



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Flaviene Felix Torres

**Influência do tratamento com melatonina sobre mecanismos
celulares de adaptação redox em células eritroleucêmicas
K562**

São José do Rio Preto
2021

Flaviene Felix Torres

**Influência do tratamento com melatonina sobre mecanismos
celulares de adaptação redox em células eritroleucêmicas
K562**

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

Financiadora CNPq – Proc. 131892/2019-3.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Grünig
Humberto da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da
Cunha

São José do Rio Preto
2021

T693i Torres, Flaviene Felix

Influência do tratamento com melatonina sobre mecanismos celulares de adaptação redox em células eritroleucêmicas K562 / Flaviene Felix Torres. -- São José do Rio Preto, 2021

79 f. : il., tabs.

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

Orientador: Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientador: Anderson Ferreira da Cunha

1. Melatonina. 2. Estresse Oxidativo. 3. Antioxidante. 4. Genética molecular. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Flaviene Felix Torres

**Influência do tratamento com melatonina sobre mecanismos celulares
de adaptação redox em células eritroleucêmicas K562**

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

Financiadora CNPq – Proc. 131892/2019-3.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Edis Belini Junior
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof. Dr. Carlos A. Tairum Junior
Universidade de São Paulo - USP

São José do Rio Preto
28 de abril de 2021

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente à **Deus** por todas graças que me concede.*

*Aos meus pais, **José Antônio e Nigéria**, aos meus avós, **Dirce e Luís**, aos meus tios, **Alisson e Ariadne**, e à minha irmã, **Vitória**, por sempre me apoiar, incentivar e acreditar em mim.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva**, pelos ensinamentos, correções, paciência e por acreditar tanto nas nossas pesquisas.*

*Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha**, pelas correções e dicas que contribuem muito para meu aprendizado.*

*À uma grande professora de longa data, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pelos ensinamentos e confiança.*

*À dois grandes pesquisadores e “professores”, **Dra. Carla Peres de Paula e João Pedro Maia de Oliveira** pela paciência e por dedicarem parte de seu tempo ao meu aprendizado.*

*À minha grande amiga, **Victoria**, que em mais uma etapa esteve ao meu lado, com seu bom humor contagiante e sua bondade infinita. Obrigada por sempre me ajudar, incentivar e também por ter compartilhado tantas risadas ao longo de todos esses anos.*

*Aos **amigos do LHGDH**, pelas risadas, conversas e muito cafézinho!*

*Aos meus **professores** por tudo que me ensinaram durante estes seis anos de muito aprendizado, não apenas relacionado às Ciências Biológicas.*

*Aos membros da **banca examinadora** por aceitarem contribuir com o presente trabalho.*

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante esta pesquisa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá, 1979)

RESUMO

A homeostase redox já foi descrita como “o meio áureo da vida saudável” e sua regulação pode ocorrer através do controle de atividade enzimática ou em nível transcricional. Importantes fatores de transcrição relacionados a esta homeostase são FoxO3 e Nrf2, ambos influenciados pela ação da melatonina (MEL). Esta indolamina e seus metabólitos constituem uma família química particularmente eficiente, com grande capacidade de combate ao estresse oxidativo, podendo atuar de forma direta contra os mesmos ou indireta, atuando na indução da expressão de enzimas antioxidantes. Um tipo celular constantemente exposto a insultos oxidativos é o eritrócito, dessa forma, o presente estudo utilizou a linhagem eritroleucêmica K562 induzidas a diferenciação em células eritróides. Assim, a presente proposta teve como objetivo investigar o possível efeito modulador da MEL sobre as vias de sinalização redox PI3K/AKT/FoxO3 e Keap1/Nrf2/ARE, em cultivo de células eritroleucêmicas K562 submetidas a indução de estresse oxidativo, favorecendo a manutenção da homeostase redox celular. Para tanto, avaliou-se a viabilidade, bem como os níveis de transcritos dos genes de importantes enzimas antioxidantes, utilizando células K562 em diferentes períodos de diferenciação eritroide como modelo experimental. Assim, o estudo contou com três amostras pseudoreplicadas acompanhadas durante cinco dias de acordo com os períodos de incubação, sendo as avaliações realizadas: antes do início (D0), no início de diferenciação (D2) e final da diferenciação (D4). Além disso, cada amostra foi dividida nos seguintes grupos: células eritroides sem indução de estresse oxidativo e tratamento antioxidante (Referência); células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio (100 μ M H₂O₂); células tratadas com 1 nM (C1) e com 1 mM (C2) de MEL; por fim, dois conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse (C1+ H₂O₂ e C2+ H₂O₂, respectivamente). Dentre os principais resultados, observou-se o reestabelecimento de níveis fisiológicos de Nrf2 em ambas concentrações de MEL, sob indução de estresse com peróxido, quando comparado ao grupo sob a ação apenas do agente estressor, sugerindo um efeito citoprotetor. A menor concentração (C1) relacionou-se com a indução da expressão de genes antioxidantes por intermédio da via NRF2-ARE, quando comparados com suas respectivas referências. Este padrão foi observado no dia 0 para os genes da *CAT*, *SOD1*, *PRXD1* e 6; No dia 2, foi constatado para *CAT*, *PRDX1* e 6. Em relação ao dia 4, o mesmo padrão foi observado para *SOD1*, *PRDX1* e 6, sugerindo, inclusive, um efeito protetor da MEL em relação a esta primeira peroxirredoxina, uma vez que os tratamentos utilizando MEL ocasionaram uma expressão semelhante aos níveis fisiológicos. Quanto a C2, esta relacionou-se com a indução da expressão de *FOXO3*, quando associada ou não a indução de estresse oxidativo; sendo que, no D4, C2 + H₂O₂ mostrou-se relacionada a uma redução de viabilidade celular possivelmente relacionada a ativação de vias apoptóticas. Dessa forma, os efeitos da administração de MEL nestas células apresentaram um padrão período e dose-dependentes contra o estresse oxidativo induzidos com H₂O₂, com ação direta sobre a detoxificação do agente estressor e indireta, visto que a via FoxO3 apresentou papel sugestivo de indução de vias apoptóticas, enquanto o fator de transcrição predominantemente responsável pela manutenção da homeostase redox nas células K562 foi o Nrf2. Dessa forma, o presente trabalho reforça a importância dessa indolamina na regulação da homeostase celular, sendo uma alternativa terapêutica promissora para doenças que apresentam um dano oxidativo exacerbado, devido ao seu potente efeito redutor.

Palavras-chave: Melatonina. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Estresse antioxidante.

ABSTRACT

Redox homeostasis has already been described as “the golden mean of healthy living” and its regulation can occur through the control of enzymatic activity or at the transcriptional level. Important transcription factors related to this homeostasis are FoxO3 and Nrf2, both influenced by the action of melatonin (MEL). This indolamine and its metabolites constitute a particularly efficient chemical family, with a great capacity to fight oxidative stress, which can act directly against them or indirectly, acting on the induction of the expression of antioxidant enzymes. A cell type constantly exposed to oxidative insults is the erythrocyte, so the present study used the erythroleukemic lineage K562 induced to differentiate into erythroid cells. Thus, this proposal aimed to investigate the possible modulating effect of MEL on the redox signaling pathways PI3K/AKT/FoxO3 and Keap1/Nrf2/ARE, in cultivation of K562 erythroleukemic cells subjected to oxidative stress induction, favoring the maintenance of cellular redox homeostasis. For this, the viability, as well as the transcript levels of genes of important antioxidant enzymes, were evaluated, using K562 cells in different periods of erythroid differentiation as an experimental model. Thus, the study had three pseudo-replicated samples followed for five days according to the incubation periods, the evaluations was carried out: before the start (D0), at the beginning of differentiation (D2) and end of differentiation (D4). In addition, each sample was divided into the following groups: erythroid cells without oxidative stress and antioxidant treatment (Reference); cells under stress induction by hydrogen peroxide (100 μ M H₂O₂); cells treated with 1 nM (C1) and 1 mM (C2) MEL; finally, two sets of cells treated with the same concentrations of MEL associated with stress induction (C1 + H₂O₂ and C2 + H₂O₂, respectively). Among the main results, it was observed the restoration of physiological levels of Nrf2 in both concentrations of MEL, under stress induction with peroxide, when compared to the group under the action of only the stressor, suggesting a cytoprotective effect. The lowest concentration (C1) was related to the induction of the expression of antioxidant genes through the Nrf2-ARE pathway, when compared with their respective references. This pattern was observed on day 0 for the *CAT*, *SOD1*, *PRDX1* and 6 genes; On day 2, it was found for *CAT*, *PRDX1* and 6. In relation to day 4, the same pattern was observed for *SOD1*, *PRDX1* and 6, even suggesting a protective effect of MEL in relation to this first peroxiredoxin, since the treatments using MEL caused an expression similar to the physiological levels. As for C2, it was related to the induction of *FOXO3* expression, when associated or not with the induction of oxidative stress; and on D4, C2 + H₂O₂ was shown to be related to a reduction in cell viability possibly related to activation of apoptotic pathways. Thus, the effects of MEL administration in these cells showed a period and dose-dependent pattern against oxidative stress induced with H₂O₂, with direct action on the detoxification of the stressor and indirect, since the FoxO3 pathway had a suggestive role in inducing apoptotic pathways, while the transcription factor predominantly responsible for maintaining redox homeostasis in K562 cells was Nrf2. Thus, the present work reinforces the importance of this indolamine in the regulation of cellular homeostasis, being a promising therapeutic alternative for diseases that present an exacerbated oxidative damage, due to its potent reducing effect.

Keywords: Melatonin. Oxidative stress. Antioxidants. Antioxidant stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação da localização subcelular de FoxO3 de acordo com o estímulo oxidante	20
Figura 2. Regulação da localização subcelular de Nrf2 de acordo com o estímulo oxidante	21
Figura 3. Importância da MEL para homeostase celular.....	23
Figura 4. Cultivo de células K562	30
Figura 5. Comprovação da diferenciação de células K562 pelo método de benzidina	31
Figura 6. Viabilidade de células K562 acompanhadas durante 5 dias de cultivo com e sem indução de estresse oxidativo por 100µM de H ₂ O ₂	36
Figura 7. Expressão relativa de <i>FOXO3</i> em células eritroides K562.....	38
Figura 8. Expressão relativa de <i>14-3-3</i> em células eritroides K562.....	39
Figura 9. Expressão relativa de <i>MST1</i> em células eritroides K562.....	40
Figura 10. Expressão relativa de <i>NRF2</i> em células eritroides K562.....	41
Figura 11. Expressão relativa de <i>KEAP1</i> em células eritroides K562	42
Figura 12. Expressão relativa de <i>PRDX1</i> em células eritroides K562	43
Figura 13. Expressão relativa de <i>PRDX6</i> em células eritroides K562	44
Figura 14. Expressão relativa de <i>PRDX2</i> em células eritroides K562	45
Figura 15. Expressão relativa de <i>SOD1</i> em células eritroides K562.....	46
Figura 16. Expressão relativa de <i>CAT</i> em células eritroides K562	47
Figura 17. Expressão relativa de <i>GPx1</i> em células eritroides K562	48
Figura B1 – Padronização dos primers <i>PRDX1</i>	68
Figura B2 - NTCs (no-template controls) <i>PRDX1</i>	69
Figura B3 – Teste de eficiência da reação para análise do gene <i>PRDX1</i>	70
Figura C1. Expressão relativa de <i>FOXO3</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	72
Figura C2. Expressão relativa de <i>14-3-3</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	73
Figura C3. Expressão relativa de <i>MST1</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	73
Figura C4. Expressão relativa de <i>NRF2</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	74
Figura C5. Expressão relativa de <i>KEAP1</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	75
Figura C6. Expressão relativa de <i>PRDX1</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	75
Figura C7. Expressão relativa de <i>PRDX2</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	76
Figura C8. Expressão relativa de <i>PRDX6</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	77
Figura C9. Expressão relativa de <i>SOD1</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	77

Figura C10. Expressão relativa de <i>CAT</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	78
Figura C11. Expressão relativa de <i>GPx1</i> entre células K562 induzidas ou não a diferenciação.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições testadas no experimento	33
Tabela B1. Sequências dos primers que foram utilizados nas reações de qPCR.	67
Tabela B2. Apresentação da concentração ideal de cada par de primer determinada durante a padronização e eficiência de cada reação para cada gene alvo.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-OHM	<i>cyclic 3-hydroxymelatonin</i>
AFMK	<i>N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine</i>
AKT	proteína quinase B
AMK	<i>N1-acetyl-5-methoxykynuramine</i>
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante
CAT	Catalase
EO	Estresse oxidativo
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
<i>FOXO3</i>	Forkhead box O3 (gene)
FoxO3	Forkhead box O3 (proteína)
FT	Fator de transcrição
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GLM	General Linear Models (Teste estatístico)
GPx1	Glutathione peroxidase 1
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
Hb	Hemoglobina
Hb(FeII)O ₂	Hemoglobina oxigenada
Hb(FeIII)	Metahemoglobina
HO-1	Hemoxygenase I
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
MEL	Melatonina
MST1	<i>mammalian sterile 20-like kinase-1</i>
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NQO1	NADPH-quinona oxirredutase
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2</i> (proteína)
<i>NRF2</i>	<i>Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2</i> (gene)
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
PRDX	Peroxiredoxina

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SBF	Soro Bovino Fetal
SEM	Sinal de Exportação Nuclear
SLN	Sinal de Localização Nuclear
sMAF	Proteína Small Maf
SOD	Superóxido dismutase
Srx	Sulfiredoxina
TRX	Tioredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo	15
1.2 Fontes Oxidativas em Eritrócitos	16
1.3 Proteção Antioxidante em Eritrócitos	17
1.4 Vias de sinalização	18
1.5 Suplementação terapêutica com antioxidantes - Melatonina	21
1.5.1 Estresse antioxidante ou redutor	24
1.6 Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias.....	25
2. OBJETIVOS	28
3. METODOLOGIA.....	30
3.1 Cultivo de células K562 - Linhagem de célula eritroleucêmica.....	30
3.2 Diferenciação de células K562 induzida pela adição de hemina combinada com hidroxureia.....	31
3.3 Indução do estresse oxidativo pela adição de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) como agente estressor.....	32
3.4 Design Experimental	32
3.4.1 - Determinação de expressão de hemoglobina utilizando o método de benzidina	33
3.4.2 - Contagem de células e determinação da viabilidade celular através de azul de tripan.....	33
3.4.3 – Análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)	34
3.5 Análises Estatísticas	34
4. RESULTADOS	36
4.1 – Papel protetor da melatonina sobre a viabilidade celular.	36
4.2 – Influência do tratamento com melatonina na regulação de vias de sinalização redox em células eritroides	37
4.2.1 FOXO3 e reguladores de sua localização subcelular	37
4.2.2 Nrf2 e seu sensor molecular	40
4.3 Influência do tratamento com melatonina na expressão gênica de agentes antioxidantes importantes em células eritrocitárias.....	42
4.3.1 <i>Influência direta e indireta da MEL no combate ao estresse oxidativo</i>	42
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	57

APÊNDICES	64
Apêndice A	64
Detalhes da cultura celular	64
Apêndice B	66
Padronização dos primers de qPCR	66
Apêndice C	72
Detalhes do PCR em tempo real de todos os genes analisados para células K562 induzidas ou não a diferenciação eritroide	72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas como subprodutos deste tipo de metabolismo ou podem ser produzidas através de disfunção biológica, como durante atividade física intensiva, exposição a infecções microbianas que envolvem a ativação de fagócitos, ação de poluentes/toxinas como fumaça de cigarro, álcool, radiações ionizantes e UV, pesticidas e ozônio (PISOSCHI; POP, 2015). E, independente da forma de produção, influenciam significativamente a manutenção da homeostase celular e apresentam seus efeitos contrapostos pelas reações de redução (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). ERO incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$), todos com propriedades químicas particulares que conferem reatividade a diferentes alvos biológicos, podendo apresentar efeitos prejudiciais à célula, tais como peroxidação lipídica, danos às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (SCHIEBER; CHANDEL, 2014; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

O estresse oxidativo (EO), decorrente do aumento da produção de ERO, foi primeiramente definido por Sies como um “desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente” (SIES, 1991). Os danos provocados à célula podem manifestar-se clinicamente de diferentes formas, como através do envelhecimento ou diversas doenças. Assim, hoje, o EO está relacionado como causa ou consequência de mais de 100 doenças (PISOSCHI; POP, 2015; POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Em decorrência de descobertas sobre o efeito destas moléculas no organismo, hoje em dia existe um grande interesse no estudo de moléculas que contrapõem tal ataque oxidante, os chamados antioxidantes (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Além disso, nas últimas duas décadas, tornou-se evidente que as ERO também servem como moléculas de sinalização redox, regulando processos biológicos e fisiológicos, atuando como mecanismo de defesa contra várias cepas de bactérias/fungos através de sua geração por fagócitos, além de serem essenciais em processos como de regulação da proliferação celular, apoptose e expressão gênica, por ativarem fatores de transcrição (FT) (PISOSCHI; POP, 2015; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Assim, uma definição contemporânea para EO, com base em estudos recentes sobre vias de

sinalização redox, mecanismo antioxidante e marcadores de EO, é “uma ruptura da sinalização e controle redox” (JONES, 2006). A homeostase redox já foi descrita como “o meio áureo da vida saudável” e a regulação para tal homeostase pode ocorrer através do controle de atividade enzimática ou em nível transcricional (KLOTZ et al., 2015; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

1.2 Fontes Oxidativas em Eritrócitos

Dentre os diferentes tipos celulares, os eritrócitos, os quais passam continuamente por ciclos de normóxia e hipóxia, são constantemente expostos a insultos oxidativos durante seus 120 dias de vida, o que resulta em contínuas mudanças bioquímicas, físicas e estruturais (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014). Nos pulmões, o O_2 se liga à hemoglobina (Hb) em altas pressões parciais de oxigênio e é liberado para os tecidos em pressões parciais de oxigênio reduzidas na microcirculação (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2015). Ainda, devido ao fato dos eritrócitos serem maiores do que o diâmetro capilar na microcirculação, é necessário, portanto, para o fluxo sanguíneo, que os eritrócitos discoides se deformem para passar por esses capilares para a devida oxigenação dos tecidos (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014). Durante o processo de transporte do O_2 para os tecidos, as moléculas de Hb parcialmente oxigenadas formadas nestes eritrócitos na microcirculação, possuem elevada afinidade pela membrana desta célula, o que acarreta no aumento do processo denominado autooxidação, produzindo ERO que não são completamente neutralizadas pelo sistema antioxidante. Isto contribui para o EO nos eritrócitos e, eventualmente, desencadeiam sua remoção da circulação pelo sistema retículo-endotelial (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014; VOSKOU et al., 2015).

