UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto

Bárbara Braga Vieira Marques

Inflamação estéril na doença falciforme: melatonina e ergotioneína como estratégias terapêuticas em camundongos transgênicos

São José do Rio Preto
2025

Bárbara Braga Vieira Marques

Inflamação estéril na doença falciforme: melatonina e ergotioneína como estratégias terapêuticas em camundongos transgênicos

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Área de Concentração: Genética e Biologia Evolutiva

Orientador: Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat

São José do Rio Preto
2025

M357i

Marques, Bárbara

Inflamação estéril na doença falciforme: melatonina e ergotioneína como estratégias terapêuticas em camundongos transgênicos / Bárbara Marques. -- São José do Rio Preto, 2025

52 p. : il., tabs.

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

Orientador: Danilo Grunig Humberto da Silva

Coorientador: Marcus Alexandre Finzi Corat

1. Hemglobina S. 2. Animais Transgênicos. 3. Citocinas. 4. MCP-1. 5. Medicina Translacional. I. Título.

IMPACTO SOCIAL DA PESQUISA

A presente pesquisa contribui significativamente para o entendimento dos mecanismos inflamatórios associados à anemia falciforme (AF), uma das doenças hereditárias mais prevalentes no Brasil e no mundo, especialmente em populações afrodescendentes e de regiões com menor acesso a recursos de saúde. Ao investigar os efeitos da melatonina e da ergotioneína sobre mediadores inflamatórios em modelo transgênico de AF, este estudo abre novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias complementares e acessíveis voltadas à modulação da inflamação estéril, um dos principais processos envolvidos nas complicações clínicas da doença.

Do ponto de vista social, os resultados obtidos reforçam a importância da pesquisa básica como base para inovações terapêuticas capazes de melhorar a qualidade de vida de indivíduos com AF, reduzindo complicações inflamatórias, hospitalizações e custos associados ao tratamento. Além disso, ao empregar biomoléculas com perfil de segurança reconhecido, o estudo contribui para ampliar o conhecimento científico sobre alternativas terapêuticas potencialmente menos invasivas e economicamente viáveis, alinhadas às necessidades do sistema público de saúde brasileiro.

Por fim, esta pesquisa também possui um impacto educacional e social indireto, ao promover a formação de recursos humanos qualificados em biociências e ao fortalecer a integração entre universidades e centros de pesquisa nacionais, favorecendo a continuidade de estudos translacionais que possam futuramente resultar em benefícios concretos para pacientes com anemia falciforme e outras doenças inflamatórias crônicas.

SOCIAL IMPACT OF THE RESEARCH

This research contributes significantly to the understanding of the inflammatory mechanisms associated with sickle cell anemia (SCA), one of the most prevalent hereditary diseases in Brazil and worldwide, especially in populations of African descent and in regions with less access to healthcare resources. By investigating the effects of melatonin and ergothioneine on inflammatory mediators in a transgenic model of SCD, this study opens up new perspectives for the development of complementary and accessible therapies aimed at modulating sterile inflammation, one of the main processes involved in the clinical complications of the disease.

From a social perspective, the results obtained reinforce the importance of basic research as a basis for therapeutic innovations capable of improving the quality of life of individuals with AF, reducing inflammatory complications, hospitalizations, and treatment-related costs. In addition, by employing biomolecules with a recognized safety profile, the study contributes to expanding scientific knowledge about potentially less invasive and economically viable therapeutic alternatives, aligned with the needs of the Brazilian public health system.

Finally, this research also has an indirect educational and social impact by promoting the training of qualified human resources in biosciences and strengthening integration between universities and national research centers, favoring the continuity of translational studies that may in the future result in concrete benefits for patients with sickle cell anemia and other chronic inflammatory diseases.

Bárbara Braga Vieira Marques

Inflamação estéril na doença falciforme: melatonina e ergotioneína como estratégias terapêuticas em camundongos transgênicos

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências.

Área de Concentração: Genética e Biologia Evolutiva

Data da Defesa: 07/10/2025

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto

_____
Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

_____
Profª. Drª. Priscila de Matos Cândido Bacani
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS -, Campus de Três Lagoas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a minha família e aos amigos que me deram forças e apoio para concluir esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

*À minha mãe, **Juliana Braga**, e aos meus avós **Santos Moacyr Braga** e **Maria Elena Nugoli Braga**, pela base da minha formação pessoal e profissional, pelo amor incondicional e por me ensinarem o valor da dedicação e da perseverança.*

*Aos meus irmãos, **Laura Braga** e **Guilherme Braga**, e minha prima, **Maria Clara Braga**, pelo companheirismo, pelo afeto e pelas brincadeiras que tornaram a minha trajetória mais leve.*

*Ao meu namorado, **Murilo Gimenez Vicentini,** e minha grande amiga **Giulia Grava Ordones**, pelo amor, pela paciência e apoio incondicional ao longo de toda essa caminhada. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos de incerteza e por me incentivar a seguir em frente.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Danilo Grunig Humberto da Silva**, pela orientação atenta, pelos ensinamentos generosamente compartilhados e pela confiança depositada em meu trabalho. Sua dedicação à pesquisa e à formação científica é uma inspiração e o torna um exemplo de professor e pesquisador a ser seguido.*

*Ao meu coorientador **Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat** e sua equipe **Daniela Cagnoto Noronha** e **Mayara Cristina Moreira Silva** por todo apoio e dedicação prestado durante a manipulação dos camundongos.*

*Ao **Prof. Dr. Edis Belini-Júnior,** e toda a equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) composta por **Amanda Cristina Meneguetti Berti**, **Ingrid de Souza Dias**, **Luis Antonio de Souza Júnior**, **Kaiky Corturato Piva**, **Lucas Nathan de Souza Nunes** e **Marcela Cantarin Roncada**, que além de consolidarem a base da minha formação acadêmica, foram as pessoas com quem eu compartilhei os meus dias e minha trajetória.*

*Ao **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP/IBILCE)** e a **Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)** por permitirem a realização do meu projeto de pesquisa.*

*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 o financiamento.*

*Além disso, também gostaria de agradecer ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq, Processo: 406700/2021- 4) e a **Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul** (Fundect, TO: 155/2024) pelos financiamentos.*

“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes”
(Isaac Newton; 1675)

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma condição hereditária autossômica codominante caracterizada por uma fisiopatologia complexa que engloba: a polimerização da hemoglobina (Hb) S, eventos vaso-oclusivos, disfunção endotelial e inflamação estéril. Apesar dos avanços, o perfil inflamatório de pacientes com AF permanece controverso e sem abordagens terapêuticas direcionadas a resolução da inflamação. Neste sentido, o presente estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios da ergotioneína (ERT) e da melatonina (MEL) sobre o perfil plasmático de citocinas em camundongos transgênicos para AF (HbSS), comparado aos controles traço falciforme (HbAS). Os camundongos humanizados foram obtidos a partir de um processo de transplante de células da medula de camundongos HbSS e HbAS de colônia originados do modelo Berkeley. Foram gerados quatro grupos: 5 indivíduos AS (controle), 8 SS (grupo doente), 5 SS+ERT (tratados com ERT) e 9 SS+MEL (tratados com MEL). Em período experimental de 60 dias foram administradas 35 mg/kg/dia de ERT e 10 mg/kg/dia de MEL, diluídas na água potável dos respectivos grupos do tratamento. Ao final, os camundongos foram eutanasiados, o sangue foi coletado e processado para obtenção do plasma. Por citometria de fluxo, foram quantificados os níveis plasmáticos das citocinas: IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, IL-10 e IL-6. As análises univariadas e multivariadas demonstraram que os grupos AS e SS não diferiram estatisticamente entre si, corroborando evidências de que o modelo murino não mimetiza a resposta inflamatória da condição sem indução. A ERT não promoveu alterações significativas no perfil de citocinas. Em contraste, a MEL reduziu de forma seletiva a MCP-1, sem efeito significativo sobre as demais citocinas. A modulação seletiva da MCP-1 pela MEL pode ocorrer por múltiplos mecanismos, incluindo regulação de sinalização intracelular, modulação transcricional e mecanismos epigenéticos. Conclui-se que o modelo murino apresenta uma translação limitada da resposta inflamatória sistêmica na AF e pode subestimar efeitos terapêuticos; contudo, os resultados sustentam a MCP-1 como alvo promissor de intervenção e a MEL como possível agente modulador seletivo desse marcador.

Palavras–chave: hemoglobina S; berkeley; citocinas; MCP-1; medicina translacional.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an autosomal codominant hereditary condition characterized by complex pathophysiology that includes hemoglobin (Hb) S polymerization, vaso-occlusive events, endothelial dysfunction, and sterile inflammation. Despite advances, the inflammatory profile of patients with SCD remains controversial, and there are no therapeutic approaches aimed at resolving inflammation. In this sense, the present study evaluated the anti-inflammatory effects of ergothioneine (ERT) and melatonin (MEL) on the plasma cytokine profile in transgenic mice for AF (HbSS), compared to sickle cell trait (HbAS). We obtained the transgenic mice by transplanting bone marrow cells from HbSS and HbAS mice, which originated from a colony of the Berkeley model. We generated four groups: 5 AS individuals (control), 8 SS (sick group), 5 SS+ERT (treated with ERT), and 9 SS+MEL (treated with MEL). During a 60-day experimental period, 35 mg/kg/day of ERT and 10 mg/kg/day of MEL were administered, diluted in water for the respective treatment groups. At the end, the mice were euthanized, and blood was collected and processed to obtain plasma. We quantified plasma levels of cytokines IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, IL-10, and IL-6 by flow cytometry. Univariate and multivariate analyses demonstrated that the AS and SS groups did not differ statistically from each other, corroborating evidence that the murine model does not mimic the inflammatory response of the condition without induction. ERT did not promote significant changes in the cytokine profile. In contrast, MEL selectively reduced MCP-1, with no significant effect on other cytokines. Selective modulation of MCP-1 by MEL may occur through multiple mechanisms, including regulation of intracellular signaling, transcriptional modulation, and epigenetic mechanisms. It is concluded that the murine model presents a limited translation of the systemic inflammatory response in FA and may underestimate therapeutic effects; however, the results support MCP-1 as a promising target for intervention and MEL as a possible selective modulator of this marker.

Keywords: hemoglobin S; berkeley; cytokines; MCP-1; translational medicine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisiopatologia complexa da anemia falciforme (AF) 15
Figura 2 – Inflamação estéril na anemia falciforme (AF) 19
Figura 3 – Estrutura, função e características da melatonina (MEL). 23
Figura 4 - Estrutura, função e características da ergotioneína (ERT) 26
Figura 5 – Concentração plasmática das citocinas 35
Figura 6 – Análise multivariada do perfil combinado das citocinas 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AP-1	Ativador de Proteína 1, do inglês "*Ativactor Protein 1*"
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante, do inglês *"Antioxidant Response Element"*
ATF2	Fator de transcrição ativador 2, do inglês "*Activating transcription factor 2*"
ATP	Adenosina Trifosfato, do inglês *"Adenosine triphosphate"*
CAT	Catalase
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
COX-2	Ciclooxigenase -2
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos, do inglês *"Damage-Associated Molecular Patterns"*
DF	Doença Falciforme
eDAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos em Eritrócito, do inglês *"Erythrocyte Damage- Associated Molecular Patterns"*
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERT	Ergotioneína
ETT	Transportador de Ergotioneína, do inglês *"Ergotioneine Transporter"*
FOXO3	Proteína O da caixa de forquilha, do inglês *"Forkhead box O3"*
GPx	Glutationa Peroxidase, do inglês *"Glutathione Peroxidase"*
GSH	Glutationa
GSSG	Dissulfeto de Glutationa
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HMGB1	Caixa 1 do Grupo de Alta Mobilidade, do inglês *"High Mobility Group Box 1"*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IkB	Inibidor do *κappa* B, do inglês *"Inhibitor of κappa B"*
IKK	Quinase IκB , do inglês *"Iκappa B Kinase"*
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível, do inglês *"Inducible Nitric Oxide Synthase"*

IRAK	Quinases associadas ao receptor da interleucina-1, do inglês "*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinases"*
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 subunidade p70
IFN-γ	Interferon gama, do inglês *"Interferon gamma"*
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPKs	Quinases ativadas por mitógeno, do inglês *"Mitogen-Activated Protein Kinases"*
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1, do inglês "*Monocyte Chemoattractant Protein-1"*
MEL	Melatonina
MyD88	Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88, do inglês "*Myeloid Differentiation Primary Response 88"*
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, do inglês "*Nicotinamide Adenine Dinucleotide"*
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B, do inglês "*Nuclear Factor Kappa B"*
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos, do inglês "*Neutrophil Extracellular Traps"*
NLRs	Receptores do tipo NOD, do inglês "*NOD-like Receptors"*
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal, do inglês "*Neuronal Nitric Oxide Synthase"*
·NO	Óxido nítrico, do inglês "*Nitric Oxide"*
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2, do inglês "*Nuclear factor erythroid 2–related factor 2"*
O_2^-	Ânion superóxido
$^1O_2$	Oxigênio singlete
OCTN1	Transportador de Cátions Orgânicos, do inglês "*Organic Cation Transporter Novel Type 1"*
•OH	Radical hidroxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito

PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês "*Pathogen-Associated Molecular Patterns"*
Prxs	Peroxirredoxinas, do inglês "*Peroxiredoxins"*
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões, do inglês "*Pattern Recognition Receptors"*
SIT1	Sirtuína 1, do inglês "*Sirtuin 1"*
SOD	Superóxido Dismutase
STA	Síndrome Torácica Aguda
TAK1	Quinase ativada por Fator de crescimento transformador Beta, do inglês "*Transforming Growth Factor-β-Activated Kinase 1"*
TGF-β	Fator de crescimento transformador Beta, do inglês "*Transforming Growth Factor Beta"*
TLRs	Receptores do tipo TOLL, do inglês "*Toll-like Receptors"*
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α, do inglês "*Tumor Necrosis Factor alpha"*
TRAF6	Fator Associado ao Recetor do Fator de Necrose Tumoral 6, do inglês "*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6"*
TrxR	Tiorredoxina reductase, do inglês "*Thioredoxin Reductase"*
VCM	Volume Corpuscular Médio
VOCs	Crises de Vaso-Oclusão, do inglês "*Vaso-Occlusive Crises"*

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Letra grega alfa
β	Letra grega beta
cGy	Centigray
γ	Letra grega gama
ml	Mililitros
mol	Mol
pg	Picograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

1.1. DOENÇA FALCIFORME 13

1.2. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME 13

1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO 15

1.3.1. Inflamação Estéril na Doença Falciforme 17

1.4. TERAPIAS PARA DOENÇA FALCIFORME 20

1.5. MELATONINA 22

1.6. ERGOTIONEÍNA 24

1.7. CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS COMO MODELO DE ESTUDO 27

2. OBJETIVOS 29

2.1. OBJETIVO GERAL 29

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

3. METODOLOGIA 29

3.1. OBTENÇÃO E ALOJAMENTO DOS CAMUNDONGOS 29

3.2. PRODUÇÃO DOS CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS POR 30

TRANSPLANTE] 31

3.3. PERÍODO EXPERIMENTAL 31

3.4. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS 32

3.5. ANÁLISE DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS 32

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4. RESULTADO 33

4.1. REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NOS 33

GRUPOS CONTROLES 33

4.2. PERFIL INFLAMATÓRIO TRATADO COM ERT 36

4.3. PERFIL INFLAMATÓRIO TRATADO COM MEL

5. DISCUSSÃO 37

6. CONCLUSÃO 41

REFERÊNCIAS 41

APÊNDICE I – PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS 48

APÊNDICE II - PESO CORPORAL E MASSA ESPLÊNICA DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS UTILIZADOS NO ESTUDO 49

APÊNDICE III – CURVAS PADRÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS 50

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA FALCIFORME

A doença falciforme (DF) foi descrita pela primeira vez em 1910 por James B. Herrick, que observou, em alguns pacientes, eritrócitos com um formato anômalo de foice (Herrick, 1910). Desde então, a compreensão sobre essa condição e os dados a seu respeito têm aumentado gradativamente. Em 2019, essa doença demonstrou grande impacto no âmbito nacional, após apresentar uma prevalência de 60 mil casos, acompanhada por uma taxa de mortalidade de 0,25 a cada 100 mil óbitos (Cançado *et al.*, 2023). Em 2021, por sua vez, a incidência global da DF foi de 382 casos por 100 mil nascidos vivos, com uma prevalência estimada em 7,74 milhões de pessoas afetadas, sendo considerada a condição hematológica monogênica mais comum em todo o mundo (Thomson *et al.*, 2023).

