

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 6/03/2028.



Ana Clara Albertin Zucão

**Influência do uso de hidroxycarbamida sobre o papel do sistema ubiquitina-proteassomo
na homeostasia redox de células falcêmicas**

Ana Clara Albertin Zucão

Influência do uso de hidroxycarbamida sobre o papel do sistema ubiquitina-proteassomo na homeostasia redox de células falcêmicas

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

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

Orientador: Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Marilene Demasi

São José do Rio Preto

2024

Z94i

Zucão, Ana Clara Albertin

Influência do uso de hidroxycarbamida sobre o papel do sistema ubiquitina-proteassomo na homeostasia redox de células falcêmicas. /

Ana Clara Albertin Zucão. -- São José do Rio Preto, 2024

60 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: Marilene Demasi

1. Anemia Falciforme. 2. Hidroxiureia. 3. Proteassomon. 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(a).

Essa ficha não pode ser modificada

Ana Clara Albertin Zucão

Influência do uso de hidroxycarbamida sobre o papel do sistema ubiquitina-proteassomo na homeostasia redox de células falcêmicas

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

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

Comissão Examinadora

Prof Dr. Danilo Grünig Humberto da
Silva UNESP – Câmpus de São José
do Rio Preto Orientador

Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Debora Pires de Campos Zuccari
FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto
6 de março de 2024

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva por me ensinar o fazer ciência e por enxergar seus alunos com tanta empatia. Agradeço por todos os conselhos acadêmicos e de vida, e por toda confiança em mim depositada. Durante esses dois anos sua orientação foi imprescindível ao meu desenvolvimento, permitindo que enxergasse a beleza de ser um cientista. O meu muito obrigada.

Agradeço à minha coorientadora Prof^a. Dr^a Marilene Demasi por ter aberto seu laboratório e compartilhado seu conhecimento comigo. Obrigada por toda sua disponibilidade e paciência ao ensinar.

Aos profissionais do Hemocentro de São José do Rio Preto e aos pacientes que aceitaram fazer parte desse trabalho o meu muito obrigada. Vocês foram a principal força motriz dessa pesquisa e pela busca de sempre tentar fazer o melhor.

Ao grupo de pesquisa do NPBIM da faculdade de medicina de São José do Rio Preto, por me receberem no laboratório, pelo acolhimento científico e pessoal. Todo o meu carinho por todos que me ajudaram e contribuíram de alguma forma com a minha pesquisa e meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço à minha família por todo suporte dado durante minha trajetória acadêmica. Em especial, agradeço à minha mãe Magda pelo exemplo de mulher, força e resiliência que é, por ter sido meu porto seguro e meu impulso para continuar e acreditar na minha capacidade. Esse trabalho também é um fruto seu. Aos meus tios Paulo e Marli, primos Saulo e Carol, e ao meu irmão Gabriel, pelo apoio incondicional à minha formação, pelas preces e torcida nos momentos mais decisivos. Espero um dia fazer por alguém, o que vocês fizeram por mim

Ao Pedro e sua família, que me conheceram durante esse processo e me acolheram. Obrigada pelo incentivo, apoio e por todos os conselhos. Vocês se tornaram minha casa longe de casa.

Aos meus amigos de apartamento Karina e Rodrigo, vocês foram como irmãos. Agradeço pela convivência, por todas as risadas, desabafos e conselhos que fizemos. Espero que vocês voem cada vez mais alto e alcancem todos os seus sonhos. O apartamento 21 sempre ficará nas minhas melhores lembranças.

Às amigas do grupo de pesquisa Flaviene, Victoria, Amanda e Ilana, nossas conversas e trocas de experiências foram valiosas nesse período. É lindo ver mulheres tão incríveis escrevendo suas trajetórias de forma tão brilhante e honesta.

Agradeço também à espiritualidade que nunca me desamparou e que me deu forças para continuar, quando eu já não tinha.

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

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hemolítica caracterizada por uma série de complicações decorrentes do estresse oxidativo constante. Esse fenômeno desencadeia a produção exacerbada de pró-oxidantes, os quais promovem danos severos às macromoléculas celulares, culminando na formação de eritrócitos densos, com uma densidade superior a 1,11 g/mL. Sabe-se que o sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) é um dos principais mecanismos de degradação de proteínas com anomalias estruturais ou com danos oxidativos, sendo fundamental para a homeostasia celular. Diante desse cenário, este estudo se propôs a investigar a relação entre o estresse oxidativo característico das células falciformes e a atividade do sistema UPS, com um enfoque especial na influência do tratamento com hidroxycarbamida (HC). Para tal, foram avaliados 9 indivíduos controles (CG), 10 com AF tratados (HC^+) e 10 sem tratamento (HC^-). Dos indivíduos com AF obteve-se, por centrifugação, os subconjuntos celulares de baixa densidade (LDSC – *low dense sickle cells*) e de alta densidade (HDSC - *high dense sickle cells*), associadas ao envelhecimento celular. A atividade proteassômica do tipo quimiotripsina (ChT-L) e tripsina (T-L) foram analisadas nos extratos proteicos sem purificação e purificados por coluna DEAE- Sepharose, enquanto a expressão do core do proteassomo 20S e imunoproteassomo foi avaliada por imunomarcagem. Nossos resultados demonstraram, no conjunto completo de hemácias, um aumento da atividade T-L para o grupo HC^- em relação ao CG ($p<0,01$). No entanto, este grupo apresentou a menor expressão do proteassomo 20S em relação aos demais grupos de estudo ($p<0,01$). Após a eliminação da hemoglobina e outras proteínas do eritrócito pela purificação, verificou-se uma mudança do perfil de atividade ChT- L, uma vez CG apresentou maior atividade em relação a HC^+ e atividades semelhantes entre HC^+ e HC^- ($p=0,04$). O efeito do envelhecimento eritrocitário foi verificado, indicando um aumento na atividade Cht-L ($p<0,01$) e T-L ($p<0,01$) nos conjuntos LDSC- HC^- em relação aos de HDSC- HC^- . No extrato proteico purificado, notou-se a mudança do perfil da atividade, com o grupo CG apresentando os maiores valores de atividade, porém sem qualquer efeito estatisticamente significativo entre os subconjuntos celulares independente do uso de HC ($p=0,22$). Por fim, encontramos, alta expressão de subunidades do imunoproteassomo nas células do grupo HC^- . Deste modo, embora a HC tenha demonstrado melhorar o controle de qualidade das proteínas nas células falciformes, esse efeito antioxidante não se traduziu em mudanças significativas na atividade proteassômica, independentemente do tipo de extrato proteico ou do envelhecimento celular. Além disso, fornecemos a evidência preliminar da presença do imunoproteassomo nas hemácias e a influência do tratamento com HC em sua expressão, sugerindo que a relação entre o tratamento com HC e o UPS na manutenção da homeostase redox nas células falcêmicas é muito mais complexa do que foi explorado até o momento.

Palavra-chave: Anemia Falciforme. Hidroxiureia. Proteassomo

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hemolytic disease characterized by complications from constant oxidative stress. This phenomenon triggers the exacerbated production of pro-oxidants, which promote severe damage to cellular macromolecules, culminating in dense erythrocytes with a density of more than 1.11 g/mL. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is known to be one of the primary mechanisms for the degradation of proteins with structural anomalies or oxidative damage and is essential for cellular homeostasis. Given this scenario, this study set out to investigate the relationship between the oxidative stress characteristic of sickle cells and the activity of the UPS system, with a special focus on the influence of treatment with hydroxycarbamide (HC). To this end, nine control individuals (CG), 10 treated AF individuals (HC⁺), and ten untreated individuals (HC⁻) were evaluated. The low-dense sickle cells (LDSC) and high-dense sickle cells (HDSC), associated with cellular aging, were obtained by centrifugation. Chymotrypsin-like (ChT-L) and trypsin-like (T-L) proteasome activity was analyzed in the protein extracts without purification and purified by DEAE-Sepharose column, while the expression of the 20S proteasome core and immunoproteasome was evaluated by immunolabeling. Our results showed an increase in T-L activity for the HC⁻ group compared to the CG group ($p < 0.01$). However, this group showed the lowest expression of the 20S proteasome compared to the other study groups ($p < 0.01$). After the elimination of hemoglobin and other erythrocyte proteins by purification, there was a change in the ChT-L activity profile since CG showed higher activity compared to HC⁺ and similar activities between HC⁺ and HC⁻ ($p = 0.04$). The effect of erythrocyte aging was verified, indicating an increase in ChT-L ($p < 0.01$) and T-L ($p < 0.01$) activity in LDSC-HC⁻ sets compared to HDSC-HC⁻ sets. In the purified protein extract, there was a change in the activity profile, with the CG group showing the highest activity values but without any statistically significant effect between the cell subsets regardless of the use of HC ($p = 0.22$). Finally, we found high expression of immunoproteasome subunits in the cells of the HC⁻ group. Thus, although HC has been shown to improve protein quality control in sickle cells, this antioxidant effect has yet to translate into significant changes in proteasome activity, regardless of the type of protein extract or cell aging. In addition, we provide preliminary evidence of the presence of the immunoproteasome in RBCs and the influence of HC treatment on its expression, suggesting that the relationship between HC treatment and the UPS in maintaining redox homeostasis in sickle cells is much more complex than has been explored to date.

