

Victoria Simões Bernardo

Ergotioneína como alternativa terapêutica: efeitos antioxidantes e/ou moduladores em células eritroleucêmicas K562

São José do Rio Preto

2021

Victoria Simões Bernardo

Ergotioneína como alternativa terapêutica: efeitos antioxidantes e/ou moduladores 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora CNPq – Proc. 131890/2019-0

Orientador: Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

São José do Rio Preto

2021

B523e

Bernardo, Victoria Simões

Ergotioneína como alternativa terapêutica: efeitos antioxidantes e/ou moduladores em células eritroleucêmicas K562 / Victoria Simões Bernardo. -- São José do Rio Preto, 2021

81 f.

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. Genética Humana e Molecular. 2. Antioxidantes. 3. Metabolismo
Regulação. 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.

Victoria Simões Bernardo

Ergotioneína como alternativa terapêutica: efeitos antioxidantes e/ou moduladores 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora CNPq – Proc. 131890/2019-0

COMISSÃO AVALIADORA

Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
UFMS – Câmpus de Três Lagoas
Orientador

Prof. Dr. Lucas Gazarini
UFMS – Câmpus de Três Lagoas

Prof^a. Dr^a. Lidiane de Souza Torres
Albert Einstein College of Medicine - Nova York

São José do Rio Preto

07 de Abril de 2021

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente aos meus pais, **Milton e Ana** e ao meu irmão **Victor** por sempre estarem comigo nesta jornada e por apoiarem meus sonhos.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva**, pela oportunidade, confiança e por compartilhar seus ensinamentos.*

*Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha**, por acreditar no projeto e dedicar tempo para minha formação.*

*A **Dra. Carla Peres de Paula** e ao **Doutorando João Pedro Maia**, que sempre encontraram tempo para me ajudar contribuindo enormemente para minha formação. Vocês são exemplos de organização, disciplina e responsabilidade, muito obrigada por tudo.*

Aos meus professores pelo aprendizado e por proporcionarem uma formação excelente aos alunos do curso de Pós-Graduação em Biociências.

*As minhas grandes amigas por me acolherem em uma cidade diferente, me guiarem e apoiarem durante essa etapa desafiadora, vocês são as melhores Fourmigas (**Alana, Carol e Renata**) que alguém poderia pedir e o melhor Quarteto fantástico ao qual poderia fazer parte (**Giovanna, Thais e Flavi**). Especialmente você, **Flavi** com quem eu já criei uma relação quase simbiótica e pra lá de dependente, brincadeiras à parte, muito obrigada pela sua ajuda e companheirismo, esse projeto com certeza não seria o mesmo sem você para me apoiar.*

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

*A **CNPq**, pela bolsa concedida durante meu Mestrado (**Proc. 131890/2019-0**).*

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e compartilharam essa conquista.

“Muitos dos nossos sonhos a princípio parecem impossíveis, depois parecem improváveis e, quando convocamos à vontade, eles logo se tornam inevitáveis.”

(Christopher Reeve, 2004)