O termo “doença falciforme” engloba um grupo de doenças hereditárias, caracterizadas por uma mutação pontual (*HBB*:c.20A>T; rs334), herdada em homozigose ou dupla heterozigose, no gene que codifica a subunidade β da hemoglobina (Hb). Essa alteração resulta na substituição de um ácido glutâmico, com características hidrofílicas, por uma valina, que dispõe de características hidrofóbicas, na sexta posição da cadeia, levando a formação de uma Hb com características estruturais e bioquímicas diferentes da Hb A, chamada de Hb S (Ballas *et al.*, 2012; Rees *et al*., 2010; Sundd *et al.*, 2019)

A DF é transmitida como uma característica autossômica codominante, em nível molecular; tendo em vista que os indivíduos heterozigotos para o alelo β^S apresentam a manifestação fenotípica da mutação, sendo considerados traço falciforme (HbAS), mas não manifestam a condição clínica. Indivíduos homozigotos para o alelo β^S, por sua vez, desenvolvem a forma mais comum da DF: a anemia falciforme (AF) (Sundd *et al.*, 2019).

1.2. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

A AF dispõe de uma fisiopatologia complexa envolvendo a falcização dos glóbulos vermelhos, reologia sanguínea alterada e dano tecidual subsequente (Sundd *et al.*, 2019). Os processos fisiopatológicos que caracterizam a condição são impulsionados principalmente pelas alterações estruturais e funcionais da HbS e posterior prejuízo na forma dos glóbulos vermelhos.

Em momentos de desoxigenação intraeritrocitária, há a exposição de motivos hidrofóbicos da HbS. A fim de evitar tal exposição, os diferentes tetrâmeros de HbS desoxigenados se agrupam, formando longos e rígidos polímeros, em um processo denominado polimerização da HbS, que constitui um dos principais mecanismos fisiopatológicos dessa condição (Ballas *et al.*, 2012; Rees *et al.*, 2010; Sundd *et al.*, 2019). Esses polímeros de HbS se alongam rapidamente, aumentando a rigidez celular e distorcendo a membrana do eritrócito, resultando na falcização destas células, as quais se tornam menos flexíveis e mais suscetíveis à hemólise precoce (Elendu *et al.*, 2023; Rees *et al.*, 2010).

A polimerização da HbS e posterior falcização celular desencadeiam o segundo mecanismo fisiopatológico característico da AF que é a vaso-oclusão. A falcização dos eritrócitos expõe moléculas de adesão e motivos de ligação que contribuem para a agregação destes às células inflamatórias e endoteliais, formando aglomerados que comprometem o fluxo sanguíneo, principalmente em capilares e pós-capilares venosos (Rees *et al.*, 2010; Sundd *et al.*, 2019). Ademais, o aumento na taxa de hemólise acompanhada pelo prejuízo na deformabilidade dos eritrócitos falcizados afetam diretamente a viscosidade do plasma, contribuindo para crise vaso-oclusivas (VOCs), as quais desencadeiam danos teciduais devido aos processos de isquemia-reperfusão (Elendu *et al.*, 2023; Sundd *et al.*, 2019).

Outro mecanismo característico da AF é a disfunção endotelial, ocasionada pelo impacto crônico da anemia hemolítica contínua e VOCs (Sundd *et al.*, 2019). Os eritrócitos falcêmicos estão sujeitos a hemólise intravascular e extravascular, sendo que a primeira danifica diretamente os vasos sanguíneos (Kato *et al.*, 2017). Durante esse processo, a Hb liberada passa por reações de oxidação que resultam na geração do ânion superóxido (O_2^-), o qual, no vaso sanguíneo, reage com o óxido nítrico (·NO), um potente vasodilatador, para formar peroxintrito ($ONOO^-$), um forte oxidante, de forma irreversível. Isso não apenas favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que desregulam a homeostase redox vascular e contribuem para lesões no endotélio, mas também prejudica a vasodilatação ao sequestrar o NO, intensificando os eventos de vaso-oclusão (Kato *et al.*, 2017; Sundd *et al.*, 2019). O comprometimento da resposta de dilatação e constrição dos vasos sanguíneos associado a anemia persistente, ao longo do tempo, contribui para a disfunção de órgãos, como o coração, rim e fígado (Anthi *et al.*, 2007; Gladwin & Ofori-Acquah, 2014; Sachdev *et al.*, 2021).

Há mais de 70 anos, a fisiopatologia complexa da AF tem sido investigada por diversos pesquisadores com o objetivo de compreender e minimizar as manifestações clínicas dessa condição. Durante esse período, a caracterização da fisiopatologia dessa doença foi baseada nos três mecanismos descritos anteriormente (polimerização da HbS, vaso-oclusão e disfunção endotelial) e suas inter-relações. No entanto, recentemente, um quarto mecanismo foi identificado como um importante fator para a clínica da AF: a inflamação estéril (Sundd *et al.*, 2019) (Figura 1).

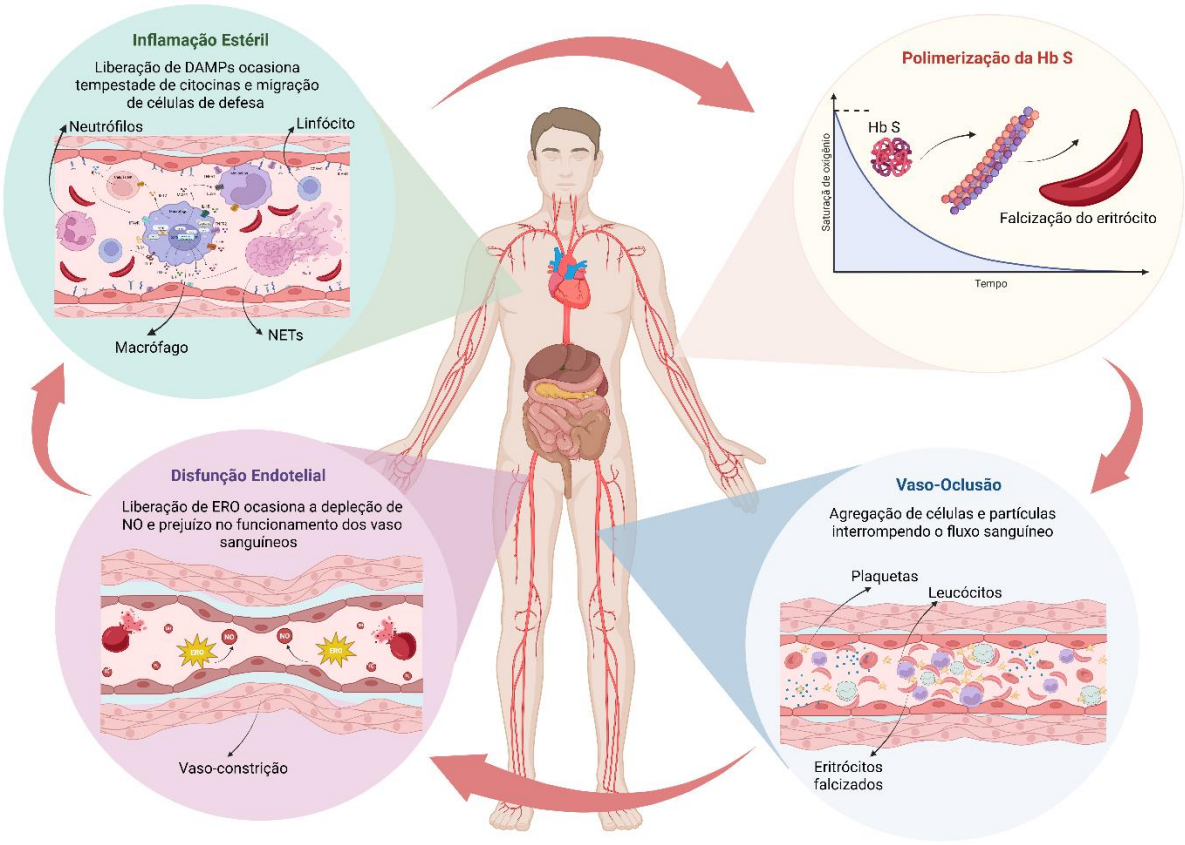


Figura 1. Fisiopatologia complexa da anemia falciforme (AF). A polimerização da HbS ocorre quando a hemoglobina desoxigenada sofre rearranjo molecular, formando polímeros que deformam o eritrócito, resultando na falcização. A vaso-oclusão é caracterizada pela agregação de eritrócitos falcizados, plaquetas e leucócitos à parede endotelial, interrompendo o fluxo sanguíneo e causando hipóxia tecidual. A disfunção endotelial é induzida principalmente pela liberação de ERO (espécies reativas de oxigênio), que levam à depleção de NO (óxido nítrico) e à vasoconstrição, prejudicando o tônus e a função vascular. A inflamação estéril é desencadeada pela liberação de DAMPs (padrões moleculares associados a dano), que promovem a ativação de células de defesa como neutrófilos, linfócitos e macrófagos, gerando uma tempestade de citocinas e formação de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), perpetuando a inflamação e contribuindo para o dano vascular. Hb S: hemoglobina S. ERO: espécies reativas de oxigênio. NO: óxido nítrico. DAMPs: padrões moleculares associados a dano. NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos. Fonte: Elaborado pelo autor. *Biorender.* Referências de consulta: Sundd et al., 2019; Ballas et al., 2012; Elendu et al., 2023; Kato et al., 2017.

1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um processo onipresente e benéfico ao organismo, onde o principal intuito é limpar o corpo de uma causa específica (Chen & Nuñez, 2010;

Watson et al., 2017). Inúmeras são as causas que podem desencadear o processo inflamatório, incluindo coágulo sanguíneo, lesões físicas, exposições químicas a compostos nocivos, condições neurológicas, doenças autoimunes e infecções por patógenos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários (Roe, 2021; Watson et al., 2017). De acordo com Zindel e Kubes (2020), a inflamação depende absoluta e categoricamente do recrutamento de leucócitos, ou seja, ainda que diferentes vias sejam mobilizadas dependendo da causa inflamatória, o objetivo final é o mesmo: garantir o tráfego de leucócitos à região afetada.

O processo inflamatório pode ser classificado como estéril ou não estéril, com base na presença ou ausência de infecção microbiana (Rarick et al., 2024; Zindel & Kubes, 2020). A inflamação não estéril ocorre na presença de infecção, na qual os patógenos geralmente são reconhecidos por padrões moleculares evolutivamente conversados associados à sua estrutura. Esses produtos microbianos conservados, como o lipopolissacarídeo de bactérias (LPS), ácidos nucleicos de vírus e componentes da parede celular de fungos, também são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), localizados em células endoteliais, dendríticas e macrófagos (MURPHY, 2014; Sangiuliano et al, 2014; Zindel & Kubes, 2020). Os PRRs acionam vias de sinalização que estimulam uma resposta imunológica marcada pela ativação do sistema do complemento, a liberação de citocinas e a migração de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (MURPHY, 2014; Sangiuliano et al., 2014).

Por outro lado, a inflamação estéril ocorre na ausência de patógenos, mas pode ser desencadeada por lesões físicas, químicas ou autoimunidade. Neste cenário os padrões moleculares imunoestimuladores diferem dos padrões microbianos e são canonicamente associados a danos; sendo chamados de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Sangiuliano et al., 2014; Zindel & Kubes, 2020). Os DAMPs são, em sua maioria, fatores endógenos contidos no espaço intracelular, onde não são reconhecidos pelos receptores das células imunes em condições normais. Entretanto, em caso de lesão tecidual, esses fatores são liberados para o espaço extravascular devido a morte celular, permitindo, assim, seu reconhecimento por esses receptores (Chen & Nuñez, 2010). Dessa forma, a resposta inflamatória na inflamação estéril é mediada por fatores como a liberação de ATP (adenosina trifosfato), urato e ácido graxos, ERO, proteínas específicas, as quais ativam

receptores do tipo NOD (NRLs) e TOLL (TLRs), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1β (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF-α), interferon-gama (IFN-y), interleucina 8 (IL-8), além da ativação de células como os macrófagos e os mastócitos (MURPHY, 2014; Sangiuliano et al., 2014). Em resumo, em ambos os mecanismos citados o processo inflamatório se inicia a partir da detecção de perigo (PAMPs ou DAMPs) por receptores (TLRs e NLRs) contidos em células endoteliais ou sentinelas, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Esse reconhecimento culmina na produção e liberação de mediadores inflamatórios que desencadeiam a ativação e recrutamento de leucócitos a região afetada afim de eliminar a causa inflamatória.

Após a remoção do estímulo agressor, há a produção de mediadores pró-resolução como lipoxinas e resolvinas, além de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (interleucina 10), IL-4 (Interleucina 4), IL-13 (Interleucina 13) e TGF-B (Fator de crescimento transformador Beta), as quais inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, alteram o perfil de polarização de macrófagos, promovem o reparo tecidual, filtragem das células de defesa e angiogêneses (Conran & Belcher, 2018; Sangiuliano et al., 2014).

1.3.1 Inflamação Estéril na Anemia Falciforme

Como mencionado anteriormente, a manifestação clínica da AF tem sua origem na polimerização da HbS, o que resulta na falcização dos eritrócitos e contribui para VOCs. A vaso-oclusão, por sua vez, desencadeia eventos de isquemia e reperfusão, que, ao longo do tempo, causam danos teciduais (Sundd *et al.*, 2019; Ware *et al.* 2017). Essas lesões liberam DAMPs, principalmente eDAMPs (padrões moleculares associados a danos em eritrócitos), que estimulam a progressão da inflamação estéril, caracterizada pela ativação de leucócitos, plaquetas, células endoteliais, tempestade de citocinas, depleção de NO e geração de ERO (Conran & Belcher, 2018; Sundd *et al*., 2019).

Os episódios de vaso-oclusão, associados à perda de flexibilidade dos eritrócitos falcizados, desencadeiam altas taxas de hemólise intra e extravascular (Sundd *et al.*, 2019). A hemólise resulta na liberação de HbS, ERO, HMGB1 (Caixa 1 do Grupo de Alta Mobilidade), DNA mitocondrial, ATP, entre outras moléculas que atuam como DAMPs no ambiente extracelular (Allali *et al.*, 2022; Garcia et al., 2020; Huang *et al.* 2024; Rarick *et al.*, 2024; Sundd *et al.*, 2019; Tumburu *et al.*, 2021). A

oxidação da Hb livre, por exemplo, leva à liberação do grupo heme e de sua forma oxidada, a hemina, ambos potentes agonistas do receptor TLR4, presente em leucócitos circulantes (Kato *et al.*, 2017; Owusu-Ansah *et al.*, 2016; Sundd *et al.*, 2019). A ligação dessas moléculas ao receptor promove o recrutamento do adaptador MyD88 (Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88), que aciona duas rotas principais de ativação de fatores de transcrição inflamatórios. Em uma via direta, a MyD88 interage com as quinases IRAK (Quinases associadas ao receptor da interleucina-1), que, por sua vez, recrutam e ativam a proteína adaptadora TRAF6 (Fator Associado ao Recetor do Fator de Necrose Tumoral 6). Esta ativa o complexo TAK1 (Quinase ativada por Fator de crescimento transformador Beta), que estimula diretamente o complexo IKK (Quinase IκB). O IKK então fosforila a proteína inibitória IκB (Inibidor kappa B), levando à sua degradação e permitindo que o fator de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B) transloque-se ao núcleo, onde regula a expressão de genes pró-inflamatórios(Calvo-Marzal *et al.*, 2006; Conran & Belcher, 2018; Guo *et al.*, 2024).

