise pode ser utilizado por bombas de íons de membrana e na manutenção da integridade eritrocitária, enquanto que o NADH é utilizado para a redução da metHb, mantendo essa proteína no estado ferroso (Van Wijk e Van Solinge, 2005). Aproximadamente, de 70-90% dessa glicose é metabolizada pela via glicolítica para produzir ATP (Van Zwieten *et al.*, 2014). A glicose remanescente é direcionada para a via das pentoses fosfato, cuja função principal é a produção de potencial redox na forma de NADPH (Beutler, 1971), por sucessivas reações de oxidação catalisadas pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e pela fosforilgluconato desidrogenase (Beutler, 1971). A G6PDH catalisa a primeira etapa irreversível da via das pentoses fosfato, que produz a primeira molécula de NADPH. Por este motivo, ela tem um papel crucial no estresse oxidativo pela captura de ERO. Além disso, a atividade dessa enzima deve ser rigidamente controlada, uma vez que ela desloca diretamente a via oxidativa, regula a glicólise e o fluxo para a via das pentoses fosfato (Akram *et al.*, 2019).

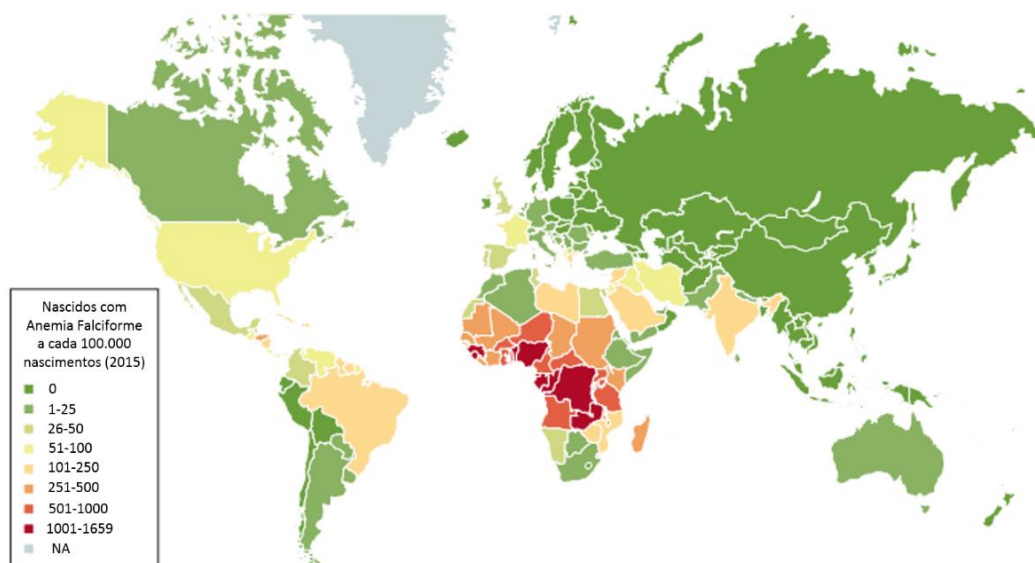
Os eritrócitos possuem ainda, um metabolismo de nucleotídeos que auxilia na manutenção do balanço energético nos eritrócitos, através do ciclo metabólico das purinas (Yeung *et al.*, 2018). Além da manutenção do balanço energético, o ATP pode ser utilizada pelos eritrócitos para manter a estabilidade osmótica e as proteínas da rede esquelética da membrana, possibilitando assim a manutenção do formato das membranas e o controle na deformação (Frag e Alagawany, 2018). Sabe-se que em condições fisiológicas normais, a adenina intracelular é proveniente da hidrólise da *S*-adenosil-homocisteína e do catabolismo do ATP à adenosina 5'-difosfato (ADP) e depois à adenosina 5'-monofosfato (AMP), que é posteriormente catalisado para produzir adenosina (Yeung *et al.*, 2018). Externamente, as concentrações de adenosina são mantidas muito baixas devido à rápida absorção pelos transportadores de nucleotídeos e também pelo catabolismo a outros metabólitos da oxipurina, como hipoxantina e ácido úrico (Farthing *et al.*, 2015). Internamente, em situações de hipóxia ou estresse celular pode ocorrer o acúmulo de hipoxantina e ácido úrico nas células (Castilhos *et al.*, 2017a).

1.2 Eritrócito Falciforme

Entretanto, várias condições clínicas podem sobrecarregar o metabolismo energético, nucleotídico e sistema de defesa antioxidante dos eritrócitos normais, como por exemplo: a anemia falciforme (AF). Essa doença, caracteriza-se por ser uma das hemoglobinopatias mais prevalentes no mundo (Kato *et al.*, 2018). A incidência de nascimentos com AF na África subsaariana foi estimada em, aproximadamente, 230.000 em 2010, o que corresponde a cerca de 75% dos nascimentos com AF em todo o mundo (Piel, F. B. *et al.*, 2013; Piel, Frédéric B. *et al.*, 2013). Enquanto que no Brasil, a incidência de recém-nascidos com AF varia entre os estados, refletindo a heterogeneidade da população brasileira. Em 2014, a incidência de AF foi de 1 em 650 recém-nascidos rastreados no estado da Bahia, 1 em 1.300 no estado do Rio de Janeiro e 1 em 13.500 no estado de Santa Catarina (Saúde, 2014). Em 2016, constatou-se que em todo o país, 1.071 recém-nascidos tinham AF e mais de 60.000 eram heterozigotos para o alelo β^S (Braga *et al.*, 2016). A Figura 6 ilustra as estimativas de nascimentos com AF no mundo.

Nessa afecção, devido a mudanças genéticas e bioquímicas o eritrócito normal é alterado à eritrócito falciforme, o qual é mais frágil, suscetível a danos oxidativos, e altamente instável, com uma vida útil reduzida em $\geq 75\%$, devido a presença da Hb S (Quinn *et al.*, 2016).

Figura 6. Estimava de nascimentos de indivíduos com AF no mundo.

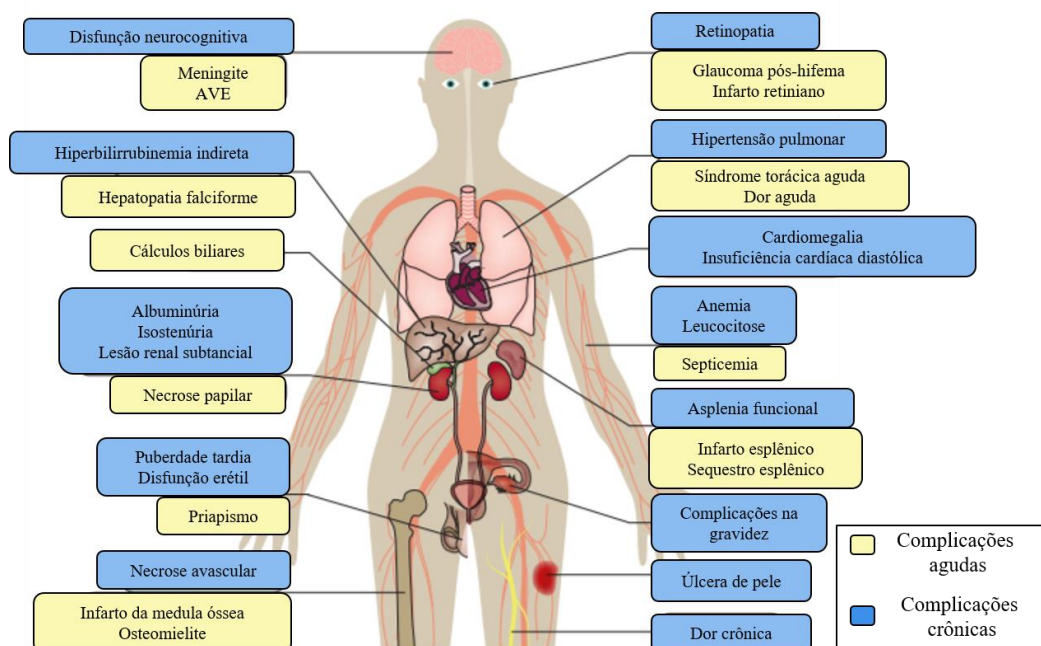


Números estimados de nascimentos com falciforme anemia por 100.000 nascimentos por país em 2015. As estimativas são derivadas de dados de prevalência publicados por (Piel, Frédéric B. *et al.*, 2013). Fonte: (Adaptado de KATO *et al.*, 2018).