O grupo heme e o ferro são agentes altamente oxidantes. Assim, embora considerada uma molécula relativamente estável, a Hb oxigenada $[Hb(FeII)O_2]$ pode se autooxidar fisiologicamente em metahemoglobina $[Hb(FeIII)]$. Este processo, que ocorre a uma taxa de ~ 0,5–3% por dia, é quase inteiramente responsável pela geração de ERO dentro dos eritrócitos, devido a produção de $O_2^{\bullet-}$ (UMBREIT, 2007; VOSKOU et al., 2015), que através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea, pode ser convertido a H_2O_2 (VALKO et al., 2004). A autooxidação é mais pronunciada em condições hipóxicas, como na microcirculação e para HbS ou cadeias de α -globina livres, encontradas na doença falciforme e β -talassemia, respectivamente

(NAGABABU et al., 2008). Além disso, o ferro, na forma livre ou ligado ao grupo heme e a Hb, pode atuar como um reagente de Fenton no ciclo de Haber-Weiss, que gera o $\text{OH}^\bullet$ altamente reativo (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2015). Este radical, ao contrário do $\text{O}_2^{\bullet-}$, não pode ser eliminado enzimaticamente, podendo, portanto, promover danos oxidativos extensos (VOSKOU et al., 2015).

1.3 Proteção Antioxidante em Eritrócitos

Halliwell e Gutteridge (1995) definiram antioxidantes como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação desse substrato”. Porém, posteriormente foi definido como “qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo” (HALLIWELL, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Para tal, a defesa antioxidante humana é complexa e visa minimizar os efeitos das ERO e EO resultante da exposição constante a fontes endógenas e exógenas de estresse na circulação enquanto permite papéis úteis das ERO para realizar a sinalização celular e regulação redox (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014; POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Dessa forma, a homeostase redox celular é primorosamente regulada por um complexo sistema de defesa antioxidante endógeno, dividido em dois grupos principais: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Considerando os antioxidantes endógenos não enzimáticos, existem vários deles, nomeadamente vitaminas (A), cofatores enzimáticos (Q10), compostos de nitrogênio (ácido úrico), peptídeos (glutathione - GSH) e a melatonina (CAROCHO; FERREIRA, 2013; POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013).

Com relação aos antioxidantes enzimáticos, eles são divididos em defesas enzimáticas primárias e secundárias. No que diz respeito à defesa primária, é composta por três importantes enzimas que impedem a formação ou neutralizam os radicais livres: a glutathione peroxidase (GPx), que doa dois elétrons para reduzir peróxidos, um substrato potencial para a reação de Fenton; a catalase (CAT), que converte H_2O_2 em água e oxigênio molecular e tem uma das maiores taxas de renovação conhecidas, permitindo que apenas uma molécula de CAT converta 6 milhões de moléculas de H_2O_2 ; e, finalmente, a superóxido dismutase (SOD) converte $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (RAHMAN, 2007). Além dessas enzimas, outros antioxidantes, incluindo proteínas redox, como tioredoxinas (TRXs) e peroxiredoxinas (PRDXs), também desempenham papéis cruciais nas defesas

antioxidantes. A TRX reduz proteínas oxidadas e atua como doadora de elétrons para as PRDX, sendo a PRDX6 uma exceção pois esta tem como seu redutor fisiológico a GSH (FISHER, 2011), e estas atuam na redução de peróxidos e hidropéroxidos orgânicos (RAHMAN, 2007; ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2013).

A defesa enzimática secundária inclui duas enzimas que não neutralizam os radicais livres diretamente, mas têm funções de apoio para os outros antioxidantes endógenos, sendo elas: a glutatona redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A GR reduz a glutatona de sua forma oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (GSH), reciclando-a para continuar neutralizando mais radicais livres (PANDEY; RIZVI, 2010; ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2013). Nos eritrócitos, a GSH desempenha papel primordial como antioxidante, pois atua como cofator de enzimas como a GPx, durante a redução de peróxidos e hidropéroxidos orgânicos (ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2013). Outra enzima fundamental é a G6PDH, a qual regenera o NADPH, criando um ambiente redutor. A redução contínua de NADP^+ a NADPH é crucial para manter altas concentrações de GSH e PRDXs nos eritrócitos, permitindo que atuem como agentes redutores, caracterizando-se como uma via de extrema importância para a capacidade redox dos eritrócitos (ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2013).

1.4 Vias de sinalização

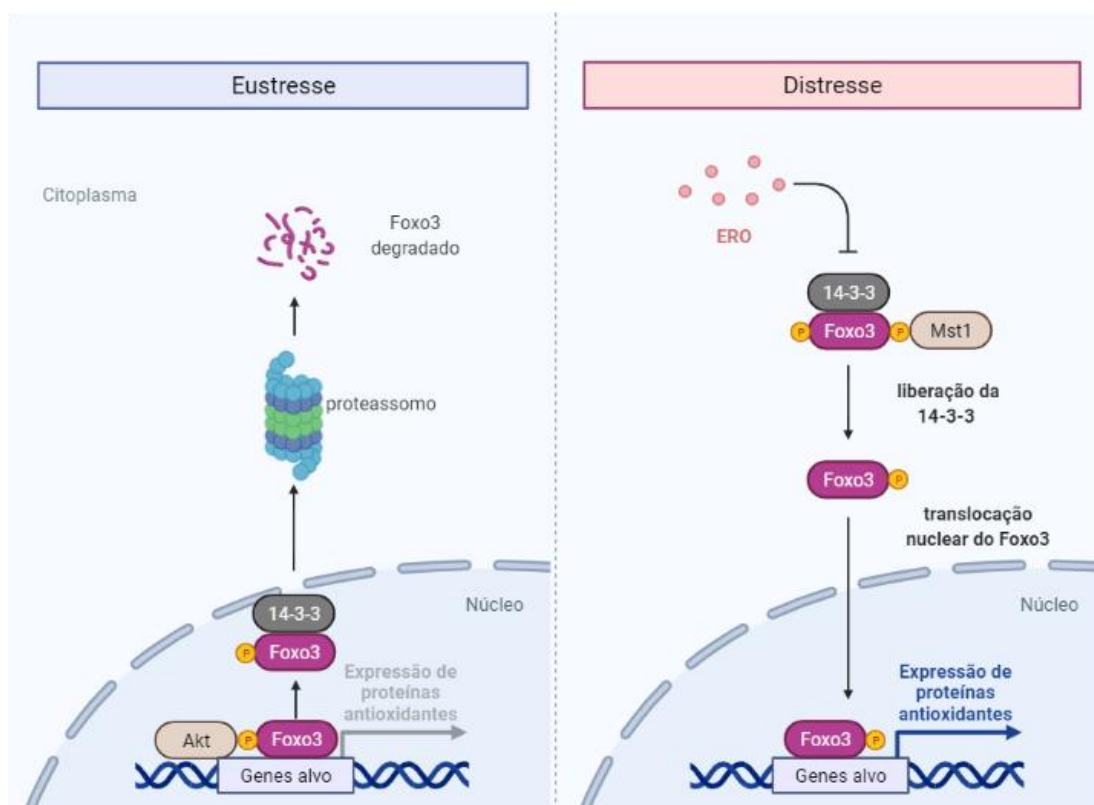
A via de sinalização fosfatidilinositol 3 quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT), vastamente estudada, já é descrita como via chave na ativação de diferentes FT, como é o caso do FoxO3 (*Forkhead box O3*). Os alvos do FoxO3 incluem genes que codificam para antioxidantes intra- e extracelulares, interferindo em todos os níveis de redução de oxigênio que, de outra forma, gerariam diversas ERO e causariam danos oxidativos às biomoléculas. Dentre os genes alvos de FoxO3, que codificam importantes antioxidantes para detoxificação de ERO, podemos citar *SOD1* e 2, *CAT*, *PRDX 2*, 3 e 5 e *GPx1* (KLOTZ et al., 2015). Além disso, este FT é responsável por regular a diferenciação celular, metabolismo, vias de supressão tumoral, parada do ciclo celular, autofagia e apoptose por meio da ativação da transcrição de seus genes-alvo (CALNAN; BRUNET, 2008). A atividade transcricional das proteínas FoxO3 é regulada através de várias modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, acetilação e ubiquitinação (CALNAN; BRUNET, 2008; GREER; BRUNET, 2005; WANG; HU; LIU, 2017) e assim como os demais membros da subclasse “O”, o FoxO3 é negativamente regulado

pela via de sinalização PI3K/AKT (KLOTZ et al., 2015). A via da PI3K é fundamental para a regulação da ação do FoxO3, pois a ativação do PI3K conduz à fosforilação e ativação de alvos a jusante incluindo a AKT (BOCCITTO; KALB, 2011).

Brunet e colaboradores demonstraram pela primeira vez, a regulação do FoxO3 pela AKT, através da fosforilação do FoxO3 em três locais: T32, S253 e S315 tanto *in vitro* como *in vivo*, resultando na exclusão nuclear do FoxO3, impedindo assim a transativação de seus genes-alvo (Figura 1) (BRUNET et al., 1999). Cada um desses três locais de fosforilação desempenha função importante na exportação nuclear do FoxO3: a fosforilação na região C-terminal, S315, desmascara o Sinal de Exportação Nuclear (SEN) do FoxO3, aumentando assim sua taxa de exportação nuclear. O sítio de fosforilação central S253 está localizado no Sinal de Localização Nuclear (SLN) e atua interrompendo o SLN através da introdução de uma carga negativa, impedindo a reentrada do FoxO3 no núcleo e, por fim, o local de fosforilação N-terminal, T32, juntamente com a S253, está envolvido na associação do FoxO3 com a chaperona 14-3-3, que é essencial para a exportação nuclear deste FT (BOCCITTO; KALB, 2011; TZIVION; DOBSON; RAMAKRISHNAN, 2011).

Entretanto, existem quinases, como a MST1 (*mammalian sterile 20-like kinase-1*), capazes de fosforilar a S207 do FoxO3, inibindo sua associação com a 14-3-3, promovendo assim a translocação deste FT de volta para o núcleo, sob condições de estresse (BOCCITTO; KALB, 2011; WANG; HU; LIU, 2017). Isto demonstra a existência de uma hierarquia entre as modificações pós-traducionais, na qual a fosforilação pela MST1 supera os efeitos da fosforilação pela AKT, permitindo a rápida resposta ao estímulo de EO (CALNAN; BRUNET, 2008; TZIVION; DOBSON; RAMAKRISHNAN, 2011).

Figura 1. Regulação da localização subcelular de FoxO3 de acordo com o estímulo oxidante

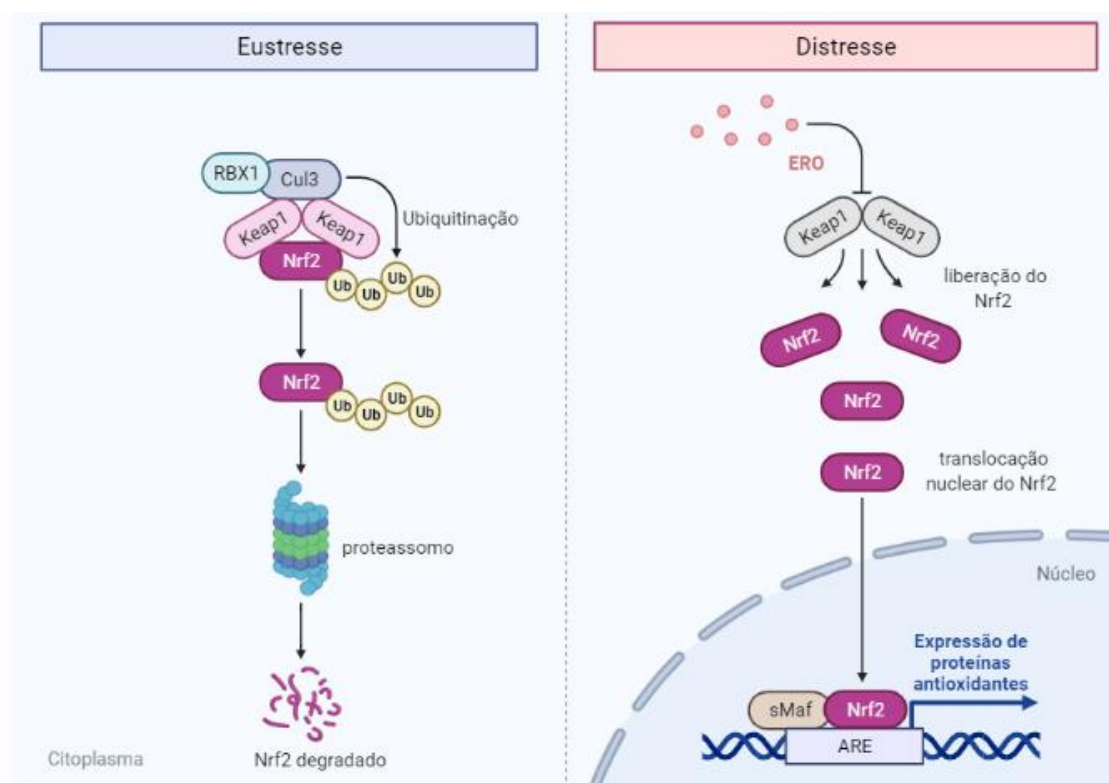


Em seu estado fosforilado, a AKT é capaz de fosforilar a proteína FoxO3, rompendo sua ligação com o DNA e translocando esta forma fosforilada do núcleo para o citoplasma, interrompendo assim a transcrição de seus genes-alvo. Este processo é realizado pela chaperona 14-3-3, que além de fazer essa realocação subcelular também protege o FoxO3 de ser desfosforilada. A via da proteína MST1 é antagônica a da PI3K/AKT, ou seja, em situações específicas como em estados de alto estresse oxidativo, a MST1 fosforila FoxO3, o que interrompe a ligação com a chaperona 14-3-3, ocasionando a realocação subcelular desta proteína para o núcleo, permitindo que o FoxO3 ative a transcrição de genes alvo que visam combater o estresse oxidativo ao qual a célula está submetida. Fonte: esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da BioRender – Life Science Icons (<https://biorender.com/>).

Outro importante FT regulado pela via PI3K/AKT é o Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2*) (LIM et al., 2008; ZHANG et al., 2017; ZHUANG et al., 2014). Nrf2 desempenha papel central no controle da expressão de enzimas de defesa antioxidantes (VRIEND; REITER, 2015). A proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) atua como uma subunidade de reconhecimento de substrato de ligase de ubiquitina E3 e atinge especificamente o Nrf2 (ROBLEDINOS-ANTÓN et al., 2019). Em condições oxidativas fisiológicas, o Nrf2 é eficientemente ubiquitinado pela Keap1-Cul3 E3 ligase e degradado rapidamente através da via do proteassomo, de tal forma que a atividade celular de Nrf2 é suprimida constitutivamente (Figura 2). Em oposição, quando em EO, o complexo contendo Keap1 perde sua capacidade de ubiquitinar o Nrf2 (VRIEND; REITER, 2015). Em seguida, Nrf2 dimeriza com uma das pequenas proteínas

Maf (sMaf). O heterodímero Nrf2-sMaf liga-se ao elemento de resposta antioxidante 2 ou elemento de resposta eletrofílica (ARE) localizado nas regiões reguladoras de muitos genes de enzimas citoprotetoras (ROBLEDINOS-ANTÓN et al., 2019). Desta forma, o Nrf2 ativa uma ampla gama de genes envolvidos na defesa celular, como a *SOD1*, *CAT*, *GPx1*, *PRDX1*, 2, 5 e 6, *HO-1* (Hemoxigenase I), *NQO1* (NADPH-quinona oxirredutase), *Srx* (sulfirredoxina), *TRXR* (Tiorredoxina redutase), *GST* (Glutathione-S-transferase), além de estimular a transcrição de γ -Globina e, estima-se, outros milhares de genes, detoxificando a células de todos tipos de substâncias nocivas (VRIEND; REITER, 2015).

Figura 2. Regulação da localização subcelular de Nrf2 de acordo com o estímulo oxidante



Em condições livres de estresse oxidativo, o Nrf2 é mantido inativo sendo ligado ao seu inibidor endógeno, Keap1. Nessa condição, os níveis de Nrf2 são regulados principalmente pelo proteassoma. O estresse oxidativo faz com que o Nrf2 se separe de Keap1 e se transloque para o núcleo, onde se heterodimeriza com Maf: o heterodímero Nrf2-Maf se liga a ARE para induzir a expressão de genes antioxidantes e metabólicos. Fonte: esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da BioRender – Life Science Icons (<https://biorender.com/>).

1.5 Suplementação terapêutica com antioxidantes - Melatonina

O EO representa uma ameaça grave à integridade química de biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. O dano oxidativo a essas moléculas frequentemente resulta em

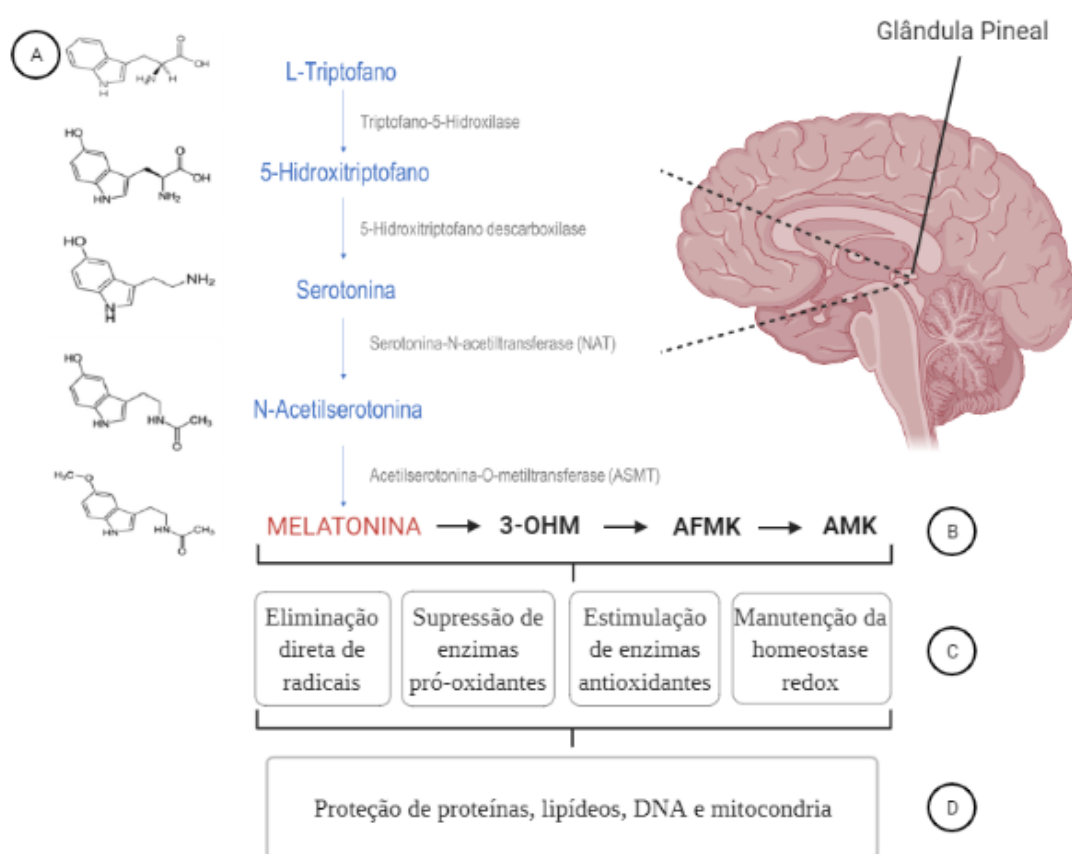
problemas de saúde graves. Portanto, a preocupação com o EO é bem justificada. Além dos mecanismos de defesa enzimática, existem compostos que oferecem proteção contra os efeitos deletérios do EO (GALANO; TAN; REITER, 2011). Entre eles, a melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina; MEL) e seus metabólitos constituem uma família química particularmente eficiente. Durante décadas a MEL foi considerada um hormônio animal envolvido na sincronização do ritmo circadiano, regulação da pressão arterial e reprodução sazonal. No entanto, atualmente existem cada vez mais evidências de suas diversas outras funções, como propriedades de reforço imunológico e anti-inflamatórias, manutenção da fluidez das membranas biológicas, papéis homeostáticos na mitocôndria e inibição da progressão do câncer (GALANO; REITER, 2018; SOCACIU et al., 2020). Outra função fundamental exercida e bem documentada é sua capacidade antioxidante.