Paralelamente, a ativação das IRAKs também desencadeia a cascata de sinalização das MAPKs (Quinases ativadas por mitógeno). Essas quinases podem promover a ativação do NF-kB, bem como do fator de transcrição AP-1 (Ativador de Proteína 1), formado principalmente pelos dímeros das proteínas da família Jun (c-Jun) e Fos (c-Fos) (Calvo-Marzal *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2024). O AP-1 atua em cooperação com o NF-κB, amplificando direta ou indiretamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias e pró-coagulantes, como IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1 (Proteína Quimiotática de Monócitos-1) e IL-12 (Interleucina -12) (Calvo-Marzal *et al.*, 2006; Conran & Belcher, 2018; Guo *et al.,* 2024; H. Yu, Lin, Zhang, Zhang, & Hu, 2020).

As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias liberadas desencadeiam eventos em cascata que ativam vias de sinalização secundárias, promovendo a liberação de outras citocinas ou reforçando a produção das mesmas por retroalimentação. As IL-1β e o TNF-α atuam como iniciadores centrais da inflamação, estimulando a expressão de moléculas de adesão endotelial, aumentando a permeabilidade vascular e reforçando as vias de sinalização que envolvem a sua expressão e de outras citocinas (Conran & Belcher, 2018; Sangiuliano *et al.*, 2014). A IL-6, por sua vez, exerce funções pleiotrópicas, sendo mediadora da inflamação aguda ao estimular a síntese de proteínas desta fase, mas podendo atuar na resolução da inflamação ao

inibir a atividade do TNF-α e induzir a produção de IL-10 (Roe, 2021). Ademais, a IL-6 juntamente com a IL-8, pode promover o recrutamento de neutrófilos que quando ativados por DAMPs formam armadilhas extracelulares (NETs) (Conran & Belcher, 2018; Roe, 2021; Sangiuliano *et al.*, 2014). Já a MCP-1 atua principalmente no recrutamento de monócitos para o local da inflamação, onde posteriormente os mesmos se diferenciam em macrófagos que se polarizam de acordo com os estímulos locais, podendo intensificar a resposta inflamatória (Calvo-Marzal *et al.*, 2006; Singh *et al*., 2021). A IL-12p70, por sua vez, é um potente indutor de células NK (*natural killer*), além de promover a diferenciação de células T CD4+ virgem em células Th1, as quais produzem citocinas como IFN-γ, que dentre outras funções, é responsável por ativar macrófagos e induzir a produção de IL-12 e NO pelos mesmos (Roe, 2021; Tau & Rothman, 2001) (Figura 2).

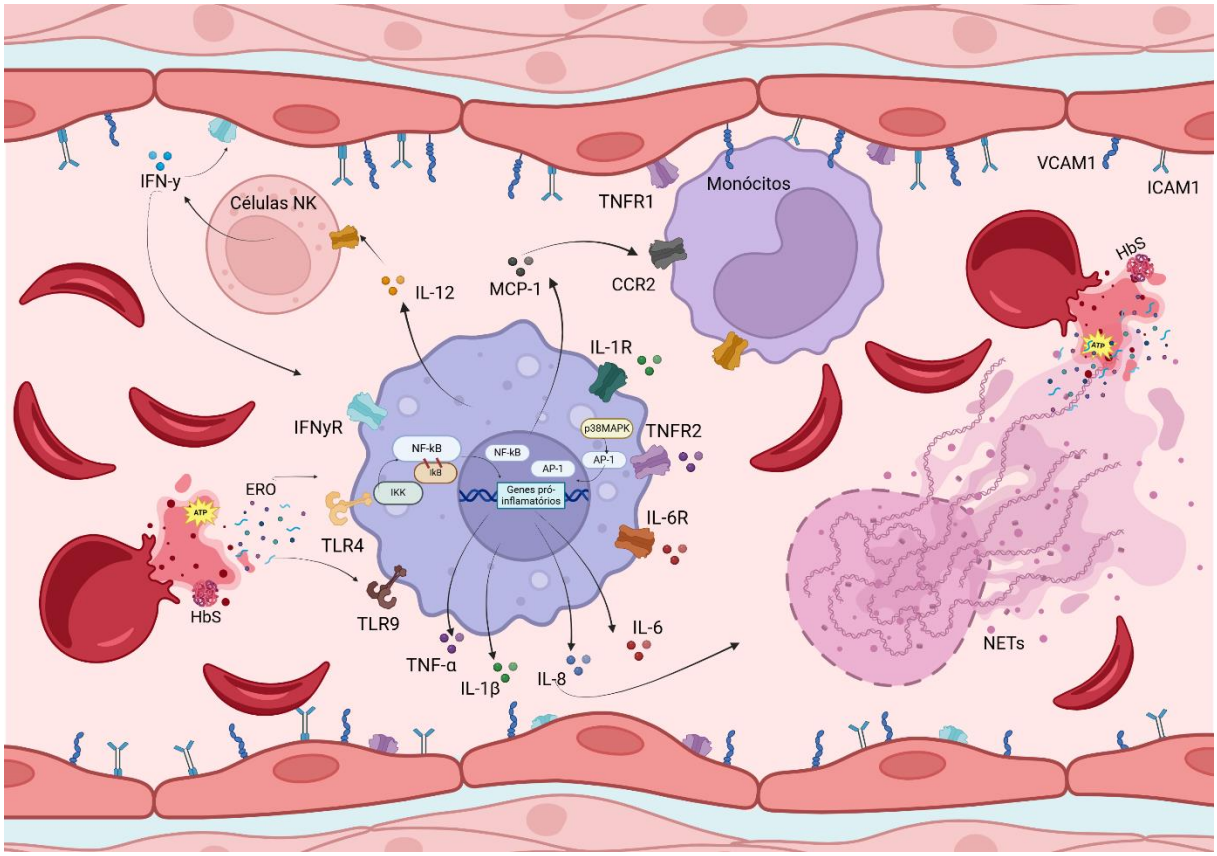


Figura 2. **Inflamação estéril na anemia falciforme (AF):** Representação esquemática das interações celulares e moleculares envolvidas na resposta inflamatória na AF. A hemoglobina livre (Hb) liberada pela hemólise, juntamente com espécies reativas de oxigênio (ERO), ativa receptores do tipo Toll (TLR4 e TLR9) em células sentinelas de defesa, desencadeando vias de sinalização intracelular como NF-κB, MAPK e AP-1, que culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12) e quimiocinas (MCP-1/CCL2). O interferon gama (IFN-γ), produzido por células NK, também estimula macrófagos por meio do receptor IFNγR. As citocinas interagem com receptores específicos como TNFR1 e TNFR2, IL-1R e IL-6R, amplificando a resposta inflamatória e recrutando monócitos via receptor CCR2. Moléculas de adesão como VCAM-1 e ICAM-1 favorecem a interação entre células inflamatórias, eritrócitos falcizados e endotélio, contribuindo para a vaso-oclusão. Neutrófilos ativados liberam armadilhas extracelulares, intensificando o dano vascular. Hb: hemoglobina. ERO: espécies reativas de oxigênio. TLR4/TLR9: receptores do tipo Toll 4 e 9. NF-κB: fator nuclear kappa B. MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno. NF-kB: fator nuclear kappa b. IKK: IkB quinase. IkB: inibidor kappa b. AP-1: proteína ativadora 1. TNF-α: fator de necrose tumoral alfa. IL: interleucina. MCP-1/CCL2: proteína quimiotática de monócitos 1 / ligante 2 do motivo CC de quimiocina. IFN-γ: interferon gama. NK: células Natural Killer. IFNγR: receptor de interferon gama. TNFR1/TNFR2: receptores 1 e 2 do fator de necrose tumoral. IL-1R: receptor de interleucina 1. IL-6R: receptor de interleucina 6. CCR2: receptor de quimiocina CC tipo 2. VCAM-1: molécula 1 de adesão de célula vascular. ICAM-1: molécula 1 de adesão intercelular. NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos. Fonte: Elaborado pelo autor. *Biorender*. Referências de consulta: Allali et al., 2022; Garcia et al., 2020; Huang et al. 2024; Rarick et al., 2024; Sundd et al., 2019; Tumburu et al., 2021 ; Conran & Belcher, 2018; Guo et al., 2024.

1.4. TERAPIAS PARA DOENÇA FALCIFORME

Apesar dos avanços nas investigações sobre os mecanismos fisiopatológicos da DF, as opções terapêuticas aprovadas ainda são limitadas, tendo em vista que atualmente há apenas três medicamentos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) e comercialmente disponíveis para o tratamento da condição: a hidroxiureia (HU), a L-glutamina e o crizalizumabe.

A HU foi o primeiro medicamento aprovado pela FDA para o tratamento da AF, inicialmente em 1998 para adultos e, posteriormente, em 2017 para uso pediátrico (U.S. Food and Drug Administration, 2017). Embora os mecanismos moleculares da HU ainda não estejam totalmente elucidados, sabe-se que o fármaco atua principalmente induzindo a produção de Hb Fetal (HbF), o que reduz a polimerização da HbS, diminuindo a frequência de VOCs e a necessidade de transfusões sanguíneas, além de aumentar quantidade de NO e diminuir leucócitos (Kavanagh, Fasipe, & Wun, 2022; McGann & Ware, 2011). Apesar de sua eficácia clínica, a adesão ao tratamento é frequentemente comprometida devido à ocorrência de efeitos colaterais, como alopecia, erupções cutâneas, cefaleia, neutropenia, náuseas além da necessidade de monitoramento laboratorial frequente (Badawy *et al.*, 2017; Neumayr *et al.*, 2019). Ademais, a HU pode apresentar potencial carcinogênico e afetar negativamente a fertilidade, levantando preocupações adicionais em seu uso a longo prazo (Badawy *et al.*, 2017; McGann & Ware, 2011).

Aproximadamente duas décadas após aprovação da hidroxiureia, a L-glutamina foi aprovada pela FDA, em 2017, para uso adulto e pediátrico (≥ 5 anos) na AF (*U.S. Food and Drug Administration*, 2017). Esse aminoácido contribui principalmente para a redução do estresse oxidativo nos eritrócitos, garantindo a manutenção do sistema antioxidante, haja vista que a glutamina é a precursora da síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), o qual é essencial para reduzir os compostos oxidados. O uso da L-glutamina diminui a frequência de VOCs e da síndrome torácica aguda (STA) (Niihara *et al.*, 2018). Entretanto, foram registrados alguns efeitos adversos como náuseas leves, dor torácica não cardíaca, fadiga e dor musculoesquelética (Quinn, 2018). Ressalta-se que os desafios para adesão ao tratamento com esse composto consistem principalmente no seu alto custo e sua fórmula em pó que requer diluição e administração duas vezes ao dia (Quinn, 2018).

Por fim, o crizalizumabe foi a mais recente aprovação feita pela FDA, em 2019, para pacientes do DF (≥ 16 anos) (*U.S. Food and Drug Administration*, 2019). Esse composto trata-se de um anticorpo monoclonal humanizado que atua bloqueando a P-selectina, haja vista que ao inibir a interação dessa proteína transmembrana de células endoteliais, o crizalizumabe reduz agregação celular e obstrução vascular que desencadeia as VOCs (Kavanagh *et al.*, 2022; Neumayr *et al.*, 2019). Esse medicamento é administrado por infusão intravenosa a com as duas primeiras aplicações quinzenais, seguidas de doses mensais. Ademais, os efeitos colaterais

mais frequentemente observados incluem náusea, artralgia, febre e reações infusionais leves (Neumayr *et al.*, 2019).

Essas terapias medicamentosas representam marcos importantes no tratamento farmacológico da doença, ainda que não sejam resolutivas, mas sim paliativas, com foco na redução de sintomas e complicações associadas. Entretanto, novos compostos têm apresentado grande potencial farmacológico para tratar as manifestações clínicas da condição de diferentes maneiras, mas com igual eficiência.

1.5. MELATONINA

A MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula derivada do triptofano que conserva em sua estrutura química um anel aromático, o qual lhe confere propriedades antioxidantes, tendo em vista a capacidade doadora de elétrons desta estrutura cíclica (Tan *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2025). A MEL é produzida em diversos organismos tais como plantas, algas, bactérias e invertebrados (Cho *et al.*, 2021). Nos humanos, esse composto é sintetizado por vários órgãos como retina, fígado, pâncreas, rins e pele, porém sua principal produção deriva da glândula pineal e classicamente desempenha o papel regulatório do ciclo circadiano em resposta a luz (Galano & Reiter, 2018; Torres *et al*., 2025). Entretanto, atualmente, um dos aspectos mais estudados da MEL é sua capacidade de atuar como um potente antioxidante e anti-inflamatório, além da baixa toxicidade e propriedades anfifílicas, o que facilita seu acesso intracelular, o qual também pode ser mediado por receptores específicos chamados de MT1 e MT2, distribuídos no cérebro e em diversos órgãos periféricos (Cho *et al.*, 2021; Jockers *et al.*, 2016).

O efeito antioxidante da MEL se dá por meio de mecanismos diretos e indiretos, fazendo desta molécula multifacetada um protetor endógeno contra radicais livres altamente tóxicos derivados do oxigênio e do nitrogênio (Chitimus *et al.*, 2020). A atividade direta de eliminação de radicais livres pela MEL é conhecida há mais de 25 anos e ocorre por meio de sua estrutura, na qual ela reduz espécies reativas, formando metabólitos que conservam a capacidade de redução (Chitimus *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2025). A MEL também atua de maneira indireta na defesa antioxidante ao estimular a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (Chitimus *et al.*, 2020; Radogna *et al.* 2010). Essa regulação ocorre principalmente por meio da ativação de fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo, com destaque para

o Nrf2 (Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2), um dos principais reguladores da expressão gênica de enzimas citoprotetoras. Em condições de estresse oxidativo, a MEL favorece a translocação do Nrf2 para o núcleo, onde ele se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) no DNA, aumentando a transcrição de genes de interesse (Chitimus *et al.*, 2020; Radogna *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2025).

Além da ação antioxidante, a MEL também apresenta propriedades anti-inflamatórias significativas, envolvendo a modulação de diversas vias de sinalização intracelular. A MEL tem a capacidade de inibir a atividade transcricional do NF-κB por meio de diferentes mecanismos moleculares, incluindo a ativação da via da sirtuína 1 (SIRT1), a regulação do complexo IκB quinase, interação e supressão do receptor TLR-4, além de reduzir as ERO *(*Escribano *et al.,* 2014*;* Hardeland*,* 2018*;* Radogna *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2022). Esses processos comprometem a cascata inflamatória subsequente, levando a uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6, IL-12, TNF- α, MCP-1 entre outras, bem como dos próprios componentes do inflamassoma NLRP3. Ademais, a MEL é capaz de suprimir a atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima envolvida na síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias relacionadas à dor, além de modular negativamente a expressão das isoformas da óxido nítrico sintase, tanto a induzível (iNOS) quanto a neuronal (nNOS) (Favero *et al.*, 2017; Hardeland, 2018).