1.2.1 Hemoglobina S (Hb S)

A hemoglobina S (Hb S) é causada por uma mutação pontual (*HBB:c.20A>T*; rs334) no gene da beta (β)-globina (*HBB*) (Ballas *et al.*, 2012). Essa mutação leva à troca do vigésimo nucleotídeo, adenina por timina ($GAG \rightarrow GTG$), o que resulta na substituição do ácido glutâmico (características hidrofílicas) por valina (características hidrofóbicas), na sexta posição da cadeia (*HBB^{glu6val}*), o que acarreta em características estruturais e bioquímicas diferentes da Hb normal (Ballas *et al.*, 2012; Steinberg e Sebastiani, 2012). Quando herdada em homozigose (Hb SS) há ocorrência da AF, a qual se caracteriza por ser uma anemia hemolítica hereditária autossômica recessiva (Kato *et al.*, 2018). A fisiopatologia dessa doença é complexa e multissistêmica caracterizada por complicações agudas e crônicas (Figura 7). Avanços e cuidados médicos gerais, diagnóstico precoce e tratamento levaram a melhorias substanciais na expectativa de vida de indivíduos com AF em países de alta renda. No entanto, mesmo com o melhor atendimento, a expectativa de vida desses indivíduos ainda é reduzida em cerca 30 anos (Anie, 2005; Weatherall, 2011).

Figura 7. Complicações clínicas na Anemia Falciforme.

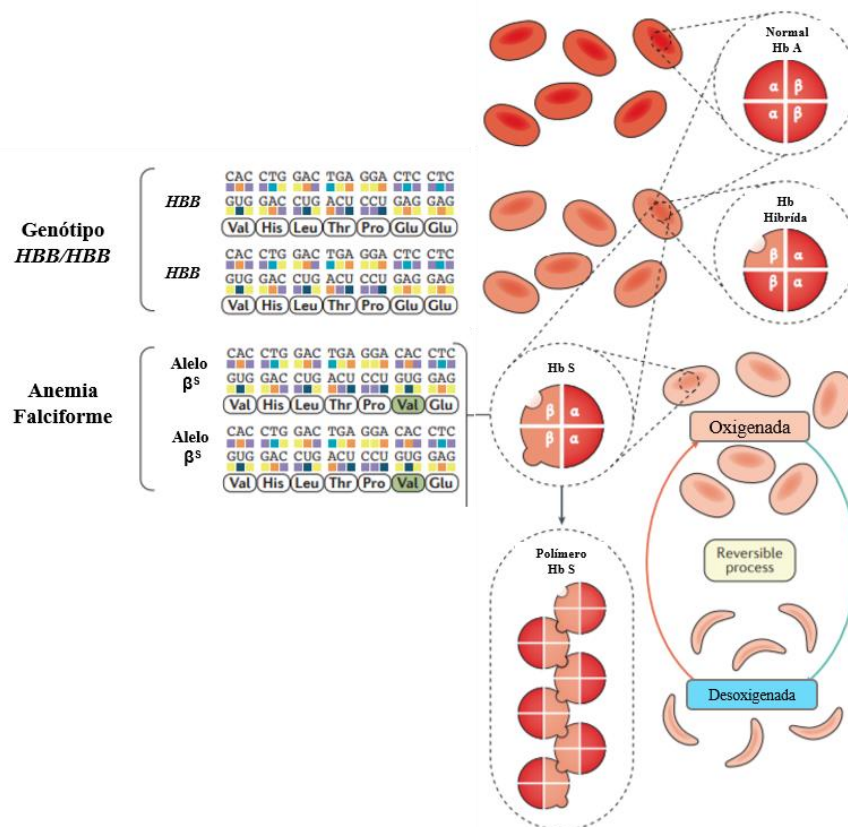


Dentre as complicações agudas em indivíduos com AF, a crise de dor é a mais comum, e assim como as demais complicações agudas, pode ocasionar disfunção nos órgãos e morte precoce. Fonte: (Adaptado de KATO, 2018).

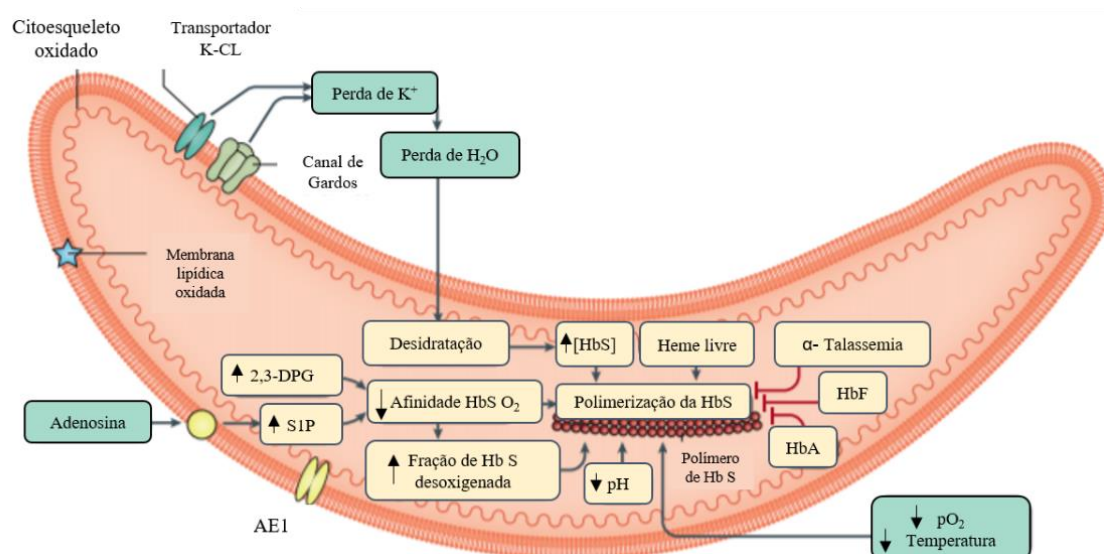
Devido às características estruturais e bioquímicas alteradas da Hb S, em condições de baixa oxigenação, acidose ou desidratação, essa Hb sofre mudanças

conformacionais (Kato *et al.*, 2018). Isso ocorre devido ao aminoácido valina tentar se estabilizar em meio hidrofílico, formando interações com resíduos hidrofóbicos de outra Hb S-desoxigenada dando origem a cristais e, com a agregação destes aos polímeros, há o rompimento do citoesqueleto e origem da célula falcizada (Steinberg e Sebastiani, 2012). Sendo assim, na presença de O₂ as células mantêm seu formato bicôncavo normal e em situações de baixa oxigenação, elas tendem a se polimerizar, gerando um ciclo de polimerização/despolimerização, o qual não é permanente, mas o momento e os motivos pelos quais ele é interrompido, não é bem descrito (Kato *et al.*, 2018) (Figura 8).