A MEL é uma indolamina com ocorrência universal ao longo de diferentes táxons e com grande potencial antioxidante. Esta indolamina, derivada do aminoácido triptofano (Figura 3-A), e seus metabólitos (Figura 3-B) são altamente eficazes no combate ao EO. A MEL, quando comparada à maioria de seus análogos estruturais de ocorrência natural, revelou-se consideravelmente mais eficiente (GALANO; REITER, 2018; HARDELAND; PANDI-PERUMAL, 2005; PANDI-PERUMAL et al., 2006; REITER, 2000). Na literatura, inúmeros estudos já comprovaram que a MEL possui a maioria das características desejáveis de bons depletors de radicais livres: é anfifílica e assim, pode ser facilmente transportada através das membranas celulares; é produzida por diversos tecidos e dessa forma é amplamente distribuída no corpo; os metabólitos que são formados quando a MEL incapacita uma espécie radical também atuam na detoxificação de radicais livres, na chamada cascata antioxidante; é um quelante de íons metálicos que estão envolvidos nas reações de Haber-Weiss e Fenton, impedindo assim a formação de $\bullet\text{OH}$; tem toxicidade mínima, permitindo ingestão de quantidades elevadas sem efeitos colaterais; aumenta a eficiência da transferência de elétrons entre os complexos respiratórios mitocondriais, reduzindo assim o vazamento de elétrons e a formação de radicais livres (Figura 3-C) (GALANO; REITER, 2018; GALANO; TAN; REITER, 2011; HARDELAND; PANDI-PERUMAL, 2005; REITER, 2000; REITER et al., 2018).

Além disso, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, atua como um antioxidante de amplo espectro, podendo atuar diretamente como antioxidante, ao interagir com radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inativando-os, ou de forma indireta, modulando a atividade e/ou expressão de moléculas produtoras de espécies reativas (inibe enzimas pró-oxidantes como por exemplo, mieloperoxidase, lipoxigenase) ou de

integrantes do sistema antioxidante celular. Dessa forma, podendo atuar sinergizando com os sequestradores de radicais clássicos, tornando-os mais eficazes na redução do dano oxidativo ou estimulando a expressão e, conseqüentemente, a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, entre as quais a SOD, CAT, GPx e GR. A MEL também protege as enzimas antioxidantes de danos oxidativos e aumenta a síntese de GSH e G6PDH, enzima fundamental para a via da pentose fosfato, na qual o NADPH é produzido e usado para a reciclagem de GSH. Assim, considerando-se os múltiplos meios pelos quais a MEL age contra as ERO, esta parece ser implacável na manutenção do equilíbrio redox da célula e prevenção de danos moleculares (Figura 3-D) (FERLAZZO et al., 2020; GALANO; REITER, 2018; GALANO; TAN; REITER, 2011; REITER, 2000; REITER et al., 2018).

Figura 3. Importância da MEL para homeostase celular



A- Via de síntese de melatonina a partir do aminoácido essencial triptofano. (Adaptado de Bravo *et al.* 2012). B- Cascata antioxidante da melatonina. C- Mecanismos de proteção contra danos oxidativos. D- Efeitos celulares decorrentes da ação da melatonina. 3-OHM: cyclic 3-hydroxymelatonin; AFMK: N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine; AMK: N1-acetyl-5-methoxykynuramine. Fonte: esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da BioRender – Life Science Icons (<https://biorender.com/>).

Por fim, diversos estudos demonstraram que a MEL influencia diretamente em vias de extrema importância para a manutenção redox e homeostase celular. Já foi descrito que a MEL aumenta os níveis celulares de Nrf2 em vários modelos de indução de EO (JUNG et al., 2009; KILIC et al., 2013; SANTOFIMIA-CASTAÑO et al., 2015; YU et al., 2019). Ainda, dados mostram que a ação da MEL sobre as enzimas antioxidantes no estriado de camundongos submetidos à exposição ao manganês é mediada pelo FT Nrf2 após sua translocação para o núcleo e sua interação com ARE (DENG et al., 2014). Gou e colaboradores (2020) observaram que a MEL tem efeitos neuroprotetores e seus resultados indicaram que o tratamento exógeno com MEL tem um efeito protetor no dano cerebral hipóxico-isquêmico através da via Nrf2 (GOU et al., 2020). Em relação à segunda via, Carbajo-Pescador *et al.* (2013) e Jang *et al.* (2016) demonstraram a importância da MEL sobre a via PI3K/AKT/FoxO3 (CARBAJO-PESCADOR et al., 2013; JANG et al., 2016). Esta é capaz de suprimir a fosforilação dos componentes desta via e ainda, aumentar significativamente o nível de proteína total e atividade do FoxO3 a partir de sua localização nuclear aumentada, já tendo sido confirmada por experimentos de microscopia de fluorescência, bem como por *Western Blot* do FoxO3 em extratos nucleares e citoplasmáticos (CARBAJO-PESCADOR et al., 2013).

1.5.1 Estresse antioxidante ou redutor

O dano celular decorrente de EO tem sido vastamente explorado, mas pouco se sabe sobre o dano celular causado pelo “estresse antioxidante”, termo este proposto por Dundar e Aslan para a oxidação intracelular/desequilíbrio antioxidante causado por antioxidantes excessivos (DÜNDAR; ASLAN, 2000). Caso o nível de ERO nas células esteja baixo ou o nível de antioxidantes nas células for muito alto, tal desequilíbrio pode caracterizar um resultado perigoso para as células, devido a um desbalanço na sinalização redox podendo ocasionar um dano celular induzido por antioxidantes em excesso. Dessa forma, assim como os radicais livres nem sempre são a “raiz de todos os males”, os antioxidantes nem sempre devem ser vistos como “quanto mais, melhor” (DING et al., 2020).

Um exemplo clássico para esse estresse antioxidante é a vitamina C, a qual é quimicamente capaz de reagir com a maioria dos radicais e oxidantes fisiologicamente importantes e atua como um comprovado antioxidante hidrossolúvel (DUARTE; LUNEC, 2005). Foi demonstrado que a adição de vitamina C até uma concentração de

0,2 mM potencializou o aumento da peroxidação lipídica induzida por Fe. A vitamina C não tem efeito negativo por si mesma, mas a combinação dela com o Fe causa intensa oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, portanto, o grau de redução do ferro pode determinar a atuação da vitamina C como um fator de ameaça ou agente de eliminação (DÜNDAR; ASLAN, 2000). Além disso, há algumas evidências de que a vitamina C, em baixa ou em mega doses, pode reduzir o nível de vitamina B12 ao afetar sua absorção dos nutrientes. Outros antioxidantes como vitamina E, SOD e GSH, também podem possuir potencial de estresse antioxidante sob certas condições (DÜNDAR; ASLAN, 2000; POLJSK; MILISAV, 2012).

No caso da MEL, perfil similar pode ser observado. Já foi demonstrado que na presença de MEL nas concentrações de 1,5 e 3,0 mM foi observada oxidação acelerada da Hb-Fe⁺² em comparação ao controle (sem MEL) e aumento do EO nas células (KROKOSZ et al., 2013). A aceleração da oxidação da Hb na presença das concentrações de MEL acima indicou sua reação direta com essa proteína. Gilad e Zisapel mostraram que a MEL se ligava à Hb, mas não diretamente ao grupo heme. Os resultados obtidos por esses autores sugeriram que a MEL estava ligado ao estado de HbO₂ (GILAD; ZISAPEL, 1995). Pode ser proposto que a ligação de MEL a HbO₂ funcione como um efector alostérico, alterando a estrutura da proteína e tendendo a acelerar a oxidação do heme Fe (II). Em concentrações de MEL como 0,6 mM e inferiores, provavelmente as posições de ligação não estão completamente saturadas e, portanto, a oxidação acelerada de HbO₂ não é observada (KROKOSZ et al., 2013). Desta forma, a MEL em si não possui um efeito negativo, mas sua interação com outros fatores pode ocasionar tal consequência.

1.6 Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias

K562 é uma linhagem celular estabelecida *in vitro* a partir de um derrame pleural de um paciente com leucemia mieloide crônica em crise blástica (LOZZIO, LOZZIO, 1975). Se trata de uma célula blástica indiferenciada com um diâmetro de cerca de 20 µm. A célula possui um citoplasma basofílico sem grânulos e há dois ou mais nucléolos proeminentes. Possui um tempo médio de duplicação de 24 horas e crescem bem em cultura em suspensão (KOEFFLER; GOLDE, 1980; TSIFTSOGLU; PAPPAS; VIZIRIANAKIS, 2003). A membrana celular de células K562 apresenta muitas semelhanças com as glicoproteínas dos eritrócitos e, em particular, as células sintetizam

a glicoforina A, que é encontrada exclusivamente em eritrócitos humanos (KOEFFLER; GOLDE, 1980), além de espectrina e acetilcolinesterase (VILLEVAL et al., 1983).

As células K562 mostram um grau considerável de plasticidade na expressão de propriedades relacionadas a linhagens distintas de diferenciação (TSIFTSOGLU; PAPPAS; VIZIRIANAKIS, 2003). Essas células exibem marcadores eritroides, granulocíticos, monocíticos ou megacariocíticos, o que sugere que podem resultar da transformação de um precursor hematopoiético multipotencial. As células K562 têm sido amplamente utilizadas como sistema modelo *in vitro* para estudar a diferenciação ao longo da linhagem eritroide (GUO et al., 2012), pois sob tratamento com hemina e outros agentes indutores, as células K562 são diferenciadas em células produtoras de Hb (KOEFFLER; GOLDE, 1980; TSIFTSOGLU; PAPPAS; VIZIRIANAKIS, 2003).

Os estudos de linhagens eritroides *in vitro* que utilizam a linhagem celular K562, vem sendo amplamente utilizados como modelo de estudo da ação de drogas com possível ação terapêutica, devido ao considerável grau de plasticidade. Além disto, pelas características eritroides, esta abordagem metodológica permite estudar diferentes vias que levam a expressão de Hb e que regulam a homeostase destas células, fatores importantes para o entendimento de como possíveis alternativas terapêuticas poderiam atuar em diferentes doenças hematológicas (CAÑEDO, 2005).

Portanto, levando-se em conta o exposto, este modelo de estudo é uma boa alternativa para avaliarmos o papel crucial do FOXO3 e do Nrf2 na manutenção metabólica dos precursores eritroides, possibilitando analisar sua modulação e a ação da MEL sobre tais via, bem como sua capacidade antioxidante. Desta forma, a investigação deste composto como agente que possa atuar na modulação do estresse oxidativo de células como as eritroides é válida e promissora, não só para um melhor entendimento das vias de adaptação redox, mas também para a validação da MEL como alternativa terapêutica no tratamento de alterações hematológicas com quadro oxidativo e inflamatório crônicos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A presente proposta teve como objetivo geral, confirmar o possível efeito modulador da MEL sobre as vias de sinalização redox PI3K/AKT/FOXO3 e Keap1/NRF2/ARE, em cultivo de células eritroleucêmicas K562 submetidas a indução de estresse oxidativo, favorecendo a manutenção da homeostase redox celular.

Os objetivos específicos são:

- (1) Avaliar o papel de diferentes concentrações de MEL na viabilidade e níveis de transcritos de células K562 em diferentes períodos de diferenciação, submetidas ou não a estresse oxidativo induzido por H₂O₂;
- (2) Avaliar a contribuição de cada via de sinalização redox sobre os níveis de transcritos de importantes antioxidantes envolvidos na homeostase redox;
- (3) Verificar os possíveis efeitos moduladores da MEL sobre os padrões de expressão de cada via de sinalização redox estudada.

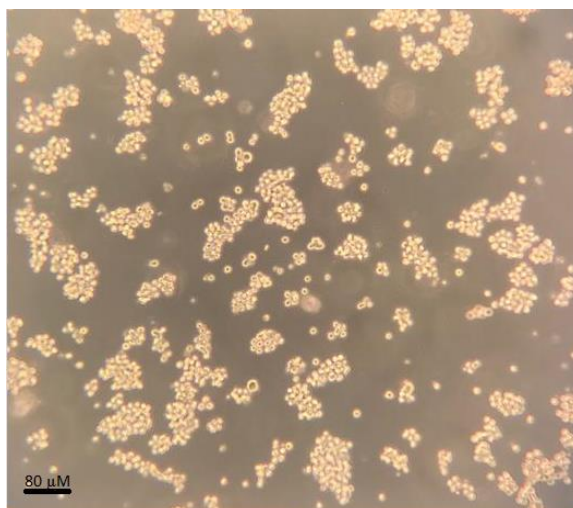
METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo de células K562 - Linhagem de célula eritroleucêmica

A linhagem celular K562 foi obtida pelo banco de células ATCC, Philadelphia, USA e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos - SP. Essa linhagem celular foi proliferada em suspensão e após a adaptação ao meio, caracterizam-se por dobrarem de número a cada 24 horas e apresentam-se como aglomerados celulares em formato de “cachos de uva” (Figura 4) (LOZZIO et al., 1981; LOZZIO; LOZZIO, 1975).

Figura 4. Cultivo de células K562



Células em suspensão de aproximadamente 20μm que foram aglomerados celulares em forma de “cachos de uva” (aumento 20X). Fonte: próprio autor.

Foi utilizado o meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), o qual é considerado um excelente meio de cultivo para diferentes células como HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC e K562 entre outras. A cultura celular foi mantida em frascos de poliestireno em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao meio foram adicionados os antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μg/ml) e o fungicida anfotericina B (0,25 μg/ml). Foi utilizado o Soro Bovino Fetal (SBF) como complemento do meio de cultura, este contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. Diariamente as células foram observadas quanto a sua confluência, número, morfologia e possíveis contaminações; adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de SBF

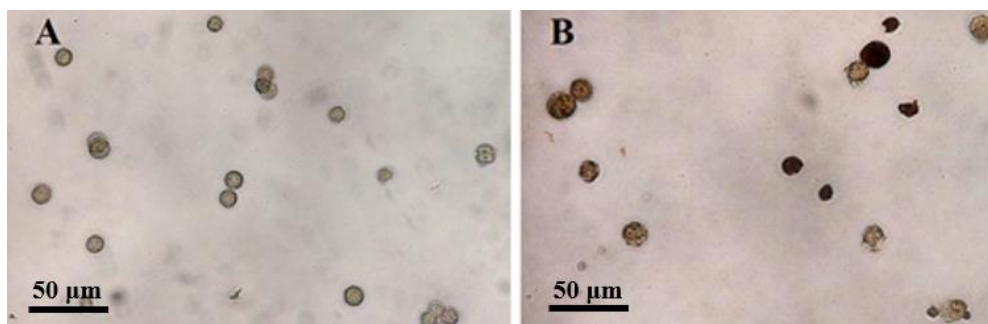
quando necessário (em casos de mudança de pH) (detalhes no **Apêndice A**). A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando o reagente azul de tripan (Trypan Blue), para determinar a viabilidade celular.

3.2 Diferenciação de células K562 induzida pela adição de hemina combinada com hidroxureia

Na literatura, estão descritos uma série de compostos que induzem a diferenciação eritroide para esta linhagem celular, dentre eles o tratamento com hemina e hidroxureia é reconhecido por estimular fortemente a síntese de Hb do tipo fetal e embrionária. Além do aumento da produção hemoglobínica, estes agentes indutores também ocasionam um aumento do volume, da complexidade celular e causam alterações morfológicas entre as células (forma de pêra, circular, células com vesiculosidades entre outras) (HIETAKANGAS et al., 2003; ISODA et al., 2014; IYAMU et al., 1998; ZHANG et al., 2019). Dessa forma, estes compostos indutores foram selecionados, seguindo o protocolo previamente estabelecido por Paula (2020), no qual foi utilizado 50 μ M de Hemina e 100 μ M de Hidroxureia para indução da diferenciação eritroide na linhagem celular K562 (PAULA, 2020).

A diferenciação celular foi confirmada através do método de benzidina (ROWLEY et al., 1981), um teste que analisa a produção de Hb. Na Figura 5, é possível observar a produção de Hb evidenciada pela coloração marrom das células quando incubadas com benzidina e H_2O_2 , comprovando a eficácia desses compostos como agentes indutores capazes de reproduzir as características eritroides.

Figura 5. Comprovação da diferenciação de células K562 pelo método de benzidina



(A) K562 controle (sem tratamento) (B) K562 no 4º dia de tratamento com hemina e hidroxureia. Fonte: próprio autor.

3.3 Indução do estresse oxidativo pela adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como agente estressor

Foi adotada a concentração 100 µM de H₂O₂, previamente testada e validada por Paula (2020) para este modelo experimental. A seleção desta concentração se deve a manutenção de uma viabilidade celular significativa, aproximadamente 80%, após administração do composto durante 7 dias (PAULA, 2020). Em outras palavras, a seleção dessa concentração de agente estressor apresentou uma toxicidade tolerável, garantindo a eficiência da investigação dos possíveis efeitos moduladores do agente protetor testado (melatonina) em células K562 diferenciadas.