Os efeitos anti-inflamatórios da MEL têm sido amplamente investigados em diferentes modelos patológicos, revelando sua atuação versátil na modulação da resposta inflamatória. Em modelo de choque séptico induzido por LPS em ratos suíços, a administração de MEL foi capaz de atenuar significativamente a resposta inflamatória, reduzindo os níveis locais de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-12 e IFN-γ, e, simultaneamente, aumentando a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, tanto no sítio da injeção quanto de forma sistêmica (Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram observados por Wu *et al.* (2020), que demonstraram que a MEL foi eficaz em suprimir a ativação do inflamassoma NLRP3 em camundongos submetidos a um modelo de inflamação alérgica das vias aéreas. Além disso, em um estudo de esclerose múltipla induzida por cuprizona, a administração de MEL durante a fase de desmielinização resultou no aumento dos níveis de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx), além de redução significativa nos níveis de malondialdeído (MDA) e citocinas inflamatórias como IL-1β e TNF-α (Abo Taleb & Alghamdi, 2020). Dessa forma, a MEL dispõe de ações pleiotrópicas que abrangem

funções antioxidantes, anti-inflamatórias e reguladoras de homeostase em diferentes condições clínicas e modelos experimentais (Figura 3)

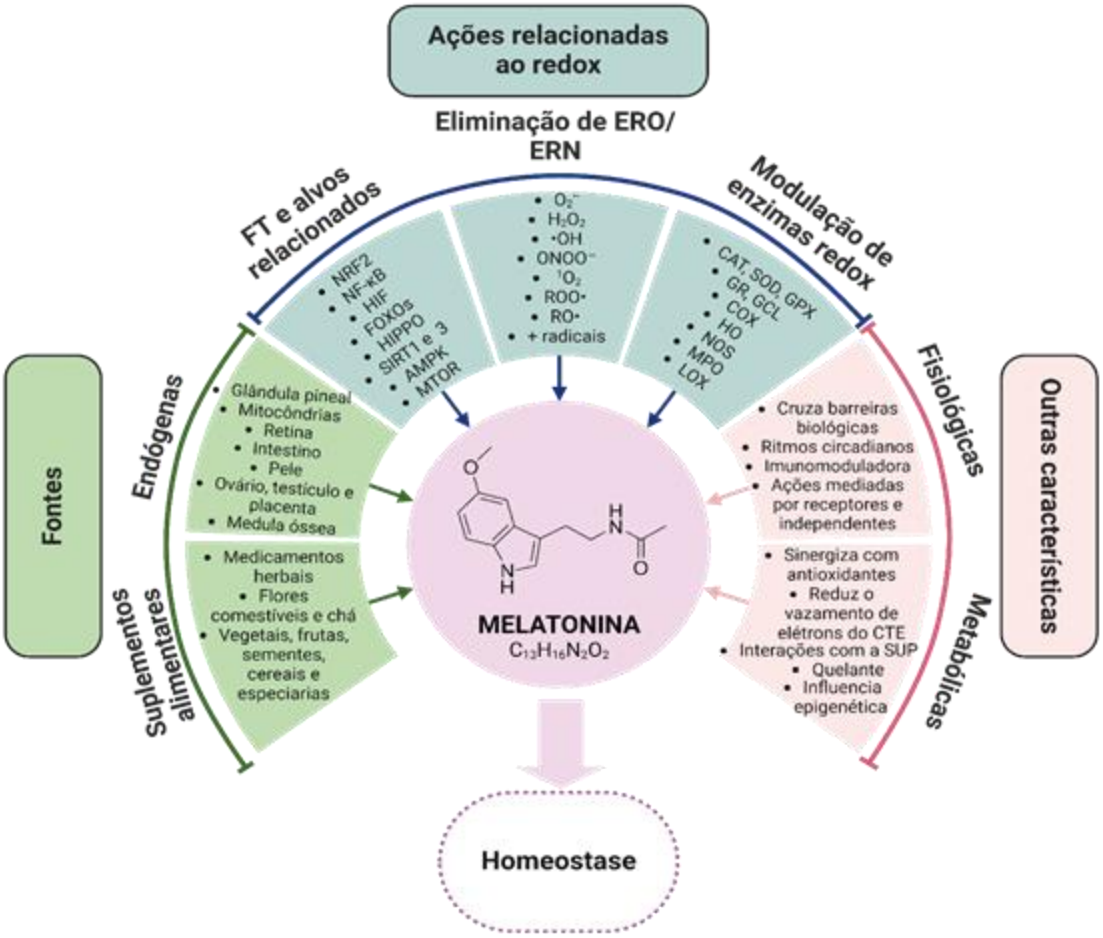


Figura 3. Estrutura, fontes e principais características metabólicas, fisiológicas e antioxidantes da MEL. TF: fator de transcrição. Nrf2, fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2. NF-κB: fator nuclear kappa-cadeia leve-potenciador de células B ativadas. HIF: fator induzível por hipóxia. FOXO: forkhead box classe O. SIRT: sirtuína. AMPK: proteína quinase ativada por AMP. mTOR: alvo mamífero da rapamicina. O2•-: superóxido. H2O2: peróxido de hidrogênio. •OH: radical hidroxila. $ONOO^-$: peroxinitrito. $^1O_2$: oxigênio singlete. ROO•: radical peroxil. CAT: catalase. SOD: superóxido dismutase. GR: glutationa redutase. GCL: glutamatocisteína ligase. COX: ciclooxigenase. HO: heme oxigenasse. NOS: óxido nítrico sintase. MPO: mieloperoxidase. LOX: lipoxigenase. CTE: cadeia de transporte de elétrons. SUP: sistema ubiquitina-proteassoma. Adaptado de Torres *et al*. (2025).

1.6. ERGOTIONEÍNA

A ergotioneína (ERT) é um aminoácido tiouréia natural, derivado da histidina, sintetizado exclusivamente por alguns fungos e bactérias do solo (Cheah & Halliwell, 2012). Esse aminoácido apresenta uma estrutura química única, com um anel imidazólico contendo enxofre que pode ser encontrado na forma de tiol ou tiona, o que lhe confere alta estabilidade redox e capacidade de neutralizar ERO e ERN podendo ser reciclada intracelularmente sem consumo enzimático significativo (Cheah &

Halliwell, 2012). Assim como a MEL, a ERT tem enorme potencial terapêutico, haja vista ausência de toxicidade ou efeitos adversos, mesmo quando administradas em altas dose, como já demonstrado em estudos (Forster *et al.*, 2015; Marone *et al.*, 2016). A FDA conferiu à ERT o status de *Generally Recognized As Safe* (GRAS), e a *European Food Safety Authority* (EFSA) considera segura a suplementação até 30 mg/dia em adultos. Ensaios clínicos em humanos (5–25 mg/dia por até 16 semanas) demonstraram boa tolerabilidade sem efeitos adversos em parâmetros clínicos, cognitivos ou hepáticos. Estudos em animais corroboram essa segurança com doses muito superiores (até 1600 mg/kg/dia). (Cheah & Halliwell, 2012; Forster *et al.*, 2015; Marone *et al.*, 2016; Zajac *et al.*, 2025).

Apesar de não ser produzida endogenamente em plantas e mamíferos, a ERT é amplamente biodisponível em tecidos humanos e animais, sendo o segundo tiol mais abundante nos eritrócitos maduros. Este aminoácido é obtido principalmente através da alimentação e sua internalização celular ocorre através de um transportador altamente seletivo, denominado transportador de ergotioneína (ETT), antigamente conhecido como transportador de cátions orgânicos (OCTN1) (Cheah & Halliwell, 2012; Forster *et al.*, 2015; Kuypers, 2014). Esse transportador apresenta ampla distribuição em tecidos como fígado, rins, sistema nervoso central, trato gastrointestinal e células hematopoiéticas, sugerindo um papel essencial na manutenção da homeostase redox e na proteção celular (Tang *et al.*, 2018).

As propriedades citoprotetoras da ERT estão fundamentadas, primordialmente, em sua ação de antioxidante estrutural. Essa molécula atua diretamente na neutralização de ERO e ERN, como o radical hidroxila (•OH), $ONOO^-$, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1O_2$) (Cheah & Halliwell, 2012; Song *et al.*, 2010). Além disso, a ERT contribui para a manutenção dos níveis intracelulares de glutationa (GSH), promovendo direta ou indiretamente a conversão de sua forma oxidada, o dissulfeto de glutationa (GSSG), de volta à forma funcional (Song et al., 2010). Outro aspecto relevante é sua capacidade de reduzir a meta-hemoglobina (MetHb), forma oxidada da hemoglobina, cuja presença está aumentada na DF e representa um importante gatilho para o desequilíbrio redox (Arduini et al., 1990).

Adicionalmente, estudos demonstraram a ação moduladora da ERT sobre vias redox intracelulares, tais como e Nrf2-ARE e FOXO3 (Proteína O da caixa de forquilha 3). Conforme demonstrado por Hseu et al. (2015), *in vitro*, a ERT é capaz de promover a translocação nuclear do Nrf2 por meio da inibição da proteína Keap1, aumento da

estabilidade do Nrf2 citoplasmático e ativação das vias PI3K/AKT, culminando na ativação do ARE e no aumento da expressão de genes de defesa oxidativa (Hseu et al., 2015). Quanto ao FOXO3, o estudo de Bernardo et al. (2022) evidenciou que o tratamento com baixa dose de ERT em células eritroide K562 foi capaz de promover o aumento da expressão de *FOXO3* e de enzimas antioxidantes como tiorredoxina (Trx), a qual garante a manutenção dos níveis de peroxirredoxinas (Prx) na sua forma reduzida, dessa forma, sugerindo um eixo de sinalização ERT-FOXO3 –Trx (Bernardo *et al.*, 2022).

Além de suas propriedades antioxidantes, a ERT também exerce importantes efeitos anti-inflamatórios. Esse aminoácido é capaz de inibir a ativação da p38 MAPK, e, dessa forma, impedir a degradação da IkB. Ao bloquear essa cascata, a ERT reduz a translocação nuclear da subunidade p65 do NF-kB, suprimindo a expressão de genes como TNF-a, IL-6 e IL-1β (Saing *et al.*, 2016; Salama *et al.*, 2021). Ademais, a inibição da p38 MAPK também impede a fosforilação dos componentes do complexo AP-1 (Ativador da Proteína – 1), como ATF2 (Fator de transcrição ativador 2) e c-Jun (Fator de Transcrição Jun), os quais são responsáveis pela transcrição de citocinas como IL-2 e IL-8 (Apparoo *et al.*, 2022; Salama *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado por Laurenza *et al.* (2008), utilizando cultura de células musculares de camundongos expostas previamente ao ácido palmítico, observou-se que o tratamento com ERT resultou em redução significativa na expressão e secreção de IL-6 (Laurenza *et al.*, 2008). Corroborando esses achados, Rahman et al. (2003) demonstraram que a ERT inibe a ativação do NF-κB induzida tanto por TNF-α quanto por H_2O_2 em células alveolares, evidenciando sua capacidade de modular a resposta inflamatória frente a diferentes estímulos oxidativos (Rahman *et al.*, 2003). Por fim, em um estudo com células endoteliais, Koh et al. (2021) registraram que a ERT reduziu significativamente a expressão de mRNA de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α, além de inibir a atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Koh *et al.*, 2021). Esses dados reforçam o papel multifacetado da ERT como moduladora da inflamação e do estresse oxidativo (Figura 4).

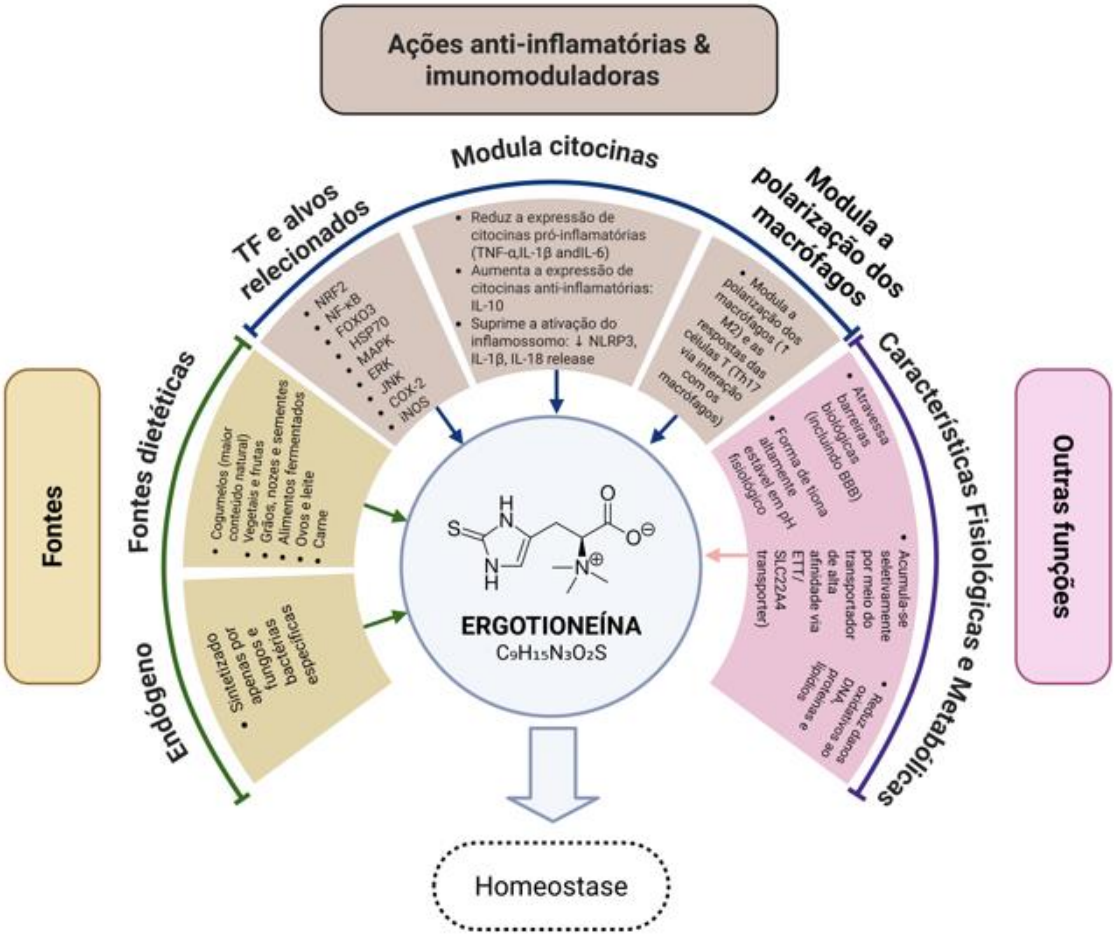


Figura 4. Estrutura, fontes e principais características metabólicas, fisiológicas e antioxidantes da ERT. Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2. NF-κB: fator nuclear kappa-cadeia leve-potenciador de células B ativadas. FOXO: forkhead box classe O. HSP70: Proteína de choque térmico 70. MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno. ERK: quinase regulada por sinal extracelular. JNK: quinase N-terminal c Jun. COX-2: ciclooxigenase 2. iNOS: óxido nítrico sintase induzível. TNF-α: Fator de necrose tumoral. IL-1β: interleucina 1β. IL-6: interleucina 6. IL-10: interleucina 10. IL-18: interleucina 18. NLRP3: NOD-like receptor protein 3. ETT: transportador de ergotioneína. Adaptado de Bernardo et al. (2025) (não publicado). *Biorender*

1.7. CAMUNDONGOS TRANSGÊNICO COMO MODELO DE ESTUDO

Humanos e camundongos compartilham diversas características fisiológicas e patológicas, apresentando similaridades nos sistemas nervoso, cardiovascular, endócrino, imunológico, musculoesquelético, entre outros órgãos internos (Fujiwara, 2018; Rosenthal & Brown, 2007). Além de serem modelos experimentais de fácil manipulação, manutenção, reprodução e controle, os camundongos também apresentam características genômicas conservadas em relação aos humanos, o que tem possibilitado avanços significativos em engenharia genética para a criação de modelos experimentais que mimetizam patologias humanas com alta fidelidade (Perlman, 2016). Esses modelos têm contribuído não apenas para o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças, mas

também para a avaliação de novas estratégias terapêuticas e desenvolvimento de fármacos (Denayer et al., 2014; Rosenthal & Brown, 2007).

Ao longo das últimas décadas, o avanço das técnicas de edição genética possibilitou o desenvolvimento de modelos murinos humanizados para a AF, sendo o modelo Berkeley um dos mais amplamente utilizados em estudos pré-clínicos (Kamimura et al., 2024). Nesse modelo, os camundongos foram geneticamente modificados para carregar genes das cadeias globínicas humanas, incluindo cadeia β^S, por meio de um transgene ($Hba^{0/0}$ $Hbb^{0/0}$ $Tg(Hu\text{-}miniLCR\alpha1^G\gamma^A\gamma\delta\beta^S)$. Como resultado, esses animais expressam exclusivamente a HbS e reproduzem de forma significativa as principais manifestações clínicas observadas em indivíduos com AF (Manci *et al.*, 2006; Paszty *et al.*, 1997).

Semelhante aos pacientes, os camundongos Berkeley apresentam hemácias falciformes em esfregaços sanguíneos periféricos, anemia hemolítica progressiva (intensificada com o envelhecimento), reticulocitose acentuada e leucocitose, sugerindo um estado de inflamação crônica e disfunção da imunidade inata (Charrin *et al.*, 2016; Kamimura *et al.*, 2024; Paszty *et al.*, 1997). Além disso, esse modelo desenvolve hiperalgesia mecânica e térmica, bem como complicações multissistêmicas, incluindo hipertensão pulmonar, cardiomiopatia, nefropatia, disfunção hepática e priapismo, características frequentemente observadas em pacientes com AF(Bakeer *et al.*, 2016; Charrin *et al.*, 2016; Hsu *et al*., 2007; Kamimura *et al.*, 2024; Vats *et al.*, 2021).