Esse processo de polimerização da Hb S pode ser desencadeado por diversos mecanismos, dentre eles, a afinidade reduzida da Hb S ao O₂ quando comparado à Hb A (Ballas *et al.*, 2012). Além disso, a afinidade ao O₂ pela Hb S é ainda mais reduzida pela ação do intermediário glicolítico presente em altas quantidades nos eritrócitos falciformes: 2,3 bifosfoglicerato (2,3-BFG), o qual por interação com subunidades de β -globina desoxigenadas, reduz a afinidade da Hb por O₂ (Rogers *et al.*, 2013). Sabe-se ainda que, eritrócitos falcêmicos possuem elevada atividade da esfingosina cinase, a qual eleva os níveis de esfingosina-1-fosfato, e este intermediário também diminui a afinidade da Hb S ao O₂ e desencadeia a polimerização (Zhang *et al.*, 2014). Ainda, devido à homeostase catiônica anormal dos eritrócitos falcêmicos, vários canais de membrana tornam-se disfuncionais, como o canal de Gardos e o cotransportador K-Cl, nos quais há perda de K⁺, desidratação, altos níveis de Hb S e consequente polimerização (Figura 9) (Mohandas e Gallagher, 2008).

Figura 8. Alterações genéticas na Hb S

Na Hb S há substituição adenina-timina resultando na substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 na cadeia β -globina. Em presença de baixa oxigenação, a Hb S pode se polimerizar. Entretanto, esse processo é reversível até um determinado momento, o qual não é ainda bem elucidado. Fonte: (Adaptado de KATO et al., 2018).

Figura 9. Polimerização da Hb S e deformação dos eritrócitos

A polimerização da Hb S depende de muitos fatores, incluindo a concentração de Hb S, pressão parcial de oxigênio (pO_2), temperatura, pH, concentração de 2,3-BPG e presença de diferentes moléculas de Hb. Fonte: (Adaptado de KATO, 2018).

1.2.2 Membrana Eritrocitária Falcêmica

Em decorrência dos ciclos recorrentes de polimerização/despolimerização, ocorre uma desregulação na assimetria dos fosfolípidos de membrana, o que afeta o citoesqueleto e propicia à exposição de epítomos protéicos e lipídicos como a PS e CD36, (Frenette e Atweh, 2007). Além disso, os polímeros e a oxidação da Hb S podem afetar proteínas de membrana com funções estruturais, especialmente o domínio citoplasmático da proteína banda 3, o qual pela presença de hemicromos pode ocasionar a dissociação de proteínas do citoesqueleto por ruptura de ligação à anquirina (Mannu, 1995). Pode ocorrer ainda, a oxidação da espectrina, actina e proteína 4.1 em uma taxa superior à que comumente ocorre em eritrócitos saudáveis (Mohandas e Gallagher, 2008).

Em razão do estresse oxidativo acentuado na AF, as membranas eritrocitárias são constantemente afetadas por ERO, as quais podem alterar e destruir os lipídios de membrana (Biswal *et al.*, 2018) levando a formação dos peróxidos lipídicos, como por exemplo o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA) (Lazzaretti *et al.*, 2008). As reações peroxidativas têm sido reconhecidas como potenciais fatores na contribuição de processos celulares degenerativos, acarretando danos oxidativos com alteração nas propriedades de membrana, o que ocasiona aumento na rigidez e diminuição da deformidade celular (Lazzaretti *et al.*, 2008). Estudos anteriores demonstraram que, em comparação com eritrócitos normais, os eritrócitos falciformes apresentaram um aumento considerável na extensão endógena de lipídios oxidados, bem como uma maior suscetibilidade para peroxidação lipídica (Biswal *et al.*, 2018).

Os níveis elevados de MDA na AF indicando peroxidação lipídica, são bem reportados na literatura (Hebbel, 1982; Akohoue *et al.*, 2007). O acúmulo de dessa molécula perturba a organização dos fosfolipídios na bicamada da membrana do eritrócito, o que pode contribuir para a fisiopatologia da AF devido a formação de células falciformes irreversíveis (Akohoue *et al.*, 2007). Além disso, a membrana eritrocitária falcêmica pode sofrer danos devido a formação de 4-HNE, o qual é produto final da peroxidação lipídica e considerado um biomarcador do estresse oxidativo, podendo mediar a inativação de antioxidantes, como a tiorredoxina redutase-1 (TrxR-1) e aumentar a produção de ERO nas células (Cohen *et al.*, 2013). Estudos têm evidenciado o aumento desse produto nas células falcêmicas, Lagoda e colaboradores (2014) confirmaram níveis elevados de 4-HNE em ratos com AF, o que pode ser explicado devido a atividade aumentada de NADPH oxidase e a produção de $O_2^{\bullet-}$ (Lagoda *et al.*, 2014).

1.2.3 Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Falcêmicos

O processo de polimerização da Hb S é uma das principais fontes pró-oxidantes nos eritrócitos falcêmicos (Barabino *et al.*, 2010). Uma vez que a Hb S instável é auto oxidativa e aumenta a necessidade metabólica devido a ciclos recorrentes de polimerizações/despolimerização, causando assim maior geração de ERO (Van Zwieten *et al.*, 2014). Segundo Hebbel e colaboradores, a Hb S tem uma tendência a se auto oxidar 1,7 vezes mais rápido que a Hb A (Hebbel *et al.*, 2004). Dessa forma, estudos têm evidenciado que os eritrócitos falciformes geram maiores quantidades de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH e produtos da oxidação lipídica quando comparados com os eritrócitos contendo Hb A (Aslan, 2000). Além disso, o evento de polimerização/despolimerização pode levar a múltiplas fontes pró-oxidante com conseqüente estresse oxidativo, dentre elas: a adesão das células sanguíneas, hemólise, vaso-oclusão e lesão de isquemia-reperusão (Chirico e Pialoux, 2012).

O H_2O_2 pode reagir com a Hb e com a metHb produzindo a Hb ferril [HbFe(IV)=O] e oxiferrilHb [\bullet HbFe(IV)=O], respectivamente (Rifkind *et al.*, 2014). No entanto, a Hb, ao contrário das peroxidases clássicas (por exemplo, citocromo oxidase), é incapaz de aproveitar seus próprios radicais prejudiciais e, portanto, é classificada como uma pseudoperoxidase (Alayash, 1999). Em um estudo recente, Kassa e colaboradores (2015) descobriram que a Hb S exibe uma química oxidativa única, uma vez que quando essa Hb recicla o Fe férrico e o ferril na presença de H_2O_2 , ela tende a permanecer por mais tempo no estado ferril, ao contrário do que ocorre com a Hb A. Essa redução ocasiona uma maior concentração da forma ferril reativa que não apenas oxida subunidades dentro da proteína Hb, mas também atinge componentes celulares próximos (Kassa *et al.*, 2015).

Além disso, as fontes oxidativas podem ainda ativar células sanguíneas circulantes e acarretar a liberação de microvesículas de fosfolipídios derivados da membrana citoplasmática, denominadas micropartículas (MPs) (Romana *et al.*, 2018). Nas células falciformes, os repetidos episódios de polimerização/despolimerização induzem a uma maior liberação de MPs, devido ao desacoplamento entre o esqueleto da membrana e a bicamada lipídica (Liu, 2016). Sabe-se que em indivíduos com AF, a liberação de MPs, assim como a falcização do eritrócito são eventos chave na hemólise intravascular (Hierso *et al.*, 2017). Hierso e colaboradores (2017) realizaram um estudo com pacientes falciformes monitorados durante crises vaso-oclusivas e revelaram um estresse oxidativo

exacerbado e o acúmulo de MPs (Hierso *et al.*, 2017). Além disso, as MPs possuem capacidade de promover a coagulação, uma vez que a exposição de PS na superfície resulta em uma carga negativa, o que permite a ligação dos fatores de coagulação e geração de trombina. Assim, de acordo com essa propriedade pró-coagulante, estudos têm evidenciado elevados níveis de MPs em condições clínicas, como: incidência de trombose e doença cardiovascular (Mezzano *et al.*, 2017).

