

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/04/2022.



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	<p>Torres, Flaviene Felix</p> <p>Influência do tratamento com melatonina sobre mecanismos celulares de adaptação redox em células eritroleucêmicas K562 / Flaviene Felix Torres. -- São José do Rio Preto, 2021</p> <p>79 f. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: Danilo Grünig Humberto da Silva</p> <p>Coorientador: Anderson Ferreira da Cunha</p> <p>1. Melatonina. 2. Estresse Oxidativo. 3. Antioxidante. 4. Genética molecular. I. Título.</p>
-------	---

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 μM H_2O_2); 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+ H_2O_2 e C2+ H_2O_2 , 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*, *PRDX1* 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 + H_2O_2 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 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.

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 reductase
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 hidroxiiureia.....	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 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 hidroperóxidos 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 glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A GR reduz a glutathione 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 hidroperóxidos 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

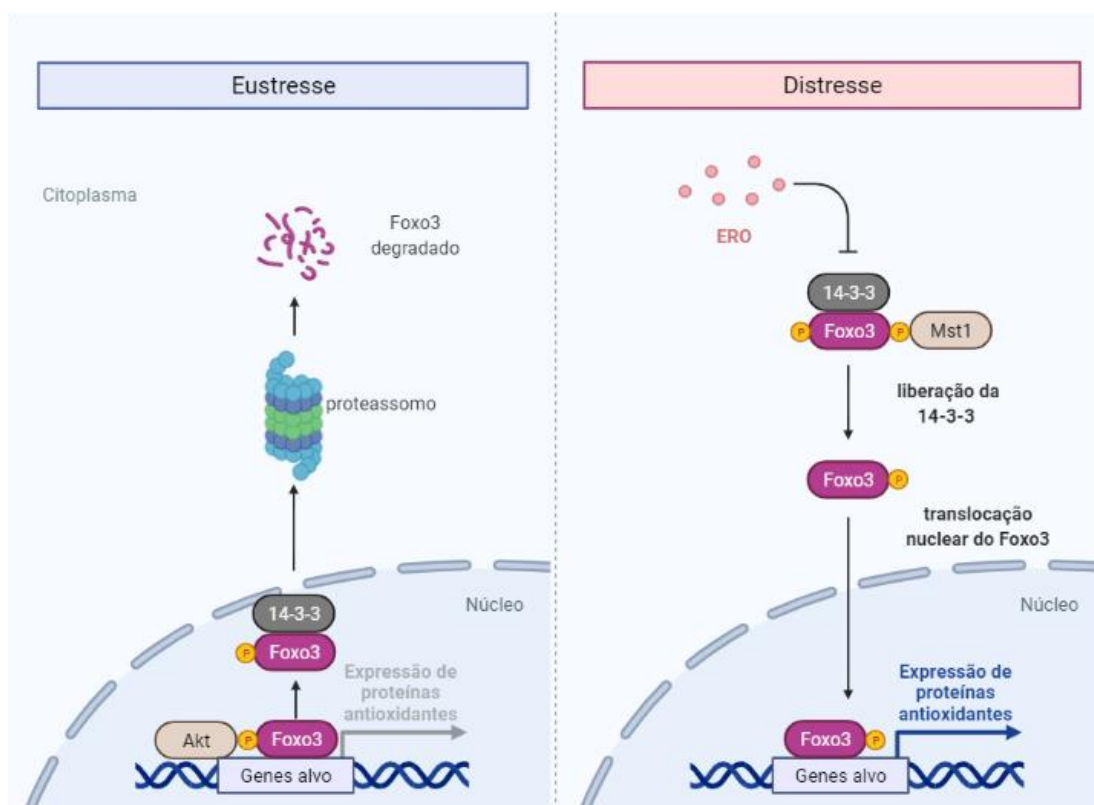
A via de sinalização fosfatidilinositol 3 quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT), vastamente estudada, já é descrita como via chave na ativação de diferentes FT, como é o caso do FoxO3 (*Forkhead box O3*). Os alvos do FoxO3 incluem genes que codificam para antioxidantes intra- e extracelulares, interferindo 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