Entretanto, é importante destacar que existem limitações e divergências relevantes entre o modelo murino e o quadro clínico humano da AF. Embora os camundongos transgênicos para AF apresentem isquemia cerebral, não há evidências de que desenvolvam espontaneamente acidentes vasculares cerebrais (AVCs), uma complicação observada em cerca de 28% das crianças e 25% dos adultos com a doença (Manci et al., 2006). Além disso, não há relatos de que o modelo mimetize de forma espontânea os episódios recorrentes de VOC, uma das manifestações clínicas mais características da AF em humanos (Kamimura *et al.*, 2024). Por fim, diferentemente dos pacientes, os camundongos humanizados para condição apresentam volume corpuscular médio (VCM) elevado, baixa hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM), além de uma hematopoiese esplênica ativa, que resulta em esplenomegalia evidente (Manci *et al.*, 2006; Paszty *et al.*, 1997).

Diante da relevância dos processos inflamatórios e oxidativos na fisiopatologia da AF e do potencial terapêutico de compostos como a MEL e a ERT, torna-se essencial investigar de forma integrada seus efeitos moduladores, visando contribuir para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no manejo dessa doença, especialmente no modelo murino transgênico Berkeley, que busca reproduzir as características clínicas e fisiopatológicas observadas em humanos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios da MEL e ERT sobre mecanismos de progressão da inflamação estéril em modelo animal de camundongos transgênicos para anemia falciforme.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas associado à progressão da inflamação estéril na anemia falciforme.

- Investigar, individualmente, os efeitos das biomoléculas ativas (MEL e ERT) sobre esses mediadores inflamatórios.

- Investigar se o conjunto de citocinas analisadas configura uma assinatura biológica capaz de diferenciar os grupos estudados.

3. METODOLOGIA

3.1. OBTENÇÃO E ALOJAMENTO DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos Berkeley (STOCK Hba^{tm1Paz} Hbb^{tm1Tow} Tg (HBA-HBBs)41Paz/J), linhagem humanizada para AF (BERK-SS) e os camundongos traço falciforme (AS) precursores foram obtidos dos Laboratórios Jacksons (Bar Harbor, ME) e encaminhados ao Laboratório de Animais do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP), onde permaneceram alojados sob condições livre de patógenos e em uma temperatura controlada (21-25ºC), com no máximo 5 indivíduos por caixa, em um ciclo de 12h/12h de claro/escuro, com acesso irrestrito a água autoclavada e ração estéril, até atingirem 5 semanas de idade. A partir da linhagem precursora foram desenvolvidas colônias de indivíduos SS e AS, os quais foram utilizados como doadores para o processo de transplante descrito a seguir.

3.2. PRODUÇÃO DOS CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS A PARTIR DE TRANSPLANTE

Os camundongos transgênicos SS e AS utilizados no estudo foram gerados a partir de um processo de transplante. Os animais AS receptores da colônia, após completarem 5 semanas de idade, foram suplementados por três dias com água antibiótica, e em seguida submetidos à irradiação gama por fonte de Cobalto-60 em dose subletal única de 9 gray (Gy). Posteriormente, 1,5 x 10^6 células nucleadas da medula óssea femoral dos camundongos SS e AS foram coletadas e injetadas através do plexo orbital, nos animais receptores (AS), os quais foram transferidos para alojamentos esterilizados com água autoclavada e comida estéril. Os camundongos recém transplantados foram suplementados com água antibiótica por 10 dias e permaneceram 54 dias em repouso até a completa recuperação medular e substituição dos eritrócitos. Ao final do período de repouso a eficiência do transplante foi averiguada pela análise do perfil hemoglobínico por Cromatografia Liquida de Alta Performance (*CDM System, Variant V-II Instrument I*), sendo considerados SS e AS e, portanto, aptos para compor os grupos de estudos, os indivíduos com concentrações de HbS≥90% e HbS≤40%, respectivamente (Apêndice I).

Dessa forma, ao final do processo de transplante foram obtidos 5 camundongos transgênicos AS (grupo controle) e 22 camundongos transgênicos SS, sendo que os últimos foram subdivididos em três grupos, compostos de camundongos de ambos os sexos: 8 no grupo doente (SS), 9 no grupo doente tratado com MEL (SS+MEL) e 5 no grupo doente tratado com ERT (SS+ERT).

Destaca-se que todos os procedimentos experimentais descritos foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade de Campinas (CEUA/UNICAMP; Protocolo: 5955-1/2022) e realizados de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a legislação brasileira n° 11.794/2008. Além disso, é importante mencionar que foram dedicados esforços na execução dos experimentos para minimizar o sofrimento dos animais, utilizando o número mínimo necessário para garantir resultados replicáveis.

3.3. PERÍODO EXPERIMENTAL

Após o período de recuperação, com aproximadamente 4 meses de idade, todos os camundongos ingressaram no período experimental, onde os grupos controle (AS) e doente (SS) permaneceram por 60 dias ingerindo água pura e comida irrestrita. A cada 10 dias, o consumo de água e o peso dos animais foi monitorado.

Aos camundongos do grupo SS+ERT foi administrada a dose média diária de 35mg/kg de ERT adquirida do Instituto de Pesquisa Tetrahedron (Vincennes, França) por 60 dias. O composto foi diluído na água dos animais e seu consumo foi monitorado a cada 10 dias através da pesagem dos camundongos e medição da água restante no recipiente. Quando necessário foram ajustadas a quantidade de ERT diluída para garantir a ingestão média final de 35mg/kg/dia. A escolha da dose e da metodologia aplicada foi fundamentada em estudos anteriores que forneceram evidências robustas dos seus benefícios (Dare *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2018).

Aos camundongos do grupo SS+MEL foi administrada a dose média diária de 10mg/kg de MEL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 60 dias. O composto foi diluído na água dos animais e da mesma forma que no grupo anterior, o consumo foi monitorado a cada 10 dias através da pesagem dos camundongos e medição da água restante no recipiente. Quando necessária foram ajustadas a quantidade de MEL diluída para garantir a ingestão média final de 10 mg/kg/dia. A escolha da dose e da

metodologia aplicada foi fundamentada em estudos anteriores que forneceram evidências robustas dos seus benefícios (Song *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018).

3.4. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após o período experimental de 60 dias, os camundongos foram pesados e submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia com 3% de isoflurano em 100% da fração inspirada de oxigênio, conforme a metodologia recomendada pelo *Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais* produzido pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os dados morfométricos, juntamente com o sexo biológico dos animais, estão disponíveis no Apêndice II.

Em tubos de EDTA foram coletados aproximadamente 500 µl de sangue de cada camundongo por punção cardíaca. Em seguida, cada amostra de sangue total foi centrifugada a 3.500g por 10 minutos a 4ºC. Ao final foram alíquotados, no mínimo, 200 µl de plasma por amostra e armazenados a -80ºC.

3.5. ANÁLISE DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A quantificação das citocinas inflamatórias foi realizada por meio da técnica de Citometria de Fluxo utilizando o kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. A partir do kit selecionado foi feita a detecção de um painel composto por seis citocinas murinas: IL-6, IL-10, MCP-1 (CCL2), IFN-γ, TNF-α e IL-12p70.

As amostras de plasma, previamente armazenadas a −80 °C, foram descongeladas em gelo e incubadas, juntamente com o *pool* de beads de captura e o reagente de detecção conjugado à PE, por 3 h à temperatura ambiente, protegidas da luz. O padrão concentrado de citocinas (*Standard*), fornecido pelo kit, foi reconstituído e submetido a diluições seriadas para a obtenção da curva padrão de cada analito, seguindo as instruções do fabricante. Assim como as amostras, os padrões foram incubados com o *pool* de beads de captura e o reagente de detecção PE nas mesmas condições experimentais. Após a incubação, procedeu-se à lavagem das amostras e dos padrões com tampão específico e posterior ressuspensão em *Wash Buffer*, conforme especificações do kit, para aquisição dos dados no citômetro de fluxo *BD FACSVerse™*. A análise posterior foi conduzida no *CBA Analysis Software*, utilizando

ajuste por curva padrão sigmoidal de quatro parâmetros logísticos (4PL) para cada citocina, possibilitando a quantificação das concentrações em pg/mL (Apêndice III).

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no software *Statistica 9.0* (*Statsoft Inc., Tulsa*, OK, USA), enquanto os gráficos foram feitos no software *GraphPad Prisma versão 5.01* para *Windows (GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada usando *Normal Probability Plots of Residuals* enquanto a homocedasticidade dos dados pelo teste de *Levene*, assumindo nível de significância de 0,05. Nas comparações entre os grupos estudados, foi adotado o *General Linear Model* (GLM), no formato *one-way* ANOVA, aplicando teste *post hoc* de Bonferroni quando necessário. Foram considerados estatisticamente significativo $p < 0,05$, sendo os resultados expressos na forma de média ± erro padrão.

Como abordagem de análise multivariada, foi realizada uma Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis* – PLS-DA) conduzida no *MetaboAnalyst*, com o objetivo de avaliar se o perfil combinado das citocinas analisadas seria capaz de discriminar os diferentes grupos experimentais e evidenciar os efeitos dos tratamentos.

4. RESULTADOS

4.1. REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NOS GRUPOS CONTROLES

Na comparação entre os grupos AS e SS, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos das citocinas analisadas (Figura 5A–F). Embora a representação gráfica sugira um padrão de concentrações elevadas de IL-12p70, TNF-α, MCP-1, IL-6 e IL-10 no grupo SS em relação ao grupo AS, tais variações não atingiram significância estatística. Esses achados indicam que, sob as condições experimentais avaliadas, o grupo SS não apresentou um perfil inflamatório claramente distinto do grupo AS.

A análise multivariada realizada por PLS-DA corrobora os achados da análise univariada, evidenciando a sobreposição entre os grupos AS e SS no espaço de componentes principais (Figura 6A). O componente 1, que explica 46,9% da variação total dos dados, concentra a maior parte da informação responsável por discriminar os grupos. De acordo com o VIP Score (Figura 6B), a IL-12p70 foi identificada como a citocina de maior relevância na formação desse componente. No entanto, a sobreposição indica que, mesmo ao considerar o perfil combinado das citocinas avaliadas, os grupos controle não apresentam separação clara entre si. Dessa forma, reforça-se a interpretação de que a condição isolada, sem intervenção, não induziu um padrão inflamatório sistêmico distinto entre os grupos controles sob as condições do experimento.

4.2. PERFIL INFLAMATÓRIO DO GRUPO TRATADO COM ERT

O grupo tratado com ERT não apresentou diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos das citocinas analisadas (Figura 5A–F), demonstrando um perfil muito similar ao SS para a maioria das citocinas, com excessão do TNF-α, onde é possível observar uma tendência a concentrações menores em comparação ao SS, ainda que sem significância estatística (Figura 5B).

Essas observações são reforçadas pela análise multivariada, na qual se evidencia uma considerável sobreposição entre os grupos SS e SS+ERT no espaço de componentes principais (Figura 6A), indicando que o perfil combinado das citocinas avaliadas não promoveu uma distinção clara dos grupos, sendo que a discreta

separação observada entre eles parece ser influenciada, principalmente, pela contribuição do TNF-α na modelagem do componente discriminante (Figura 6B).

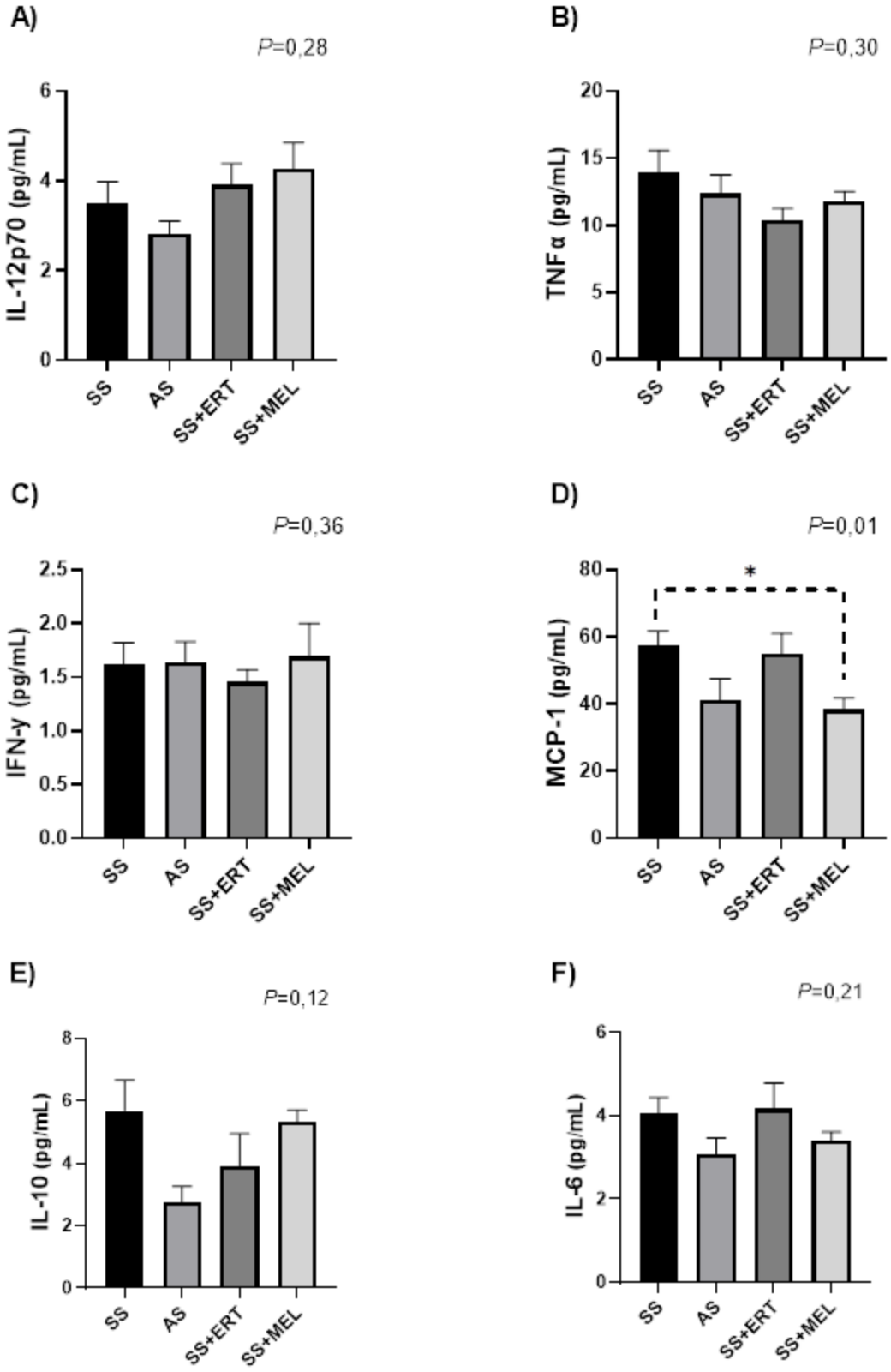


Figura 5. Concentração plasmática das citocinas. As dosagens de IL-12p70 (**A**), TNF-α (**B**), IFN-γ (**C**), MCP-1 (**D**), IL-10 (**E**) e IL-6 (**F**) foram quantificadas em pg/ml (picograma por mililitro) para cada grupo experimental. **IL-12p70:** Interleucina 12 subunidade 70. **TNF-α:** Fator de necrose tumoral alfa. **IFN-γ:** Interferon gama. **MCP-1:** Proteína quimiotática de monócito. **IL-10:** Interleucina 10**. IL-6:** Interleucina 6. **SS**: Grupo doente. **AS**: Grupo controle. **SS +ERT**: Grupo doente tratado com ergotioneína. **SS+MEL:** Grupo doente tratado com melatonina. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média (±SEM). *General Linear Models* (GLM) com formato ANOVA one-way, seguida de teste de *post-hoc* de Bonferroni, quando necessário. ***** Indica diferença estatística entre os grupos, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo

4.3. PERFIL INFLAMATÓRIO DO GRUPO TRATADO COM MEL

O grupo tratado com MEL apresentou uma redução estatisticamente significativa nas concentrações de MCP-1, quando comparado ao grupo SS (Figura 5D), sugerindo uma modulação seletiva da resposta inflamatória. Para as demais citocinas analisadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, é possível identificar uma tendência de redução nas concentrações de TNF-α e IL-6 (Figuras 5B e 5F, respectivamente), indicando um possível efeito atenuador adicional do tratamento.