1.2.4 Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Falcêmicos

Devido à constante e exacerbada geração de espécies pró-oxidantes na AF, há um consumo excessivo de antioxidantes e, portanto, um sistema antioxidante deficiente, caracterizando o estresse oxidativo crônico dessa doença (Chaves *et al.*, 2008). Dentre os antioxidantes estudados na AF, a atividade de SOD mostra-se aumentada alguns estudos (Das, 1980), relacionando-a um mecanismo de defesa em resposta ao estresse oxidativo, enquanto outros evidenciaram a diminuição na atividade da mesma, devido ao consumo (Schacter, 1988). De maneira semelhante, há discrepâncias entre os resultados da atividade de CAT na AF, alguns trabalhos evidenciam o aumento (Das, 1980) dessa enzima como um efeito protetor e outros trazem a diminuição na atividade, devido ao consumo (Dasgupta, 2006). A atividade de GPx, geralmente, também são reduzidas com uma relação direta ao aumento da gravidade da doença (Biswal *et al.*, 2018). De maneira semelhante, as concentrações de GSH – cofator para a redução do H_2O_2 – são significativamente reduzidas em pacientes com AF (Reid, 2001). Alguns estudos evidenciaram uma diminuição de 50% no níveis de GSH nas células falcêmicos quando comparadas às células saudáveis (Tatum, 1996). Nur e colaboradores (2011) evidenciaram níveis diminuídos de GSH nos indivíduos com AF, e provaram que essa diminuição é em decorrência de um maior efluxo de GSSG nas células falcêmicos. Uma vez que, os eritrócitos falcêmicos possuem níveis elevados de produção de ERO e um sistema antioxidante desfavorecido, o que acarreta na maior produção de GSSG e esse aumento impulsiona o seu efluxo, o que impede que este seja reciclado para GSH pela GR, levando a perda desse tiol nas células (Nur *et al.*, 2011). Isso é especialmente importante sob condições de estresse oxidativo elevado, como crise vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda e hemólise acentuada (Aslan, 2000).

1.2.5 Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos falcêmicos

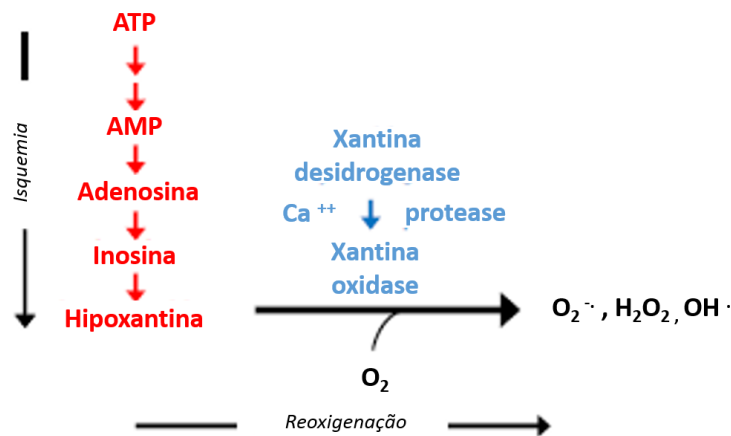
Além do metabolismo redox, devido à alta produção de ERO nas células falcêmicas, o metabolismo energético das células falciformes também é alterado (Van Zwieten *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017). Sabe-se que quase todas as funções da vida dos eritrócitos são propiciadas por energia proveniente da glicólise, além disso, o balanço do fluxo de glicose entre a glicólise e a via das pentoses fosfato é extremamente importante para os eritrócitos (Sun *et al.*, 2017). Muitos estudos têm evidenciado uma reprogramação metabólica em eritrócitos normais sob condições de hipóxia, por meio da ligação da desoxiHb ao domínio da proteína da banda 3 e, conseqüentemente, o aumento da disponibilidade de enzimas glicolíticas citosólicas (Rogers *et al.*, 2013). Entretanto, no eritrócito falcêmico, o metabolismo da glicólise e a via das pentoses fosfato é constantemente alterado, levando ao excesso de produção de 2,3-BPG e à escassez da GSH (Sun *et al.*, 2017).

A via das pentoses fosfato está diretamente relacionada à glicólise, uma vez que a glicose 6-fosfato (G6P) é um intermediário em ambas as vias. Assim, qualquer condição que influencie a atividade glicolítica pode alterar potencialmente o fluxo de glicose através da via das pentoses fosfato, levando a uma mudança na quantidade de NADPH gerada (Lachant *et al.*, 1983). Sob condições oxidativas, como no caso da AF, o fluxo de G6P através do via das pentoses fosfato é acentuado, a fim de garantir níveis adequados de NADPH necessários para proteger os eritrócitos das lesões desencadeadas pelo oxidante (Castagnola *et al.*, 2010). Estudos recentes têm evidenciado que na AF, a deleção da esfingosina cinase-1, principal enzima na via do metabolismo de esfingolípido, pode reprogramar o metabolismo da glicólise, canalizando a glicose para a via das pentoses fosfato ao invés da glicólise, o que, por sua vez, ocasiona no aumento de NADPH e diminuição de 2,3-BPG, evidenciando o ambiente oxidativo das células falciformes e a necessidade de proteção antioxidante, promovida por meio do NADPH (Sun *et al.*, 2017).

Devido a condições de hipóxia ou estresse celular, os quais podem ser ocasionados por ciclos de isquemia/reperfusão, comuns na AF, o metabolismo nucleotídico dos eritrócitos falcêmicos também pode ser alterado (Barabino *et al.*, 2010). Isso ocorre devido a duas grandes mudanças em tecidos isquêmicos ou privados de O₂: primeiramente, as condições isquêmicas promovem a conversão da xantina desidrogenase (XD) à xantina oxidase (XO). Essa conversão envolve a oxidação do grupo sulfidril ou proteólise desencadeada pela ativação de uma protease citosólica como mecanismo adaptativo para transporte de cálcio em células com falta de energia (Kalyanaraman,

2013). Outra grande modificação nos tecidos isquêmicos é a depleção de ATP para AMP, o catabolismo de AMP e, eventualmente, o acúmulo de hipoxantina, um substrato de purina para a enzima XO (Figura 10). A atividade XO converte xantina em hipoxantina e esta em ácido úrico (Kalyanaraman, 2013). As condições isquêmicas também promovem a liberação de metais com atividade redox (por exemplo, Fe) que podem ativar oxidante mais potente (hidroxila radical através do mecanismo de Fenton) (Odeh, 1991; Kalyanaraman, 2013).

Figura 10. Mecanismo de isquemia e reperfusão na formação de ERO.



O ATP pode ser catalisado para AMP, este em adenosina, e esta em hipoxantina e ácido úrico, os quais podem estar acumulados nos eritrócitos falcêmicos (Adaptado de (Kalyanaraman, 2013).

Muitos estudos demonstraram, separadamente, o estado hiperoxidativo das células falciformes, enquanto outros evidenciaram alterações no metabolismo redox do eritrócito (Silva, D. G. H. *et al.*, 2013), mudanças nos níveis de nucleotídeos de piridina e metabólitos de purina (Zerez, 1990), nas atividades das enzimas das vias glicolíticas e da pentose fosfato, resultando em comprometimento dessas vias (Lachant *et al.*, 1983; Zerez, 1990). No entanto, ao conhecimento dos autores, não há nenhum trabalho abordando as implicações da presença de Hb S no rompimento da homeostase do metabolismo dos eritrócitos falcêmicos. Sendo, portanto, de extrema relevância o estudo da integração dessas vias e suas implicações, a fim de melhorar a compreensão do metabolismo do eritrócito falcêmico, favorecendo a descoberta de marcadores oxidativos mais específicos, bem como de possíveis agentes terapêuticos, como antioxidantes mais específicos e eficientes.