Keyword: Sickle Cell Anemia. Hydroxyurea. Proteasome

Lista de Figuras

Figura 1- Membrana plasmática eritrocitária	18
Figura 2. Fisiopatologia da anemia falciforme	21
Figura 3. Processo de marcação pela ubiquitina	26
Figura 4- Representação dos subtipos de proteassomos.	28

Manuscrito “The relationship between hydroxycarbamide treatment and ubiquitin-proteasome system in the maintenance of redox homeostasis in sickle cells”.

Figure 1. Proteasome activity in SCA... ..	37
Figure 2. Expression of the 20S proteasome in SCA... ..	38
Figure 3. Chymotrypsin-like activity in the purified extract... ..	39
Figure 4. Proteasomal activity in cells of different densities... ..	40
Figure 5. Immunoproteasome activity	42

Lista de Tabela

Manuscrito “The relationship between hydroxycarbamide treatment and ubiquitin-proteasome system in the maintenance of redox homeostasis in sickle cells”.

Table 1. *Description of patients with SCA*.....34

Lista de Abreviaturas

AF	Anemia Falciforme
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
desoxiHb	Hb desoxigenada
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ubiquitina ligase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GLM	<i>General Linear Models</i>
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione-S-Transferase
GSSG	Glutathione dissulfeto
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina adulta
Hb F	Hemoglobina Fetal
<i>HBB</i>	Gene beta globina
Hb ferril	HbFe(IV)=O
Hb S	Hemoglobina S
HC	Hidroxycarbamida
HC ⁻	Grupo não tratado
HC ⁺	Grupo tratado
HDSC	<i>High dense sickle cell</i>
ISC	<i>Irreversible sickle cell</i>
LDSC	<i>Low dense sickle cell</i>
Lis	Lisina

MetHb	Metahemoglobina
OxiFerrilHb	•HbFe(IV)=O
PRX	Peroxirredoxina
SOD	Superóxido Dismutase
Ub	Ubiquitina
UPS	Sistema Ubiquitina Proteassomo

SÍMBOLOS

α Gene alfa
 β Gene beta
g Giros

Lista de Fórmulas Químicas

Ca ²⁺	Cálcio
KCl	Cloreto de potássio
NaCl,	Cloreto de sódio
CO ₂	Dióxido de carbono
Fe	Ferro
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio monobásico
CO	Monóxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Radical ânion Superóxido
OH	

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 p o r mililitros
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

Prefácio	15
1. Introdução	16
1.1. Eritrócito Humano.....	16
1.1.1. Estrutura e função	16
1.1.2. Espécies Reativas no Eritrócito Saudável	18
1.1.3. Sistema Antioxidante no Eritrócito Saudável.	19
1.2. Anemia Falciforme.....	20
1.2.1. Tratamento com Hidroxicarbamida.....	22
1.2.2. Estresse Oxidativo na Anemia Falciforme.....	22
1.2.3. Estresse Oxidativo e a Formação de Células Densas na Anemia Falciforme	23
1.3. Sistema Ubiquitina- Protassomo (UPS)	24
1.3.1. Sistema Ubiquitina-Proteassomo e Anemia Falciforme	28
2. Objetivos	30
2.1. Objetivos Específicos	30
3. <i>The relationship between hydroxycarbamide treatment and ubiquitin-proteasome system in the maintenance of redox homeostasis in sickle cells</i>	31
4. Conclusões	49
REFERÊNCIAS	50
Apêndice A	59
Apêndice B.....	60

Prefácio

A presente dissertação está sendo apresentada na forma de manuscrito a ser submetido em revista internacional indexada, intitulado “The relationship between hydroxycarbamide treatment and ubiquitin-proteasome system in the maintenance of redox homeostasis in sickle cells”. O manuscrito será submetido na revista “*Experimental Hematology*”, com fator de impacto (2022) 2,6 e Qualis/Capes – Ciências Biológicas I e II: A3.

A introdução apresenta uma revisão da literatura sobre o eritrócito humano saudável e estresse oxidativo, a fisiopatologia da anemia falciforme (AF) e seu tratamento, o estresse oxidativo nos eritrócitos falciformes e seu papel formação das células densas, os componentes do sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) e sua relação com a AF. Em sequência, foram apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos do trabalho. A metodologia, os resultados e discussões foram apresentados na forma do manuscrito, em língua inglesa, que será formatado de acordo com as normas da revista. Por fim, apresentamos as conclusões finais do trabalho.

1. Introdução

1.1. Eritrócito Humano

1.1.1 Estrutura e função

Formados a partir de um processo de maturação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, os eritrócitos ou glóbulos vermelhos são as células mais prevalentes e uma das mais diferenciadas no organismo humano (FÖLLER; HUBER; LANG, 2008; LANG; QADRI; LANG, 2012). Sua principal função é o transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões aos tecidos periféricos e do transporte de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões (LANG; QADRI; LANG, 2012). Essa troca gasosa é mediada pela hemoglobina (Hb), proteína altamente concentrada no interior dos glóbulos vermelhos maduros (PANDEY; RIZVI, 2011a). A Hb adulta normal (Hb A) é composta por duas cadeias globínicas do tipo alfa (α), duas cadeias do tipo beta (β), cada uma delas contendo um grupo prostético heme, que por sua vez, apresenta um átomo de ferro com alta afinidade ao O_2 (KATO et al., 2018; KOSMACHEVSKAYA; TOPUNOV, 2018). Além disso, os eritrócitos atuam na regulação da homeostase ácido-base, mantendo o pH sanguíneo dentro dos limites fisiológicos adequados e do metabolismo de óxido nítrico (NO) dependente do O_2 (KOSMACHEVSKAYA; TOPUNOV, 2018).

Por atravessarem todo o sistema circulatório humano, os eritrócitos são submetidos ao cisalhamento contínuo, assim como à exposição constante à espécies reativas de oxigênio (ERO) endógenas e exógenas (PANDEY; RIZVI, 2011a; RISINGER; KALFA, 2020). No primeiro caso, tanto a deformabilidade celular quanto a integridade estrutural dos glóbulos vermelhos dependem da organização e composição da membrana plasmática eritrocitária, bem como de sua interação com os elementos do citoesqueleto (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008). A membrana plasmática eritrocitária é uma bicamada fosfolipídica, constituída majoritariamente por proteínas, lipídeos, água e carboidratos (DE OLIVEIRA; SALDANHA, 2010; FARAG; ALAGAWANY, 2018). Em peso, as proporções de colesterol e fosfolipídios são iguais, mas apresentam disposições diferentes na bicamada (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008). Enquanto o colesterol é disposto de forma simétrica, os fosfolipídios são distribuídos assimetricamente, de modo que a fosfatidilcolina e a esfingomielina encontram-se presentes na monocamada externa e a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilserina (FS) assim como outros constituintes menores, fazem parte da monocamada interna (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008).

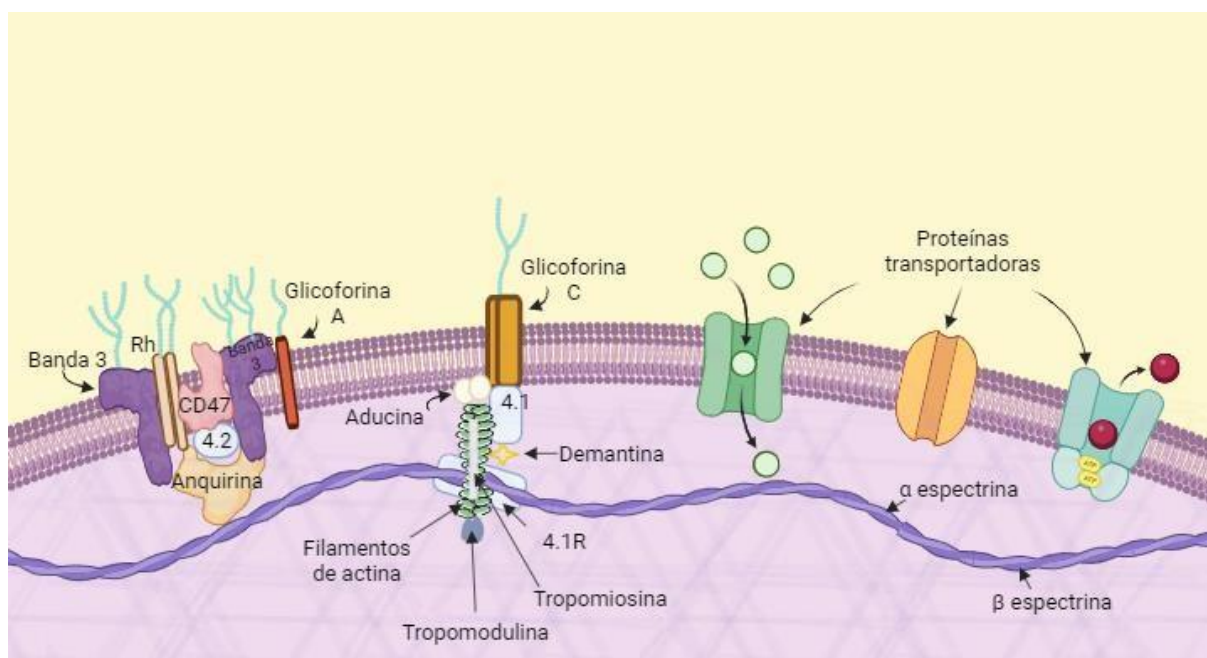
Essa composição é mantida por meio de enzimas como as scramblases, flipases e flopases, que são responsáveis pela translocação dos fosfolipídios entre e dentre as duas monocamadas da membrana eritrocitária (DALEKE, 2008; SAKURAGI; NAGATA, 2023; SIMS; WIEDMER, 2001). Esse transporte e, principalmente, a manutenção da FS na camada interna da membrana, garantem a sobrevivência da célula, uma vez que a exposição desse fosfolipídio leva ao reconhecimento e fagocitose do eritrócito por macrófagos, além de promover adesão às células endoteliais vasculares (WOOD; GIBSON; TAIT, 1996). Portanto, a perda da assimetria pode levar à destruição prematura das hemácias, um fenômeno observado em doenças como talassemias e a anemia falciforme (AF) (WOOD; GIBSON; TAIT, 1996)