3.4 Design Experimental

O estudo contou com três amostras pseudoreplicadas acompanhadas durante cinco dias de diferenciação celular, com coletas de amostras biológicas em três períodos, os quais representam o processo de diferenciação da seguinte forma: antes do início (D0), início da diferenciação (D2) e ao final do processo (D4). No dia 0 do experimento, 3,1 x 10⁶ células/ml (100% viáveis e 70-80% confluentes) foram dispostas em garrafas de poliestireno em um volume final de 30 ml de cultura, induzidas à diferenciação eritroides por meio da adição de Hemina (50 µM) e Hidroxiureia (100 µM) e incubadas em estufa a 37°C/5% de CO₂. Além disso, cada amostra foi, individualmente, dividida nos seguintes grupos: células eritroides sem indução de estresse oxidativo e tratamento antioxidante (Referência); células sob indução de estresse com H₂O₂ (100 µM H₂O₂); células tratadas nas concentrações 1 nM (C1) e 1 mM (C2) de MEL; por fim, dois conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados a indução do estresse (C1+ H₂O₂ e C2+ H₂O₂, respectivamente).

É importante ressaltar que as administrações do antioxidante e do peróxido foram realizadas diariamente e de forma escalonada nos grupos associados (C1+ H₂O₂ e C2+ H₂O₂), ou seja, uma hora após a administração das respectivas concentrações de MEL, foi adicionado o H₂O₂. As amostras foram coletadas após 1 hora da administração do agente estressor, nos dias 0 (D0), 2 (D2) e 4 (D4). Em seguida, o material foi fracionado e utilizado para os seguintes fins: i) Contagem de células e determinação da viabilidade celular; ii) Identificação da expressão de hemoglobina através do método de benzidina; e iii) Análise de expressão gênica por PCR em tempo real. Para as últimas duas etapas

citadas, o material foi lavado com PBS 1X e centrifugado (13400 rpm a temperatura ambiente por 5 min). As condições testadas estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições testadas no experimento

Não diferenciadas	Diferenciadas
Dias 0	Dias 2 e 4
K562 Referência	K562 Referência
K562 100 μ M de H ₂ O ₂	K562 100 μ M de H ₂ O ₂
K562 Mel. 1nM (C1)	K562 Mel. 1nM (C1)
K562 Mel. C1 + 100 μ M de H ₂ O ₂	K562 Mel. C1 + 100 μ M de H ₂ O ₂
K562 Mel. 1mM (C2)	K562 Mel. 1mM (C2)
K562 Mel. C2 + 100 μ M de H ₂ O ₂	K562 Mel. C2 + 100 μ M de H ₂ O ₂

Fonte: próprio autor.

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

Para determinação da expressão de Hb induzidas pela adição de hemina (50 μ M) e Hidroxiureia (100 μ M), foi utilizado o método colorimétrico de benzidina (ROWLEY et al., 1981). Esse método é amplamente utilizado na literatura para detectar Hb em amostras. O método de benzidina baseia-se na catálise da decomposição do H₂O₂ em água e oxigênio pela Hb presente na amostra. O oxigênio formado oxida a benzidina, alterando sua estrutura fazendo com que fique com coloração marrom.

As células em solução foram centrifugadas e o precipitado celular foi ressuspendido em 1 ml de PBS 1X. Em um tubo plástico foi adicionado 100 μ l da solução contendo as células, 10 μ l de benzidina (2mg/mL) e 50 μ l de H₂O₂. Os tubos foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 25 minutos. A solução foi pipetada em uma lâmina, adicionada uma lamínula sobre a gota e observado imediatamente ao microscópio de luz (40x). Células diferenciadas apresentaram uma coloração marrom escura, enquanto as células não diferenciadas apresentam cor transparente, muitas vezes levemente marrom, por conta da expressão basal de Hb.

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

Para calcular a viabilidade celular, foi utilizado o reagente azul de tripan (Trypan Blue), na concentração final de 0,1%. Este reagente não atravessa membranas íntegras e assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma

coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul.

Dessa forma células viáveis aparecem com coloração branco/transparente enquanto as células mortas ou danificadas apresentam uma coloração azul. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a proporção entre o número de células vivas e mortas nos forneceu uma porcentagem da viabilidade celular (TENNANTH, 1964).

3.4.3 – *Análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)*

O RNA foi extraído pelo método de TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com *DNaseI* (Fermentas, ThermoScientific) e foi realizada a transcrição reversa para obtenção do cDNA, usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems). Foram utilizados primers construídos especificamente para os genes de interesse, e primers para amplificação do gene β -*ACTINA* (*ACTB*) como gene endógeno (**Apêndice B**). A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento ABI 5700 *Sequence Detector System* (Applied Biosystems) e como meio de reação foi utilizado o reagente *SyberGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

3.5 Análises Estatísticas

Foram realizadas análises univariadas por meio do 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*. Assim, alguns dados foram transformados por log10, quando necessário. Para comparação entre os grupos, foram adotados os *General Linear Models* (GLM) no formato ANOVA *two-ways*, permitindo verificar efeitos dos tratamentos, dos períodos de incubação, bem como quaisquer interações entre esses preditores sobre as variáveis dependentes. Assim, foram estabelecidos como preditores, os tratamentos compostos pelos grupos Referência, 100 μ M H₂O₂, C1 (1 nM de MEL), C2 (1 mM de MEL); C1 + 100 μ M H₂O₂; e C2 + 100 μ M H₂O₂ e os dias de coleta de amostras (D0, D2 e D4), enquanto os níveis de transcritos dos genes avaliados foram definidos como variáveis dependentes (QUINN; KEOUGH, 2002).

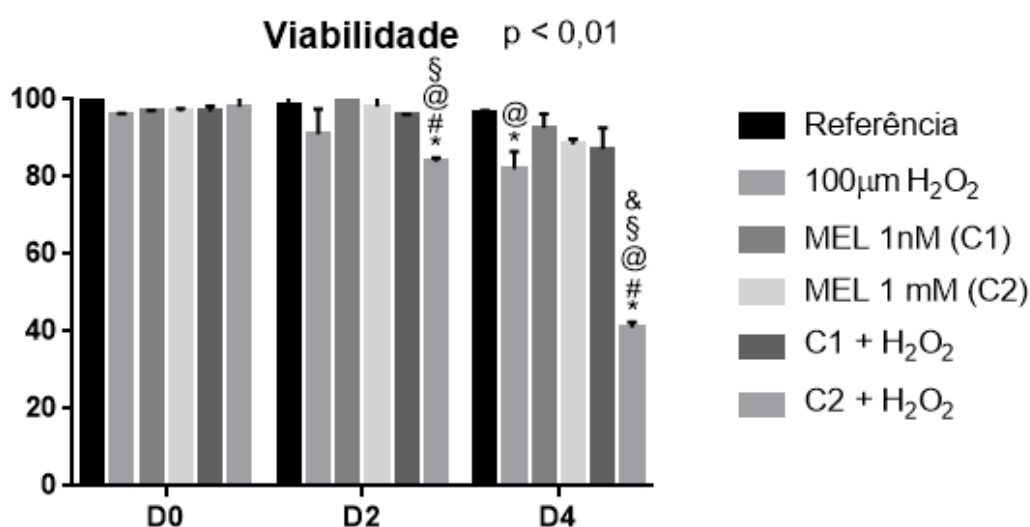
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 – Papel protetor da melatonina sobre a viabilidade celular.

Para analisar o papel protetor da MEL em células K562 em diferentes períodos de incubação, foram empregadas as concentrações fisiológicas (1 nM) e farmacológicas (1 mM) de melatonina (HARDELAND et al., 2011) induzidas ou não por estresse oxidativo decorrente da administração de 100 μ M de H₂O₂, como descrito na metodologia. A viabilidade das células foi diariamente acompanhada e os resultados dos experimentos realizados são apresentados na figura 6.

Figura 6. Viabilidade de células K562 acompanhadas durante 5 dias de cultivo com e sem indução de estresse oxidativo por 100 μ M de H₂O₂



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100 μ M H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM de MEL; C1 + 100 μ M H₂O₂ e C2 + 100 μ M H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; §Efeito da C1 + 100 μ M H₂O₂ comparada ao tratamento C2 + 100 μ M H₂O₂ comparada ao tratamento C2 + 100 μ M H₂O₂ dentro do mesmo período; @Efeito da C2 comparada aos outros tratamentos dentro do mesmo período. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Em relação a viabilidade das células K562, é possível observar que no dia 0, em todas condições a viabilidade se manteve próxima a 100%. Já no dia 2, o tratamento com agente estressor ocasionou diminuição na viabilidade, mesmo na presença da maior concentração de MEL testada (C2 + 100 μ M H₂O₂), a qual (C2), por sua vez, não apresentou efeitos citotóxicos na ausência do H₂O₂. A menor concentração associada ao

agente estressor (C1 + 100 μ M H₂O₂) manteve viabilidade muito similar à referência, sugerindo um efeito citoprotetor. No dia 4, o mesmo padrão de viabilidade celular foi observado entre os tratamentos, porém com uma acentuação na redução da viabilidade celular, a partir do grupo referência, e particularmente nos grupos sob ação do peróxido, mesmo na presença da MEL, sendo a redução mais drástica quando na presença de 1mM. Assim, novamente é observado um possível efeito citoprotetor no tratamento utilizando C1 + 100 μ M H₂O₂, visto que a viabilidade se mantém maior do que a observada para o grupo apenas sob ação do agente estressor.

Inesperadamente, não foi observado nenhum efeito citoprotetor do tratamento com C2 + 100 μ M H₂O₂, ao contrário, no decorrer do experimento, principalmente no último dia, a maior concentração testada do antioxidante associada ao H₂O₂ relacionou-se com valores mais baixos de viabilidade celular. Mas é válido ressaltar, que apenas a maior concentração testada apresentou efeito indesejado, sendo este majoritário na presença do agente estressor, sugerindo efeito combinado de um possível “estresse antioxidante” devido a concentração utilizada somada a presença do agente estressor e/ou indução de vias apoptóticas, ocasionando o decréscimo da viabilidade neste período avaliado.

4.2 – Influência do tratamento com melatonina na regulação de vias de sinalização redox em células eritroides

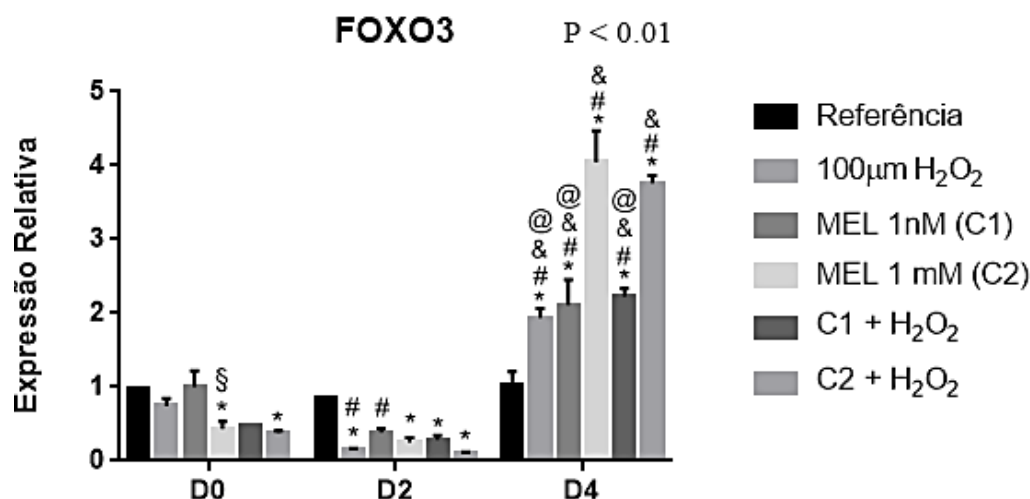
4.2.1 FOXO3 e reguladores de sua localização subcelular

4.2.1.1 FOXO3

Dentre as expressões relativas de *FOXO3*, observamos que, assim como em todos os demais genes analisados, a expressão das referências se mostrou constante e independente do período de incubação (Figura 7). No dia 0, C2 e C2 + H₂O₂ demonstraram-se diferentes de sua referência e, ainda, C2 se mostrou diferente de C1. Um efeito intrigante pode ser observado no D2, onde ocorre uma redução drástica na expressão deste gene quando comparado a sua própria referência, bem como com o outro período de incubação das células diferenciadas (D4). Quando sob indução de estresse oxidativo com H₂O₂, é possível observar um aumento da expressão deste gene no D4, sendo este diferente de sua referência, de sua contraparte no D0, do outro período em células diferenciadas, bem como dos tratamentos utilizando 1 mM (com e sem peróxido); as mesmas diferenças são observadas para os tratamentos com 1 nM (com e sem

peróxido). Ainda, no D4, os tratamentos com 1 mM (C2 e C2 + H₂O₂) apresentam-se elevados em relação aos demais.

Figura 7. Expressão relativa de FOXO3 em células eritroides K562



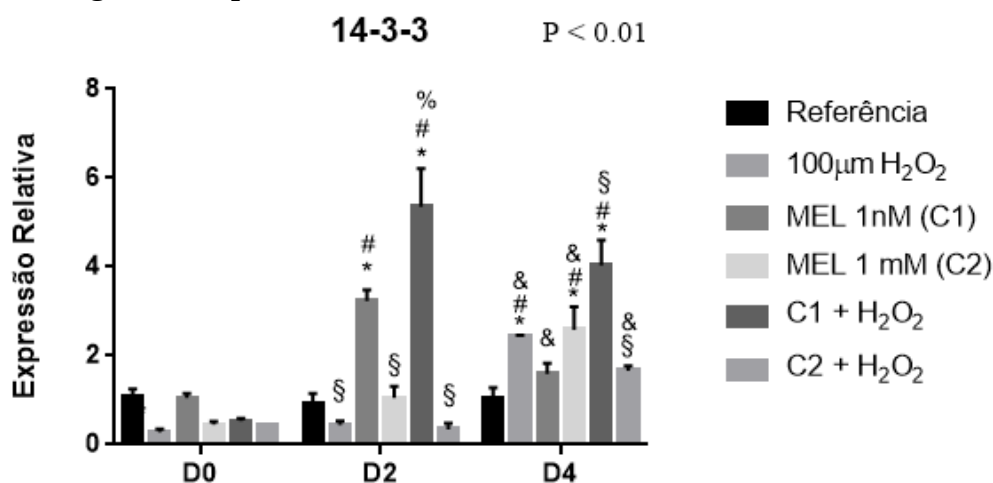
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; @Efeito da C1 comparada ao tratamento C2 dentro do mesmo período; §Efeito da C2 comparada aos outros tratamentos dentro do mesmo período. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

4.2.1.2 Chaperona 14-3-3

Em relação a esta chaperona, até o momento, já se tem descrito que esta é capaz de interagir com mais de 500 proteínas, as quais possuem múltiplas funções em diversos processos celulares, como transdução de sinal, apoptose, regulação do ciclo celular e transcrição (FU; SUBRAMANIAN; MASTERS, 2000; KLEPPE et al., 2011). Sua expressão, em nosso estudo, no D0, apresentou um padrão de inibição, com exceção ao tratamento de 1 nM, o qual mantém níveis de transcritos similares a referência (Figura 8). Já no D2, ocorre um aumento da expressão deste gene nos tratamentos com C1 em relação a referência, ao grupo com indução de estresse (100 µM de H₂O₂), C2 e C2 + H₂O₂. Ainda, nas células no D2 e também no D4 é observado um aumento na expressão deste gene quando sob tratamento C1 + H₂O₂, apresentando-se diferentes de suas respectivas referências e contraparte no D0. Além disso, no D4, C1 + H₂O₂ também se mostrou

diferente do tratamento com MEL na menor concentração (C1) e na maior concentração com o agente estressor (C2 + H₂O₂).

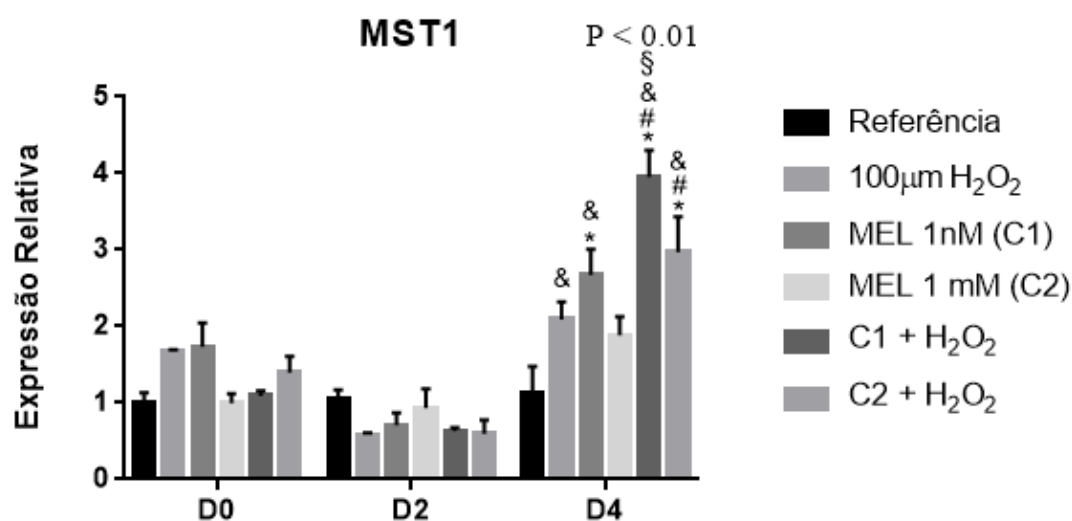
Figura 8. Expressão relativa de 14-3-3 em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período; §Efeito da C1 comparada aos demais tratamentos dentro do mesmo período; Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

4.2.1.3 MST1

Esta importante quinase associada a mecanismos reguladores para muitos eventos biológicos, incluindo crescimento celular, apoptose, resposta ao estresse e senescência (QIN et al., 2013), apresentou, em nosso trabalho, nos dias 0 e 4, um aumento nos níveis de transcritos quando sob tratamento C1, em relação as referências (Figura 9). No D4 esse aumento também pode ser observado quando comparado o tratamento com H₂O₂. Assim, em ambos os casos se tem evidencias importantes sugerindo um efeito deste tratamento na expressão desta quinase. No dia 2, apesar de não significativo, tem-se um padrão de inibição da expressão deste gene, em todos os tratamentos, em relação ao controle. Além disso, no D4, C1 e C2, ambos com peróxido apresentaram os maiores valores de expressão, ambos diferindo da referência e dos mesmos tratamentos no D2. Ainda, entre as células induzidas a diferenciação, houve efeito do período de incubação entre os tratamentos, com exceção de C2, que não diferiu entre o D2 e 4.