RESUMO

Os eritrócitos são células que apresentam um ambiente interno extremamente pró-oxidante, propenso a constante formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) devido a seu papel fisiológico como transportador de oxigênio. Além desse ambiente interno oxidante, fontes extracelulares também contribuem para o estresse oxidativo constante dessas células devido à alta permeabilidade de ERO apresentada pela membrana eritrocitária. Em contrapartida, essas células possuem um sistema de regulação redox altamente eficiente e estritamente comprometido em manter a integridade e funcionalidade celular após a completa maturação, devido a capacidade metabólica limitada apresentada por essas células (ausência de núcleo e organelas). A ergotioneína (ERT) é um antioxidante natural que vem ganhando destaque na comunidade científica como uma potencial alternativa terapêutica no tratamento de diferentes doenças hematológicas humanas com quadros clínicos caracterizados por estresse oxidativo e inflamação crônicos. Isto, pois seu uso apresenta uma série de vantagens, dentre as quais podemos citar a i) existência de transportador altamente específico para sua captação, em diversos tipos celulares, inclusive em células eritróides; ii) alta biodisponibilidade, resultante da alta retenção e baixa excreção; iii) sua capacidade de detoxificar uma série de compostos oxidantes; e iv) não apresentar toxicidade ou efeitos indesejado associados à sua administração, mesmo em altas doses. Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar os possíveis efeitos antioxidantes e/ou moduladores da ERT sobre os mecanismos celulares de adaptação redox indispensáveis para homeostase em células eritróides submetidas ao estresse oxidativo, baseados nas vias de sinalização em resposta ao estresse oxidativo, PI3K/AKT/FOXO3 e Keap1/Nrf2/ARE; utilizando células eritroleucêmica K562 sob indução de diferenciação eritróide como modelo experimental. Para tanto, foram avaliados a viabilidade celular e os níveis de transcritos dos fatores de transcrição e seus moduladores supramencionados, bem como de importantes antioxidantes envolvidos na adaptação redox. Assim, o estudo contou com três amostras pseudoreplicadas acompanhadas durante cinco dias de diferenciação celular, com avaliações em três períodos do processo de diferenciação: antes do início (D0), no início de diferenciação (D2) e máximo da diferenciação (D4). Além disso, cada amostra foi dividida nos seguintes grupos: células eritróides 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 100 μM (C2) de ERT; por fim, dois conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse (C1+ H_2O_2 e C2+ H_2O_2 , respectivamente). Dentre os resultados obtidos, destaca-se o tratamento com a menor concentração de ERT (C1) que se associou com a indução da expressão do FOXO3; já na concentração C2 houve uma redução dos níveis de transcritos no início do processo de diferenciação, se mantendo baixa até o final do experimento. Também foi observada que a menor concentração de ERT testada, na presença do agente estressor, apresentou os maiores níveis de transcritos de Nrf2 (todos os períodos), Keap1 (dia 0) e 14-3-3 (dia 2 e 4), enquanto, no tratamento ERT C2 + H_2O_2 , no dia 2, observou-se um aumento de FOXO3 e MST1 e uma diminuição da 14-3-3 e Nrf2. As análises multivariadas destacaram que a via Keap1/Nrf2/ARE apresentou maior contribuição com o padrão de expressão de PRDX1, SOD1 e CAT, enquanto a via MST1-FOXO3, com PRDX2 e Trx. Conclui-se que ERT apresentou uma ação citoprotetora em células eritróides K562, através da ativação dos fatores de transcrição FOXO3 e Nrf2, sendo que a via de sinalização redox Nrf2-ARE mostrou-se como a principal envolvida na homeostase redox, enquanto a via MST1-FOXO3 parece estar envolvida tanto na homeostase redox quanto na proliferação e diferenciação eritróide. É válido ressaltar que os resultados possibilitaram a proposição e/ou elucidação de um mecanismo de ação das vias estudadas em células eritróides, dependente da concentração de ERT administrada.

Palavras-chave: Genética humana e Molecular. Antioxidantes. Metabolismo Regulação