A constituição proteica do eritrócito pode ser dividida em proteínas integrais e periféricas. As proteínas integrais são aquelas que penetram ou estão embebidas na membrana, fortemente ligadas aos lipídeos (MURADOR; DEFFUNE, 2007). Os principais representantes desse grupo são as proteínas da banda-3 e glicoforinas (Figura 1) (MURADOR; DEFFUNE, 2007). A proteína banda-3 é composta por um domínio citoplasmático N-terminal que se associa a outras proteínas como a anquirina, proteínas 4.1 e 4.2, sendo um local de ancoragem do citoesqueleto à membrana plasmática eritrocitária. Em contrapartida, seu domínio C-terminal, está relacionado ao transporte de íons cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) pela membrana (DE OLIVEIRA; SALDANHA, 2010; LUX, 2016; REMIGANTE; MORABITO; MARINO, 2021). As glicoforinas (A, B, C e D), por sua vez, atuam no reconhecimento célula-célula e na especificidade dos grupos sanguíneos (MURADOR; DEFFUNE, 2007). Há também outras proteínas com função de transporte como a Aquaporina 1, relacionada ao transporte de água e outras substâncias pela membrana (AZOUZI et al., 2013; KOURGHI et al., 2018; MATHAI et al., 1996) o Transportador de Glicose 1 (Glut 1), o qual é responsável pelo transporte da glicose, principal fonte energética do glóbulo vermelho (GUIZOUARN; ALLEGRI, 2020), os Cotransportadores de Potássio e Cloreto (KCC), relacionados a homeostase iônica e ao volume celular (LAUF; ADRAGNA, 2000) e os Canais de Gardos ativados por cálcio (Ca^{2+}), também relacionados ao volume celular (VOSKOU et al., 2015).

As proteínas periféricas da membrana também são conhecidas como proteínas do citoesqueleto. Esse grupo é composto pelas proteínas espectrina α e β , actina, proteínas da banda 4.1 e 4.2, demantinas, aducinas, tropomiosina e tropomodulina, que são responsáveis pela estabilidade, flexibilidade e formato das hemácias (Figura 1) (SALOMAO et al., 2008). A rede que forma o citoesqueleto é composta por tetrâmeros de espectrina, nos quais a α -espectrina e β -espectrina se dimerizam (SHOTTON; BURKE; BRANTON, 1979) e se associam, nas

extremidades, ao complexo juncional formado por um protofilamento de actina F e proteínas de ligação (proteína da banda 4.1, demantinas, aducinas, tropomiosina e tropomodulina) à actina que estabilizam a interação espectrina-actina (BASU; CHAKRABARTI, 2015; RISINGER; KALFA, 2020; SALOMAO et al., 2008). Cerca de seis tetrâmeros de espectrina se ligam ao complexo, formando uma rede hexagonal ancorada à membrana pela ligação à banda 3, mediada pela anquirina e pela interação com a Glicoforina C, por meio da proteína 4.1 (LIU; DERICK; PALEK, 1987; REID et al., 1990; RISINGER; KALFA, 2020).

Figura 1 - Membrana plasmática eritrocitária.



A estrutura da membrana plasmática é composta por duas categorias principais de proteínas: as integrais, como a banda 3, glicoforinas e proteínas transportadoras e as periféricas, que formam o citoesqueleto. O citoesqueleto é formado pela dimerização da α e β espectrina, que se associam em sua extremidade pelo complexo juncional composto por filamentos de actina, tropomiosina, tropomodulina, demantina, actina e proteína 4.1 e se ancoram à membrana pela interação com as glicoforinas C e proteína banda 3, nesse caso, mediada pela anquirina e proteína 4.2. **Fonte:** autoria própria (criado em Biorender.com)

1.1.2. Espécies Reativas no Eritrócito Saudável

O estresse oxidativo costuma ser definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies pró-oxidantes e a capacidade antioxidante do organismo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Pode-se dizer que o eritrócito está em estresse oxidativo contínuo quando há altas tensões de O_2 no sangue arterial e pela abundância de Hb e ferro em seu interior (CIMEN, 2008). A ligação do O_2 à Hb [$Hb(FeII)O_2$] ocorre de modo reversível, formando uma estrutura relativamente estável (UMBREIT, 2007). No entanto, a exposição constante do ferro ferroso (FeII) da Hb a altas concentrações de O_2 pode acarretar na lenta auto-oxidação da proteína, gerando metahemoglobina (metHb) [$Hb(FeIII)$] e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), espécie

capaz de causar danos nas membranas e proteínas celulares (PANDEY; RIZVI, 2011; WALLACE; MAXWELL; CAUGHEY, 1974).

Devido à alta concentração de Hb nos eritrócitos humanos, a autooxidação desta proteína é um dos principais processos responsáveis pela geração de ERO endógeno (UMBREIT, 2007; VAN ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014a; VOSKOU et al., 2015). Apesar de ocorrer a uma taxa de 0,5 a 3% por dia e ser revertida pela ação da enzima NADH-citocromo b5 redutase (metHb redutase), a formação de metHb pode ser aumentada em situações de hipóxia e nos casos de Hb variante com processo autoxidativo instável, como a Hb S, presente na AF (UMBREIT, 2007; VAN ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014a).

O ferro e o grupamento heme também são fontes oxidantes no eritrócito humano. O ferro na forma livre ou ligado a Hb pode atuar na reação de Fenton e Haber-Weiss gerando radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) que, devido a sua alta reatividade e baixa especificidade, pode causar diversos danos às biomoléculas (BOU-FAKHREDIN et al., 2022; SADRZADEH et al., 1984). Devido a seu caráter hidrofóbico, o heme livre pode se intercalar à membrana, aumentando sua suscetibilidade à ação de oxidantes, promovendo reações oxidativas com lipídeos e proteínas (BELCHER et al., 2010; BOU-FAKHREDIN et al., 2022; VOSKOU et al., 2015). Essa série de oxidações lipídicas e proteicas podem resultar na desorganização da membrana do eritrócito e na alteração de sua deformabilidade celular, impactando, portanto, a sobrevivência celular e a qualidade da circulação pelos capilares sanguíneos (BELCHER et al., 2010; BOU-FAKHREDIN et al., 2022).

1.1.3. Sistema Antioxidante no Eritrócito Saudável.

Os eritrócitos sobrevivem, em média, por 120 dias na circulação, onde são expostos a diversos estressores e agentes oxidantes. De modo a minimizar os danos oxidativos, os glóbulos vermelhos são equipados com um sistema antioxidante enzimático e não enzimático eficiente (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014; MÖLLER et al., 2022).

O $\text{O}_2^\bullet$ gerado durante a formação da metHb é dismutado em O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; VOSKOU et al., 2015). O H_2O_2 , por sua vez, pode ser também decomposto em O_2 e duas moléculas de água pela ação da catalase (CAT) (VOSKOU et al., 2015) ou reagir com as peroxirredoxinas (Prx) (WOOD et al., 2003) e glutatonas peroxidases (GPx) (COHEN; MANNERVIK, 1987). Em mamíferos, são conhecidas seis isoformas de Prx encontradas em

diferentes compartimentos celulares como o citosol, complexo de Golgi, mitocôndrias, peroxissomos e no núcleo (WOOD et al., 2003). Nos eritrócitos, encontram-se as isoformas Prx 1, Prx2 e Prx6, sendo a Prx2 a mais abundante (LOW; HAMPTON; WINTERBOURN, 2008). A Prx 2 metaboliza hidroxiperoxídeos lipídicos, peroxinitrito e o H_2O_2 , com quem reage rapidamente. Dessa forma, devido a sua alta abundância e taxa de reação, a Prx2 é considerada a primeira linha de defesa contra os danos causados pela presença do H_2O_2 (ORRICO et al., 2018). Sua forma oxidada é reduzida pela ação da tioredoxina ($Trx (SH)_2$) via tioredoxina redutase ($TrxR$) e NADPH (HOLMGREN, 1995).

A família GPx também contribui para a redução de lipoperóxidos e hidroxiperoxídeos (COHEN; MANNERVIK, 1987). Nos eritrócitos, a isoforma GPx1 é a mais predominante e tem sido associada a proteção contra oxidantes endógenos e presentes em baixas concentrações, sendo uma outra barreira ao H_2O_2 (MÖLLER et al., 2022; ORRICO et al., 2018). A enzima oxidada é regenerada pela glutathiona (GSH) (FLOHÉ; BRAND, 1969), a qual também exerce papel como cofator da enzima glutathiona-S-transferase (GST), cuja atividade está relacionada à detoxificação de xenobióticos (VAN ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014b). A glutathiona oxidada (GSSG), por sua vez, é convertida em GSH pela ação da glutathiona redutase (GR) que utiliza o NADPH como agente redutor (NUR et al., 2011).