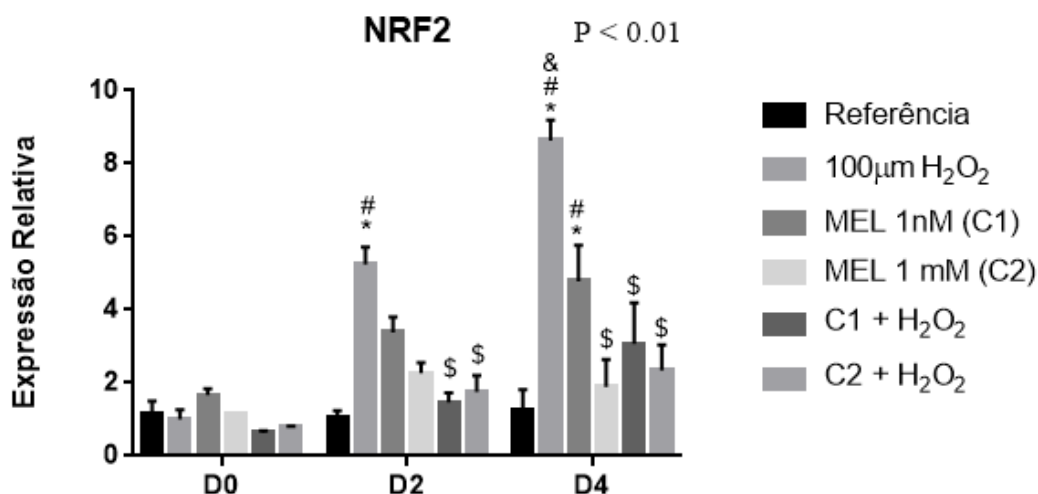
Figura 9. Expressão relativa de *MST1* em células eritroides K562

Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; §Efeito da C1 comparada aos demais tratamentos dentro do mesmo período; Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

4.2.2 Nrf2 e seu sensor molecular

4.2.2.1 NRF2

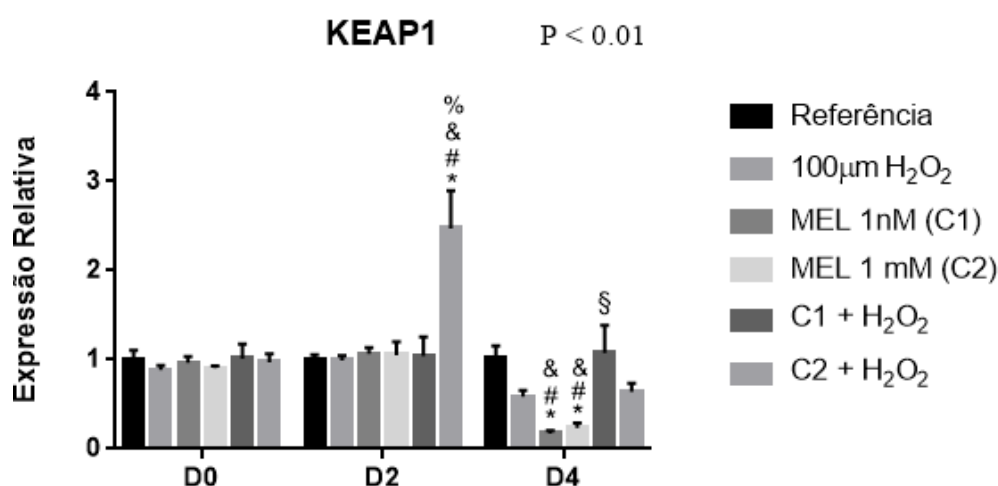
Para este FT podemos observar que no D0 não há diferença na expressão entre referência e tratamento apenas com o agente estressor (Figura 10). Entretanto, nas células induzidas a diferenciação, ocorreram aumentos de 6 e 8 vezes na expressão relativa no tratamento apenas com peróxido de hidrogênio em relação aos grupos de referência, nos dias 2 e 4, respectivamente. Ainda nas células dos dias 2 e 4, podemos observar um possível efeito protetor nos grupos tratados com MEL sob indução de estresse (C1 + H₂O₂ e C2 + H₂O₂), ao compará-los ao grupo 100 µM H₂O₂, também nos períodos D2 e D4, mantendo os níveis de transcritos do Nrf2 semelhantes aos observados nos respectivos grupos de referência. Além disso, dentre os tratamentos utilizando MEL, observa-se que C1 demonstrou os maiores níveis de transcritos em todos períodos analisados. É importante ressaltar, que ao contrário do observado para o *FOXO3*, não se observou efeitos adversos sugestivos dos tratamentos com MEL em qualquer condição testada.

Figura 10. Expressão relativa de *NRF2* em células eritroides K562

Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; \$Efeito protetor da melatonina. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

4.2.2.2 *KEAP1*

No dia 0, a expressão deste importante sensor molecular se mantém estável, independente do tratamento (Figura 11). Nas células do D2, é observado um aumento da expressão no tratamento C2 + H₂O₂, diferindo de todas outras condições no mesmo grupo, de sua contraparte em D0 e do outro período de incubação induzido a diferenciado (D4). Por fim, no D4, observamos uma redução na expressão quando empregada C1 e C2, sendo estes diferentes de sua referência, contraparte no D0, bem como dos mesmos tratamentos no dia 2.

Figura 11. Expressão relativa de *KEAP1* em células eritroides K562

Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período; §Efeito da C1 comparada aos demais tratamentos dentro do mesmo período; Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

4.3 Influência do tratamento com melatonina na expressão gênica de agentes antioxidantes importantes em células eritrocitárias

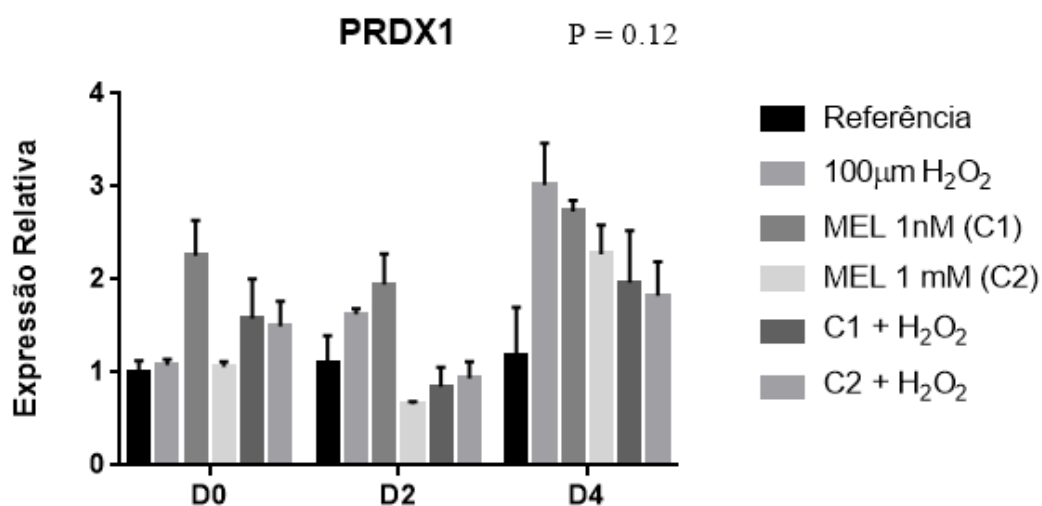
4.3.1 Influência direta e indireta da MEL no combate ao estresse oxidativo

Avaliamos a expressão de alguns genes que codificam enzimas antioxidantes (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX6*, *CAT*, *SOD1* e *GPX1*) modulados pelas vias Nrf2-ARE e FoxO3-MST1, com o intuito de verificar se a MEL influencia a expressão dessas enzimas em células K562. Verificamos que, no geral, a MEL quando em sua menor concentração (1 nM) relacionou-se com a ativação da expressão de genes-chave envolvidos no combate ao estresse oxidativo através da modulação da atividade dos FT analisados. Enquanto que, em sua maior concentração (1 mM), na maioria dos casos, esta indolamina foi capaz de agir diretamente detoxificando ERO, o que é refletido numa menor expressão relativa de genes antioxidantes. Maiores detalhamentos sobre cada um dos antioxidantes analisados será feita a seguir.

4.3.1.1 As peroxirredoxinas

Apesar de não ser observado diferença estatística significativa nos valores de expressão relativa deste gene, no D0, foi possível verificar que a concentração de 1 nM de MEL, com e sem peróxido de hidrogênio, corresponderam as maiores expressões relativas de *PRDX1*, reforçando a noção que nesta concentração, a MEL age de forma indireta, ativando a transcrição de enzimas antioxidantes e que, na maior concentração (C2) esta age diretamente sobre o agente oxidante, como sugere a menor expressão do gene desta enzima (Figura 12). Já nas células induzidas a diferenciação, a maior expressão do gene desta enzima ocorreu no grupo sob indução de estresse (100 μ M H_2O_2), refletindo a necessidade dessa enzima para a manutenção da homeostase redox desta célula. É importante ressaltar que, em células induzidas a diferenciação, novamente, dentre os tratamentos com MEL, a menor concentração (C1) apresentou os maiores níveis de transcritos, enquanto os níveis de transcritos nos demais tratamentos com MEL foram menores do que os grupos tratados apenas com peróxido de hidrogênio, particularmente, aqueles sob indução de estresse (C1 + H_2O_2 e C2 + H_2O_2).

Figura 12. Expressão relativa de *PRDX1* em células eritroides K562

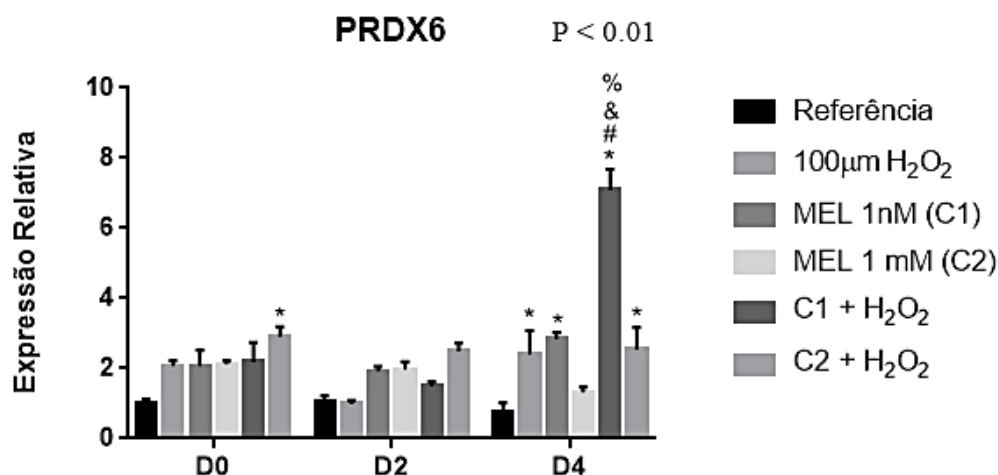


Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100 μ M H_2O_2 : Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H_2O_2 de MEL; C1 + 100 μ M H_2O_2 e C2 + 100 μ M H_2O_2 : conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA. Fonte: próprio autor.

Em relação a *PRDX6*, em células K562 no D0, observou-se um aumento, apesar de não significativo na maioria dos casos em relação a referência, da expressão do RNAm desta enzima (Figura 13). Já em relação as células induzidas a diferenciação, observamos

um aumento expressivo dos níveis de transcritos no D4, sendo maior no tratamento de 1 nM, principalmente associado à indução de estresse, quando comparado a referência.

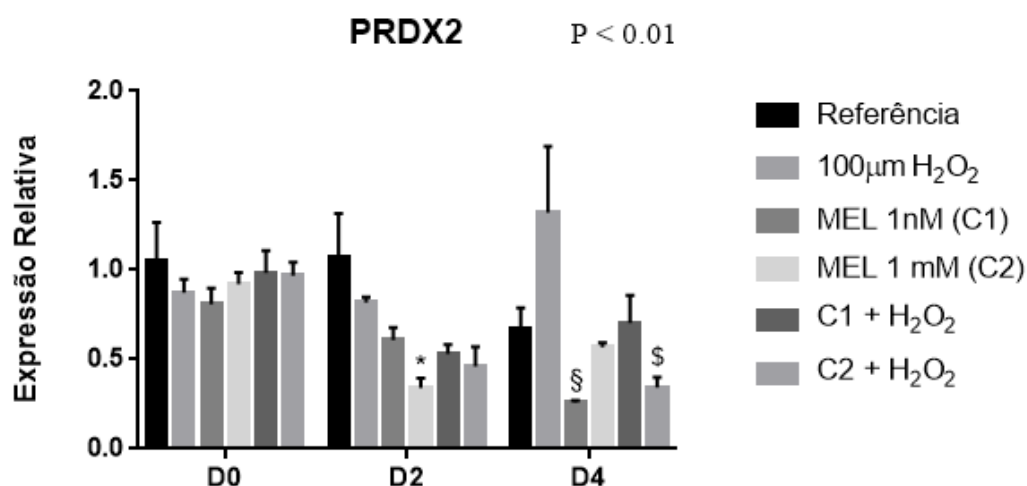
Figura 13. Expressão relativa de *PRDX6* em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período; Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Surpreendentemente, em relação a *PRDX2*, gene que codifica a terceira proteína mais abundante em eritrócitos, responsável por protegê-los de danos ao DNA mediados por ERO durante a eritropoiese (LEE, 2020), não apresentou grande expressão de RNAm (Figura 14). Nas células induzidas a diferenciação, os tratamentos com MEL apresentaram padrão de inibição da expressão de *PRDX2* quando comparados aos grupos de referência e aos grupos tratados com o agente estressor. Apenas o tratamento C1 + H₂O₂, no D4, manteve níveis de transcritos mais semelhantes ao fisiológico do que ao tratamento apenas com o agente estressor, sugerindo assim um possível efeito protetor da MEL. Ainda no D4, o tratamento apenas com agente estressor mostrou-se diferente de C1, bem como C2 + H₂O₂.

Figura 14. Expressão relativa de *PRDX2* em células eritroides K562



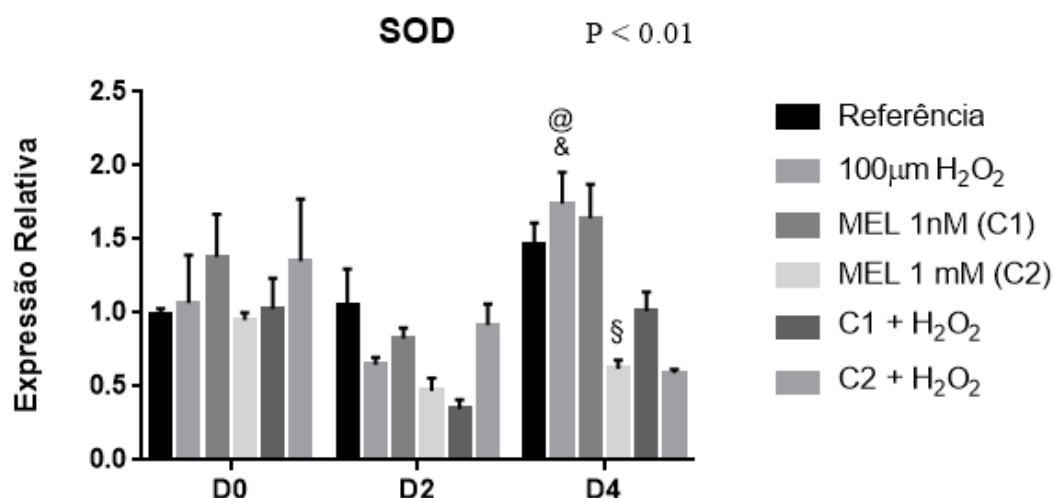
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; §Efeito da melatonina; \$Efeito da C1 comparada ao tratamento com peróxido dentro do mesmo período. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

4.3.1.2 Superóxido Dismutase (*SOD1*), Catalase (*CAT*) e Glutathione Peroxidase (*GPx1*)

Superóxido Dismutase 1

No dia 0, a expressão relativa deste gene se mantém próxima a 1, apresentando um pequeno aumento quando sob tratamento C1 e C2 + H₂O₂ (Figura 15). Em relação as células no D2, observa-se uma pequena redução nos níveis de transcritos em todos os tratamentos utilizados. Já no D4, um leve aumento dos níveis de transcritos ocorre quando sob tratamento apenas com o agente estressor, sendo este diferente do mesmo tratamento no D2 e de C2 com e sem peróxido de hidrogênio. Dentre os tratamentos utilizando MEL, tanto no D0 quanto D4, C1 demonstrou maiores níveis de transcritos em relação a referência.

Figura 15. Expressão relativa de *SOD1* em células eritroides K562

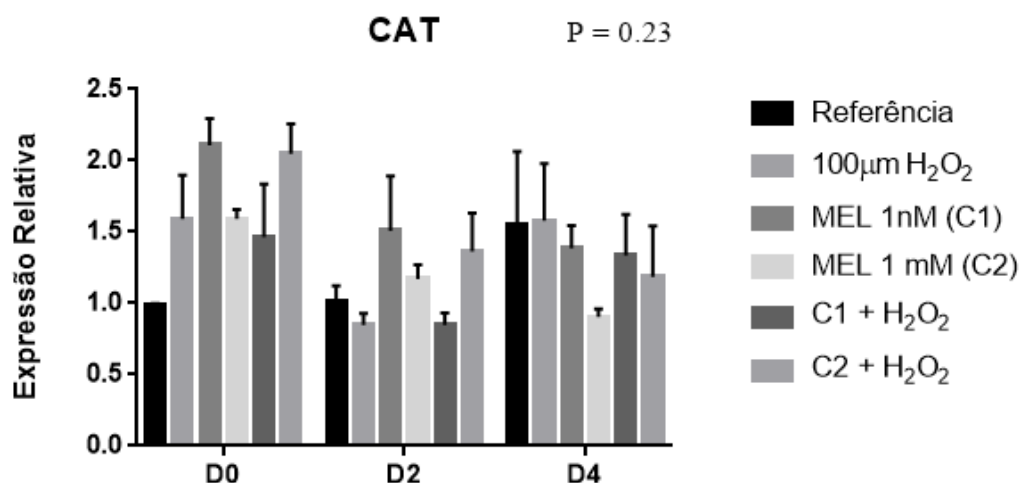


Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. [&]Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; [§]Efeito da C1 comparada aos demais tratamentos dentro do mesmo período; [@]Efeito da C2 comparada aos outros tratamentos dentro do mesmo período. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Catalase

Nas células do D0, podemos observar uma clara indução da expressão do gene desta enzima, apesar de não significativo, quando sob tratamento de peróxido de hidrogênio (Figura 16). Além disso, no D0 e também no D2, observa-se um aumento na expressão quando sob tratamento com 1 nM em relação a referência; enquanto no D4, o padrão de expressão se mantém semelhante em todos tratamentos, com exceção de C2, o qual apresentou um padrão de inibição.