De forma complementar, a análise multivariada por PLS-DA demonstrou certa sobreposição entre os grupos SS e SS+MEL, sugerindo que o perfil combinado das citocinas avaliadas não resultou em uma distinção robusta entre os grupos. Essa sobreposição reforça a ideia de que o efeito da MEL foi seletivo, sendo que a disposição dos grupos observada no espaço de componentes foi parcialmente explicada pela variação nas concentrações de MCP-1, haja vista que ela foi elencada como a segunda citocina que mais contribuiu para formação do componente 1 (Figura 6B).

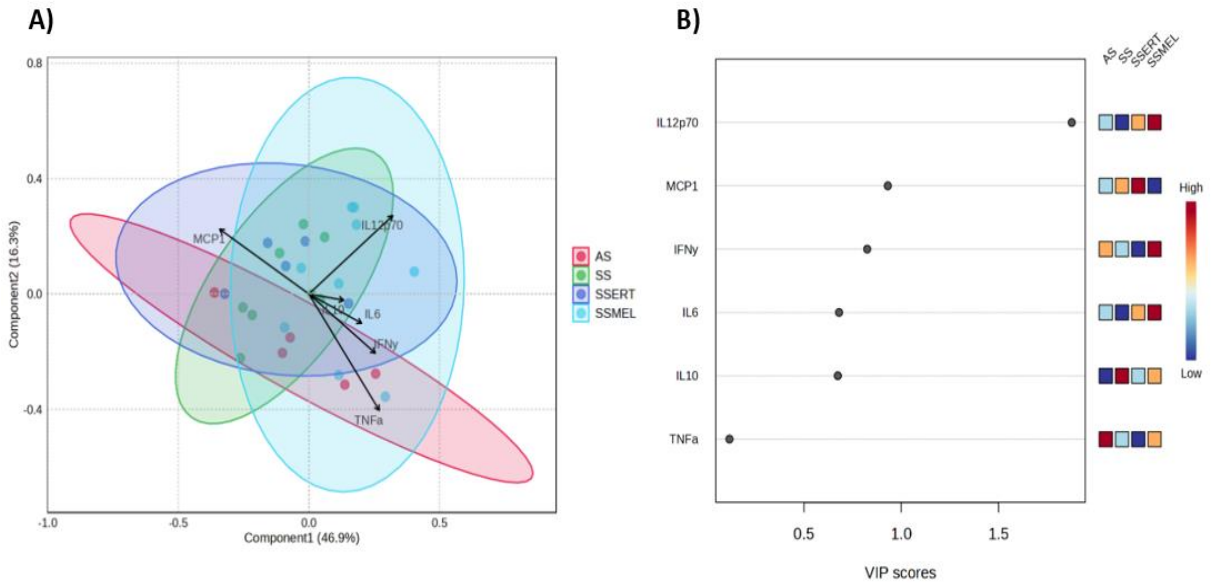


Figura 6. Análise multivariada do perfil combinado das citocinas. (A) Gráfico biplot. As áreas elípiticas sombreadas indicam regiões com 95% confiança que correspondem a cada um dos grupos das respectivas cores que as preenchem. Cada ponto representa um indíviduo pertencente ao grupo da respectiava cor que o preenche. Os eixos representam os dois primeiros componentes principais, sendo o componente 1 responsável por 46,9% da variação total. As setas indicam a contribuição relativa de cada citocina para a separação entre os grupos no espaço multivariado. (**B**) Pontuação de importância das variáveis (VIP scores) para o componente 1. Cada citocina está representada no eixo y e sua contribuição para a composição do componente 1 está disposta no eixo x. O miniheatmap disposto ao lado do VIP Score representa variação das concentrações de cada citocina dentro dos grupos **Q2:**-0,06. **IL12p70:** Interleucina 12 subunidade 70. **TNFα:** Fator de necrose tumoral alfa. **IFNγ:** Interferon gama. **MCP1:** Proteína quimiotática de monócito. **IL10:** Interleucina 10**. IL6:** Interleucina 6. **SS**: Grupo doente. **AS**: Grupo controle. **SSERT**: Grupo doente tratado com ergotioneína. **SSMEL:** Grupo doente tratado com melatonina. Análise *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) conduzida no *MetaboAnalyst*

5. DISCUSSÃO

A inflamação estéril é uma resposta inflamatória desencadeada na ausência de patógenos, mediada principalmente por compostos liberados por células danificadas ou estressadas (Rarick et al., 2024; Zindel & Kubes, 2020). Na AF, durante a hemólise, a liberação de Hb livre, DNA mitocondrial, heme e demais ERO no plasma atua como DAMP promovendo ativação endotelial, disfunção vascular e recrutamento de leucócitos que somados a recorrentes eventos de VOCs alimentam um ciclo persistente de inflamação e dano tecidual, contribuindo para diversas manifestações clínicas da doença (Kato et al., 2017; Mendonça et al., 2016; Sundd et al., 2019). Apesar de ter recebido mais atenção recentemente, os mecanismos moleculares subjacentes à inflamação estéril ainda não estão completamente esclarecidos e permanecem como alvo de controvérsia e investigação na literatura.

Keikhaei *et al.* (2013), por exemplo, demonstraram que pacientes com AF apresentam elevações significativas nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, TNF-α, IL-17 e TGF-β, sem, no entanto, evidenciar alterações relevantes nas concentrações de IL-1β, IFN-γ e IL-6 em comparação a controles saudáveis (Keikhaei et al., 2013). Em contraste, Pathare *et al.* (2004) relataram um aumento significativo de IL-1β, IL-6, IL-4 e IFN-γ nesses pacientes, enquanto os níveis de TNF-α e IL-8 não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos controles (Pathare et al., 2004). Outros estudos também têm documentado perfis distintos, como a elevações de IL-1β, IL-6, IL-12, IFN-γ, IL-17, IL-10 e IL-8, mas ausência de alterações nas concentrações de TNF-α e MCP-1 (Garcia et al., 2020). Essas evidências reforçam que o perfil inflamatório nos pacientes com AF pode ser variável, não seguindo um padrão de modulação evidente quanto as citocinas. Tal heterogeneidade pode ser decorrente de uma série de fatores, como o estado clínico do paciente, idade, uso de medicamentos, variantes genéticas e métodos analíticos utilizados (Szczepanek *et al.*, 2012).

Neste sentido, surge o modelo murino na tentativa de investigar e esclarecer o contexto imunológico da condição, integrando múltiplos marcadores inflamatórios em um meio controlado (Kamimura et al., 2024). Entretanto, o modelo parece apresentar certa limitação em representar o quadro inflamatório característico da condição. Szczepanek *et al.* (2012), por exemplo, avaliaram os níveis plasmáticos de 15 citocinas, incluindo IFN-γ, IL-1β, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF-α, em

camundongos C57BL/6, HbAS e HbSS, tendo observado uma redução significativa apenas nos níveis de IL-1α no HbSS em comparação ao grupo controle selvagem e um aumento significativo nas concentrações de IL-6 no HbSS em comparação aos HbAS (Szczepanek et al., 2012). Ademais, outros trabalhos, como o de Holtzclaw *et al.* (2004), demonstraram que, na ausência de indutores como LPS, não é possível verificar diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos três grupos experimentais (C57BL/6, HbAS e HbSS) em relação aos níveis plasmáticos de IL-6, IL-1β e TNF-α (Holtzclaw *et al.*, 2004). Assim, os dados obtidos quanto aos grupos controle no presente estudo corroboram esses achados, haja vista que apesar do grupo SS ter demonstrado uma tendência a um perfil inflamatório, manifestando níveis superiores de IL-12p70, MCP-1, IL-6 e TNF-α, ele não apresentou diferença estatística em comparação ao grupo AS.

A ausência de uma inflamação sistêmica suficientemente robusta no modelo murino pode ter origem na inexistência de VOC espontâneas nesse modelo. De acordo com Kamimura et al. (2024) não há relatos de que o modelo mimetize de forma espontânea os episódios recorrentes de VOC, uma das manifestações clínicas mais características da AF em humanos. Isso pode impactar diretamente no perfil inflamatório, haja vista que adesão de eritrócitos falcizados, plaquetas e células inflamatórias à parede endotelial, exacerbam a hipóxia tecidual e consequentemente a lesão nesses locais, o que favorecem a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Alagbe, Olaniyi, & Aworanti, 2018; Conran & Belcher, 2018).

A resolução da inflamação é considerada um processo ativo, altamente regulado e não apenas como um retorno passivo ao estado basal. Esse processo depende de uma complexa rede de sinais celulares e moleculares coordenada por mediadores endógenos que são ativados após o pico de resposta inflamatória (Gilroy *et al.*, 2004; Ortega-Gómez *et al*., 2013). Como descrito por Carlini *et al.* (2023), a resolução ocorre em um momento posterior à ativação do sistema imune inato, quando mediadores pró-resolução passam a predominar sobre os sinais pró-inflamatórios. A liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e IL-13, são fundamentais nesse contexto, pois promovem o silenciamento de macrófagos ativados, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, restabelecem a permeabilidade vascular e favorecem a limpeza eficiente de células apoptóticas, contribuindo para o restabelecimento da homeostase (Carlini *et al.*, 2023; Gilroy *et al.*, 2004). No entanto, esse mecanismo só é desencadeado na presença ou após uma

inflamação ativa que sirva de gatilho para o início da cascata de resolução (Ortega-Gómez *et al.*, 2013), logo sem uma inflamação prévia, pode não haver a sinalização para resolução da mesma.

Considerando a fragilidade do modelo em representar o perfil inflamatório característico da condição e sabendo que a resolução da inflamação é um processo ativo, os efeitos anti-inflamatórios da ERT e MEL podem ter sido subestimados neste estudo. Dessa forma, nós acreditamos que para uma avaliação mais fidedigna da ação desses compostos é necessário induzir um estado pró-inflamatório para posteriormente fazer a administração dos mesmos.

Curiosamente, mesmo neste cenário, a MEL reduziu significativamente os níveis de MCP-1, o que sugere uma forte modulação seletiva direta ou indiretamente desta proteína. Diversos estudos têm demonstrado que a MEL pode atenuar seletivamente a expressão de quimiocinas como MCP-1, CCL5 (RANTES) e CCL9 (Fernandes *et al.*, 2019; Min *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; G. M. Yu & Tan, 2019) . Em parte, essa modulação ocorre pela via da PI3K/Akt, onde a MEL inibe a fosforilação da Akt, o que impede a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF-κB, e sua translocação nuclear (Min *et al.*, 2012). Adicionalmente, a supressão da PI3K/Akt pela MEL também reduz a fosforilação de STAT3 e STAT1, na presença de estímulos como LPS, limitando a ativação de *GAS* e, consequentemente, a transcrição de genes inflamatórios, incluindo *CCL2* (Min *et al., 2012)*. Em modelos murinos submetidos à pinealectomia, a administração de MEL foi capaz de diminuir significativamente a ativação da p38-MAPK, bem como os níveis de NF-κB fosforilado e MCP-1 (Wang *et al.*, 2013). Além disso, estudos *in vitro* mostram que a MEL pode atuar por mecanismos epigenéticos, modulando a expressão de microRNAs, como o miR-294-3p, cujo aumento está associado à repressão da expressão de MCP-1 (Fernandes *et al.*, 2019).

Em conjunto, esses achados sustentam a hipótese de que a MEL exerce um efeito anti-inflamatório seletivo sobre a MCP-1 por múltiplas vias convergentes, envolvendo regulação de sinalização intracelular, modulação transcricional e mecanismos epigenéticos. Essa seletividade também foi evidenciada em nossa análise multivariada, na qual o VIP score indicou MCP-1 como a segunda variável de maior contribuição para o componente 1 da PLS-DA, sendo superada apenas pela IL-12p70, com o *heatmap* reforçando que a separação parcial entre SS e SS+MEL foi impactada pela variação dessas quimiocinas. Assim, nossos resultados univariados e

multivariados convergem para a interpretação de que a MEL modulou de forma direcionada a MCP-1.

A MCP-1 ou CCL2 é uma proteína quimiotática produzida por diversos tipos celulares constitutivamente ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. Sua função consiste em regular a migração e infiltração de linfócitos T de memórias, células NK e principalmente monócitos (Deshmane *et al.*, 2009). A MCP-1 está entre os membros mais estudados da família de quimiocinas por ter se mostrado um ponto de intervenção potencial para o tratamento de várias doenças, incluindo aterosclerose (Yan *et al.*, 2021), câncer (Yi *et al.*, 2024), diabetes (Seok *et al*., 2013) e condições neuroinflamatórias (Tian *et al.*, 2022). Na AF, a MCP-1 contribui significativamente para o recrutamento de monócitos ao endotélio vascular, favorecendo sua diferenciação em macrófagos e a subsequente amplificação da resposta inflamatória por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Conran & Belcher, 2018). Esse acúmulo celular também está associado à formação das VOCs, já que monócitos e outras células de defesa podem interagir com plaquetas e eritrócitos falcizados, promovendo adesão ao endotélio e interrupção do fluxo sanguíneo (Keikhaei *et al.*, 2013; Sundd *et al.*, 2019). As VOCs representam uma das principais causas de morbidade e hospitalização em pacientes com AF(Ballas *et al.*, 2012; Rees *et al.*, 2010). Nesse contexto, a modulação seletiva da MCP-1 pela MEL, observada em nosso estudo, reforça a hipótese de que esse composto possa atenuar mecanismos-chave da fisiopatologia da doença, se apresentando como um agente promissor para melhorar a qualidade de vida de indivíduos com AF.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados corroboram evidências prévias de que o modelo murino de AF, embora valioso para estudos controlados, apresenta uma translação limitada da resposta inflamatória sistêmica característica da doença em humanos. Essa limitação possivelmente contribuiu para a subestimação dos efeitos anti-inflamatórios das terapias testadas. Ainda assim, mesmo nesse cenário de inflamação pouco pronunciada, a MEL foi capaz de modular de forma seletiva e significativa os níveis de MCP-1, uma quimiocina-chave no recrutamento de monócitos e na amplificação da resposta inflamatória, intimamente relacionada à patogênese das crises vaso-oclusivas. Este achado reforça a plausibilidade biológica e o potencial terapêutico da MEL como estratégia terapêutica ou adjuvante para mitigar eventos inflamatórios críticos na AF, abrindo perspectivas para investigações futuras em ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ABO TALEB, H. A., & Alghamdi, B. S. (2020). Neuroprotective Effects of Melatonin during Demyelination and Remyelination Stages in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, *70*(3), 386–402. https://doi.org/10.1007/s12031-019-01425-6

ALAGBE, A. E., Olaniyi, J. A., & Aworanti, O. W. (2018). Adult sickle cell anaemia patients in bone pain crisis have elevated pro-inflammatory cytokines. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.4084/mjhid.2018.017

ALLALI, S., Rignault-Bricard, R., de Montalembert, M., Taylor, M., Bouceba, T., Hermine, O., & Maciel, T. T. (2022). HbS promotes TLR4-mediated monocyte activation and proinflammatory cytokine production in sickle cell disease. *Blood*, *140*(18), 1972–1982. https://doi.org/10.1182/blood.2021014894

ANTHI, A., Machado, R. F., Jison, M. L., Taveira-DaSilva, A. M., Rubin, L. J., Hunter, L., … Gladwin, M. T. (2007). Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *175*(12), 1272–1279. https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1498OC

APPAROO, Y., Phan, C. W., Kuppusamy, U. R., & Sabaratnam, V. (2022). Ergothioneine and its prospects as an anti-ageing compound. *Experimental Gerontology*, *170*(October), 111982. https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111982

ARDUINI, A., Eddy, L., & Hochstein, P. (1990). The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: A novel function for ergothioneine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *281*(1), 41–43. https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90410-Z

BADAWY, S. M., Thompson, A. A., Penedo, F. J., Lai, J. S., Rychlik, K., & Liem, R. I. (2017). Barriers to hydroxyurea adherence and health-related quality of life in adolescents and young adults with sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, *98*(6), 608–614. https://doi.org/10.1111/ejh.12878

BAKEER, N., James, J., Roy, S., Wansapura, J., Shanmukhappa, S. K., Lorenz, J. N., … Malik, P. (2016). Sickle cell anemia mice develop a unique cardiomyopathy with restrictive physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(35), E5182–E5191. https://doi.org/10.1073/pnas.1600311113

BALLAS, S. K., Gupta, K., & Adams-Graves, P. (2012). Sickle cell pain: A critical reappraisal. *Blood*, *120*(18), 3647–3656. https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-383430

BALLAS, S. K., Kesen, M. R., Goldberg, M. F., Lutty, G. A., Dampier, C., Osunkwo, I., … Malik, P. (2012). Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: An update on management. *The Scientific World Journal*, *2012*. https://doi.org/10.1100/2012/949535

BERNARDO, V. S., Torres, F. F., de Paula, C. P., da Silva, J. P. M. de O., de Almeida, E. A., da Cunha, A. F., & da Silva, D. G. H. (2022). Potential Cytoprotective and Regulatory Effects of Ergothioneine on Gene Expression of Proteins Involved in Erythroid Adaptation Mechanisms and Redox Pathways in K562 Cells. *Genes*, *13*(12). https://doi.org/10.3390/genes13122368

CALVO-MARZAL, P., Chumbimuni-Torres, K. Y., Höehr, N. F., & Kubota, L. T. (2006).

Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte with amperometric sensor based on TTF-TCNQ. *Clinica Chimica Acta*, *371*(1–2), 152–158. https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.006

CANÇADO, R. D., Costa, F. F., Lobo, C., Migliavaca, C. B., Falavigna, M., Filho, H. C. R. S., … Silva-Pinto, A. C. (2023). Estimated mortality rates of individuals with sickle cell disease in Brazil: real-world evidence. *Blood Advances*, *7*(15), 3783–3792. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008938

CARLINI, V., Noonan, D. M., Abdalalem, E., Goletti, D., Sansone, C., Calabrone, L., & Albini, A. (2023). The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*, *14*(June), 1–19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161067

CARRILLO-VICO, A., Guerrero, J. M., Lardone, P. J., & Reiter, R. J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, *27*(2), 189–200. https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:189

CHARRIN, E., Ofori-Acquah, S. F., Nader, E., Skinner, S., Connes, P., Pialoux, V., … Martin, C. (2016). Inflammatory and oxidative stress phenotypes in transgenic sickle cell mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *62*, 13–21. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.10.020

CHEAH, I. K., & Halliwell, B. (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1822*(5), 784–793. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.09.017

CHEN, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, *10*(12), 826–837. https://doi.org/10.1038/nri2873

CHITIMUS, D. M., Popescu, M. R., Voiculescu, S. E., Panaitescu, A. M., Pavel, B., Zagrean, L., & Zagrean, A. M. (2020). Melatonin's impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease. *Biomolecules*, *10*(9), 1–28. https://doi.org/10.3390/biom10091211

CHO, J., Bhutani, S., Kim, C., & Irwin, M. (2021). Anti-Inflammatory Effects of Melatonin: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Brain Behav Immun.*, *93*(1), 245–253. https://doi.org/doi:10.1016/j.bbi.2021.01.034

CONRAN, N., & Belcher, J. D. (2018). Inflammation in sickle cell disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, *68*(2–3), 263–299. https://doi.org/10.3233/CH-189012

DARE, A., Channa, M. L., & Nadar, A. (2021). L-ergothioneine and metformin alleviates liver injury in experimental type-2 diabetic rats via reduction of oxidative stress, inflammation, and hypertriglyceridemia. *Can J Physiol Pharmacol*.

DENAYER, T., Stöhrn, T., & Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, *2*(1), 5–11. https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001

DESHMANE, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *29*(6), 313–325. https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027

ELENDU, C., Amaechi, D. C., Alakwe-Ojimba, C. E., Elendu, T. C., Elendu, R. C., Ayabazu, C. P., … Adenikinju, J. S. (2023). Understanding Sickle cell disease Causes, symptoms, and

treatment options, *38*(July).

ESCRIBANO, B., Colin-Gonzalez, A., Santamaria, A., & Tunez, I. (2014). The Role of Melatonin in Multiple Sclerosis, Huntington's Disease and Cerebral Ischemia. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *13*(6), 1096–1119. https://doi.org/10.2174/1871527313666140806160400

FAVERO, G., Franceschetti, L., Bonomini, F., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2017). Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. *International Journal of Endocrinology*, *2017*, 17–19. https://doi.org/10.1155/2017/1835195

FERNANDES, J. C. R., Aoki, J. I., Acuna, S. M., Zampieri, R. A., Markus, R. P., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2019). Melatonin and infection altered mir- 294, mir-30e, and mir-302d impacting on , , and 2 expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*(MAR), 1–15. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00060

FORSTER, R., Spézia, F., Papineau, D., Sabadie, C., Erdelmeier, I., Moutet, M., & Yadan, J. C. (2015). Reproductive safety evaluation of L-Ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology*, *80*, 85–91. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.019

FUJIWARA, S. (2018). Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(4), 2889–2901. https://doi.org/10.1002/jcp.26022

GALANO, A., & Reiter, R. J. (2018). Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *Journal of Pineal Research*, *65*(1), 1–33. https://doi.org/10.1111/jpi.12514

GARCIA, N. P., Júnior, A. L. S., Soares, G. A. S., Costa, T. C. C., Santos, A. P. C. dos, Costa, A. G., … Martins-Filho, O. A. (2020). Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4 + CD69 +. *Journal of Immunology Research*, *2020*, 22.

GILROY, D. W., Lawrence, T., Perretti, M., & Rossi, A. G. (2004). Inflammatory resolution: New opportunities for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(5), 401–416. https://doi.org/10.1038/nrd1383

GLADWIN, M. T., & Ofori-Acquah, S. F. (2014). Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood*, *123*(24), 3689–3690. https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-563874

GUO, Q., Jin, Y., Chen, X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., … Zhang, J. (2024). NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9

HARDELAND, R. (2018). Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. *Journal of Pineal Research*, *65*(4), 0–3. https://doi.org/10.1111/jpi.12525

HERRICK, B. J. (1910). The JAMA Network. *The JAMA Network Revisited*.

HOLTZCLAW, J. D., Jack, D., Aguayo, S. M., Eckman, J. R., Roman, J., & Hsu, L. L. (2004). Enhanced Pulmonary and Systemic Response to Endotoxin in Transgenic Sickle Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *169*(6), 687–695. https://doi.org/10.1164/rccm.200302-224oc

HSEU, Y. C., Lo, H. W., Korivi, M., Tsai, Y. C., Tang, M. J., & Yang, H. L. (2015). Dermato-

protective properties of ergothioneine through induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated Human keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *86*, 102–117. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.026

HSU, L. L., Champion, H. C., Campbell-Lee, S. A., Bivalacqua, T. J., Manci, E. A., Diwan, B. A., … Gladwin, M. T. (2007). Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood*, *109*(4), 1772. https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128926

HUANG, Y., Jiang, W., & Zhou, R. (2024). DAMP sensing and sterile inflammation: intracellular, intercellular and inter-organ pathways. *Nature Reviews Immunology*, *24*(October). https://doi.org/10.1038/s41577-024-01027-3

HYLTON, D. J., Hoffman, S. M., Van Rooijen, N., Tomlinson, S., & Fleming, S. D. (2011). Macrophage-produced IL-12p70 mediates hemorrhage-induced damage in a complement-dependent manner. *Shock*, *35*(2), 134–140. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181ed8ec9

JOCKERS, R., Delagrange, P., Dubocovich, M. L., Markus, R. P., Renault, N., Tosini, G., … Zlotos, D. P. (2016). Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *British Journal of Pharmacology*, 2702–2725. https://doi.org/10.1111/bph.13536

KAMIMURA, S., Smith, M., Vogel, S., Almeida, L. E. F., Thein, S. L., & Quezado, Z. M. N. (2024). Mouse models of sickle cell disease: Imperfect and yet very informative. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *104*, 1–38. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2023.102776

KATO, G. J., Steinberg, M. H., & Gladwin, M. T. (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(3), 750–760. https://doi.org/10.1172/JCI89741

KAVANAGH, P. L., Fasipe, T. A., & Wun, T. (2022). Sickle Cell Disease: A Review. *Jama*, *328*(1), 57–68. https://doi.org/10.1001/jama.2022.10233

KEIKHAEI, B., Mohseni, A. R., Norouzirad, R., Alinejadi, M., Ghanbari, S., Shiravi, F., & Solgi, G. (2013). Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *European Cytokine Network*, *24*(1), 45–52. https://doi.org/10.1684/ecn.2013.0328

KO, H. J., Kim, J., Ahn, M., Kim, J. H., Lee, G. S., & Shin, T. (2021). Ergothioneine alleviates senescence of fibroblasts induced by UVB damage of keratinocytes via activation of the Nrf2/HO-1 pathway and HSP70 in keratinocytes. *Experimental Cell Research*, *400*(1), 112516. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112516

KUYPERS, F. A. (2014). Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *28*(2), 155–179. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.12.002

LAURENZA, I., Colognato, R., Migliore, L., Del Prato, S., & Benzi, L. (2008). Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action. *BioFactors*, *33*(4), 237–247. https://doi.org/10.1002/biof.5520330401

MANCI, E. A., Hillery, C. A., Bodian, C. A., Zhang, Z. G., Lutty, G. A., & Coller, B. S. (2006a). Pathology of Berkeley sickle cell mice: Similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*, *107*(4), 1651–1658. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2839

MANCI, E. A., Hillery, C. A., Bodian, C. A., Zhang, Z. G., Lutty, G. A., & Coller, B. S. (2006b).

Pathology of Berkeley sickle cell mice: Similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*, *107*(4), 1651–1658. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2839

MARONE, P. A., Trampota, J., & Weisman, S. (2016). A Safety Evaluation of a Nature-Identical l -Ergothioneine in Sprague Dawley Rats. *International Journal of Toxicology*, *35*(5), 568–583. https://doi.org/10.1177/1091581816653375

MCGANN, P. T., & Ware, R. E. (2011). Hydroxyurea for sickle cell anemia: What have we learned and what questions still remain? *Current Opinion in Hematology*, *18*(3), 158–165. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521dd

MENDONÇA, R., Silveira, A. A. A., & Conran, N. (2016). Red cell DAMPs and inflammation. *Inflammation Research*, *65*(9), 665–678. https://doi.org/10.1007/s00011-016-0955-9

MIN, K. J., Jang, J. H., & Kwon, T. K. (2012). Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF-κB and STAT/GAS activity. *Journal of Pineal Research*, *52*(3), 296–304. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00943.x

MURPHY, K. (2014). *Imunobiologia de Janeway* (8º). ARTMED.

NEUMAYR, L. D., Hoppe, C. C., & Brown, C. (2019). Sickle cell disease: current treatment and emerging therapies. *The American Journal of Managed Care*, *25*(18), S335–S343.

NIIHARA, Y., Miller, S. T., Kanter, J., Lanzkron, S., Smith, W. R., Hsu, L. L., … Vichinsky, E. P. (2018). A Phase 3 Trial of l -Glutamine in Sickle Cell Disease . *New England Journal of Medicine*, *379*(3), 226–235. https://doi.org/10.1056/nejmoa1715971

ORTEGA-GÓMEZ, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: An integrated view. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(5), 661–674. https://doi.org/10.1002/emmm.201202382

OWUSU-ANSAH, A., Ihunnah, C. A., Walker, A. L., & Ofori-Acquah, S. F. (2016). Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. *Translational Research*, *167*(1), 281–297. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.07.001

PASZTY CHRIS, Brion Catherine M, Manci Elizabeth, Witokowska H. Ewa, Stevens Mary E, Mohandas Narla, & Rubin Edward M. (1997). Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science*, *278*(October), 876–878.

PATHARE, A., Al Kindi, S., Alnaqdy, A. A., Daar, S., Knox-Macaulay, H., & Dennison, D. (2004). Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *American Journal of Hematology*, *77*(4), 323–328. https://doi.org/10.1002/ajh.20196

PERLMAN, R. L. (2016). Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evolution, Medicine, and Public Health*, eow014. https://doi.org/10.1093/emph/eow014

QUINN, C. T. (2018). L-Glutamine for sickle cell anemia: More questions than answers. *Blood*, *132*(7), 689–693. https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-834440

RADOGNA, F., Diederich, M., & Ghibelli, L. (2010). Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology*, *80*(12), 1844–1852. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.041

RAHMAN, I., Gilmour, P. S., Jimenez, L. A., Biswas, S. K., Antonicelli, F., & Aruoma, O. I.

(2003). Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-α-induced NF-κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *302*(4), 860–864. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00224-9

RARICK, K. R., Li, K., Teng, R. J., Jing, X., Martin, D. P., Xu, H., … Pritchard, K. A. (2024). Sterile inflammation induces vasculopathy and chronic lung injury in murine sickle cell disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *215*(January), 112–126. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.01.052

REES, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, *376*(9757), 2018–2031. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X

ROE, K. (2021). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*, *93*(2), 6–10. https://doi.org/10.1111/sji.12970

ROSENTHAL, N., & Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature Cell Biology*, *9*(9), 993–999. Retrieved from www.eucomm.org

SACHDEV, V., Rosing, D. R., & Thein, S. L. (2021). Cardiovascular complications of sickle cell disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *31*(3), 187–193. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2020.02.002

SAHA, M., Manna, K., & Das Saha, K. (2022). Melatonin Suppresses NLRP3 Inflammasome Activation via TLR4/NF-κB and P2X7R Signaling in High-Fat Diet-Induced Murine NASH Model. *Journal of Inflammation Research*, *15*(May), 3235–3258. https://doi.org/10.2147/JIR.S343236

SAING, L., Wei, Y. C., & Tseng, C. J. (2016). Ergothioneine represses inflammation and dysfunction in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *43*(7), 720. https://doi.org/10.1111/1440-1681.12374

SALAMA, S. A., Abd-Allah, G. M., Mohamadin, A. M., Elshafey, M. M., & Gad, H. S. (2021). Ergothioneine mitigates cisplatin-evoked nephrotoxicity via targeting Nrf2, NF-κB, and apoptotic signaling and inhibiting γ-glutamyl transpeptidase. *Life Sciences*, *278*(April), 119572. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119572

SANGIULIANO, B., Pérez, N. M., Moreira, D. F., & Belizário, J. E. (2014). Cell death-associated molecular-pattern molecules: Inflammatory signaling and control. *Mediators of Inflammation*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/821043

SEOK, S. J., Lee, E. S., Kim, G. T., Hyun, M., Lee, J. H., Chen, S., … Chung, C. H. (2013). Blockade of CCL2/CCR2 signalling ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *28*(7), 1700–1710. https://doi.org/10.1093/ndt/gfs555

SINGH, S., Anshita, D., & Ravichandiran, V. (2021). MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *International Immunopharmacology*, (January).