A GSH é o tiol mais abundante nos eritrócitos. Além das funções já mencionadas, esse tiol protege proteínas de membrana contra os danos oxidativos, auxiliando na manutenção da integridade e flexibilidade da membrana eritrocitária (CARRELL; WINTERBOURN; RACHMILEWITZ, 1975). Vale ressaltar que a GSH, possui grupos sulfidrilas responsáveis pela manutenção da Hb em seu estado reduzido (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

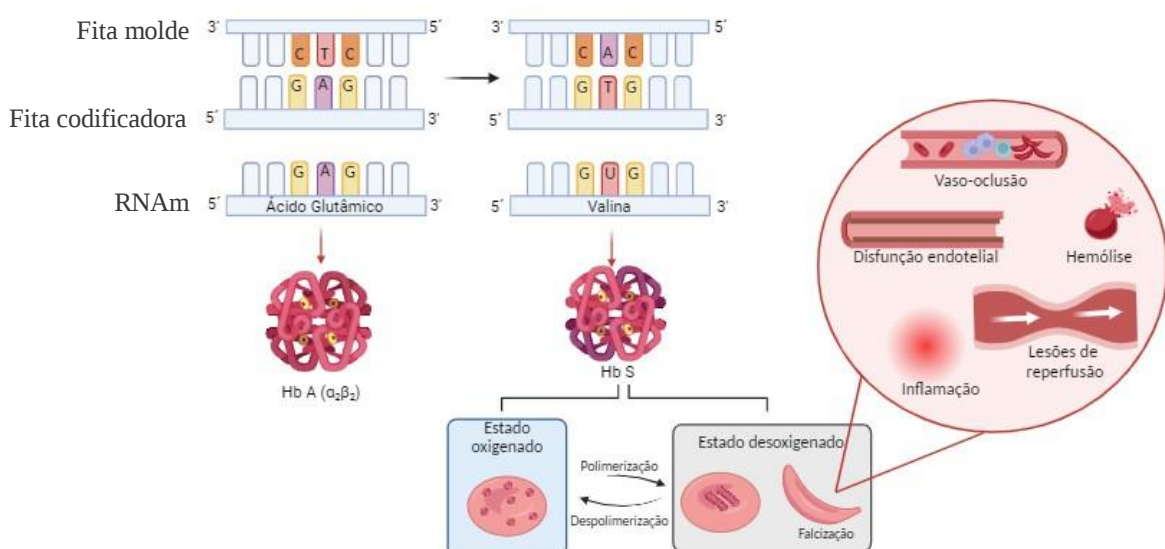
1.2. Anemia Falciforme.

A doença falciforme é um grupo de doenças hereditárias causadas, incluindo a anemia falciforme, causadas pela mutação no gene da β -globina (KATO et al., 2018). Entre os anos de 2000 e 2021, houve um aumento de nascimentos de bebês com doença falciforme de 453.000 para 515.000, apresentando uma incidência global de 382 a cada 100.000 nascidos vivos, dos quais 76,5% dos indivíduos são acometidos com AF (THOMSON et al., 2023). No Brasil, a expectativa de vida dos pacientes com AF é de até 30 anos a menos em comparação com a média brasileira, com a maioria dos óbitos observados nas regiões Sudeste e Nordeste, onde o genótipo da doença é mais prevalente. (CANÇADO et al., 2021, 2023).

A AF é uma doença genética hereditária causada pela homozigose de uma mutação pontual no gene da globina β (*HBB*) (BUNN, 1997; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012). Essa mutação consiste na substituição de uma adenina por timina (*HBB*; c.20A>T; rs334) no sexto códon do éxon 1 do gene, com consequente troca do aminoácido ácido glutâmico, de caráter hidrofílico, por uma valina de caráter hidrofóbico, na proteína. Essas alterações formam uma Hb com características morfológicas e bioquímicas diferentes, denominada de HbS ($\alpha_2\beta_2$) (Figura 2) (INGRAM, 1957; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

No eritrócito desoxigenado, a valina expõe sítios hidrofóbicos de contato com alguns aminoácidos de HbS adjacentes, formando um polímero que preenche o eritrócito alterando sua morfologia, bem como sua flexibilidade e deformabilidade celular, se tornando falcizada (FRONTICELLI; GOLD, 1976; KATO et al., 2018; CAPRARI et al., 2019; TEBBI, 2022). Essa polimerização seguida da falcização celular é reversível pela ligação ao O_2 , no entanto, é o processo determinístico para as manifestações clínicas da doença (STUART; NAGEL, 2004). A AF é uma doença complexa caracterizada por eventos vaso-oclusivos que desencadeiam processos hemolíticos e inflamatórios, disfunções endoteliais e lesões causadas por isquemia e reperfusão (Figura 2) (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Entre as manifestações clínicas, os indivíduos acometidos podem apresentar crises de dor aguda, síndrome torácica aguda, disfunção esplênica, acidente vascular cerebral, retinopatia, ulcerações nas pernas, nefropatia, entre outras manifestações (KATO et al., 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Figura 2. Fisiopatologia da anemia falciforme



A anemia falciforme é ocasionada por uma mutação no gene β da globina que substitui uma adenina por timina, levando à formação da Hb S. No estado desoxigenado ocorre a polimerização da Hb S seguida de falcização. Por sua vez, a falcização pode levar aos eventos de vaso-oclusão, hemólise, disfunções endoteliais, inflamação e lesões por reperfusão. **Fonte:** autoria própria (criado em Biorender.com)

1.2.1. Tratamento com Hidroxicarbamida

Apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento da doença, a hidroxiureia ou hidroxicarbamida (HC) ainda é considerada um dos medicamentos mais eficazes para o tratamento da AF. A HC é um agente citostático e seu principal mecanismo de ação é a indução da produção de Hb fetal (HbF), que reduz a polimerização da HbS (COKIC et al., 2003, 2008). Além disso, a HC reduz a contagem de leucócitos e reticulócitos, a hipercoagulabilidade e as interações de adesão celular e tem efeitos anti-inflamatórios imediatos independentes dos níveis de HbF (COLELLA et al., 2012; ROUMENINA et al., 2020; WARE et al., 2017), levando a uma redução na incidência de crises álgicas e de síndrome torácica aguda, bem como à diminuição das taxas de hospitalização, de transfusão de sangue e de mortalidade entre pessoas com AF. (STEINBERG et al., 2003; WARE, 2013; WARE et al., 2017).

Além destes efeitos, a influência do tratamento com HC na mitigação do estresse oxidativo vem sendo investigado. O trabalho feito por Renó et.al, 2021, investigou o efeito do tratamento com HC sobre o sistema antioxidante e energético em eritrócitos saudáveis (RENÓ et al., 2021). Os autores demonstraram que diferentes concentrações de HC (0,6mM e 0,8mM) com diferentes períodos de incubação causam alterações na resposta antioxidante e nos níveis de enzimas relacionadas ao metabolismo energético, como a hexoquinase e a glicose-6-fosfato desidrogenase (RENÓ et al., 2021). Os autores concluem que a concentração de 0,8mM por 1 hora de incubação teria o melhor efeito antioxidante, pela redução dos níveis de FeIII, H₂O₂ e peroxidação lipídica, podendo beneficiar pacientes de doenças como a AF (RENÓ et al., 2021). Por sua vez, o trabalho de Silva et al, 2011, com hemácias de indivíduos com anemia falciforme tratados e não tratados com HC, demonstrou o efeito da HC no metabolismo redox (SILVA et al., 2011). Os autores demonstraram a redução dos níveis de peroxidação lipídica, assim como o aumento da capacidade antioxidante equivalente ao trolox e dos níveis de catalase nos indivíduos com AF, indicando um possível efeito antioxidante no tratamento da AF (SILVA et al., 2011).

1.2.2. Estresse Oxidativo na Anemia Falciforme

Na AF, o equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua eliminação é modificado, uma vez que os repetidos ciclos de polimerização e auto oxidação da HbS aumentam a produção de ERO, sendo consideradas as principais fontes endógenas de pró-oxidantes no eritrócito falcêmico (BARABINO; PLATT; KAUL, 2010; HEBBEL et al., 1988). Além disso, as ERO também podem ser geradas pela atividade de NADPH-oxidases e pelas reações de Fenton (GEORGE et al., 2013; MACKINNEY et al., 2019).

Desse modo, estudos apontam uma produção de ERO, como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) e produtos de peroxidação lipídica, até duas vezes maior na AF (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000; HEBBEL et al., 1988; WANG; ZENNADI, 2021). Sabe-se que o H_2O_2 pode reagir com a Hb formando Hb oxiferril e ferril (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014). No entanto, Kassa e colaboradores (2015), descobriram que ao reciclar o ferro férrico e seu estado ferril, na presença do H_2O_2 , a Hb S permanece por mais tempo no estado ferril reativo, que age oxidando a própria Hb e componentes celulares adjacentes (KASSA et al., 2015).