Abstract

Erythrocytes are cells that present an extremely pro-oxidant internal environment, prone to the constant formation of reactive oxygen species (ROS) due to their physiological role as oxygen transporter. Besides this oxidizing internal environment, extracellular sources also contribute to the constant oxidative damage of these cells due to the high permeability of ROS presented by the erythrocyte membrane. Because of the mentioned above, these cells have a highly efficient redox regulation system and are strictly committed to maintaining cell integrity and functionality after complete maturation, due to the limited metabolic capacity presented by these cells (absence of nucleus and organelles). Ergothioneine (ERT) is a natural antioxidant that has been gaining notability in the scientific community as a potential therapeutic alternative in the treatment of different human hematological diseases with clinical conditions characterized by oxidative stress and chronic inflammation. Due to a series of advantages of its use, as i) existence of a highly specific transporter for its uptake, in several cell types, including erythroid cells; ii) high bioavailability, resulting from high retention and low excretion; iii) ability to detoxify a series of oxidizing compounds; and iv) does not present toxicity or adverse effects associated with its administration, even in high doses. In this context, the present study aimed to investigate the possible antioxidant and/or modulating effects of ERT on the cellular redox adaptation mechanisms indispensable for homeostasis in erythroid cells subjected to oxidative damage, based on the signaling pathways in response to oxidative stress, PI3K/AKT/FOXO3, and Keap1/Nrf2/ARE; using erythroleukemic K562 cells under the induction of erythroid differentiation as an experimental model. For that, the cell viability, and the levels of transcripts of the transcription factors and their aforementioned modulators were evaluated, as well as of important antioxidants involved in redox adaptation. Thus, the study had three pseudo-replicated samples followed for five days of cell differentiation, with assessments in three periods of the differentiation process: before the start (D0), at the beginning of differentiation (D2), and maximum differentiation (D4). Also, each sample was divided into the following groups: erythroid cells without inducing oxidative damage and antioxidant treatment (Reference); cells under stress induction with hydrogen peroxide (100 μM H_2O_2); cells treated with 1 nM (C1) and 100 μM (C2) of ERT; finally, two sets of cells treated with the same concentrations of ERT associated with stress induction (C1 + H_2O_2 and C2 + H_2O_2 , respectively). Among the main results, we can highlight that the treatment with the lowest concentration of ERT (C1) promoted the induction of FOXO3 expression, whereas in the C2 concentration there was a reduction in the levels of transcripts at the beginning of the differentiation process, remaining low until the end of the experiment. It was also observed that the lowest concentration of ERT, tested with the stressor, showed the highest levels of Nrf2 transcripts (every day), Keap1 (day 0), and 14-3-3 (day 2 and 4). Meanwhile, in the ERT C2 + H_2O_2 treatment, on day 2, was observed an increase in FOXO3 and MST1, concomitantly with a decrease in 14-3-3 and Nrf2. Multivariate analyzes of the degree of association between the transcript levels of the antioxidant enzyme genes, highlights that the Keap1 / Nrf2 / ARE pathway presented a greater contribution or involvement in the production of PRDX1, SOD1 and CAT mRNAs and that the MST1-FOXO3 pathway seems to be more associated with the PRDX2 and Trx transcripts in K562 erythroid cells. In conclusion, ERT presented a cytoprotective action on K562 erythroid cells, through the activation of FOXO3 and Nrf2 transcription factors, with the redox signaling pathway Nrf2-ARE being the main one involved in redox homeostasis, while FOXO3 is involved in both homeostasis redox and erythroid proliferation and differentiation. It is noteworthy that those results made it possible to propose a mechanism of redox adaptation of the pathways studied, in an ERT concentration-dependent manner.

Keywords: Human and molecular genetics. Antioxidants. Regulation metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização Nrf2.....	18
Figura 2. Modificações pós-traducionais e mudanças na localização subcelular de FoxO3....	19
Figura 3. FOXO e estresse oxidativo.....	20
Figura 4. Estrutura dos tautômeros de L- Ergotioneína.....	23
Figura 5. Cultivo de células K562.....	29
Figura 6. Design Experimental.....	32
Figura 7. Comprovação da diferenciação de células K562 pelo método de benzidina.....	33
Figura 8. Viabilidade das células K562 diferenciada nas diferentes condições experimentais testadas.....	36
Figura 9. Expressão relativa do gene Nrf2 em células eritróides K562.....	37
Figura 10. Expressão relativa do gene Keap1 em células eritróides K562.....	38
Figura 11. Expressão relativa do gene FOXO3 em células eritróides K562.....	39
Figura 12. Expressão relativa do gene YWHAQ em células eritróides K562.....	40
Figura 13. Expressão relativa do gene MST1 em células eritróides K562.....	41
Figura 14. Expressão relativa do gene Superóxido Dismutase (SOD1) em células.....	42
Figura 15. Expressão relativa do gene Catalase (CAT) em células eritróides K562.....	43
Figura 16. Expressão relativa do gene Glutationa Peroxidase 1 (GPx1) em células eritróides K562.....	44
Figura 17. Expressão relativa do gene Tiorredoxina (Trx) em células eritróides K562.....	45
Figura 18. Expressão relativa do gene Peroxirredoxina 1 (PRDX1) em células eritróides K562.....	46
Figura 19. Expressão relativa do gene Peroxirredoxina 2 (PRDX2) em células eritróides K562.....	47
Figura 20. Expressão relativa do gene Peroxirredoxina 6 (PRDX6) em células eritróides K562.....	48
Figura 21. Sinalização celular gerada por peróxido de hidrogênio e seu efeito modulatório sobre o fator de transcrição FOXO3.....	55