CONCLUSÕES

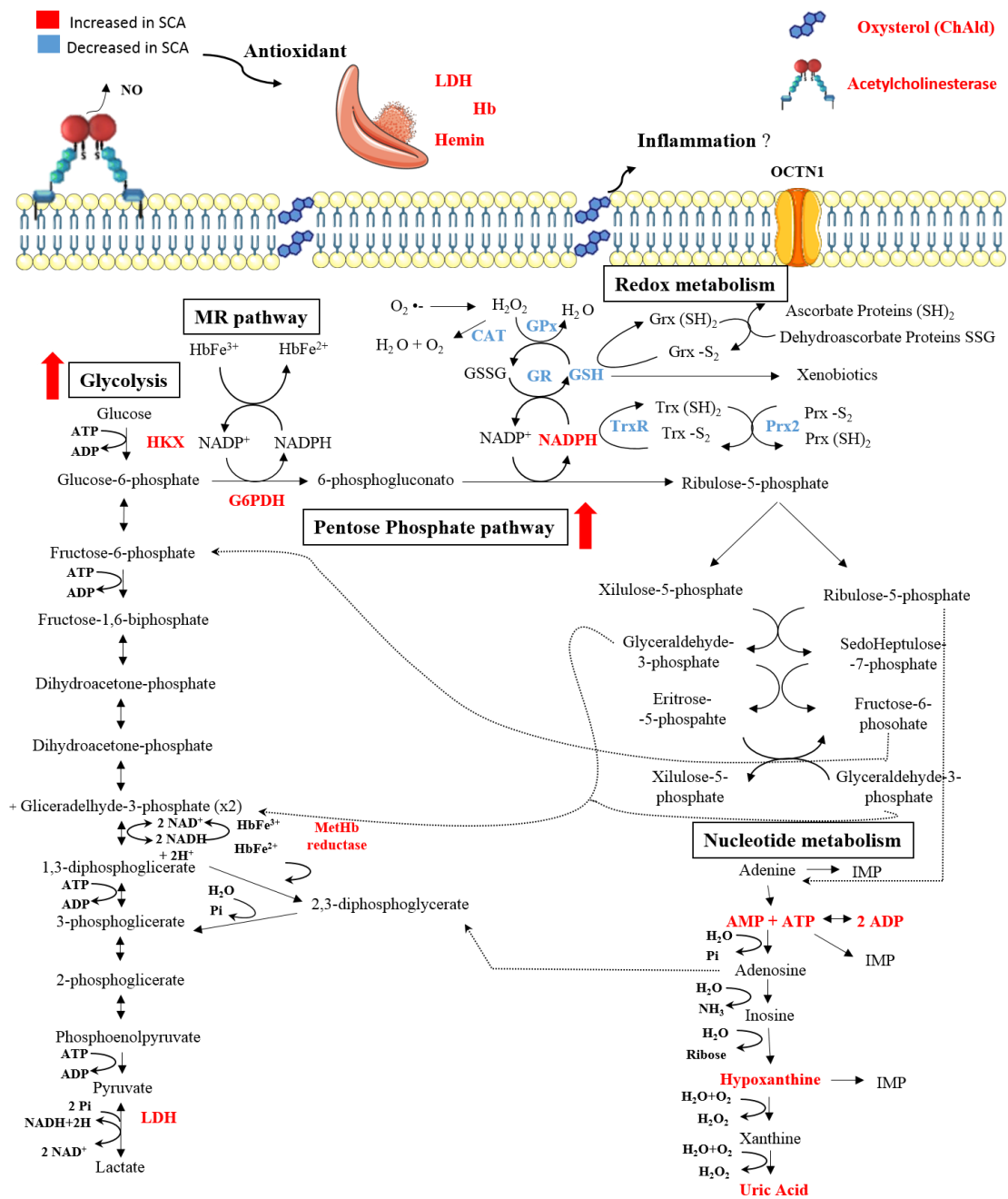
6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir:

1. A capacidade antioxidante prejudicada das células falciformes contribui significativamente para a hemólise;
2. A AChE parece contribuir com o metabolismo dos eritrócitos de um modo muito mais complexo do que foi explorado até o momento;
3. ChAld pode ser investigado com um marcador específico de lesão associado ao processo inflamatório na AF;
4. ERT deve ser considerado como uma alternativa promissora de terapia antioxidante para o tratamento de AF;
5. As células falciformes parecem escapar ou, de alguma forma, alterar o mecanismo de deslocamento entre a glicólise e a via das pentoses fosfato bem descrita para eritrócitos saudáveis, mantendo ambas as vias supra-reguladas.

As conclusões foram sintetizadas na figura 25.

Figura 25. Conclusões sintetizadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

AJDZANOVIC, V. et al. The negative effect of soy extract on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. **J Membr Biol**, v. 239, n. 3, p. 131-5, Feb 2011. ISSN 1432-1424 (Electronic) 0022-2631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21132426> >.

AKOHOUE, S. A. et al. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. **Pediatr Res**, v. 61, n. 2, p. 233-8, Feb 2007. ISSN 0031-3998 (Print) 0031-3998 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237728> >.

AKRAM, M. et al. Hexose monophosphate shunt, the role of its metabolites and associated disorders: A review. **J Cell Physiol**, Jan 29 2019. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30697723> >.

ALAYASH, A. I. Reactions of Sperm Whale Myoglobin with Hydrogen Peroxide. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** v. 274, p. 2029–2037, 1999.

_____. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells Mol Dis**, May 20 2017. ISSN 1096-0961 (Electronic) 1079-9796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28554826> >.

_____. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells Mol Dis**, v. 70, p. 78-86, May 2018. ISSN 1096-0961 (Electronic) 1079-9796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28554826> >.

ANIE, K. A. Psychological complications in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 129, n. 6, p. 723-9, Jun 2005. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952997> >.

ANSARI, F. A.; ALI, S. N.; MAHMOOD, R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1878-86, Oct 2015. ISSN 1879-3177 (Electronic) 0887-2333 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231821> >.

ARAGON-MARTINEZ, O. H. et al. A novel method for measuring the ATP-related compounds in human erythrocytes. **Tohoku J Exp Med**, v. 233, n. 3, p. 205-14, Jul 2014. ISSN 0040-8727.

ARDUINI, L. E., P. HOCHSTEIN, ET AL., . The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function for ergothioneine. **Arch. Biochem. Biophys.** , v. 281, p. 41-43,

ASHLEY-KOCH, A. E. et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5721-6, Jun 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187665> >.

ASLAN, M., BROWN, D., FREEMAN, B. . Reactive Species in Sickle Cell Disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 375-391, 2000.

BALLAS, S. K. et al. Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-55, 2012. ISSN 1537-744X.

BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle Cell Biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 345-367, 2010. ISSN 1523-9829 1545-4274.

BARODKA, V. et al. Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 434-44, Feb 2014. ISSN 1537-2995 (Electronic) 0041-1132 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781865> >.

BEDIRLI, A. et al. Ergothioneine pretreatment protects the liver from ischemia-reperfusion injury caused by increasing hepatic heat shock protein 70. **J Surg Res**, v. 122, n. 1, p. 96-102, Nov 2004. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522321> >.

BELCHER, J. D., BECKMAN, J.D., BALLA, G. ET AL. Heme Degradation and Vascular Injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, p. 234-248 2010.

BENFEITAS, R. et al. Hydrogen peroxide metabolism and sensing in human erythrocytes: a validated kinetic model and reappraisal of the role of peroxiredoxin II. **Free Radic Biol Med**, v. 74, p. 35-49, Sep 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952139> >.

BEUTLER, E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 10, p. 1957-1966, 1969.

BEUTLER, E. Red cell metabolism. **Bases moleculaires de la pathologie**, v. 54, p. 759-764, 1971.