Devido à essa produção aumentada de ERO há uma sobrecarga do sistema antioxidante. No entanto, há uma discrepância entre os estudos que analisam os níveis e a atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Das e Nair, 1980, relataram um aumento de SOD, GPx e CAT em pacientes com AF em comparação ao controle, tanto por conteúdo de hemoglobino como por números de células, como um mecanismo protetor ao estresse oxidativo (DAS; NAIR, 1980). Em contrapartida, Biswal e colaboradores (2018) demonstraram em seu estudo uma redução nos níveis de SOD, CAT, GSH e GPx em crianças com AF, com faixa etária de 6 meses a 10 anos, em comparação ao controle saudável, sendo esta redução uma resposta ao aumento da produção de ERO levando, por consequência, a um maior consumo destes antioxidantes (BISWAL et al., 2018). Neste trabalho, os autores também descreveram um aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas nos pacientes acometidos com a doença em relação ao controle (BISWAL et al., 2018). Outros trabalhos como de Nur et al, 2011 e Tatum et al, 1996, evidenciaram uma redução nos níveis de GSH nas células falcêmicas (NUR et al., 2011; TATUM; CHOW, 1996), relacionando esta redução ao efluxo de glutatona oxidada nas células de pacientes com AF (NUR et al., 2011).

1.2.3. Estresse Oxidativo e a Formação de Células Densas na Anemia Falciforme

Além dos danos causados às estruturas celulares, o estresse oxidativo também pode modular a ação de canais de transporte de íons na membrana, ativando ou inibindo seu funcionamento, podendo levar ao desequilíbrio iônico nas células vermelhas (FÖLLER et al., 2013; KIEFER; SNYDER, 2000; MACHADO et al., 2021). Entre os canais modulados pelo estresse tem-se a inibição da Ca^{2+} -ATPase, cuja função é retirar, ativamente, o excesso de Ca^{2+} intracelular, e a ativação de um canal de cátion não seletivo permeável ao Ca^{2+} (FÖLLER et al., 2013; KIEFER; SNYDER, 2000). O consequente aumento dos níveis de Ca^{2+} intracitoplasmáticos, resultante dessa modulação, leva a uma série de eventos. Os níveis

alterados desse cátion ativam enzimas como caspases e a calpaína da transglutaminase-2, que podem degradar proteínas do citoesqueleto (REDDING; RECORD; RAESS, 1991).

Além disso, o aumento de Ca^{2+} ativa o canal de Gardos e o efluxo de potássio (K^+) e água, ocasionando uma redução do volume celular (BARODKA et al., 2014; GOREKE et al., 2022; NEY; CHRISTOPHER; HEBBEL, 1990; NOOMUNA et al., 2020; SHARTAVA et al., 2000). Além da retração celular, a desidratação intracelular desencadeia a formação de células densas (DSCs - *dense sickle celss*) definidas como hemácias com densidade superior a 1,11 g/mL e altos valores de concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), características na AF (HORIUCHI et al., 1993; MACHADO et al., 2021; SCHWARTZ et al., 1998). O estado redox e os níveis de espécies reativas nas células falcêmicas de alta densidade (HDSC – *high dense sickle cells*) é ainda mais alterado, levando a danos oxidativos e glutatilonilação dos resíduos de cisteína com consequente comprometimento da interação entre o citoesqueleto (espectrina, banda 3, anquirina e proteína 4.1) e a membrana plasmática, o que resulta na formação das células irreversivelmente falcizadas (ISCs - *irreversibly sickled cells*) (GIBSON et al., 1998; SHARTAVA et al., 1995).

A formação de pontes dissulfetos nas cisteínas 284 e 373 da beta-actina contribui para a lenta dissociação do complexo espectrina-proteína 4.1- actina, enquanto a glutatilonilação na espectrina resulta na perda da atividade conjugadora/ligadora de ubiquitina E2/E3 dessa proteína-chave do citoesqueleto e, portanto, da capacidade de se auto-ubiquitinar (CHANG; KAKHNIASHVILI; GOODMAN, 2005; SHARTAVA et al., 1995). A perda de ubiquitinação nas repetições alfa-espectrina favorece a formação de um complexo ternário espectrina-4.1-actina de maior afinidade. Dessa forma, danos oxidativos reversíveis à beta-actina e perda de ubiquitinação de alfa-espectrina resultam em um citoesqueleto "bloqueado", uma vez que não consegue mais se “desmontar ou remontar” (CHANG; KAKHNIASHVILI; GOODMAN, 2005; RIAHI; KAKHNIASHVILI; GOODMAN, 2005), estando positivamente correlacionado com aumento das taxas hemolíticas e demais complicações clínicas associadas (BARTOLUCCI et al., 2012)

1.3. Sistema Ubiquitina- Protassomo (UPS)

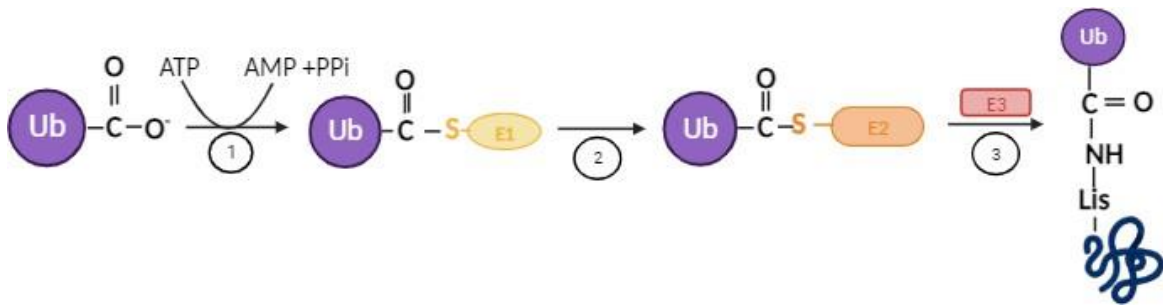
As proteínas possuem uma grande diversidade funcional, sendo importantes para a manutenção da viabilidade celular (LABBADIA; MORIMOTO, 2015). Essas funções, por sua vez, são reguladas pelo equilíbrio entre a síntese, o dobramento e a degradação proteica (DIKIC, 2017). Esta última pode ocorrer pelo sistema autofágico-lisossomal e pelo sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) (DIKIC, 2017)

O sistema autofágico-lisossomal, mediado por chaperonas, atua degradando proteínas mal dobradas e/ou danificadas, agregados proteicos, bem como organelas celulares inteiras por meio da vida de microautofagia (LAMB; YOSHIMORI; TOOZE, 2013). O UPS, por sua vez, é um dos principais mecanismos proteolíticos intracelulares, responsáveis pela degradação de proteínas com anomalias estruturais e que sofreram danos oxidativos (SHANG; TAYLOR, 2011). Além disso, o UPS também está relacionado à outros processos celulares como a progressão do ciclo celular, proliferação, apoptose, reparo no DNA e imunidade (DIKIC, 2017; FINLEY, 2009).

A ubiquitina (Ub) é uma proteína estável, evolutivamente conservada, composta por 76 aminoácidos, que se liga covalentemente ao substrato direcionando-o para a degradação ou para outros processos biológicos, como para sistemas de reparo (NANDI et al., 2006). A ligação isopeptídica entre Ub e substrato se forma entre a glicina C-terminal da Ub e o grupo ϵ -amino da lisina da proteína alvo ou de outra Ub, ocorrendo neste último caso, para a formação de uma cadeia poliubiquitinada (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). É importante ressaltar, que a posição da lisina poliubiquitinada é responsável por sinalizar diferentes respostas (NANDI et al., 2006; WEISSMAN, 2001). Essa marcação da proteína alvo, ocorre por meio da ação de três enzimas: a enzima ativadora de ubiquitina (E1) ativa o resíduo de glicina C terminal, sendo esta etapa dependente de ATP, após ocorre a ligação da Ub com a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que irá transferir a proteína ao substrato em que será ligada pela ação da enzima ubiquitina ligase (E3) (Figura 3) (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998; NANDI et al., 2006; PICKART, 2001; PICKART; EDDINS, 2004).

A ubiquitinação da lis^{48} e da lis^{29} marca proteínas alvo para degradação via proteassomo (NANDI et al., 2006; WEISSMAN, 2001). Há diferentes tipos de proteassomos nas células, que se diferenciam pela estrutura catalítica, pela interação com diferentes tipos de reguladores e por mudanças pós-traducionais em suas subunidades (DAHLMANN, 2016).

Figura 3. Processo de marcação pela ubiquitina.



A marcação pela ubiquitina se dá por meio de três reações. A reação 1) é mediada pela enzima ativadora de ubiquitina (E1) que ativa o resíduo de glicina C-terminal da proteína. Em 2) ocorre a liberação de E1 e ligação da enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que irá transferir a ubiquitina para a proteína alvo, onde será ligada (3) pela enzima ubiquitina ligase (E3) **Fonte:** autoria própria (criado em Biorender.com)

O core catalítico constitutivo, denominado de proteassomo 20S, é formado por uma estrutura cilíndrica de 700 kDa composta por quatro anéis (ORLOWSKI; WILK, 2000). Os dois anéis internos são formados por sete subunidades do tipo beta (β), que podem possuir um resíduo de treonina N-terminal exposto, parte crítica do sítio ativo (Figura 4a) (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009; NANDI et al., 2006). Nos eucariotos, apenas as subunidades β_1 , β_2 e β_5 são processadas dessa forma, apresentando, respectivamente, atividades peptidásicas do tipos i) caspase que cliva as ligações peptídicas na extremidade C-terminal dos resíduos de aminoácidos ácidos, ii) tripsina, em que a clivagem ocorre nos resíduos de aminoácidos básico e iii) quimiotripsina, cuja clivagem se dá nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (ORLOWSKI; WILK, 2000).