Figura 22. Mecanismos de ação propostos para ativação da via Nrf2-ARE no tratamento com a menor concentração de Ergotioneína em células eritróides K562 sob estresse oxidativo.....	56
Figura 23. Mecanismo de ação proposto para ação citoprotetora da menor concentração de Ergotioneína em células eritróides K562 sob estresse oxidativo.....	58
Figura 24. Mecanismo de ação proposto para ação citoprotetora da maior concentração de Ergotioneína em células eritróides K562 sob estresse oxidativo.....	59
Figura B1 – Padronização dos primers PRDX1.....	78
Figura B2 - NTCs (no-template controls) PRDX1.....	79
Figura B3 – Teste de eficiência da reação para análise do gene PRDX1.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições testadas no experimento.....	31
Tabela 2. Associação múltipla entre as expressões relativas de membros de vias redox essenciais para a defesa antioxidante em células eritróides e suas respectivas enzimas antioxidantes.....	49
Tabela 3. Associações individuais entre os membros das vias de sinalização redox e os genes dos antioxidantes analisados.....	50
Tabela B1. Sequências dos primers que foram utilizados nas reações de qPCR.....	77
Tabela B2. Apresentação da concentração ideal de cada par de primer determinada durante a padronização e eficiência de cada reação para cada gene alvo.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elemento de Resposta Antioxidante
CAT	Catalase
CML	Leucemia Mielóide Crônica
ETT	Transportador de Ergotioneína
ERO	Espécie reativas de oxigênio
ERN	Espécie reativas de nitrogênio
FOXO3	Forkhead box O3
GLM	General Linear Models (Teste estatístico)
GPx1	Glutaciona peroxidase 1
GRM	General Regression Models (Teste estatístico)
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GST	Glutaciona-S-transferase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina Fetal
HO-1	Hemoxigenase I
MPT	Modificações pós-traducionais
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NQO1	NADPH-quinona oxidase
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
OCTN1	Transportador intestinal
PRDX	Peroxirredoxina
sMAF	Proteína Small Maf
SOD1	Superóxido dismutase
Srx	Sulfiredoxina
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Estresse oxidativo	14
1.2 Estado redox celular.....	15
1.3 Estresse oxidativo e as células eritroides	15
1.4 Mecanismos celulares de adaptação redox em células eritroides	16
1.5 Vias de sinalização centrais da biologia redox	18
1.6 Suplementação terapêutica com antioxidantes	21
1.7 Ergotioneína.....	23
1.8 Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias	24
2. OBJETIVO	27
2. 1 Objetivos Específicos	27
3. METODOLOGIA.....	29
3.1 Cultivo de células K562 - Linhagem de célula eritroleucêmica.....	29
3.2 Diferenciação de células K562 induzida pela adição de hemina combinada com hidroxipuréia.....	30
3.3 Indução de estresse oxidativo pela adição de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) como agente estressor	30
3.4 Design experimental	30
3.4.1 - Determinação de expressão de hemoglobina utilizando o método de benzidina	32
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).....	33
3.5 Análises Estatísticas	34
4. RESULTADOS	36
4.1 Viabilidade celular	36
4.2 Análise de expressão gênica de agentes antioxidantes importantes em células eritróides	36
4.2.1 <i>Via Keap1/Nrf2/ARE</i>	37
4.2.2 <i>FOXO3 e reguladores de sua localização subcelular</i>	39
4.2.3 <i>Expressão das enzimas antioxidantes</i>	41
4.2.3.1 <i>Superóxido Dismutase 1</i>	41
4.2.3.2 <i>Catalase</i>	42
4.2.3.3 <i>Glutathione Peroxidase 1</i>	43
4.2.3.3 <i>Tiorredoxina (Trx)</i>	44