_____. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. . **New York: Grune & Stratton**, 1975.

_____. G6PD deficiency. **Blood** v. 84, n. 11, p. 3613, 1994.

BISWAL, S. et al. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. **Hematology**, p. 1-9, Jul 16 2018. ISSN 1607-8454 (Electronic) 1024-5332 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30010491> >.

BORDIN, L. et al. Functional link between phosphorylation state of membrane proteins and morphological changes of human erythrocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 213, n. 1, p. 249-57, Aug 4 1995. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAGA, J. A. et al. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associacao Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular: Project guidelines:

Associação Médica Brasileira - 2016. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 38, n. 2, p. 147-57, Apr-Jun 2016. ISSN 1516-8484 (Print) 1516-8484 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208574> >.

CARRELL, R. W., WINTERBOURN, C.C, RACHMILEWITZ, E. A. Activated oxygen and haemolysis. **Br J Haematol** v. 30, p. 259-264, 1975.

CARVALHO, F. A. et al. Non-neuronal cholinergic system and signal transduction pathways mediated by band 3 in red blood cells. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 40, n. 3, p. 207-27, 2008. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

CARVALHO, F. A. et al. Modulation of erythrocyte acetylcholinesterase activity and its association with G protein-band 3 interactions. **J Membr Biol**, v. 228, n. 2, p. 89-97, Mar 2009. ISSN 1432-1424 (Electronic) 0022-2631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19294450> >.

CARVALHO, F. A. et al. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. **J Appl Toxicol**, v. 24, n. 6, p. 419-27, Nov-Dec 2004. ISSN 0260-437X (Print) 0260-437x.

CASTAGNOLA, M. et al. Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art. **Blood Transfus**, v. 8 Suppl 3, p. s53-8, Jun 2010. ISSN 1723-2007 (Print) 1723-2007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606750> >.

CASTILHOS, L. G. et al. Increased oxidative stress alters nucleosides metabolite levels in sickle cell anemia. **Redox Rep**, v. 22, n. 6, p. 451-459, Nov 2017a. ISSN 1743-2928 (Electronic) 1351-0002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209096> >.

_____. Increased oxidative stress alters nucleosides metabolite levels in sickle cell anemia. **Redox Rep**, p. 1-9, Feb 16 2017b. ISSN 1743-2928 (Electronic) 1351-0002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209096> >.

CHAVES, M. A.; LEONART, M. S.; DO NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, v. 13, n. 3, p. 187-92, Jun 2008. ISSN 1607-8454 (Electronic) 1024-5332 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18702879> >.

CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 5, p. 784-93, May 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001064> >.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, Jan 2012. ISSN 1521-6551 (Electronic) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131167> >.

COHEN, G. et al. Signaling properties of 4-hydroxyalkenals formed by lipid peroxidation in diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 978-987, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23973638> >.

DA SILVA, D. G. et al. Potential utility of melatonin as an antioxidant therapy in the management of sickle cell anemia. **J Pineal Res**, v. 58, n. 2, p. 178-88, Mar 2015. ISSN 0742-3098.

DANTAS, L. S. et al. Cholesterol secosterol aldehyde adduction and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase: Potential implications in ALS. **Redox Biol**, v. 19, p. 105-115, Oct 2018. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30142602> >.

DAS, S. K., AND NAIR, R. C. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. **Br. J. Haematol**, v. 44, n. 87-92, 1980.

DASGUPTA, T. H., R. P.; KAUL D. K. Protective Effect of Arginine on Oxidative Stress in Transgenic Sickle Mouse Models. **Free Radical Biology and Medicine** v. 41, p. 1771-1778, 2006.

DAVIDSON WD, T. K. Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. **Br J Haematol.**, v. 23, n. 3, p. 371-385, 1972.

DIEPSTRATEN, S. T.; HART, A. H. Modelling human haemoglobin switching. **Blood Rev**, v. 33, p. 11-23, Jan 2019. ISSN 1532-1681 (Electronic) 0268-960X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30616747> >.

ELLSWORTH, M. L. Red blood cell-derived ATP as a regulator of skeletal muscle perfusion. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 1, p. 35-41, Jan 2004. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707765> >.

ELUWA, E. O., OBIDOA, O., OGAN, A. U., ONWUBIKO, H. A. . Erythrocyte Membrane Enzymes in Sickle Cell Anemia 2. Acetylcholinesterase and ATPase Activities. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 4, p. 234-237, 1990.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 279, p. 73-83, Jan 5 2018. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29128605> >.

FARTHING, D. E.; FARTHING, C. A.; XI, L. Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 240, n. 6, p. 821-31, Jun 2015. ISSN 1535-3699 (Electronic) 1535-3699 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956679> >.

FERREIRA, A. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 10, p. 1097-1111, Oct 2008. ISSN 0946-2716 (Print) 0946-2716 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641963> >.

FIGUEIREDO, R. T. et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 282, n. 28, p. 20221-9, Jul 13 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502383> >.

FOLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB Life**, v. 60, n. 10, p. 661-8, Oct 2008. ISSN 1521-6551 (Electronic) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720418> >.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 850-8, Apr 2007. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404610> >.

GLADWIN, M. T.; KANIAS, T.; KIM-SHAPIRO, D. B. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1205-8, Apr 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22446184> >.

GOUVEIA, Z. et al. Characterization of plasma labile heme in hemolytic conditions. **FEBS J**, v. 284, n. 19, p. 3278-3301, Oct 2017. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28783254> >.

GOZZELINO, R.; SOARES, M. P. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 11, p. 1754-69, Apr 10 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24124891> >.

GRIFFITHS, W. J. et al. New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 162, p. 4-26, 2016. ISSN 09600760.

GUPTA, S. E. A. Correlation of red blood cell acetylcholinesterase enzyme activity with various RBC. **Ind J Clin Biochem** 2017.

HARE, G. M. et al. Plasma methemoglobin as a potential biomarker of anemic stress in humans. **Can J Anaesth**, v. 59, n. 4, p. 348-56, Apr 2012. ISSN 1496-8975 (Electronic) 0832-610X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271507> >.

HEBBEL, R., ET AL. Spontaneous Oxygen Radical Generation by Sick Erythrocytes. **The American Society for Clinical Investigation**, p. 1253-1259, 1982.

HEBBEL, R. P. et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 1, p. 237-41, Jan 1988. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The Endothelial Biology of Sick Cell Disease: Inflammation and a Chronic Vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004. ISSN 1073-9688 1549-8719.

HIERSO, R. et al. Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. **Br J Haematol**, v. 176, n. 5, p. 805-813, Mar 2017. ISSN 1365-2141 (Electronic) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27984639> >.

HOPPE, C. C. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 28, n. 2, p. 265-86, Apr 2014. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589266> >.

JANG, H. H. et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 625-35, May 28

2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163410> >.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, v. 1, p. 244-57, Feb 8 2013. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024158> >.

KASSA, T. et al. Sickle Cell Hemoglobin in the Ferryl State Promotes betaCys-93 Oxidation and Mitochondrial Dysfunction in Epithelial Lung Cells (E10). **J Biol Chem**, v. 290, n. 46, p. 27939-58, Nov 13 2015. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396189> >.

KATO, G. J. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc. **J Clin Invest**, v. 119, n. 8, p. 2140-2, Aug 2009. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620777> >.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, p. 18010, Mar 15 2018. ISSN 2056-676X (Electronic) 2056-676X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29542687> >.

KEDAR, P. et al. A microplate reader-based method to quantify NADH-cytochrome b5 reductase activity for diagnosis of recessive congenital methaemoglobinemia. **Hematology**, v. 22, n. 4, p. 252-257, May 2017. ISSN 1607-8454 (Electronic) 1024-5332 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863456> >.

KOBAYASHI, D. et al. Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. **Exp Hematol**, v. 32, n. 12, p. 1156-62, Dec 2004. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588940> >.

KUCUK, O. E. A. The effects of cholesterol oxidation products in sickle and normal red blood cell membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 296-302, 1992.