Os dois anéis externos, por sua vez, são formados por sete subunidades do tipo alpha (α) e funcionam como uma barreira entre o citosol e núcleo catalítico (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009; NANDI et al., 2006; ORLOWSKI; WILK, 2000). Os anéis externos também podem se ligar à complexos regulatórios como o 19S, também conhecido com PA700, formando o proteassomo 26S (Figura 4b), quando ligada em apenas uma extremidade, e o proteassomo 30S quando ligado à ambas extremidades do core catalítico 20S (DEMARTINO et al., 1994)

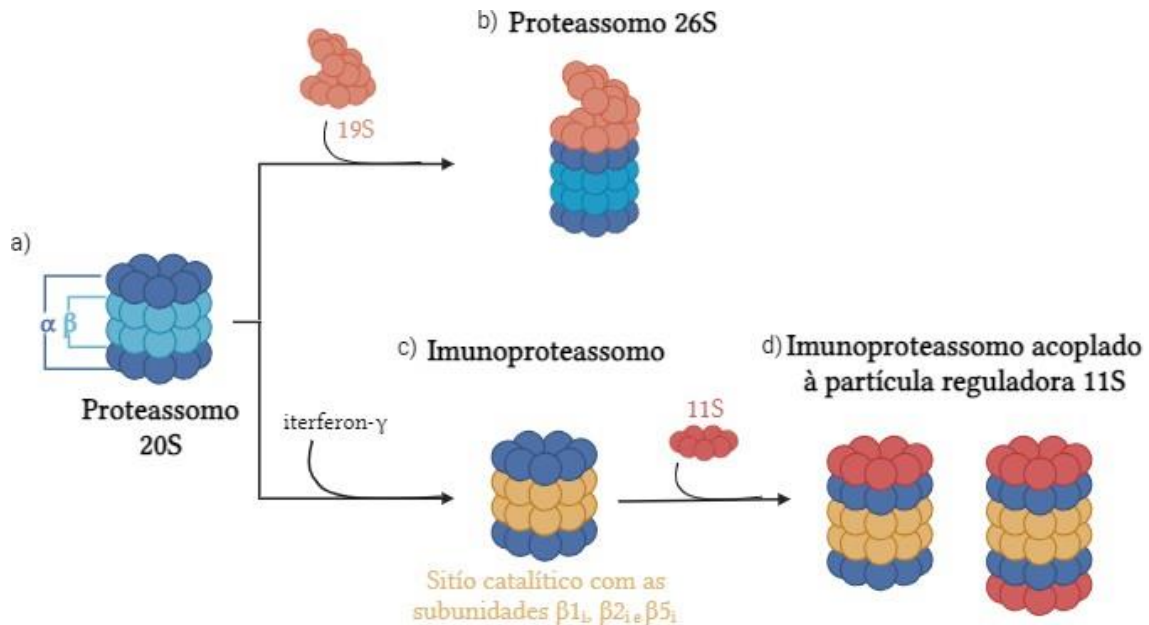
O complexo 19S é composto por cerca de 19 subunidades que conferem as funções de ATPase, de ligação à Ub, desubiquitinação, chaperona, entre outras, à estrutura (LIU; JACOBSON, 2013; VOGES; ZWICKL; BAUMEISTER, 1999). Essa partícula reguladora pode ser subdividida em dois subcomplexos, denominados de base, que atua desdobrando a proteína alvo e abrindo o poro do núcleo catalítico, e o *lid*, que contém proteínas deubiquitinadoras, sendo essencial para a degradação das proteínas marcadas com Ub.

(VOGES; ZWICKL; BAUMEISTER, 1999). Desse modo, o complexo regulatório reconhece as proteínas marcadas e as direciona para a clivagem no núcleo 20S, em um processo dependente de ATP e Ub. (ORLOWSKI; WILK, 2000).

Em seu trabalho, Reinheckel e colaboradores (1998) buscaram testar o possível efeito inibitório de oxidantes na atividade do proteassomo 20S e 26S, concluindo que tanto *in vitro* como *in vivo* o proteassomo 20S é mais resistente a oxidantes, enquanto o proteassomo 26S pode ser inibido pela oxidação (REINHECKEL et al., 1998). Desse modo, as proteínas danificadas pelo estresse oxidativo são preferencialmente degradadas pelo proteassomo 20S sem a necessidade de poli-ubiquitinação e independente de ATP (DAVIES, 2001; DEMASI; DA CUNHA, 2018; JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009).

Por fim, imunoproteassomo assemelha-se ao *core* 20S, diferindo-se apenas quanto as subunidades catalíticas do sítio ativo, que são induzidas por citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ e pelo estresse oxidativo, sendo denominadas de subunidades β_i (GRIFFIN et al., 1998; HUBER et al., 2012; JOHNSTON-CAREY; POMATTO; DAVIES, 2016). O imunoproteassomo apresenta um aumento da atividade catalítica do tipo quimiotripsina, uma vez que, as subunidades β_{1i} e β_{5i} a possuem, enquanto a β_{2i} apresenta atividade do tipo tripsina (Figura 4c) (GOMES, 2013). Expresso nas células do sistema imunológico, o imunoproteassomo é estudado por gerar peptídeos associados ao complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I (HUBER et al., 2012; JOHNSTON-CAREY; POMATTO; DAVIES, 2016; ROCK et al., 1994). Para a ligação desses peptídeos é necessário que os mesmos apresentem um comprimento de oito a nove aminoácidos ácidos e ter a presença de resíduos de ancoragem na região C-terminal, que, para o ser humano, deve ser básico ou hidrofóbico (JOHNSTON-CAREY; POMATTO; DAVIES, 2016; KNIEPERT; GROETTRUP, 2014). Quanto o seu efeito mediado pelo estresse oxidativo, Theo e Davies, 2004, propuseram a hipótese PrOxI (oxidação proteica e imunoproteassomo): proteínas oxidadas podem atuar como um sinal para ação do imunoproteassomo e consequente geração de peptídeos de apresentação (TEOH; DAVIES, 2004), além disso, foi demonstrada a degradação de proteínas oxidadas pelo imunoproteassomo com a mesma eficiência do 20S (PICKERING et al., 2012). Vale ressaltar que a ligação do imuno à partícula reguladora 11S melhora sua seletividade, aumentando degradação de proteínas com danos oxidativos (Figura 4d) (DICK et al., 1996; HUBER; GROLL, 2017)

Figura 4- Representação dos subtipos de proteassomos.



Em 4a) tem-se o proteassomo constitutivo 20S que possui as subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$. 4b) Representa a associação do core 20S à subunidade 19S formando o proteassomo 26S. 4C) Representa o imunoproteassomo cuja subunidades são induzíveis pelo interferon γ , já em D) tem-se a associação do imunoproteassomo à partícula reguladora 11S. **Fonte:** autoria própria (criado em Biorender.com)

13.1. Sistema Ubiquitina-Proteassomo e Anemia Falciforme

Contribuindo significativamente com a compreensão do metabolismo eritrocitário, o estudo do proteoma humano, de Kakhniashvili et al. (2004), identificou 14 proteínas do UPS, incluindo seis subunidades de proteassomo nas frações citoplasmáticas. Estudos anteriores já haviam relatado que as hemácias humanas contêm muitas proteínas ubiquitinadas, incluindo espectrina (KAKHNIASHVILI et al., 2001; KAKHNIASHVILI; BULLA; GOODMAN, 2004), anquirina (CHANG et al., 2004a) e banda 3, com implicações diretas no envelhecimento eritrocitário e na fisiopatologia da AF (CHANG; KAKHNIASHVILI; GOODMAN, 2005). A ubiquitinação dessas proteínas pode afetar diretamente a estrutura e função das células vermelhas influenciando na clusterização da banda 3 e, conseqüentemente, na dissociação de proteínas do citoesqueleto por interromper sua ligação à anquirina (FERRU et al., 2011). A vesiculação resultante da membrana plasmática e a geração de micropartículas são características importantes da AF (WESTERMAN et al., 2008). Apesar disso, o papel específico da ubiquitinação e da atividade proteassomal em pacientes com AF ainda é pouco compreendido e merece maior investigação.

Recentemente, Warang et al (2018) encontraram atividade proteassomal ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) aumentada e níveis menores de proteínas poliubiquitinadas em indivíduos com AF sob uso de HC em comparação com pacientes não tratados com HC (WARANG et al., 2018a). Foi notável

que, apesar da terapia com HC, alguns pacientes apresentaram complicações persistentes e acúmulo de proteínas polubiquitinadas. Assim, os autores concluíram que a atividade proteassomal aumentada entre pacientes tratados poderia ser a responsável pela remoção das proteínas poliubiquitinadas, configurando um dos importantes mecanismos de ação terapêutica da HC (WARANG et al., 2018a). Entretanto, tal conclusão está em discordância com os resultados de Neelam et al (2011) que demonstraram, por microscopia eletrônica de força atômica e de transmissão, que proteassomos isolados de hemácias maduras apresentaram abundância da unidade catalítica 20S e pouquíssimos proteassomos acoplados à unidade 19S; além disso os autores confirmaram atividade 20S *in vitro* e não detectaram atividade do proteassomo 26S usando a abordagem 2D-DIGE (NEELAM et al., 2011).