4.2.3.4 Peroxirredoxinas (PRDXs).....	45
4.2.4 Associações entre as expressões gênicas dos membros de vias redox e dos antioxidantes analisados em células eritróides	48
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	74
APÊNDICE A - Detalhes da cultura celular.....	74
APÊNDICE B - Padronização dos primers de qPCR	76

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse oxidativo

As reações de redução e oxidação (redox) controlam quase todos os aspectos da vida (SIES; BERNDT; JONES, 2017) e do nosso metabolismo, conseqüentemente, as espécies reativas como as de oxigênio (ERO) - termo que descreve as espécies químicas que são formadas após a redução incompleta de oxigênio (RAY; HUANG; TSUJI, 2012), são subprodutos desse tipo de metabolismo. Essas moléculas, resultantes de reações endógenas ou por alguma disfunção biológica podem causar danos às proteínas, DNA, carboidratos e peroxidação lipídica (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PISOSCHI; POP, 2015). Esses efeitos são neutralizados pelas reações de redução realizadas por uma variedade de enzimas e pequenos compostos especificamente dedicados a prevenir o acúmulo intracelular dessas moléculas (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Além desse aspecto deletério, ao longo das últimas duas décadas, o papel das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como mediadores da sinalização intracelular vem ganhando destaque como reguladores importantes de numerosas respostas fisiológicas (RAY; HUANG; TSUJI, 2012; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). A versatilidade dessas moléculas em relação às suas propriedades e mobilidade dentro das células é uma das grandes vantagens que se acredita ser responsável pela conservação evolutiva desse tipo de sinalização (MITTLER et al., 2011). E, como parte de uma rede de sinalização celular altamente conservada, elas estão integradas na regulação de numerosas respostas fisiológicas como proliferação celular, apoptose e expressão gênica (PISOSCHI; POP, 2015; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

A homeostase redox é atingida quando há um equilíbrio dinâmico entre os vários processos geram espécies reativas e, conseqüentemente, promovem a oxidação de biomoléculas e defesas antioxidantes que limitam a formação destes agentes oxidantes (JONES; SIES, 2015). Elevações moderadas na produção de espécies reativas acontecem dentro de parâmetros fisiológicos e permitem a adaptação celular (eustresse), sendo, assim, essenciais para a regulação de processos como proliferação celular, apoptose e expressão gênica, por meio das modulações dos fatores de transcrição (PISOSCHI; POP, 2015; SCHIEBER; CHANDEL, 2014). No entanto, quando essa produção ultrapassa valores fisiológicos (condições fisiopatológicas), os danos oxidativos passam a se acumular (distresse), processo este que é observado nos mecanismos fisiopatológicos primários ou secundários de várias doenças humanas (JONES; SIES, 2015; SIES; BERNDT; JONES, 2017). O mecanismo regulatório dessa homeostase pode ocorrer de duas formas, pelo controle da atividade enzimática ou em nível transcricional (KLOTZ et al., 2015), este último sendo o foco deste estudo.