KUCUKAL, E. et al. Red Blood Cell Adhesion to Heme-Activated Endothelial Cells Reflects Clinical Phenotype in Sickle Cell Disease. **Am J Hematol**, Jun 15 2018. ISSN 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29905377> >.

KULIG, W. et al. Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chem Phys Lipids**, v. 199, p. 144-160, Sep 2016. ISSN 1873-2941 (Electronic) 0009-3084 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956952> >.

KUYPERS, F. A. Membrane Lipid Alterations in Hemoglobinopathies. **American society of haematology**, p. 68-73, 2007.

KUYPERS, F. A. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 28, n. 2, p. 155-79, Apr 2014. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589260> >.

LACHANT, N. A.; DAVIDSON, W. D.; TANAKA, K. R. Impaired pentose phosphate shunt function in sickle cell disease: a potential mechanism for increased Heinz body formation and membrane lipid peroxidation. **Am J Hematol**, v. 15, n. 1, p. 1-13, Aug 1983. ISSN 0361-8609 (Print) 0361-8609.

LACHANT, N. A.; ZEREZ, C. R.; TANAKA, K. R. Relationship between the nicotinamide adenine dinucleotide redox potential and the 2,3-diphosphoglycerate content in the erythrocyte in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 72, n. 2, p. 265-71, Jun 1989. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048.

LAGODA, G. et al. Sustained nitric oxide (NO)-releasing compound reverses dysregulated NO signal transduction in priapism. **FASEB J**, v. 28, n. 1, p. 76-84, Jan 2014. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076963> >.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 2, p. 235-42, Feb 2009. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004988> >.

LANG, E.; QADRI, S. M.; LANG, F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 8, p. 1236-43, Aug 2012. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561748> >.

LANG, K. S., LANG, P.A., BAUER, C., DURATON, C, ET AL. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. **Cell Physiol Biochem** v. 15, p. 195-202, 2005.

LARSEN, R. E. A. A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of severe sepsis. . **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 51, p. 51-71, 2010.

LAURENZA, I. E. A. Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action. **IOS Press**, v. 33, p. 237-247, 2008.

LAZZARETTI, L. L. et al. Blood Antioxidant Parameters in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State. **Journal of the National Medical Association**, v. 100, n. 8, p. 897-902, 2008. ISSN 00279684.

LIU, S. C., ET AL. Uncoupling of the Spectrin-Based Skeleton from the Lipid Bilayer in Sickled Red Cell. **American Association for the Advancement of Science**, v. 254, p. 574-577, 2016.

LOW, F. M. et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2611-7, Mar 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105810> >.

LOW, F. M.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 9, p. 1621-30, Sep 2008. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479207> >.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. **IUBMB Life**, v. 60, n. 2, p. 94-111, Feb 2008. ISSN 1521-6543 (Print) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18379999> >.

MANNERVIK, B. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. **The enzymes of glutathione metabolism: an overview.**, v. 15, n. 4, p. 717-718, 1987.

MANNU, F. E. A. Role of Hemichrome Binding to Erythrocyte Membrane in the Generation of Band-3 Alterations in P-Thalassemia Intermedia Erythrocytes. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 2014-2020, 1995.

MANSANO, F. V. et al. Highly sensitive fluorescent method for the detection of cholesterol aldehydes formed by ozone and singlet molecular oxygen. **Anal Chem**, v. 82, n. 16, p. 6775-81, Aug 15 2010. ISSN 0003-2700.

MATTE, A. et al. Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. **Free Radic Biol Med**, v. 55, p. 27-35, Feb 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123411> >.

MATYASH, V. et al. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 5, p. 1137-1146, 2008. ISSN 0022-2275 1539-7262.

MC DONALD, J. H. Handbook of biological statistics. . **3rd ed. Batimore: Sparky House Publishing**, 2014.

MESQUITA, R. et al. Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 25, n. 3-4, p. 153-63, 2001. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

MESSANA, I. et al. Human erythrocyte metabolism is modulated by the O₂-linked transition of hemoglobin. **FEBS Lett**, v. 390, n. 1, p. 25-8, Jul 15 1996. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

MEZZANO, D. et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 95, n. 01, p. 94-99, 2017. ISSN 0340-6245 2567-689X.

MITSUYAMA, H. A. M., M. J. Uptake and antioxidant effects ofUptake and antioxidant effects ofUptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes **Clinical Science** v. 97, p. 407-411, 1999.

MIYAMOTO, S. E. A. Direct Evidence of Singlet Molecular Oxygen [O₂ (1Δg)] Production in the Reaction of Linoleic Acid Hydroperoxide with Peroxynitrite. **J AM CHEM. SOC.**, v. 125, p. 4510-4517, 2003.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939-48, Nov 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988878> >.

NEMKOV, T. et al. Metabolomics in transfusion medicine. **Transfusion**, v. 56, n. 4, p. 980-93, Apr 2016. ISSN 1537-2995 (Electronic) 0041-1132 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26662506> >.

NEY, P. A., ET AL Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. **Blood**, v. 75, p. 1192-1198, 1990.

NUR, E. et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 11, p. 1412-7, Nov 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558001> >.

ODEH, M., J. The Role of Reperfusion-Induced Injury in the Pathogenesis of the Crush Syndrome. **The new england journal of medicine**, v. 324 p. 1417-1422, 1991.

OSAROGIAGBON UR, C. S., BELCHER JD, ET AL. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. . **Blood**, v. 96, p. 314-320, 2000.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of Oxidative Stress in Red Blood Cells. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 2, p. 131-136, 2011. ISSN 12138118 18047521.

PANTALEO, A. et al. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 6, p. 457-62, Jun 2008. ISSN 1568-9972 (Print) 1568-9972 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558362> >.

PARROW, N. L. et al. Measurements of red cell deformability and hydration reflect HbF and HbA2 in blood from patients with sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 65, p. 41-50, Jun 2017. ISSN 1096-0961 (Electronic) 1079-9796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472705> >.

PATAJ, Z. et al. Quantification of oxysterols in human plasma and red blood cells by liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1439, p. 82-88, Mar 25 2016. ISSN 1873-3778 (Electronic) 0021-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607314> >.

PAUL, B. D.; SNYDER, S. H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 7, p. 1134-40, Jul 2010. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911007> >.

PERRONE, S. et al. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. Suppl 5, p. 104-8, Oct 2012. ISSN 1476-4954 (Electronic) 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23025782> >.

PIEL, F. B. et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. **Sci Rep**, v. 3, p. 1671, 2013. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591685> >.

PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142-151, 2013. ISSN 01406736.

PRIES, A., S., ET AL. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature **Cardiovascular Research** v. 32, p. 654-667, 1996.

QUINN, C. T. et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **Am J Hematol**, v. 91, n. 12, p. 1195-1201, Dec 2016. ISSN 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648808> >.

QUINN GP, K. M. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. **New York: Cambridge University Press**, 2002.

REID, M. J., F. Glutathione in disease. . **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 4, p. 65-71, 2001.

REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med**, v. 8, n. 12, p. 1383-9, Dec 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426562> >.

RHEE, S. G. Overview on Peroxiredoxin. **Mol Cells**, v. 39, n. 1, p. 1-5, Jan 2016. ISSN 0219-1032 (Electronic) 1016-8478 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26831451> >.

RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Front Physiol**, v. 5, p. 500, 2014. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642190> >.

RODRIGUEZ-ARIZA, A.; TORIBIO, F.; LOPEZ-BAREA, J. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v. 656, n. 2, p. 311-8, Jun 17 1994. ISSN 1572-6495 (Print) 1572-6495.

ROGERS, S. C. et al. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. **Blood**, v. 121, n. 9, p. 1651-62, Feb 28 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297128> >.