Desse modo, visto o importante papel fisiológico dos eritrócitos, a ruptura de seu metabolismo redox e homeostase celular devido a presença da Hb S, atrelados aos achados sobre mecanismos proteolíticos do UPS justificam a presente proposta e fundamentam a hipótese de que a HC mitiga o distresse oxidativo exacerbado na AF, e, conseqüentemente as demandas do UPS, contribuindo para manutenção do metabolismo redox.

4. Conclusões

- O tratamento com HC não exerceu influência na atividade proteassomal, que se manteve semelhante entre os grupos HC^+ e HC^- no *pool* total de hemácias e nos conjuntos celulares. A utilização do extrato purificado em resina DEAE modificou o perfil de atividade proteassomal, onde CG apresentou a maior atividade, condizendo com os dados de expressão do proteassomo 20S.
- O grupo HC^- , cujas células apresentam um quadro hiperoxidativo mais alterado apresentou o menor nível de expressão do proteassomo 20S, indicando que os danos oxidativos podem alterar o funcionamento e manutenção dos níveis do UPS.
- Fornecemos a evidência preliminar da presença do imunoproteassomo nas hemácias e da influência do tratamento com HC em sua expressão, sugerindo uma relação entre o tratamento com HC e o UPS na manutenção da homeostase redox nas células falciformes é muito mais complexa do que foi explorado até o momento

REFERÊNCIAS.

- ABI HABIB, J. et al. Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 78–86, 2018.
- ALFRED L. GOLDBERG. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 18/25 December, p. 895–899, 2003.
- ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 375–391, 2000.
- AZOUZI, S. et al. Energetic and molecular water permeation mechanisms of the human red blood cell urea transporter B. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82338, 2013.
- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 345–367, 2010.
- BARODKA, V. et al. Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 434–444, 2014.
- BARTOLUCCI, P. et al. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3136–3141, 2012.
- BASU, A.; CHAKRABARTI, A. Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules. v. 842, p. 199–215, 2015.
- BELCHER, J. D. et al. Heme degradation and vascular injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 233–248, 2010.
- BISWAL, S. et al. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. **Hematology**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2018.
- BOU-FAKHREDIN, R. et al. Redox Balance in β -Thalassemia and Sickle Cell Disease: A Love and Hate Relationship. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2022.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762–769, 1997.
- CANÇADO, R. D. et al. Sickle Cell Disease Mortality in Brazil: Real-World Evidence. **Blood**, v. 138, n. Supplement 1, p. 3025–3025, 2021.
- CANÇADO, R. D. et al. Estimated mortality rates of individuals with sickle cell disease in Brazil: real-world evidence. **Blood Advances**, v. 7, n. 15, p. 3783–3792, 2023.
- CAPRARI, P. et al. Hemorheological Alterations and Oxidative Damage in Sickle Cell Anemia. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. December, 2019.
- CARRELL, R. W.; WINTERBOURN, C. ; RACHMILEWITZ, E. A. ACTIVATED OXYGEN AND HAEMOLYSIS Oxidation. **Br J Haematol**, v. 30, p. 259–264, 1975.
- CHANG, T. L.; KAKHNIASHVILI, D. G.; GOODMAN, S. R. Spectrin's E2/E3 ubiquitin conjugating/ligating activity is diminished in sickle cells. **American Journal of Hematology**, v. 79, n. 2, p. 89–96, 2005.

CHAVES, N. A. et al. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, n. May, p. 34–46, 2019.

CIECHANOVER, A. Reprint of “A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes”. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 81, n. 4, p. 1100–1105, 1978.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, n. 1–2, p. 1–11, 2008.

COHEN, G. M.; MANNERVIK, B. 620th Meeting The enzymes of glutathione metabolism: an overview. v. 15, n. September, p. 1986–1987, 1987.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231–239, 2003.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1117–1123, 2008.

COLELLA, M. P. et al. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 9, p. 1967–1970, 2012.

DAHLMANN, B. Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 591, p. 132–140, 2016.

DALEKE, D. L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. **Current Opinion in Hematology**, v. 15, n. 3, p. 191–195, 2008.

DAS, S. K.; NAIR, R. C. Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, Catalase and Lipid Peroxidation of Normal and Sickled Erythrocytes. **British Journal of Haematology**, v. 44, n. 1, p. 87–92, 1980.

DAVIES, K. J. A. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie**, v. 83, n. 3–4, p. 301–310, 2001.

DE OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 44, n. 1, p. 63–74, 2010.

DEMARTINO, G. N. et al. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20878–20884, 1994.

DEMASI, M.; DA CUNHA, F. M. The physiological role of the free 20S proteasome in protein degradation: A critical review. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2948–2954, 2018.

DICK, T. P. et al. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. **Cell**, v. 86, n. 2, p. 253–262, 1996.

DIKIC, I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 193–224, 2017.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73–83, 2018.

- FERRU, E. et al. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5998–6006, 2011.
- FINLEY, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 477–513, 2009.
- FLOHÉ, L.; BRAND, I. Kinetics of glutathione peroxidase. **BBA - Enzymology**, v. 191, n. 3, p. 541–549, 1969.
- FÖLLER, M. et al. Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 10, p. 1350–1358, 2013.
- FÖLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB Life**, v. 60, n. 10, p. 661–668, 2008.
- FRONTICELLI, C.; GOLD, R. Conformational relevance of the beta6Glu replaced by Val mutation in the beta subunits and in the beta(1-55) and beta(1-30) peptides of hemoglobin S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 16, p. 4968–4972, 1976.
- GAUTIER, E. F. et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. **Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1470–1484, 2016.
- GEORGE, A. et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 2099–2107, 2013.
- GIBSON, X. A. et al. The efficacy of reducing agents or antioxidants in blocking the formation of dense cells and irreversibly sickled cells in vitro. **Blood**, v. 91, n. 11, p. 4373–4378, 1998.
- GOMES, A. V. Genetics of Proteasome Diseases. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–30, 2013.
- GOREKE, U. et al. Size and density measurements of single sickle red blood cells using microfluidic magnetic levitation. **Lab on a Chip**, v. 22, n. 4, p. 683–696, 2022.
- GRIFFIN, T. A. et al. Immunoproteasome assembly: Cooperative incorporation of interferon γ (IFN- γ)-inducible subunits. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 1, p. 97–104, 1998.
- GRUNE, T.; REINHECKEL, T.; DAVIES, K. J. A. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15504–15509, 1996.
- GUIZOUARN, H.; ALLEGRI, B. Erythroid glucose transport in health and disease. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 472, n. 9, p. 1371–1383, 2020.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.
- HEBBEL, R. P. et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 1, p. 237–241, 1988.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER. The ubiquitin system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 425–479, 1998.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation

of the active-site sulfhydryls to a disulfide. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 239–243, 1995.

HORIUCHI, K. et al. Image analysis studies of the degree of irreversible deformation of sickle cells in relation to cell density and Hb F level. **British Journal of Haematology**, v. 85, n. 2, p. 356–364, 1993.

HUBER, E. M. et al. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. **Cell**, v. 148, n. 4, p. 727–738, 2012.

HUBER, E. M.; GROLL, M. Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: Current and future trends in drug development. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 35, p. 8708–8720, 2012.

HUBER, E. M.; GROLL, M. The Mammalian Proteasome Activator PA28 Forms an Asymmetric $\alpha 4\beta 3$ Complex. **Structure**, v. 25, n. 10, p. 1473–1480.e3, 2017.

INGRAM, V. . Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Group Nature Publishing**, v. 180, p. 756–757, 1957.

JOHNSTON-CAREY, H. K.; POMATTO, L. C. D.; DAVIES, K. J. A. The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, n. 4, p. 268–281, 2016.

JUNG, T.; CATALGOL, B.; GRUNE, T. The proteasomal system. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 4, p. 191–296, 2009.

KAKHNIASHVILI, D. G. et al. Erythrocyte spectrin is an E2 ubiquitin conjugating enzyme. **Biochemistry**, v. 40, n. 38, p. 11630–11642, 2001.

KAKHNIASHVILI, D. G.; BULLA, L. A.; GOODMAN, S. R. The human erythrocyte proteome: Analysis by ion trap mass spectrometry. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, n. 5, p. 501–509, 2004.

KASSA, T. et al. Sickle cell hemoglobin in the ferryl state promotes β Cys-93 oxidation and mitochondrial dysfunction in Epithelial Lung Cells (E10). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 46, p. 27939–27958, 2015.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018.

KAWATANI, Y. et al. Nrf2 and selenoproteins are essential for maintaining oxidative homeostasis in erythrocytes and protecting against hemolytic anemia. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 986–996, 2011.

KIEFER, C. R.; SNYDER, L. M. Oxidation and erythrocyte senescence. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 2, p. 113–116, 2000.

KNIEPERT, A.; GROETTRUP, M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 17–24, 2014.

KOSMACHEVSKAYA, O. V.; TOPUNOV, A. F. Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 12–13, p. 1575–1593, 2018.