SONG, T. Y., Lin, H. C., Chen, C. L., Wu, J. H., Liao, J. W., & Hu, M. L. (2014). Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Free Radical Research*, *48*(9), 1049–1060. https://doi.org/10.3109/10715762.2014.920954

SONG, Tuzz Ying, Chen, C. L., Liao, J. W., Ou, H. C., & Tsai, M. S. (2010). Ergothioneine protects against neuronal injury induced by cisplatin both in vitro and in vivo. *Food and*

Chemical Toxicology, *48*(12), 3492–3499. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.030

SUNDD, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2019). Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*, 263–292. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838

SZCZEPANEK, S. M., McNamara, J. T., Secor, E. R., Natarajan, P., Guernsey, L. A., Miller, L. A., … Andemariam, B. (2012). Splenic morphological changes are accompanied by altered baseline immunity in a mouse model of sickle-cell disease. *American Journal of Pathology*, *181*(5), 1725–1734. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.034

TAIT WOJNO, E. D., Hunter, C. A., & Stumhofer, J. S. (2019). The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity*, *50*(4), 851–870. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.011

TAN, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., … Hardelan, R. (2002). Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *2*(2), 181–197. https://doi.org/10.2174/1568026023394443

TANG, R. M. Y., Cheah, I. K. M., Yew, T. S. K., & Halliwell, B. (2018). Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20021-z

TAU, G., & Rothman, P. (2001). Biologic fungtions of the INF-gamma receptors. *Allergy*, *IV*, 1233–1251. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x

THOMSON, A. M., McHugh, T. A., Oron, A. P., Teply, C., Lonberg, N., Vilchis Tella, V. M., … Kassebaum, N. J. (2023). 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*, *10*(8), e585–e599. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(23)00118-7

TIAN, Q., Guo, Y., Feng, S., Liu, C., He, P., Wang, J., … Li, M. (2022). Inhibition of CCR2 attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage through the PI3K/Akt pathway. *Journal of Neuroinflammation*, *19*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12974-022-02676-8

TORRES, F. F., Bernardo, V. S., Zucão, A. C. A., Gazarini, L., Reiter, R. J., & da Silva, D. G. H. (2025). Melatonin's role in redox homeostasis: A preclinical and clinical perspective. *Pharmacological Research - Natural Products*, *6*(January). https://doi.org/10.1016/j.prenap.2025.100147

TUMBURU, L., Ghosh-Choudhary, S., Seifuddin, F. T., Barbu, E. A., Yang, S., Ahmad, M. M., … Thein, S. L. (2021). Circulating mitochondrial DNA is a proinflammatory DAMP in sickle cell disease. *Blood*, *137*(22), 3116–3126. https://doi.org/10.1182/blood.2020009063

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2017a). FDA approved L-glutamine powder for the treatment of sickle cell disease. Retrieved July 5, 2025, from https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approved-l-glutamine-powder-treatment-sickle-cell-disease#:~:text=On July 7%2C 2017%2C the,patients 5 years and older.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2017b). FDA approves hydroxyurea for treatment of pediatric patients with sickle cell anemia. Retrieved July 5, 2025, from

https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-hydroxyurea-treatment-pediatric-patients-sickle-cell-anemia

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2019). FDA approves crizanlizumab-tmca for sickle cell disease. Retrieved July 5, 2025, from https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-crizanlizumab-tmca-sickle-cell-disease

VATS, R., Kaminski, T. W., Ju, E. M., Brozska, T., Tutuncuoglu, E., Tejero, J., … Pradhan-Sundd, T. (2021). P-selectin deficiency promotes liver senescence in sickle cell disease mice. *Blood*, *137*(19), 2676–2680. https://doi.org/10.1182/blood.2020009779

WANG, Y., Liu, X., Wang, W., Song, W., Chen, L., Fang, Q., & Yan, X. (2013). The expression of inflammatory cytokines on the aorta endothelia are up-regulated in pinealectomized rats. *Inflammation*, *36*(6), 1363–1373. https://doi.org/10.1007/s10753-013-9676-1

WARE, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet*, *390*(10091), 311–323. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9
WATSON, N., Ding, B., Zhu, X., & Frisina, R. D. (2017). Chronic inflammation – inflammaging – in the ageing cochlea: A novel target for future presbycusis therapy. *Ageing Research Reviews*, *40*(October), 142–148. https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.10.002

WU, J., Yang, Y., Gao, Y., Wang, Z., & Ma, J. (2020). Melatonin attenuates anoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive mitophagy through the MT2/SIRT3/FOXO3A signaling pathway in H9C2 cells. *Drug Design, Development and Therapy*, *14*, 2047–2060. https://doi.org/10.2147/DDDT.S248628

YAN, Y., Thakur, M., van der Vorst, E. P. C., Weber, C., & Döring, Y. (2021). Targeting the chemokine network in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *330*, 95–106. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.912

YI, M., Li, T., Niu, M., Zhang, H., Wu, Y., Wu, K., & Dai, Z. (2024). *Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy*. *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9). Springer US. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01868-3

YU, G. M., & Tan, W. (2019). Melatonin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Cultured Mouse Mammary Tissue. *Mediators of Inflammation*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/8597159

YU, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2020). Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1). https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6

ZAJAC, I. T., Kakoschke, N., Kuhn-Sherlock, B., & May-Zhang, L. S. (2025). The Effect of Ergothioneine Supplementation on Cognitive Function, Memory, and Sleep in Older Adults with Subjective Memory Complaints: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutraceuticals*, *5*(3), 15. https://doi.org/10.3390/nutraceuticals5030015

ZHU, D., Ma, Y., Ding, S., Jiang, H., & Fang, J. (2018). Effects of Melatonin on Intestinal Microbiota and Oxidative Stress in Colitis Mice. *BioMed Research International*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/2607679

ZINDEL, J., & Kubes, P. (2020). DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *15*, 493–518. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847

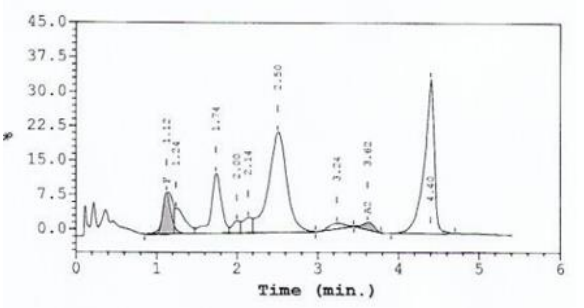
APÊNDICE I

Perfis Cromatográficos dos Grupos Experimentais

A)

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	6.6*	---	1.12	123644
P2	---	5.1	1.24	96305
P3	---	12.6	1.74	235841
Unknown	---	2.0	2.00	36581
Unknown	---	3.0	2.14	55406
Ao	---	36.4	2.50	680176
Unknown	---	1.7	3.24	31540
A2	1.6*	---	3.62	29715
S-window	---	31.1	4.40	581768

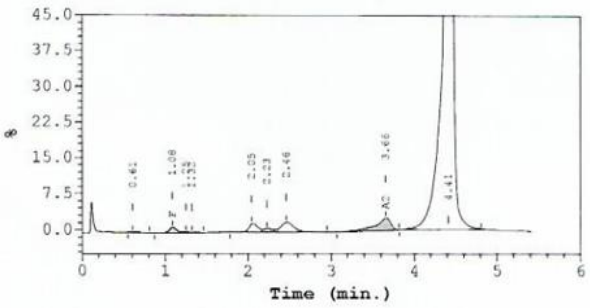
Total Area: 1,870,977



B)

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.0	0.61	880
F	0.6	---	1.08	15894
P2	---	0.0	1.25	1378
Unknown	---	0.0	1.32	1076
Unknown	---	1.1	2.05	31289
Unknown	---	0.4	2.23	12744
Ao	---	1.9	2.46	53937
A2	2.5	---	3.66	72916
S-window	---	93.3	4.41	2668150

Total Area: 2,858,263



Apêndice I. Exemplares dos perfis cromatográficos dos camundongos considerados aptos a compor os grupos experimentais. **A)** Análise cromatográfica de um camundongo traço falciforme indicando a presença de 6,6% de HbF [RT de 1.12], 36,4% de HbA [RT de 2.50], 12,6% de subfração degrada da HbA [RT de 1.74], 1,6% de HbA2 [RT de 3.62] e 31,1% de HbS [RT de 4.40]. **B).** Análise cromatográfica de um camundongo doente falciforme indicando a presença de 0,6% de HbF [RT de 1.08], 1,9% de HbA [RT de 2.46], 2,5% de HbA2 [RT de 3.66] e 93,3% de HbS [RT de 4.41]. **Unknown**: picos de subfrações degradadas de Hb.***:** Indicam valores fora dos limites esperados pelo equipamento. ***CDM System, Variant V-II Instrument I.***

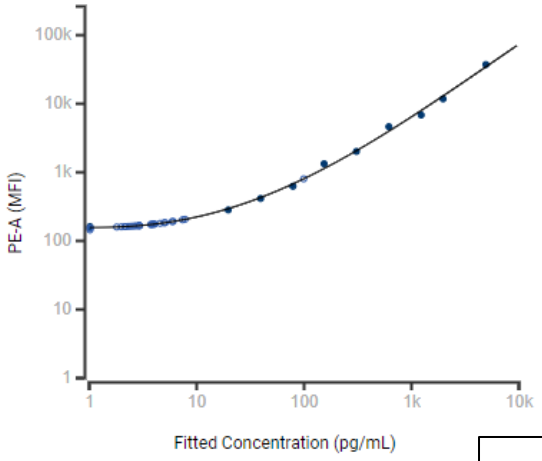
APÊNDICE II - Peso corporal e massa esplênica de camundongos transgênicos utilizados no estudo.

Código Interno	Sexo Biológico	Peso Corporal (g)	Baço (g)
1º AS	Macho	27,4	0,126
2º AS	Fêmea	24,9	0,158
3º AS	Fêmea	25,7	0,236
4º AS	Fêmea	22,6	0,143
5º AS	Fêmea	23,9	0,130
1º SS	Fêmea	26,8	0,503
2º SS	Fêmea	24,9	0,539
3º SS	Fêmea	25,5	0,391
4º SS	Macho	30,2	0,463
5º SS	Macho	28,6	0,342
6º SS	Fêmea	20,9	0,402
7º SS	Fêmea	20,5	0,474
8º SS	Fêmea	21,6	0,358
1º SS+MEL	Macho	28,3	0,41
2º SS+MEL	Macho	22,8	0,65
3º SS+MEL	Fêmea	20,9	0,58
4º SS+MEL	Fêmea	23,4	0,51
5º SS+MEL	Fêmea	24,2	0,20
6º SS+MEL	Fêmea	20,7	0,36
7º SS+MEL	Fêmea	25,2	0,26
8º SS+MEL	Fêmea	21,1	0,42
9º SS+MEL	Fêmea	22,4	0,19
1º SS+ERT	Macho	30,1	0,18
2º SS+ERT	Fêmea	17,4	0,15
3º SS+ERT	Fêmea	21,4	0,69
4º SS+ERT	Fêmea	19,2	0,28
5º SS+ERT	Fêmea	21,7	0,28

Valores individuais de peso corporal (g) e massa do baço (g) dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. **AS**: Controle saudável. **SS**: Controle doente. **SS+MEL**: Grupo doente tratado com melatonina. **SS+ERT**: Grupo doente tratado com Ergotioneína. **Código interno:** Identificação individual de cada animal.

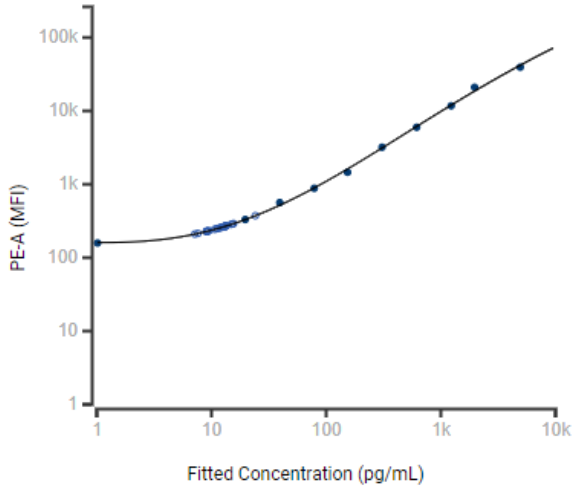
APÊNDICE III – Curvas padrão para a quantificação das citocinas

IL-12p70



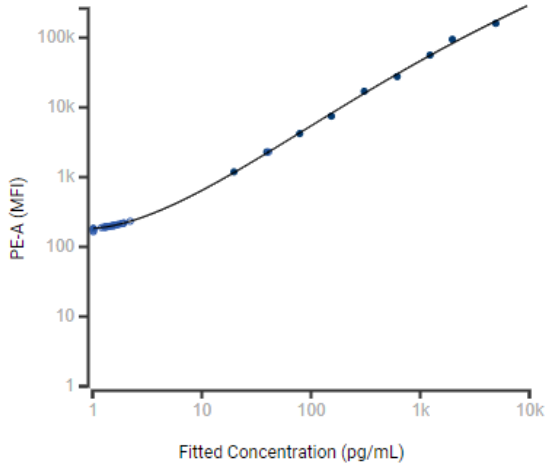
Name	Value
r2	0.99645
chi2	0.00541
Imin (a)	2.18552
Hill Slope (b)	2.31267
IC50 (c)	5.74986
Imax (d)	11.01972

TNF-α



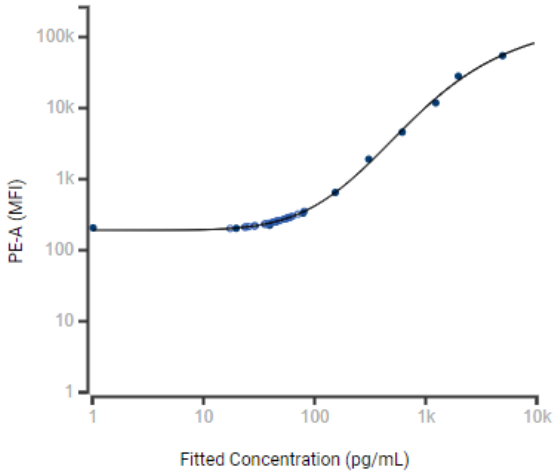
Name	Value
r2	0.99877
chi2	0.00200
Imin (a)	2.19614
Hill Slope (b)	2.53075
IC50 (c)	3.77241
Imax (d)	7.15021

IFN-γ



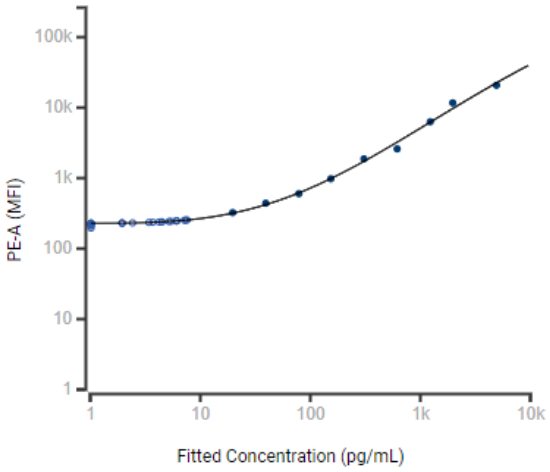
Name	Value
r2	0.99885
chi2	0.00195
Imin (a)	2.25588
Hill Slope (b)	1.65850
IC50 (c)	4.52647
Imax (d)	9.38362

MCP-1



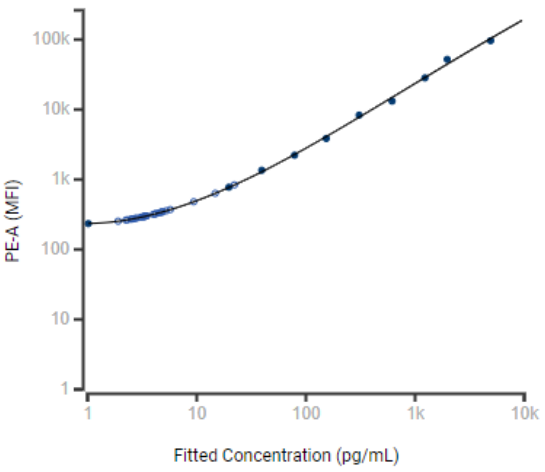
Name	Value
r2	0.99808
chi2	0.00428
Imin (a)	2.27149
Hill Slope (b)	5.82581
IC50 (c)	2.85755
Imax (d)	5.28405

IL-10



Name	Value
r2	0.99546
chi2	0.00521
Imin (a)	2.35096
Hill Slope (b)	3.09361
IC50 (c)	3.86000
Imax (d)	6.61086

IL-6



Name	Value
r2	0.99831
chi2	0.00249
Imin (a)	2.36154
Hill Slope (b)	1.87144
IC50 (c)	5.54091
Imax (d)	10.63418

Curvas padrão utilizadas na conversão e quantificação das concentrações das citocinas em pg/mL. Foram geradas curvas de quatro parâmetros logísticos (4PL) para cada citocina de acordo com a fórmula **log(y) = d + (a - d)/(1 + (log(x) / c)^b)**. **y**: intensidade média de fluorescência (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*). **x**: concentração conhecida do padrão (pg/mL). **a** (Imin): valor mínimo do sinal (plateau inferior da curva). **d** (Imax): valor máximo do sinal (plateau superior da curva). **c** (IC50): concentração na qual ocorre 50% do efeito máximo, ou ponto de inflexão da curva. **b** (Hill Slope): inclinação da curva, que indica a taxa de variação do sinal. **r^2:** coeficiente de determinação, que indica a qualidade do ajuste da curva. **χ^2** (chi^2): medida do erro do ajuste.