1.2 Estado redox celular

A manutenção do estado redox intracelular é promovida principalmente pelos sistemas antioxidantes da glutatona (GSH) e da tiorredoxina (Trx) (XIE et al., 2019). No primeiro, a glutatona reduzida (GSH) é oxidada, ao eliminar peróxidos e vários outros componentes reativos, adquirindo a configuração de glutatona oxidada (GSSG), que pode ser revertida para sua forma reduzida pela ação da glutatona redutase (GR), a qual usa o NADPH como agente redutor (PRABHAKAR et al., 2005). A Trx fornece os equivalentes redutores para as peroxidases peroxiredoxinas (PRDX), regenerando-as em um ciclo catalítico para manterem seu papel antioxidante importante (com exceção da PRDX6 cujo redutor fisiológico é a glutatona). A Trx, em sua forma oxidada, por sua vez é regenerada pela enzima tiorredoxina redutase (TrxR), a partir de elétrons doados por NADPH (HOLMGREN; LU, 2010). Assim, podemos determinar que um dos passos importantes na regulação da capacidade antioxidante da célula é a produção de NADPH, pois seu consumo é o responsável por fornecer equivalentes redutores a esses antioxidantes (BRADSHAW, 2019). E, que os sistemas da Trx e GSH fazem parte de uma intrincada rede de sinalização denominada de regulação redox, na qual tais compostos e vias relacionadas têm papéis essenciais na manutenção do um estado redox intracelular (HOLMGREN et al., 2005).

1.3 Estresse oxidativo e as células eritroides

Os eritrócitos são células que apresentam um ambiente interno extremamente oxidante, propenso a produção constante de agentes pró-oxidantes (ou ERO) devido ao seu papel fisiológico como transportador de oxigênio (EDWARDS; FULLER, 1996). A presença desses componentes oxidantes interferem na homeostase eritrocitária (YAWATA, 2003). Dentre a geração interna de fontes oxidantes, destaca-se a desnaturação oxidativa da hemoglobina (Hb), processo que ocorre diariamente durante a dissociação do oxigênio em cerca de 3% da Hb. A auto-oxidação da hemoglobina oxigenada [Hb(FeII)O₂] em metahemoglobina [Hb(FeIII)] libera ânion superóxido (O₂^{•-}), molécula que é capaz de atacar diretamente a membrana dessas células causando alterações nos lipídeos e na estrutura das proteínas, considerado um gatilho importante do processo oxidativo (JOHNSON et al., 2005; VOSKOU et al., 2015). Esse ânion sofre dismutação e gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂), composto capaz de oxidar tióis de proteínas (KANIAS; ACKER, 2010). O H₂O₂ também pode reagir com metais como o ferro dando origem ao radical hidroxila (•OH), o qual é extremamente reativo e ataca rapidamente as biomoléculas no local onde é formado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Dessa forma, a auto oxidação da Hb constitui uma das maiores fontes de H₂O₂ (BENFEITAS et al., 2014;

VOSKOU et al., 2015). Existem evidências que o aumento desse oxidante está diretamente relacionado com a peroxidação lipídica das células eritroides, considerada uma consequência primária do estresse oxidativo celular (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Em decorrência da peroxidação lipídica, são gerados hidroperóxidos de lipídios (LOOH) cuja decomposição resulta em produtos de maior reatividade e toxicidade, como os radicais peroxila (LOO^{\bullet}) ou alcoxila (LO^{\bullet}). Além de causar a polimerização dos componentes da membrana e o aumento da rigidez dos fosfolipídios da bicamada, levando à diminuição de sua deformabilidade, o que por sua vez aumenta a suscetibilidade destas células à hemólise (GIROTTI, 2009; GUTTERIDGE, 1995).