KOURGHI, M. et al. Identification of loop D domain amino acids in the human Aquaporin-1 channel involved in activation of the ionic conductance and inhibition by AqB011. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. APR, p. 1–12, 2018.

LABBADIA, J.; MORIMOTO, R. I. The biology of proteostasis in aging and disease. **Annual**

Review of Biochemistry, v. 84, n. March, p. 435–464, 2015.

LAMB, C. A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S. A. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 12, p. 759–774, 2013.

LANG, E.; QADRI, S. M.; LANG, F. Killing me softly - Suicidal erythrocyte death. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 8, p. 1236–1243, 2012.

LAUF, P. K.; ADRAGNA, N. C. K-Cl Cotransport: Properties and Molecular Mechanism. **Cell Physiol Biochem**, v. 10, p. 341–354, 2000.

LIU, C. W.; JACOBSON, A. D. Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 103–110, 2013.

LIU, S. C.; DERICK, L. H.; PALEK, J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. **Journal of Cell Biology**, v. 104, n. 3, p. 527–536, 1987.

LOW, F. M.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1621–1629, 2008.

LUX, S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: Unanswered questions. **Blood**, v. 127, n. 2, p. 187–199, 2016.

MACHADO, L. D. S. B. et al. ASPECTOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DA ANEMIA FALCIFORME. v. 16, p. 79–88, 2021.

MACKINNEY, A. et al. Disrupting the vicious cycle created by NOX activation in sickle erythrocytes exposed to hypoxia/reoxygenation prevents adhesion and vasoocclusion. **Redox Biology**, v. 25, n. December 2018, p. 101097, 2019.

MARINKOVIC, D. et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 8, p. 2133–2144, 2007.

MATHAI, J. C. et al. Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells: The colton-null phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 3, p. 1309–1313, 1996.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 25, p. 6040–6055, 1969.

MEI, Y.; LIU, Y.; JI, P. Understanding terminal erythropoiesis: An update on chromatin condensation, enucleation, and reticulocyte maturation. **Blood Reviews**, v. 46, n. August 2020, p. 100740, 2021.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: Past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939–3948, 2008a.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939–3948, 2008b.

MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Frontiers in Physiology**, v. 5 FEB, n. February, p. 1–6, 2014.

MÖLLER, M. N. et al. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. **ACS Omega**, 2022.

- MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.
- NANDI, D. et al. The ubiquitin-proteasome system. **Bioscience Journal**, v. 31, n. March, p. 137–155, 2006.
- NEELAM, S. et al. Functional 20s proteasomes in mature human red blood cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 5, p. 580–591, 2011.
- NEY, P. A.; CHRISTOPHER, M. M.; HEBBEL, R. P. Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. **Blood**, v. 75, n. 5, p. 1192–1198, 1990.
- NOOMUNA, P. et al. Inhibition of Band 3 tyrosine phosphorylation: a new mechanism for treatment of sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 4, p. 599–609, 2020.
- NUR, E. et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 11, p. 1412–1417, 2011.
- ORLOWSKI, M.; WILK, S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 1, p. 1–16, 2000.
- ORRICO, F. et al. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 121, p. 231–239, 2018.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, n. 2, p. 131–136, 2011a.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 2, p. 131–136, 2011b.
- PATRICK T, M.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opin Drug Saf.**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758., 2015.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 503–533, 2001.
- PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1695, n. 1–3, p. 55–72, 2004.
- PICKERING, A. M. et al. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 10021–10031, 2012.
- REDDING, G. S.; RECORD, D. M.; RAESS, B. U. Calcium-stressed erythrocyte membrane structure and function for assessing glipizide effects on transglutaminase activation. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 196, n. 1, p. 76–82, 1991.
- REID, M. E. et al. Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. **Blood**, v. 75, n. 11, p. 2229–2234, 1990.
- REINHECKEL, T. et al. Comparative resistance of the 20 S and 26 S proteasome to oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 335, n. 3, p. 637–642, 1998.
- REMIGANTE, A.; MORABITO, R.; MARINO, A. Band 3 protein function and oxidative

stress in erythrocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 9, p. 6225–6234, 2021.

RENÓ, C. O. et al. Oxidative stress assessment in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 5, p. 937–945, 2020.

RENÓ, C. O. et al. Biochemical evaluation of the effects of hydroxyurea in vitro on red blood cells. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2021.

RIAHI, M. H.; KAKHNIASHVILI, D. G.; GOODMAN, S. R. Ubiquitination of red blood cell α -spectrin does not affect heterodimer formation. **American Journal of Hematology**, v. 78, n. 4, p. 281–287, 2005.

RISINGER, M.; KALFA, T. A. Red cell membrane disorders: structure meets function. **Blood**, v. 136, n. 11, p. 1250–1261, 2020.

ROCK, K. L. et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell**, v. 78, n. 5, p. 761–771, 1994.

ROUMENINA, L. T. et al. Complement activation in sickle cell disease: Dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 5, p. 456–464, 2020.

SADRZADEH, S. M. H. et al. Hemoglobin. A biologic Fenton reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 23, p. 14354–14356, 1984.

SAKURAGI, T.; NAGATA, S. Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1–21, 2023.

SALOMAO, M. et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 23, p. 8026–8031, 2008.

SCHWARTZ, R. S. et al. Two Distinct Pathways Mediate the Formation of Intermediate Density Cells and Hyperdense Cells From Normal Density Sickle Red Blood Cells. **Blood**, v. 92, n. 12, p. 4844–4855, 1998.

SHANG, F.; TAYLOR, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 5–16, 2011.

SHARTAVA, A. et al. A posttranslational modification of β -actin contributes to the slow dissociation of the spectrin-protein 4.1-actin complex of irreversibly sickled cells. **Journal of Cell Biology**, v. 128, n. 5, p. 805–818, 1995.

SHARTAVA, A. et al. The Gardos channel is responsible for CDNB-induced dense sickle cell formation. **American Journal of Hematology**, v. 64, n. 3, p. 184–189, 2000.

SHOTTON, D. M.; BURKE, B. E.; BRANTON, D. The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 131, n. 2, p. 303–329, 1979.

SILVA, D. G. H. et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 47, n. 1, p. 23–28, 2011.

SIMS, P. J.; WIEDMER, T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 1, p. 266–275, 2001.

- STEINBERG, M. H. et al. Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sickle Cell Anemia: Risks and Benefits Up to 9 Years of Treatment. **Jama**, v. 289, n. 13, p. 1645–1651, 2003.
- STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol.**, v. 87, n. 8, p. 1765–803, 2012.
- STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343–1360, 2004.
- SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 263–292, 2019.
- TATUM, V. L.; CHOW, C. K. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. **Free Radical Research**, v. 25, n. 2, p. 133–139, 1996.
- TEBBI, C. K. Sickle Cell Disease, a Review. **Hemato**, v. 3, n. 2, p. 341–366, 2022.
- TEOH, C. Y.; DAVIES, K. J. A. Potential roles of protein oxidation and the immunoproteasome in MHC class I antigen presentation: The “PrOxI” hypothesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, n. 1, p. 88–96, 2004.
- THOM, C. S. et al. Trim58 Degrades Dynein and Regulates Terminal Erythropoiesis. **Developmental Cell**, v. 30, n. 6, p. 688–700, 2014.
- THOMSON, A. M. et al. Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 8, p. e585–e599, 2023.
- TORRES, L. D. S. et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, n. 6, p. 421–425, 2012.
- UMBREIT, J. Methemoglobin—It’s Not Just Blue: A Concise Review. **American journal of hematology**, v. 82, n. 9, p. 807–811, 2007.
- VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 377–386, 2014a.
- VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 377–386, 2014b.
- VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W. THE 26S PROTEASOME: A MOLECULAR MACHINE DESIGNED FOR CONTROLLED PROTEOLYSIS. **Annu**, v. 68, n. 1, p. 1015–1068, 1999.
- VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biology**, v. 6, p. 226–239, 2015.
- WALLACE, W. J.; MAXWELL, J. C.; CAUGHEY, W. S. The mechanisms of hemoglobin autoxidation evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 57, n. 4, p. 1104–1110, 1974.
- WANG, Q.; ZENNADI, R. The role of rbc oxidative stress in sickle cell disease: From the molecular basis to pathologic implications. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, 2021.
- WARANG, P. et al. Potential involvement of ubiquitin-proteasome system dysfunction associated with oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **British Journal of**

Haematology, v. 182, n. 4, p. 559–566, 2018a.

WARANG, P. et al. Potential involvement of ubiquitin-proteasome system dysfunction associated with oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 182, n. 4, p. 559–566, 2018b.

WARE, R. E. Hydroxycarbamide: Clinical aspects. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 336, n. 3, p. 177–182, 2013.

WARE, R. E. et al. Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, 2017.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704–712, 2001.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. **NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY**, v. 2, n. March, p. 169–178, 2001.

WESTERMAN, M. et al. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. **British Journal of Haematology**, v. 142, n. 1, p. 126–135, 2008.

WOOD, B. L.; GIBSON, D. F.; TAIT, J. F. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: Flow-cytometric measurement and clinical associations. **Blood**, v. 88, n. 5, p. 1873–1880, 1996.

WOOD, Z. A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 32–40, 2003.

WU, M. et al. Sustained Oxidative Stress Inhibits NF- κ B Activation Partially via Inactivating the Proteasome. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 1, p. 62–69, 2009.