ROMANA, M.; CONNES, P.; KEY, N. S. Microparticles in sickle cell disease. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 68, n. 2-3, p. 319-329, 2018. ISSN 1875-8622 (Electronic) 1386-0291 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614639> >.

ROUMENINA, L. T. et al. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 3, p. 200-213, Mar 2016. ISSN 1471-499X (Electronic) 1471-4914 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26875449> >.

SAKRAK, O. et al. Ergothioneine modulates proinflammatory cytokines and heat shock protein 70 in mesenteric ischemia and reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 144, n. 1, p. 36-42, Jan 2008. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603080> >.

SALDANHA, C. Physiological role of erythrocyte nitric oxide. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 64, n. 4, p. 517-520, 2016. ISSN 1875-8622 (Electronic) 1386-0291 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27767981> >.

_____. Human Erythrocyte Acetylcholinesterase in Health and Disease. **Molecules**, v. 22, n. 9, Sep 8 2017. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28885588> >.

SALDANHA, C. et al. Modulation of erythrocyte hemorheological properties by band 3 phosphorylation and dephosphorylation. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 36, n. 3, p. 183-94, 2007. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

SANKARAN, V. G.; WEISS, M. J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nat Med**, v. 21, n. 3, p. 221-30, Mar 2015. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742458> >.

SANTOS, T. et al. Effects of choline on hemorheological properties and NO metabolism of human erythrocytes. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 29, n. 1, p. 41-51, 2003. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

SAÚDE, M. D. Doença Falciforme: o que deve saber sobre herança. p. 1-49, 2014.

SCHACTER, L., WARTH, J. A., GORDON, E. M., PRASAD, A., & KLEIN, B. L. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **The FASEB Journal**, v. 2, n. 3, p. 237-243, 1988.

SCHAER, D. J. et al. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. **Front Physiol**, v. 5, p. 415, 2014. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389409> >.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3928, 2008.

SHINAR, E. E. A. Differing Erythrocyte Membrane Skeletal Protein Defects in Alpha and Beta Thalassemia. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 404-410, 1989.

SHOHET, S. K. J. A. S. B. A Novel Phospholipid in Irreversibly Sickled Cells: Evidence for In Vivo Peroxidative Membrane Damage in Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 63, p. 362-367, 1984.

SIES H, K. O., MARTINO E, BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SILVA, D. G. et al. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1101-9, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002011> >.

SILVA, D. G. H. et al. Oxidative Stress and Sickle Cell Disease. In: AHMAD, S. (Ed.). **Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health**. 1. Boca Raton: CRC Press, 2016. cap. 24, p.335-347.

SILVA, D. G. H. et al. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1101-1109, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002011> >.

SOARES, M. P.; BOZZA, M. T. Red alert: labile heme is an alarmin. **Curr Opin Immunol**, v. 38, p. 94-100, Feb 2016. ISSN 1879-0372 (Electronic) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26741528> >.

SOTGIA, S. et al. Quantification of L-ergothioneine in whole blood by hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography and UV-detection. **J Sep Sci**, v. 36, n. 6, p. 1002-6, Mar 2013. ISSN 1615-9314 (Electronic) 1615-9306 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418129> >.

STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol**, v. 87, n. 8, p. 795-803, Aug 2012. ISSN 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641398> >.

STOFFELS, C. et al. Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: Resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity. **Free Radic Biol Med**, v. 113, p. 385-394, Dec 2017. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074402> >.

SUN, K. et al. Structural and Functional Insight of Sphingosine 1-Phosphate-Mediated Pathogenic Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Disease. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 15281, Nov 10 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29127281> >.

TANG, R. M. Y. et al. Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. ISSN 2045-2322.

TANG, R. M. Y. et al. Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1601, Jan 25 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371632> >.

TATUM, V. L., AND CHOW, C. K. . Antioxidant Status and Susceptibility of Sickle Erythrocytes to Oxidative and Osmotic Stress. **Free Radic Biol Med**, v. 25, p. 133-139, 1996.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** v. 27, p. 502-522, 1969.

UMBREIT, J. Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. **Am J Hematol**, v. 82, n. 2, p. 134-44, Feb 2007. ISSN 0361-8609 (Print) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986127> >.

VAN WIJK, R.; VAN SOLINGE, W. W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4034-42, Dec 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051738> >.

VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radic Biol Med**, v. 67, p. 377-86, Feb 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316370> >.

VEJUX, A.; LIZARD, G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospho lipidosis. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 3, p. 153-70, Jun 2009. ISSN 1872-9452 (Electronic) 0098-2997 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19248805> >.

VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **Br J Haematol**, v. 139, n. 2, p. 173-84, Oct 2007. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897293> >.

VERCELLOTTI, G. M. et al. Hepatic Overexpression of Hemopexin Inhibits Inflammation and Vascular Stasis in Murine Models of Sickle Cell Disease. **Mol Med**, v. 22, p. 437-451, Sep 2016. ISSN 1528-3658 (Electronic) 1076-1551 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27451971> >.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in beta-thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biol**, v. 6, p. 226-39, Dec 2015. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285072> >.

WALTER, P. B. E. A. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease. **Br J Haematol.**, v. 135, n. 2, p. 254-263, 2006.

WEATHERALL, D. J. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. **Br J Haematol**, v. 154, n. 6, p. 736-44, Sep 2011. ISSN 1365-2141 (Electronic) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726207> >.

WOOD, B. D. F. G., AND JONATHAN F. TAIL. Increased Erythrocyte Phosphatidylserine Exposure in Sickle Cell Disease: Flow-Cytometric Measurement and Clinical Associations. **Blood**, v. 88, p. 1873-1880, 1996.

WOOD Z, A., ET AL. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 32-40 2003.

WRIGHT, D. L.; PLUMMER, D. T. Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes. **Biochem J**, v. 133, n. 3, p. 521-7, Jul 1973. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Web Server issue, p. W652-60, Jul 2009. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429898> >.

XU, W. et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. **Neuroscience**, v. 126, n. 2, p. 313-23, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207349> >.

YAWATA, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell As a Model. **Cell Membrane: The Red Blood Cell As a Model**, p. 133-150 2003.

YEUNG, P. K. et al. Adenosine 5'-Triphosphate Metabolism in Red Blood Cells as a Potential Biomarker for Post-Exercise Hypotension and a Drug Target for Cardiovascular Protection. **Metabolites**, v. 8, n. 2, May 2 2018. ISSN 2218-1989 (Print) 2218-1989 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29724022> >.

YU, D. et al. The effects of edible chitosan-based coatings on flavor quality of raw grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 242, p. 412-420, 2018. ISSN 03088146.

ZEREZ, C. R. et al. Decreased erythrocyte nicotinamide adenine dinucleotide redox potential and abnormal pyridine nucleotide content in sickle cell disease. **Blood**, v. 71, n. 2, p. 512-5, Feb 1988. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971.

ZEREZ, C. R., LACHANT, N.A. TANAKA, K.R Impaired Erythrocyte Methemoglobin Reduction in Sickle Cell Disease: Dependence of Methemoglobin Reduction on Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Content. **Blood**, v. 76, p. 1008-1014, 1990.

ZHANG, Y. et al. Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. **J Clin Invest**, v. 124, n. 6, p. 2750-61, Jun 2014. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837436> >.

ZHANG, Z. Z. et al. Glutathione Depletion, Pentose Phosphate Pathway Activation, and Hemolysis in Erythrocytes Protecting Cancer Cells from Vitamin C-induced Oxidative Stress. **J Biol Chem**, v. 291, n. 44, p. 22861-22867, Oct 28 2016. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27660392> >.

ZHU, B. Z. E. A. Ergothioneine Prevents Copper-Induced Oxidative Damage to DNA and Protein by Forming a Redox-Inactive Ergothioneine-Copper Complex. **Chem. Res. Toxicol.** , v. 24, p. 30-34, 2011.