Figura 16. Expressão relativa de CAT em células eritroides K562

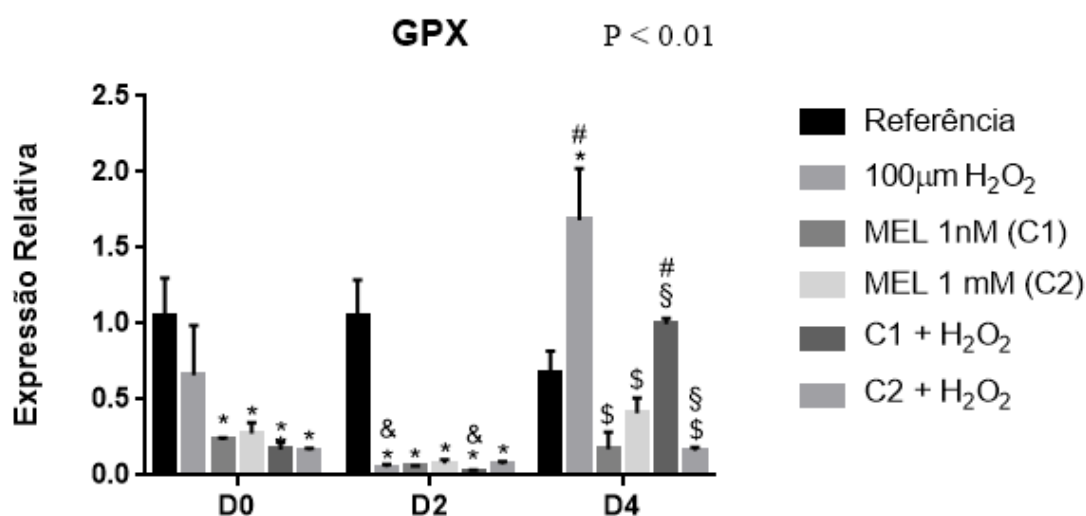


Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA. Fonte: próprio autor.

Glutathione Peroxidase (GPx1)

Esta selenoproteína, no geral, apresentou expressões relativas menores nos tratamentos com MEL do que na referência e na condição apenas com peróxido de hidrogênio (Figura 17). Logo no D0 é possível observar que os tratamentos com MEL se apresentaram menores que a condição apenas com agente estressor. Já no D2, houve uma redução da expressão em todos os tratamentos, com exceção da referência que se manteve em 1; vale ressaltar que esta queda de expressão é similar à de *FOXO3*, sugerindo assim, que esta enzima foi regulada por este FT. Já no D4, observamos um possível papel protetor da melatonina quando no tratamento C1 + H₂O₂, visto que os níveis de transcritos se apresentaram mais semelhantes à referência do que ao grupo induzido ao estresse.

Figura 17. Expressão relativa de GPx1 em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; antes do início (D0), início (D2) e máximo do processo (D4) de diferenciação celular. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento; §Efeito da C1 comparada aos demais tratamentos dentro do mesmo período; \$Efeito da melatonina; Teste realizado: GLM com desenho 2-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O papel da MEL na regulação do sistema de defesa antioxidante e o estudo de seus efeitos protetores contra insultos oxidativos foram identificados em vários estudos *in vivo* e *in vitro* (RODRIGUEZ et al., 2004; TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2007). Neste último caso, em modelos de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 tanto em suspensão de células mononucleares do sangue periférico (EMAMGHOLIPOUR; HOSSEIN-NEZHAD; ANSARI, 2016), quanto de eritrócitos (SILVA et al., 2019), evidenciando que a MEL pode prevenir impactos indesejáveis do EO induzido por H_2O_2 , normalmente tais resultados são associados a proteção contínua exercida pela MEL, por meio de sua cascata antioxidante (GALANO; TAN; REITER, 2013). Por outro lado, na maioria das células cancerosas, *in vitro*, a MEL estimula a produção de ERO endógenas com consequente dano ao DNA e morte celular (FERLAZZO et al., 2020). Mediante o exposto, o presente estudo, até onde sabemos, produziu uma oportunidade única em que, aparentemente, esses efeitos modulatórios da MEL foram constados e associados a importantes vias de adaptação redox, em um modelo de células eritroleucêmicas K562 induzidas ou não ao estresse oxidativo mediado por H_2O_2 .

A MEL elimina diretamente o H_2O_2 e, os metabólitos (N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine – AFMK; N1-acetyl-5-methoxykynuramine - AMK) desta reação possuem forte capacidade de eliminação de radicais livres, inclusive, este último metabólito, em solução aquosa, reage mais rápido do que a MEL com todos os radicais livres (GALANO; TAN; REITER, 2013). Esta interação da MEL com H_2O_2 parece exibir duas fases distintas: na fase de reação rápida, a ação da MEL sobre H_2O_2 ($2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) forma AFMK, enquanto na fase lenta, ocorre um efeito sinérgico da MEL e AFMK na eliminação do H_2O_2 . Assim, estima-se que cerca de 2–5% da MEL participa da fase de reação rápida, quando esta ocorre na proporção molecular de 1:1 (TAN et al., 2000). Portanto, é plausível hipotetizar que ambas as concentrações de MEL testadas tenham exercido ação direta de detoxificação sobre o agente estressor.

Em nosso estudo, a MEL apresentou efeito citoprotetor relevante sobre células induzidas a diferenciação submetidas a indução de estresse, em ambas as concentrações testadas, por meio da regulação da via de sinalização redox NRF2-ARE. Esse efeito foi demonstrado pela manutenção dos níveis de transcritos deste importante FT semelhantes aos respectivos grupos de referência (níveis fisiológicos), mesmo sob indução de estresse com peróxido, quando comparado aos grupos sob a ação apenas do agente estressor

(H₂O₂), sugerindo a atuação direta da MEL e de seus metabólitos na detoxificação deste e de outras ERO formadas no modelo experimental estudado que culminou na manutenção de níveis semelhantes aos fisiológicos de transcritos de alguns dos antioxidantes avaliados.

O FT Nrf2 é uma proteína chave responsável pela indução da expressão de enzimas antioxidantes e por consequência, pela manutenção da homeostase redox celular. Assim, alternativas terapêuticas que possibilitem sua regulação são de extrema valia, visto que este FT pode modular níveis de expressão de centenas de genes envolvidos no combate ao EO e aos estados fisiopatológicos relacionados (DING et al., 2014; ITOH et al., 1999; VENUGOPAL; JAISWAL, 1996). Um dos agentes com potencial terapêutico que apresenta destaque é a melatonina. Centenas de estudos vêm sendo desenvolvidos, *in vitro* e *in vivo*, buscando investigar a atuação desse composto na redução do estresse oxidativo, aumentando as expressões de genes de enzimas antioxidantes nos mais variados modelos experimentais (REITER et al., 2016).

Os efeitos antioxidantes indiretos da MEL sobre essa via redox se relacionaram com um padrão de indução da expressão de *NRF2* quando na concentração de 1 nM, possivelmente ocasionando um aumento no nível proteico, permitindo sua atuação na indução da transcrição de outros genes. Além disso, já é descrito na literatura que a MEL pode atuar como uma inibidora de proteassomo (VRIEND; REITER, 2015), permitindo assim a manutenção de maiores níveis desse FT agindo no núcleo, o que poderia auxiliar em um consequente aumento da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes regulados por ele. Tal padrão de indução de genes antioxidantes pôde ser observado, por exemplo, nas células sob tratamento C1 no dia 0, para *CAT*, *SOD*, *PRDX1* e 6. Em relação ao dia 2, o mesmo padrão foi observado para *CAT*, *PRDX1* e 6. Já no D4, este padrão foi observado para *SOD*, *PRDX6* e *PRDX1*, sugerindo, inclusive, um efeito protetor da MEL em relação a esta última peroxirredoxina, uma vez que os tratamentos utilizando MEL ocasionaram uma expressão semelhante aos níveis fisiológicos quando em comparação ao tratamento com peróxido, sem evento citotóxico significativo. Deste modo, nossos dados corroboram que a MEL e possivelmente seus metabólitos apresentam uma variedade de vantagens fisiológicas e metabólicas que podem aumentar sua capacidade de limitar o estresse oxidativo, de forma período e dose-dependentes no modelo estudado.

Os dados disponíveis na literatura científica estabelecem uma relação clara entre o efeito protetor da MEL e uma ação sistêmica nos organismos. Sua ação foi verificada tanto a nível transcricional quanto a níveis proteicos e enzimáticos em estudos com a

indução de estresse oxidativo utilizando diversos tipos de estressores, tipos celulares e tecidos. A título de exemplo, podemos citar o estudo de Zhi e colaboradores (2020), no qual houve efeitos benéficos de sua administração (1 mM) na lesão de cardiomiócitos H9c2 demonstrado através do aumento das atividades da SOD, CAT e GPx, via Nrf2, além de um efeito anti-apoptótico, dependente da sinalização PGC - 1α /TNF- α (ZHI et al., 2020). Esta ação benéfica da administração da MEL pode ser visualizada também após lesão cerebral traumática (LCT) em camundongos, já tendo sido descrito que esta indolamina melhora a lesão cerebral secundária induzida por estresse oxidativo após LCT por meio da promoção da translocação de Nrf2 do citoplasma para o núcleo e do aumento da ligação de Nrf2-ARE (DING et al., 2014). Interessantemente, efeitos citoprotetores já foram observados de forma independente dos receptores clássicos de membrana celular da MEL (JANJETOVIC et al., 2017), o que corrobora a ação desse composto a nível sistêmico devido a sua alta anfifilicidade, apresentando uma vantagem intrínseca de sua utilização em patologias geradas ou exacerbadas pelo estresse oxidativo e consequente comprometimento de inúmeros órgãos (PALA; GÜRKAN, 2008).

Em relação ao gene *FOXO3*, por outro lado, não se constatou o mesmo padrão sugestivo do efeito protetor do tratamento com MEL sobre o metabolismo redox. A manutenção da expressão desse gene na referência ao longo dos períodos avaliados pode estar associada ao papel desse FT na proliferação e diferenciação celular em linhagem hematopoiética (MENON; GHAFARI, 2018), evidenciado pela alta viabilidade em todos os períodos. No entanto, a adição da MEL, especialmente na maior concentração associada a indução de estresse (C2 + H₂O₂) resultou em um aumento da expressão de *FOXO3*, cuja via de sinalização possivelmente está relacionada à indução de vias apoptóticas (CARBAJO-PESCADOR et al., 2013). Esta possível ativação de vias apoptóticas (dia 4) em detrimento de vias de defesa antioxidante, pode estar relacionada às características próprias deste modelo biológico, bem como em decorrência de um possível estresse antioxidante desencadeado pela alta capacidade redutora da MEL e de seus metabólitos (AMFK e AMK), apesar de ainda não existirem evidências claras desse mecanismo *in vivo*.

Neste contexto, podemos propor que a MEL em sua maior concentração associada a indução de estresse oxidativo interfere na via de sinalização FoxO3 e provavelmente sua participação pode ter influenciado na indução de apoptose principalmente no último dia e/ou no processo de proliferação celular regulado por FoxO3. Carbaajo-Pescador e colaboradores (2013) observaram que o tratamento com melatonina (1 mM) aumentou a

atividade de FoxO3 com valores que representaram aproximadamente 150% do controle após 48 h e ocasionou indução da apoptose em células HepG2. Este efeito pró-apoptótico foi demonstrado pela redução da fosforilação de FoxO3 em Thr32 e Ser253, e indução de sua localização nuclear aumentada através da ação da MEL, permitindo que este FT atuasse aumentando a expressão da proteína Bim, ocasionando apoptose dessas células de origem cancerígena (CARBAJO-PESCADOR et al., 2013).

Assim, apesar da linhagem K562 ser amplamente utilizada como modelo biológico para o estudo de células com características eritróides, esta ainda se trata de uma linhagem tumoral e, dessa forma, devido a ação antitumoral da MEL, é possível que apesar do processo da diferenciação celular das células K562, tenha ocorrido a ativação dessa via apoptótica como um mecanismo adaptativo celular interessante, permitindo a sobrevivência de parte da cultura de forma compensatória. Ou seja, as células que estavam terminalmente comprometidas, possivelmente pelo efeito do estresse antioxidante gerado pela concentração de MEL utilizada somada a indução de dano oxidativo por H₂O₂, foram direcionadas a morte celular (apoptose) como uma forma de proteger o microambiente para as células que ainda estavam viáveis (COSTAS, 2006).

Por fim, é desafiador entender de forma clara o efeito da MEL pois esta não atua sozinha, elevando a complexidade da própria molécula bem como do estudo, refletida por certos padrões intrigantes dos resultados apresentados neste trabalho cujos efeitos observados provavelmente não ocorram *in vivo*. Dessa forma, trabalhos adicionais que contemplem a investigação dessas importantes vias de adaptação redox associadas às vias apoptóticas, com diferentes concentrações de melatonina, bem como de seus metabólitos, e em diferentes modelos experimentais, ainda se fazem necessários para compreensão e estabelecimento dos mecanismos de ação da melatonina sobre tais vias e quais características foram resultantes do próprio modelo experimental estudado.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os efeitos da administração de MEL em células eritroleucêmicas apresentaram um padrão período e dose-dependentes contra o estresse oxidativo induzidos com H_2O_2 , com ação direta sobre a detoxificação do agente estressor e indireta, visto que a via FoxO3 apresentou papel sugestivo de indução de vias apoptóticas, enquanto o fator de transcrição predominantemente responsável pela manutenção da homeostase redox nas células K562 foi o Nrf2. Dessa forma, o presente trabalho reforça a importância dessa indolamina na regulação da homeostase celular, sendo uma alternativa terapêutica promissora para doenças que apresentam um dano oxidativo exacerbado, devido ao seu potente efeito redutor.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BOCCITTO, M.; KALB, R. G. Regulation of Foxo-dependent transcription by post-translational modifications. **Current drug targets**, v. 12, n. 9, p. 1303–1310, 2011.
- BRUNET, A. et al. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. **Cell**, v. 96, p. 857–868, 1999.
- CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27 p. 2276–2288, 2008.
- CAÑEDO, A. D. Indução da síntese de hemoglobina em células K562 por doxorrubicina e aclarrubicina: em busca de um mecanismo em comum. **Tese de Doutorado**, p. 1–123, 2005.
- CARBAJO-PESCADOR, S. et al. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. **British Journal of Cancer**, v. 108, p. 442–449, 2013.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants , prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology journal**, v. 51, p. 15–25, 2013.
- COSTAS, M. A. Vida y muerte de la célula: las señales intracelulares. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 66, p. 281–284, 2006.
- DENG, Y. et al. Melatonin Antagonizes Mn-Induced Oxidative Injury Through the Activation of Keap1 – Nrf2 – ARE Signaling Pathway in the Striatum of Mice. **Neurotox Res**, v. 27, n. 2, p. 156–71, 2014.
- DING, D. et al. Antioxidative stress-induced damage in cochlear explants. **Journal of Otology**, v. 15, n. 1, p. 36–40, 2020.
- DING, K. et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury : the Nrf2 – ARE signaling pathway as a potential mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 1–11, 2014.
- DUARTE, T. L.; LUNEC, J. When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v. 39, n. 7, p. 671–686, 2005.
- DÜNDAR, Y.; ASLAN, R. Antioxidative Stress. **Eastern Journal of Medicine**, v. 5, n. 2, p. 45–47, 2000.
- EMAMGHOLIPOUR, S.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; ANSARI, M. Can Melatonin Act as an Antioxidant in Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Model in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells ? **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- FERLAZZO, N. et al. Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century? **Antioxidants**, v. 9, p. 1–29, 2020.
- FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6 : A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A 2 Activities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 831–44, 2011.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 40, p. 617–47, 2000.

GALANO, A.; REITER, R. J. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. **Journal of Pineal Research**, v. 65, n. 1, p. 1–33, 2018.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1–16, 2011.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 245–257, 2013.

GILAD, E.; ZISAPEL, N. High-affinity binding of melatonin to hemoglobin. **Biochem Mol Med**, v. 56, n. 2, p. 115–20, 1995.

GOU, Z. et al. Melatonin improves hypoxic-ischemic brain damage through the Akt / Nrf2 / Gpx4 signaling pathway. **Brain Research Bulletin**, v. 163, p. 40–48, 2020.

GREER, E. L.; BRUNET, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7410–7425, 2005.

GUO, Q. et al. The plasticity and potential of leukemia cell lines to differentiate into dendritic cells (Review). **ONCOLOGY LETTERS**, v. 4, n. 4, p. 595–600, 2012.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, p. 1147–1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. THE DEFINITION AND MEASUREMENT OF ANTIOXIDANTS IN BIOLOGICAL SYSTEMS. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 1, p. 125–126, 1995.

HARDELAND, R. et al. Melatonin — A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 350–384, 2011.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. **Nutrition and Metabolism**, v. 2, p. 1–15, 2005.

HIETAKANGAS, V. et al. Erythroid Differentiation Sensitizes K562 Leukemia Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Downregulation of c-FLIP. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1278–1291, 2003.

ISODA, H. et al. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, p. 269–277, 2014.

ITOH, K. et al. Regulatory Mechanisms of Cellular Response to Oxidative Stress. **Free Radical Research**, v. 31, p. 319–324, 1999.

- IYAMU, E. W. et al. Trimidox-mediated morphological changes during erythroid differentiation is associated with the stimulation of hemoglobin and F-cell production in human K562 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 3, p. 759–764, 1998.
- JANG, H. et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 3, p. 336–347, 2016.
- JANJETOVIC, Z. et al. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage : Involvement of NRF2-mediated pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1274, p. 1–13, 2017.
- JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 10, p. 1865–1879, 2006.
- JUNG, K. H. et al. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 2, p. 173–183, 2009.
- KILIC, U. et al. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2 / HO-1 pathway. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, p. 1–8, 2013.
- KLEPPE, R. et al. The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 7, p. 713–719, 2011.
- KLOTZ, L. et al. Redox regulation of FoxO transcription factors. **Redox Biology**, v. 6, p. 51–72, 2015.
- KOEFFLER, H.; GOLDE, D. W. Human Myeloid leukemia cell lines: a review. **Blood**, v. 56, n. 3, p. 344–350, 1980.
- KROKOSZ, A. et al. Can melatonin delay oxidative damage of human erythrocytes during prolonged incubation ? **Advances in Medical Sciences**, v. 58, n. 1, p. 134–142, 2013.
- LEE, Y. J. Knockout Mouse Models for Peroxiredoxins. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 1–19, 2020.
- LIM, J. H. et al. Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K / Akt signaling : Novel cytoprotective mechanism against oxidative damage. **Pharmacological Research**, v. 57, p. 325–331, 2008.
- LOZZIO, B. B. et al. A Multipotential Leukemia Cell Line (K-562) of Human Origin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 166, n. 4, p. 546–550, 1981.
- LOZZIO, B. B.; LOZZIO, C. B. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. **Leukemia Research**, v. 3, n. 6, p. 363–370, 1979.
- MENON, V.; GHAFARI, S. Transcription factors FOXO in the regulation of homeostatic hematopoiesis. **Current Opinion in Hematology**, v. 25, n. 1, p. 1–9, 2018.

- MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Front Physiol.**, v. 5, n. February, p. 1–6, 2014.
- NAGABABU, E. et al. Heme Degradation and Oxidative Stress in Murine Models for Hemoglobinopathies: Thalassemia, Sickle Cell Disease and Hemoglobin C Disease. **Blood Cells Mol Dis**, v. 41, n. 1, p. 60–66, 2008.
- PALA, F. S.; GÜRKAN, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. **Advances in Molecular Biology**, v. 1, p. 1–9, 2008.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 2–12, 2010.
- PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813–2838, 2006.
- PAULA, C. P. DE. Efeito Da Melatonina Na Proteção Contra Estresse Oxidativo Em Células Eritrocitárias K562. **Tese**, p. 1–116, 2020.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.
- POLJSAK, B.; MILISAV, I. The Neglected Significance of “Antioxidative Stress”. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- QIN, F. et al. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases. **Cell & Bioscience**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.
- QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. New Yor: Cambridge University Press, 2002. v. 4
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.
- REITER, R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **News Physiol Sci**, v. 15, p. 246–250, 2000.
- REITER, R. J. et al. Melatonin as an Antioxidant: Under Promises but Over Delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–78, 2016.
- REITER, R. J. et al. Melatonin Mitigates Mitochondrial Meltdown : Interactions with SIRT3. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1–28, 2018.
- REVISTA VEJA. Epígrafe - Entrevista com Madre Teresa de Calcutá. Edição 568, p. 4, 25.07.1979.
- RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Front Physiol.**, v. 5, n. January, p. 1–7, 2015.

- ROBLEDINOS-ANTÓN, N. et al. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004.
- ROWLEY, P. T. et al. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. **Experimental hematology**, v. 9, n. 1, p. 32–37, 1981.
- SANTOFIMIA-CASTAÑO, P. et al. Melatonin induces the expression of Nrf2-regulated antioxidant enzymes via PKC and Ca²⁺ influx activation in mouse pancreatic acinar cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 226–236, 2015.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453–462, 2014.
- SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 SUPPL. 3, p. 31–38, 1991.
- SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.
- SILVA, D. et al. Prolonged erythrocyte auto-incubation as an alternative model for oxidant generation system. **Toxicology in Vitro**, v. 56, p. 62–74, 2019.
- SOCACIU, A. I. et al. Melatonin, an ubiquitous metabolic regulator: functions, mechanisms and effects on circadian disruption and degenerative diseases. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 21, n. 4, p. 465–78, 2020.
- TAN, D.-X. et al. Melatonin Directly Scavenges Hydrogen Peroxide: A Potentially New Metabolic Pathway Of Melatonin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1177–1185, 2000.
- TENNANTH, J. Evaluation Of The Trypan Blue Technique For Determination Of Cell Viability. **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 685–694, 1964.
- TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. Melatonin as Antioxidant Under Pathological Processes. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 63–82, 2007.
- TSIFTSOGLU, A. S.; PAPPAS, I. S.; VIZIRIANAKIS, I. S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 100, n. 3, p. 257–290, 2003.
- TZIVION, G.; DOBSON, M.; RAMAKRISHNAN, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 11, p. 1938–1945, 2011.
- UMBREIT, J. Methemoglobin — It 's Not Just Blue: A Concise Review. **American Journal of Hematology**, v. 82, n. 2, p. 134–144, 2007.
- VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37–56, 2004.

VENUGOPAL, R.; JAISWAL, A. K. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 25, p. 14960–14965, 1996.

VILLEVAL, J. et al. Erythroid Properties of K562 cells: Effect of Hemin, Butyrate and TPA Induction. **Exp Cell Res**, v. 146, p. 428–435, 1983.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biology**, v. 6, p. 226–239, 2015.

VRIEND, J.; REITER, R. J. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 401, p. 213–20, 2015.

WANG, X.; HU, S.; LIU, L. E. I. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically? (Review). **Oncology Letters**, v. 13, p. 2867–2872, 2017.

YU, H. et al. Melatonin alleviates aluminium chloride-induced immunotoxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis associated with the activation of Nrf2 signaling pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, n. 600, p. 131–141, 2019.

ZHANG, C. et al. Induction of apoptosis and erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia K562 cells by low concentrations of lidamycin. **Oncology Reports**, v. 41, n. 1, p. 475–482, 2019.

ZHANG, X. et al. DJ - 1 regulating PI3K - Nrf2 signaling plays a significant role in bibenzyl compound 20C - mediated neuroprotection against rotenone-induced oxidative insult. **Toxicology Letters**, v. 271, p. 74–83, 2017.

ZHI, W. et al. Melatonin elicits protective effects on OGD/R - insulted H9c2 cells by activating PGC - 1 α /Nrf2 signaling. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 45, p. 1294–1304, 2020.

ZHUANG, C. et al. Ginsenoside Rb1 improves postoperative fatigue syndrome by reducing skeletal muscle oxidative stress through activation of the PI3K / Akt / Nrf2 pathway in aged rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 480–487, 2014.

ZWIETEN, R. VAN; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the anti-oxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 377–86, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A

- Detalhes da cultura celular

Preparação de meio RPMI

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

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

Descongelamento das células K562

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

Em seguida o tubo criopreservante contendo as células a serem descongeladas foi colocado por 5 minutos no gelo. Então o conteúdo do tubo foi despejado dentro de um

frasco de cultura de 50 ml com o meio utilizando uma pipeta. O descongelamento das células é geralmente realizado de forma rápida, de forma a minimizar os danos às células. Apesar de todo o cuidado durante o congelamento e descongelamento esses processos são danosos para as células e, portanto, ao descongelar as células, devem ser colocadas em meio de cultivo com uma concentração de 20% de SBF por um dia, a fim de promover um meio ambiente rico para a recuperação ao estresse causado. Este composto contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular.

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

As células foram centrifugadas com rotor swing por 5 minutos, a uma rotação de 600 g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuscitado em aproximadamente 10 ml de meio RPMI fresco suplementado com 10% de SBF. Após ressuscitar as células o conteúdo foi colocado novamente no frasco de cultivo e deixado em estufa úmida a 37% com atmosfera de 5% de CO₂. De 2 em 2 dias aproximadamente as células foram observadas quanto a sua confluência, número, morfologia e possíveis contaminações, adicionando-se meio fresco suplementado com 10% de SBF quando julgar necessário (em casos de mudança de pH).

Congelamento de células K562

Aproximadamente 1 semana após cultivo, congelamos uma parte das células. Primeiramente, foi preparada a solução criopreservante (DMSO 10% e SBF 90%). O conteúdo do cultivo celular foi colocado em um tubo cônico de 15 mL e centrifugado com rotor swing por 5 minutos, a uma rotação de 600 g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuscitado com o volume desejado de solução criopreservante para um número de células de 2×10^6 células/ml. A solução foi adicionada gelada de 1 em 1 ml e homogeneizado com cuidado. Após ressuscitado, o conteúdo foi aliquoteado em tubos criopreservantes com um volume de aproximadamente 1ml contendo 2×10^6 células/ml. Os tubos foram armazenados em freezer -80 por 12-24 horas e transferidos para o nitrogênio líquido.

Apêndice B

Padronização dos primers de qPCR

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

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

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

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

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>BAC</i>	5'-CAAGCAGGAGTATGACGAGTC-3'	5'-GCCATGCCAATCTCATCTTG-3'
<i>PRDX1</i>	5'-TGTAATGACCTCCCTGTTGG-3'	5'-TATCACTGCCAGGTTTCCAG-3'
<i>PRDX2</i>	5'-CTGTTAATGATTTGCCTGTGGG-3'	5'-TGGGCTTAATCGTGTCAGT-3'
<i>PRDX6</i>	5'-CACGACTTTCTGGGAGACT-3'	5'-GGGCAATCAACTTAACATTCCTC-3'
<i>CAT</i>	5'-TGAATGAGGAACAGAGGAAACG-3'	5'-GTACTTGTCCAGAAGAGCCTG-3'
<i>SOD1</i>	5'-GGGCAAAGGTGGAAATGAAG-3'	5'-CAGCTAGCAGGATAACAGATGAG-3'
<i>GPX1</i>	5'-TTCCAGACCATTGACATCGAG-3'	5'-CACCTCATAGATGAAAACCCC-3'
<i>FOXO3</i>	5'-TTGGTTTGAACGTGGGGAAC-3'	5'-AGTTTGAGGGTCTGCTTTGC-3'
<i>MST1</i>	5'-CCTCCCACATTCCGAAAACCA-3'	5'-GCACTCCTGACAAATGGGTG-3'
<i>YWHAQ (14-3-3)</i>	5'-TGCTTCCTTTGCTTGCATCC-3'	5'-GGCAGACAATGACAGACCATTC-3'
<i>NRF2</i>	5'-GCTACGTGATGAAGATGGAAAAC-3'	5'-AGCTCAGAAAAGGTCAAATCCTC-3'
<i>KEAP1</i>	5'-AACAGAGACGTGGACTTTTCG-3'	5'-GTGTCTGTATCTGGGTCGTAAC-3'

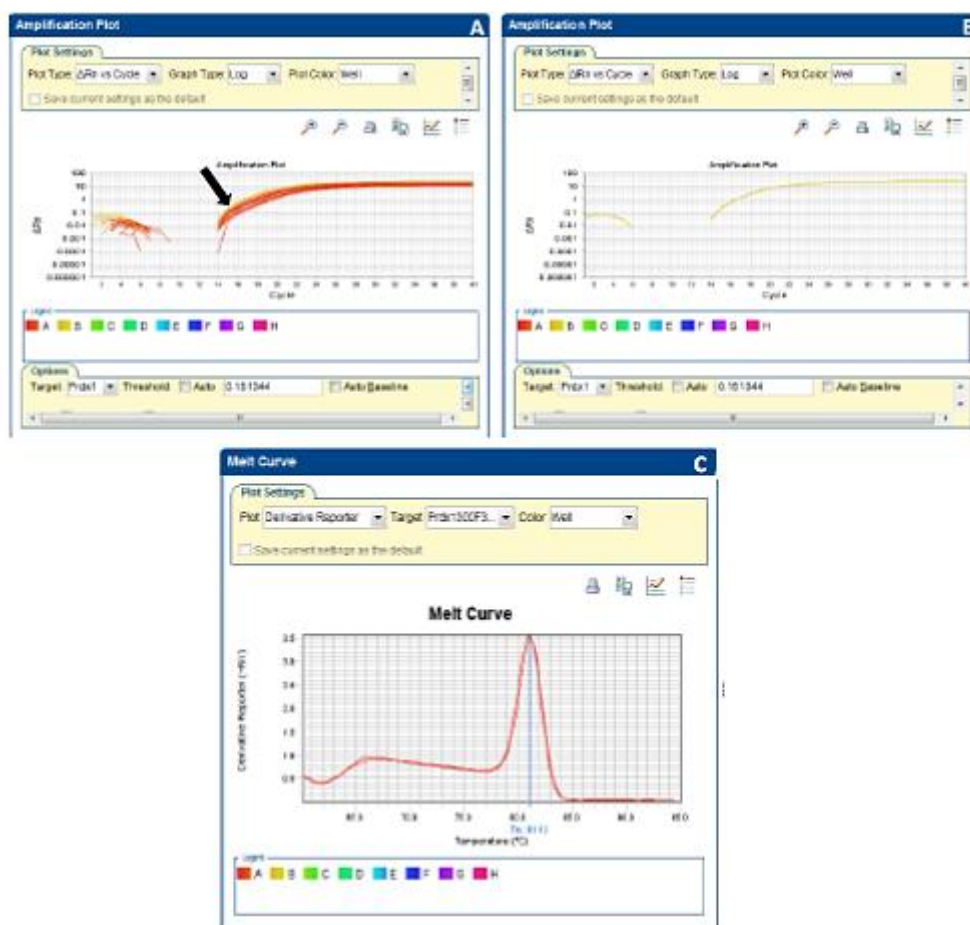
Fonte: próprio autor.

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

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

Na Figura B1, está exemplificada a curva de amplificação da padronização do *primer* da PRDX1, a qual apresentou sua melhor amplificação nas concentrações 300F/300R nM. Na Figura B1 A podemos observar todas as curvas de amplificação, na parte (Figura B1 B) observamos a curva da concentração escolhida (Seta preta) e na parte (Figura B1 C) observamos a curva de *melting* da concentração escolhida, a qual apresentou a maior fluorescência, menor formação de dímeros.

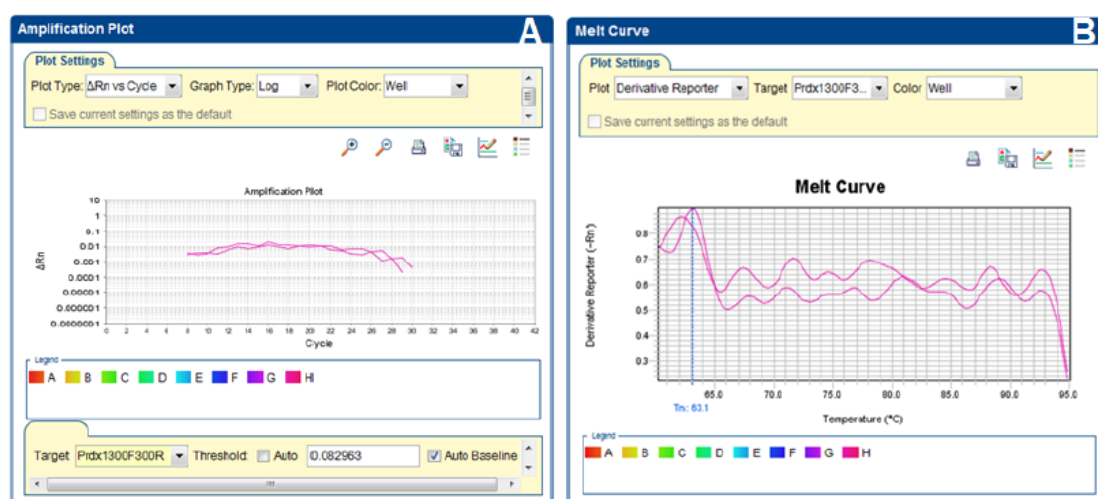
Figura B1 – Padronização dos primers PRDX1



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

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

Figura B2 - NTCs (no-template controls) *PRDX1*



A) A ausência de amplificação no controle negativo indica que não há contaminação do *primer*. **B)** A Curva de *melting* confirmando a ausência de contaminantes. Fonte: próprio autor.

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

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

Figura B3 – Teste de eficiência da reação para análise do gene *PRDX1*



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

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

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

<i>Primer</i>	<i>Concentração (F/R) nM</i>	<i>Threshold</i>	<i>Eficiência (%)</i>
<i>BAC</i>	300/150	0,098701	101,31
<i>SOD1</i>	150/150	0,058913	96,57
<i>GPX1</i>	300/150	0,070705	96,50
<i>CAT</i>	150/300	0,122229	101,92
<i>PRDX1</i>	300/300	0,060659	95,43
<i>PRDX2</i>	300/300	0,096587	95,19
<i>PRDX6</i>	100/100	0,107838	98,96
<i>NRF2</i>	150/150	0,058913	96,08
<i>KEAP1</i>	300/300	0,101843	98,69
<i>FOXO3</i>	300/150	0,101487	95,69
<i>YWHAQ (14-3-3)</i>	150/300	0,101237	100,55
<i>MST1</i>	100/150	0,084251	101,76

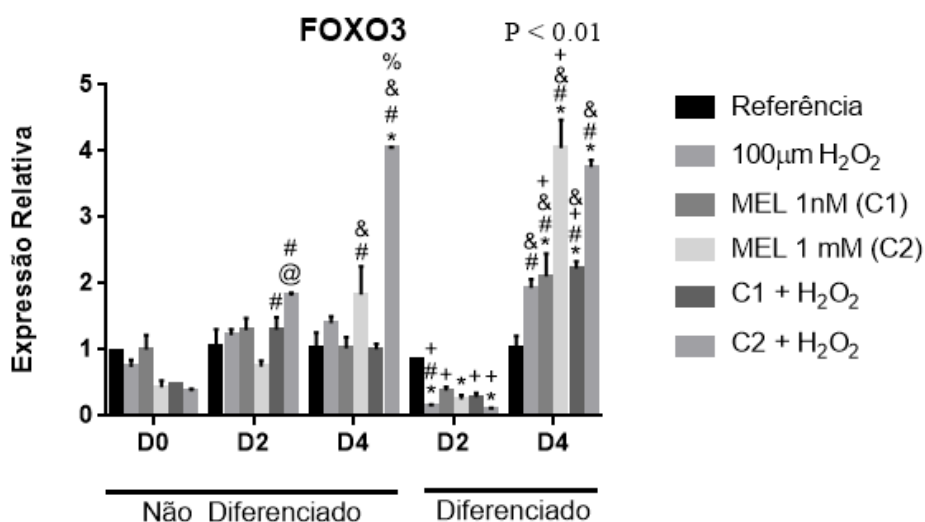
Fonte: próprio autor.

Apêndice C

Detalhes do PCR em tempo real de todos os genes analisados para células K562 induzidas ou não a diferenciação eritroide

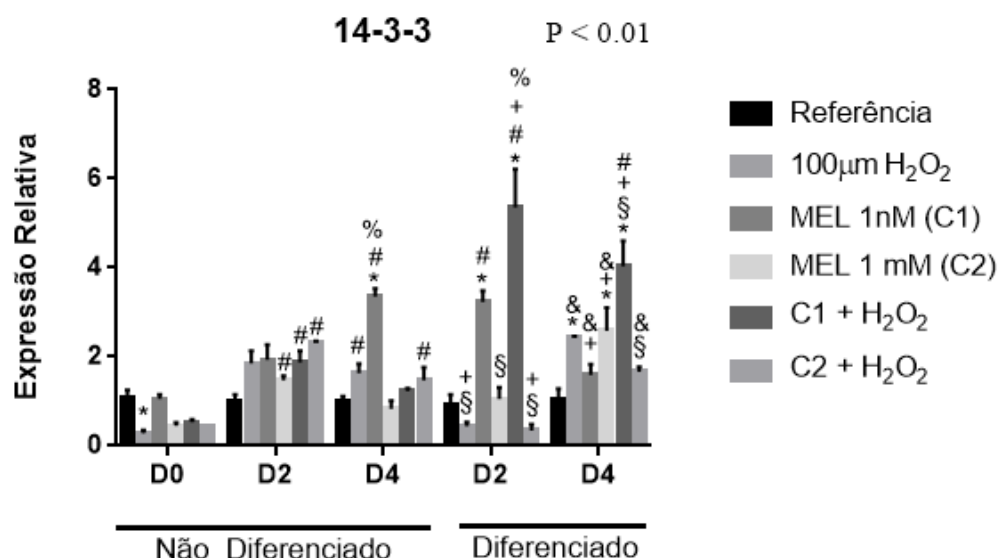
Avaliação da expressão de RNAm que codificam importantes enzimas antioxidantes moduladas pelas vias PI3K/AKT/FoxO3 e Nrf2-ARE frente ao tratamento com melatonina a fim de verificar se esta é capaz de modular a expressão dessas enzimas em células K562, induzidas ou não a diferenciação eritroide e estresse oxidativo por H_2O_2 . Foi analisado então a expressão de RNAm através de PCR em tempo real de *FOXO3* (Figura C1), *14-3-3* (Figura C2), *MST1* (Figura C3), *NRF2* (Figura C4), *KEAP1* (Figura C5), *PRDX1* (Figura C6), *PRDX2* (Figura C7), *PRDX6* (Figura C8), *SOD1* (Figura C9), *CAT* (Figura C10) e *GPX1* (Figura C11).