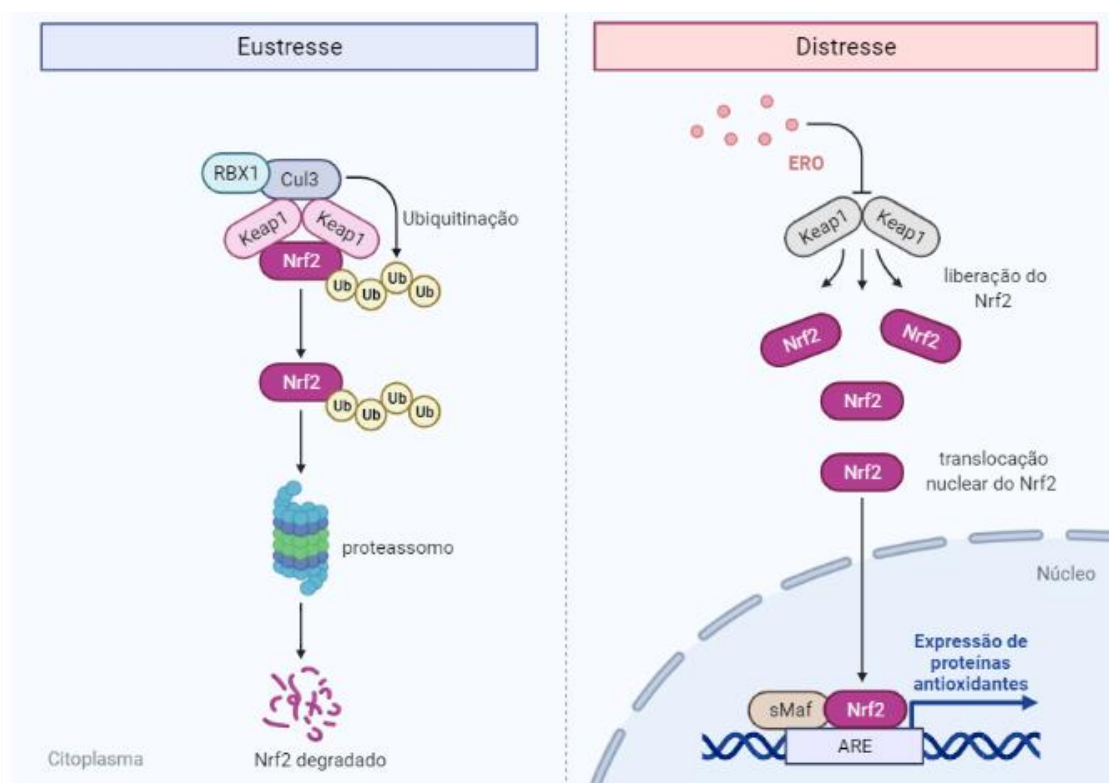


Em seu estado fosforilado, a AKT é capaz de fosforilar a proteína FoxO3, rompendo sua ligação com o DNA e translocando esta forma fosforilada do núcleo para o citoplasma, interrompendo assim a transcrição de seus genes-alvo. Este processo é realizado pela chaperona 14-3-3, que além de fazer essa realocação 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 proteossomo, 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

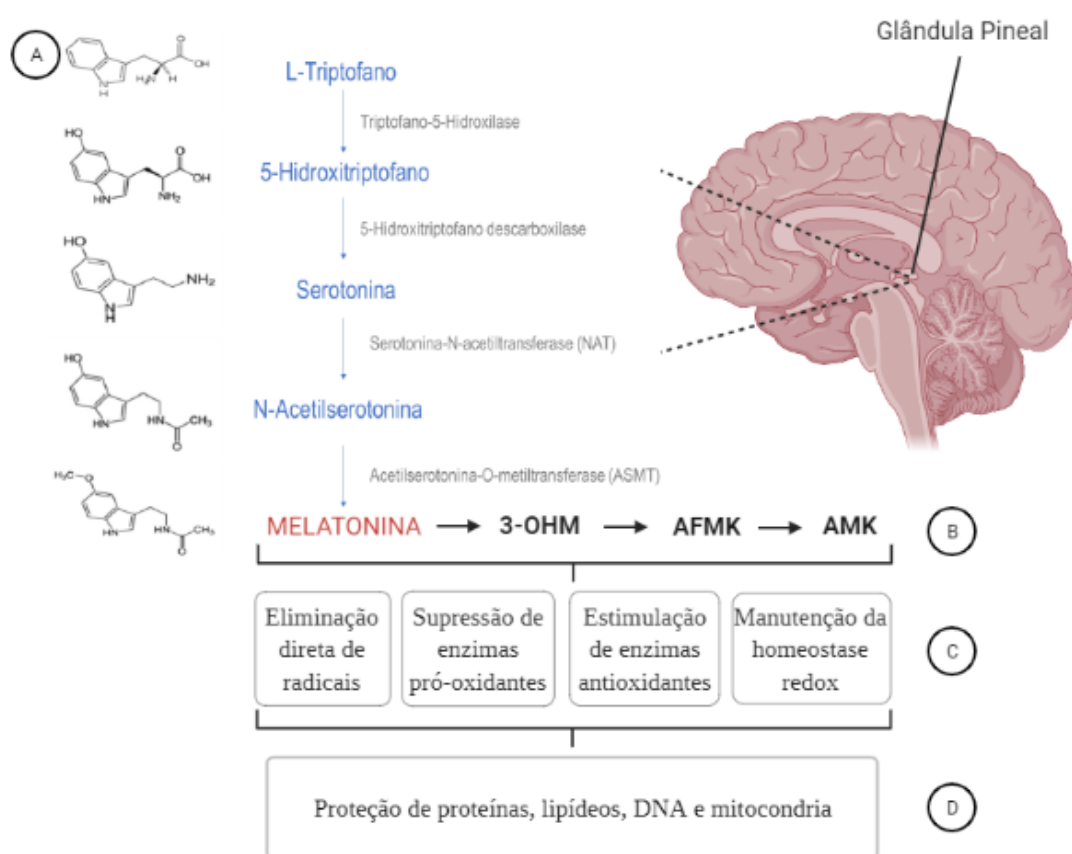
problemas de saúde graves. Portanto, a preocupação com o EO é bem justificada. Além dos mecanismos de defesa enzimática, existem compostos que oferecem proteção contra os efeitos deletérios do EO (GALANO; TAN; REITER, 2011). Entre eles, a melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina; MEL) e seus metabólitos 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, consequentemente, 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; POLJSAK; 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 (KOEFLER; 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 (TSIFTSOGLOU; 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; TSIFTSOGLOU; 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.

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. 156–171, 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.
- TENNANT, 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.