Figura C1. Expressão relativa de *FOXO3* entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



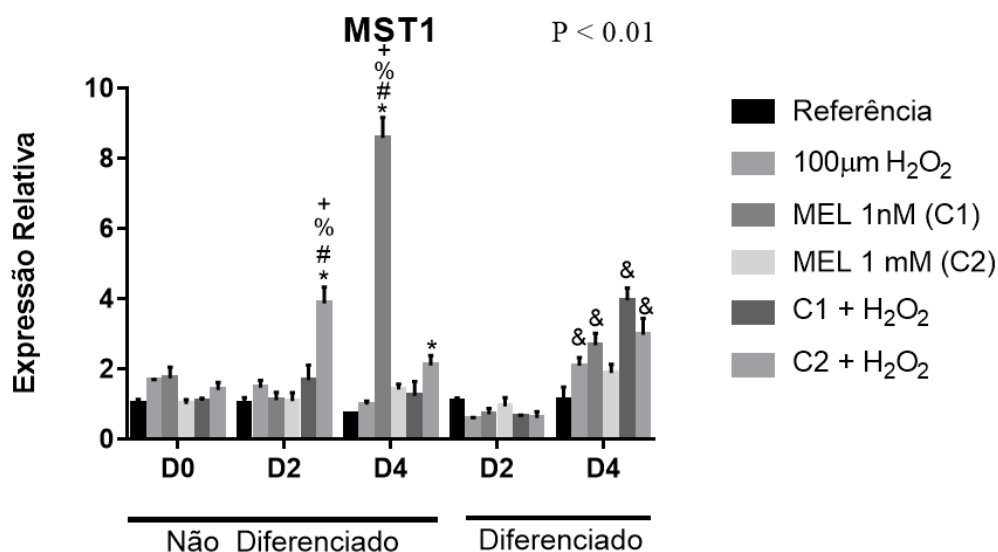
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H_2O_2 : Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H_2O_2 de MEL; C1 + 100µM H_2O_2 e C2 + 100µM H_2O_2 : conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular; @Efeito da C2 comparada aos outros tratamentos dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Figura C2. Expressão relativa de 14-3-3 entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular; §Efeito da C1 comparada aos demais tratamentos dentro do mesmo período e tipo celular; Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

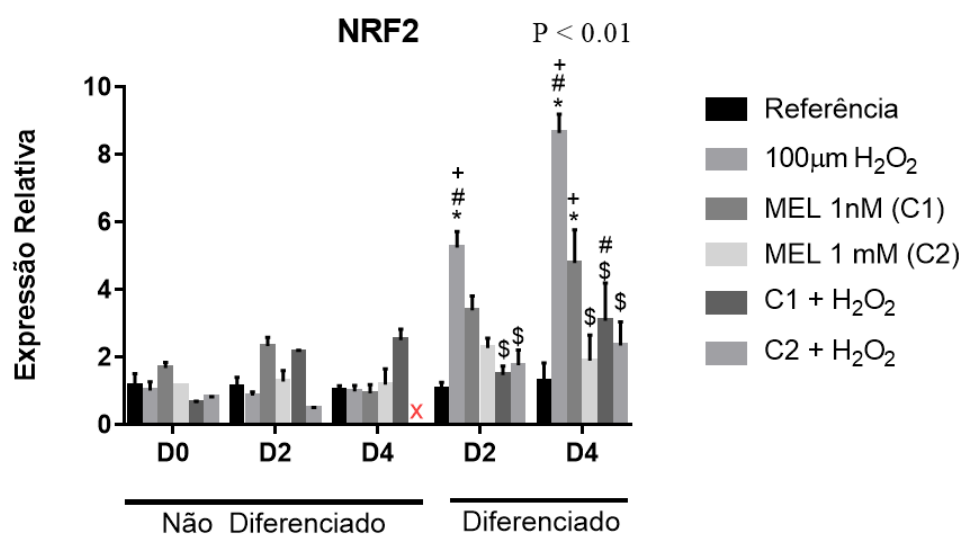
Figura C3. Expressão relativa de MST1 entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina

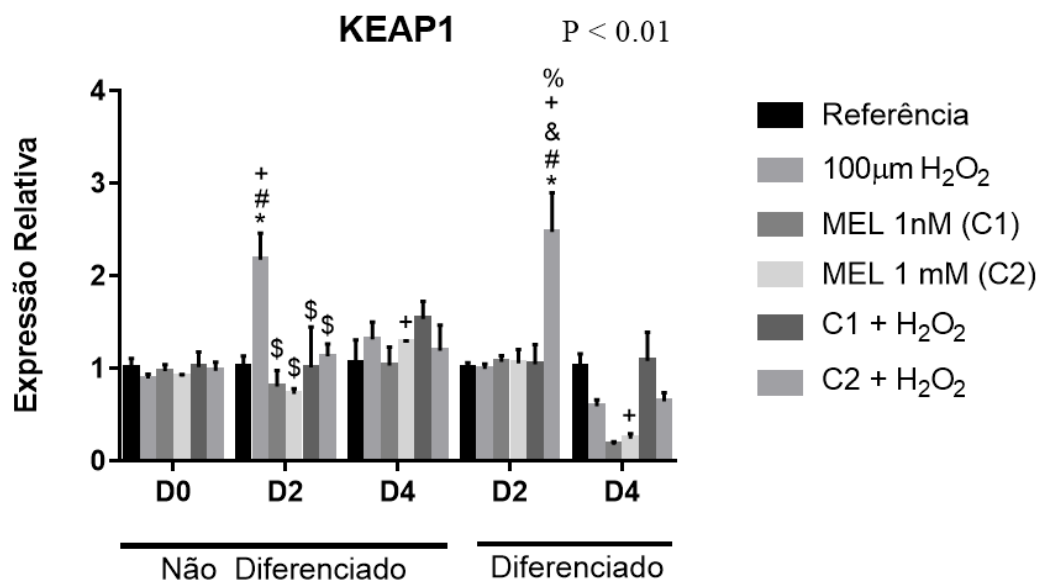
(MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular; Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Figura C4. Expressão relativa de NRF2 entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



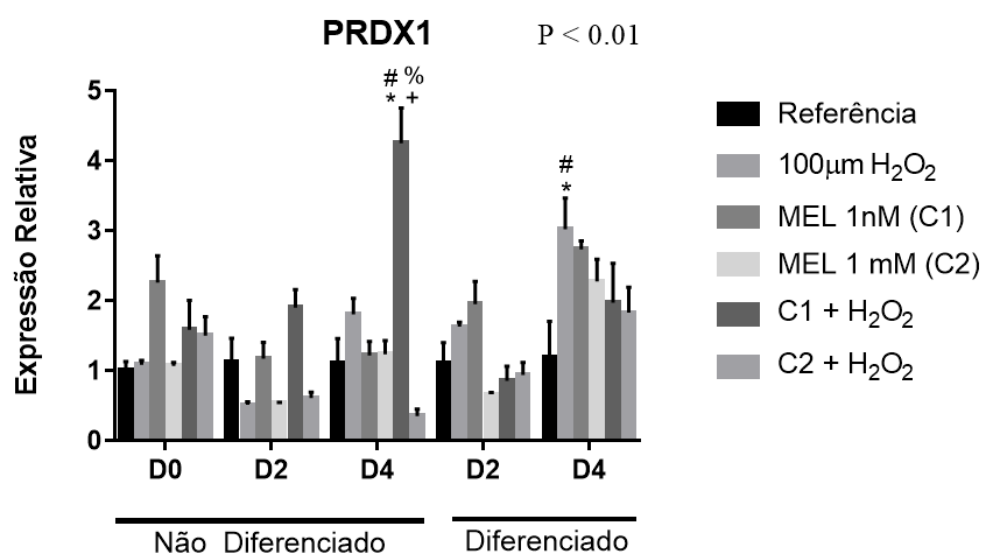
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito protetor da melatonina. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. X: amostras não amplificaram. Fonte: próprio autor.

Figura C5. Expressão relativa de *KEAP1* entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; \$Efeito protetor da melatonina; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

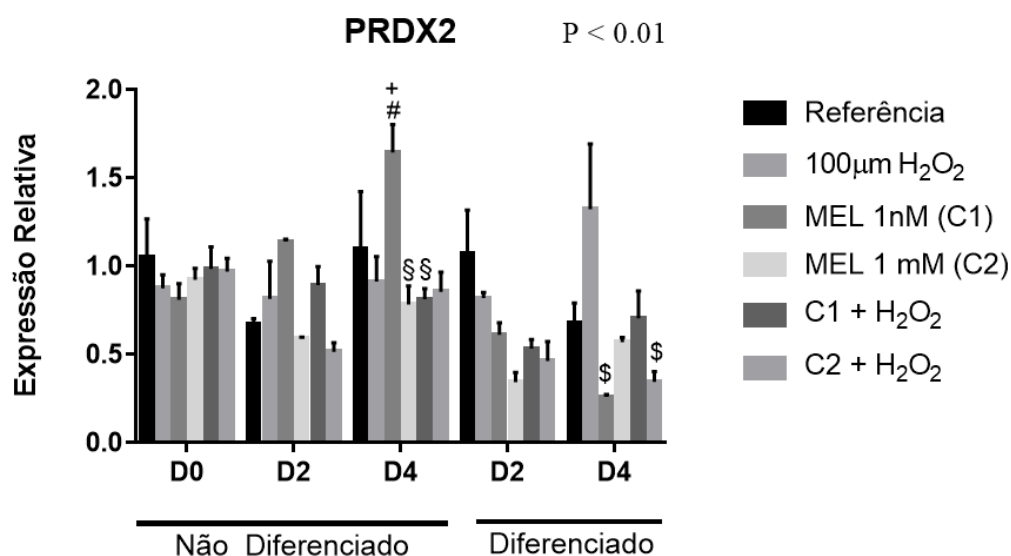
Figura C6. Expressão relativa de *PRDX1* entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina

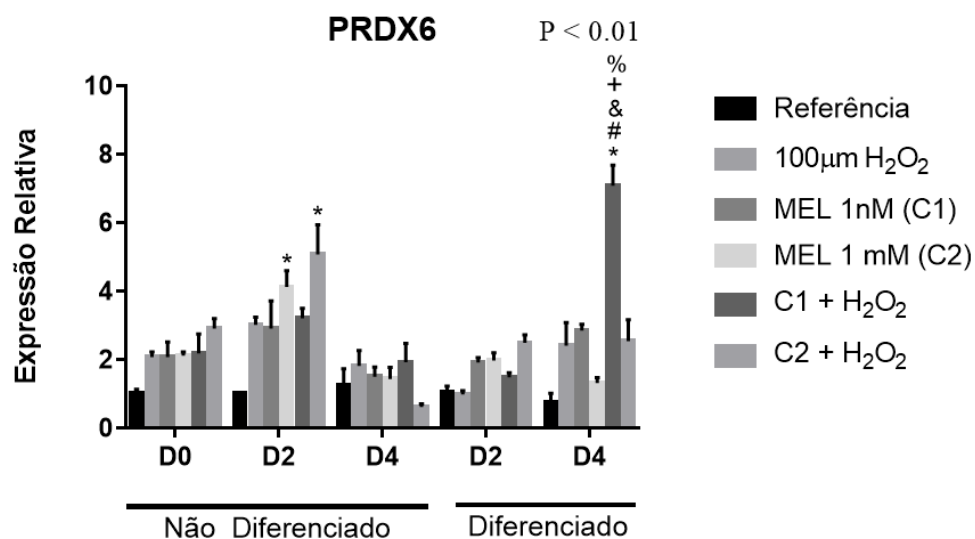
(MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Figura C7. Expressão relativa de *PRDX2* entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



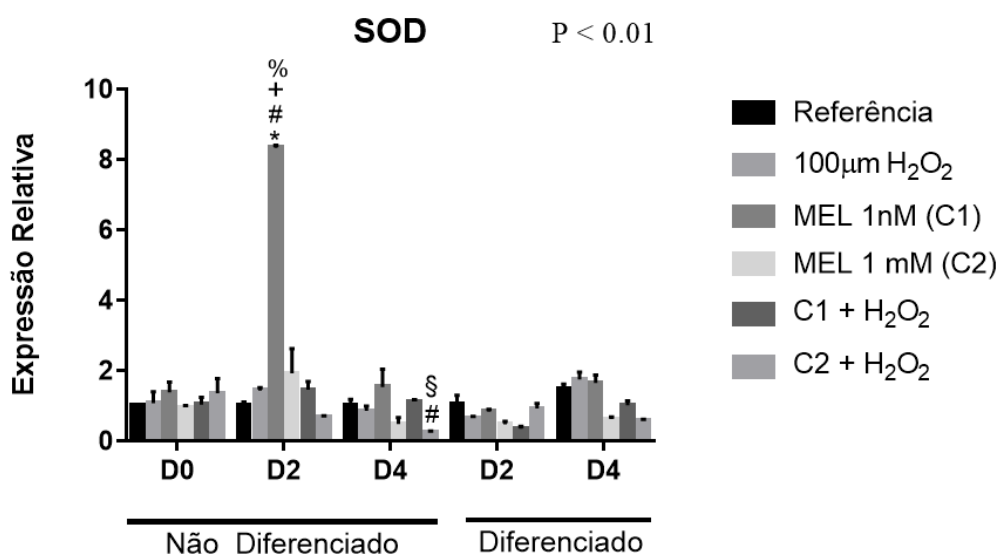
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; \$Efeito da melatonina; \$Efeito da C1 comparada a outro tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Figura C8. Expressão relativa de *PRDX6* entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

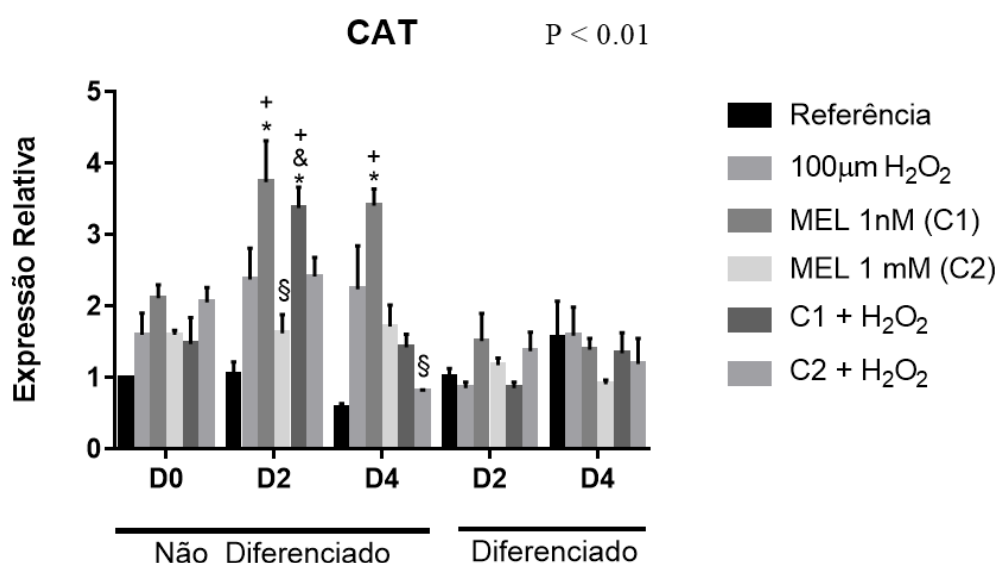
Figura C9. Expressão relativa de *SOD1* entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina

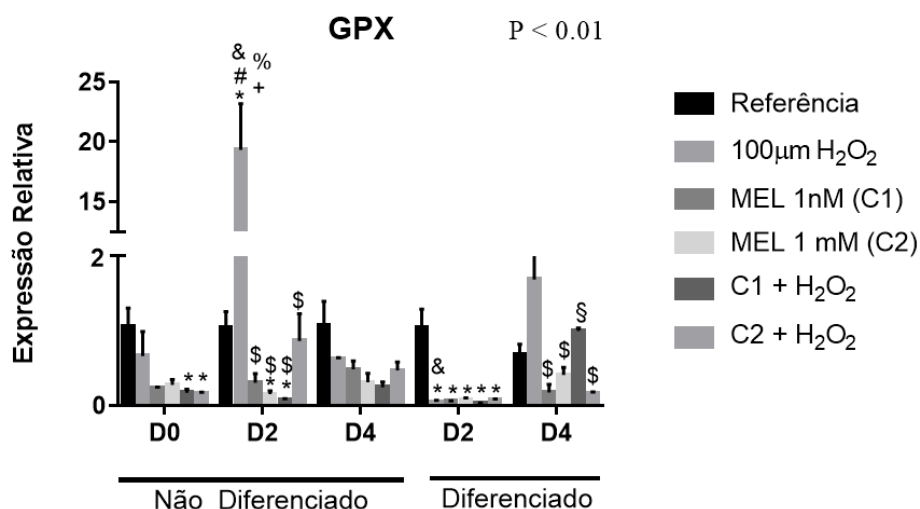
(MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; ⁺Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular; §Efeito da C1 comparada a outro tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Figura C10. Expressão relativa de CAT entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; ⁺Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; §Efeito da C1 comparada a outro tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.

Figura C11. Expressão relativa de GPx1 entre células K562 induzidas ou não a diferenciação



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com MEL; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de melatonina (MEL); C2: células tratadas com 1 mM H₂O₂ de MEL; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de MEL associados com a indução do estresse; D0, D2 e D4: períodos de incubação para células induzidas e não induzidas a diferenciação. *Efeitos dos tratamentos dentro de cada período e tipo celular, comparados aos respectivos grupos referência; #Efeito do período de incubação dentro de cada tratamento e tipo celular, comparados a suas contrapartes em D0; &Efeito do período de incubação entre D2 e D4 dentro do mesmo tratamento e tipo celular; +Efeito do processo de diferenciação dentro de cada período e tratamento; \$Efeito protetor da melatonina; %Efeito do tratamento dentro do mesmo período e tipo celular; §Efeito da C1 comparada a outro tratamento dentro do mesmo período e tipo celular. Teste realizado: GLM com desenho 3-way ANOVA, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: próprio autor.