Concomitantemente à geração interna de pró-oxidantes, fontes extracelulares também contribuem para o dano oxidativo constante dessas células por serem altamente responsivas ao ambiente externo, sendo importante ressaltar a alta permeabilidade a H_2O_2 apresentada pela membrana eritrocitária (BENFEITAS et al., 2014) e a presença de aquaporinas que permitem o transporte bidirecional de H_2O_2 através da membrana biológica de células eritroides (KINGSLEY et al., 2013; WEI et al., 2015). A membrana celular desses eritrócitos é altamente especializada, organizada e capaz de interagir com mediadores inflamatórios e agentes oxidativos, levando a uma variedade de mudanças tanto estruturais quanto funcionais e, portanto, o eritrócito deve ser considerado como um indicador importante de saúde (MASSACCESI; GALLIERA; ROMANELLI, 2020), sinalizando uma situação anormal que podem ser observadas em diversas condições patológicas (YANG et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

1.4 Mecanismos celulares de adaptação redox em células eritroides

Dentre os mecanismos de defesa utilizados pelas células eritrocitárias estão enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT), glutaciona peroxidase 1 (GPx1) e as peroxirredoxinas (PRDX), que removem cataliticamente as espécies reativas, evitando os efeitos deletérios causados pela oxidação (IUCHI, 2012). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a transformação do ânion superóxido em oxigênio molecular e H_2O_2 , sendo que nos eritrócitos a isoforma SOD1 dessa enzima atua como a primeira linha de defesa dessas células (JOHNSON; GIULIVI, 2005). O H_2O_2 produzido a partir dessa reação é decomposto por outras enzimas, como a CAT, a GPx1 e as PRDXs, atuando em conjunto com as SOD1 no combate das ERO, desempenhando um papel fundamental na manutenção dos eritrócitos (LOW et al., 2007).

A CAT apresenta uma eficiência maior de atuação na presença de concentrações altas de H_2O_2 , sendo capaz de eliminar H_2O_2 com atividade muito maior do que GPx1 quando este se encontra em concentrações acima de 100 nM (MUELLER; RIEDEL; STREMMEL, 1997; RAHMAN, 2007). A GPx1 é essencial na eliminação de H_2O_2 e outras variedades de peróxidos tóxicos (COMHAIR; ERZURUM, 2002), dessa forma o sistema glutathiona desempenha um papel fundamental, mantendo a homeostasia redox (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004; LOW et al., 2007). As PRDXs, além de reduzir peróxido, exercem um papel essencial ao atuar como transdutor de sinal de H_2O_2 e contribuem para a gestão do *pool* de NADPH intracelular (BENFEITAS et al., 2014; RHEE; KIL, 2017). Além disso, a PRDX2 se liga à Hb para estabilizá-la e protegê-la do estresse oxidativo (HAN et al., 2012), agindo como chaperona molecular da Hb, mantendo seu enovelamento adequado (durante a eritropoiese), evitando sua desnaturação (pós a maturação) e se liga ao heme livre com afinidade alta, impedindo ações oxidativas desse grupamento (DE FRANCESCHI et al., 2011; STUHLMEIER et al., 2003).

As redoxinas, incluindo as PRDXs e as Trxs, são proteínas conhecidas por estarem envolvidas em reações redox e por regularem a atividade de fatores de transcrição através da interação direta com esses fatores (maioria das vezes por via da oxidação de tióis cisteínicos), (HOPKINS; NEUMANN, 2019), o que é especialmente interessante quando pensamos no fator de transcrição FoxO3, cuja localização subcelular é um pré-requisito essencial para a sua atividade transcricional. Um estudo recente realizado por Hopkins e colaboradores (2018), demonstrou, pela primeira vez na literatura, que o complexo PRDX1-FoxO3 (ligado por dissulfeto) influencia na localização nuclear da proteína FoxO3, permitindo uma regulação rápida e precisa da resposta ao estresse oxidativo, evidenciando que uma regulação da atividade do FoxO3 dependente de H_2O_2 pode ser analisada diretamente através da PRDX1. Os autores propõe que a PRDX1 constitui um passo importante para a manutenção de reservatório citoplasmático de FoxO3 dependente de sinalização redox que é prontamente disponível frente a níveis altos de H_2O_2 , momento no qual há estimulação da translocação nuclear e expressão gênica de FOXO3 (HOPKINS et al., 2018).

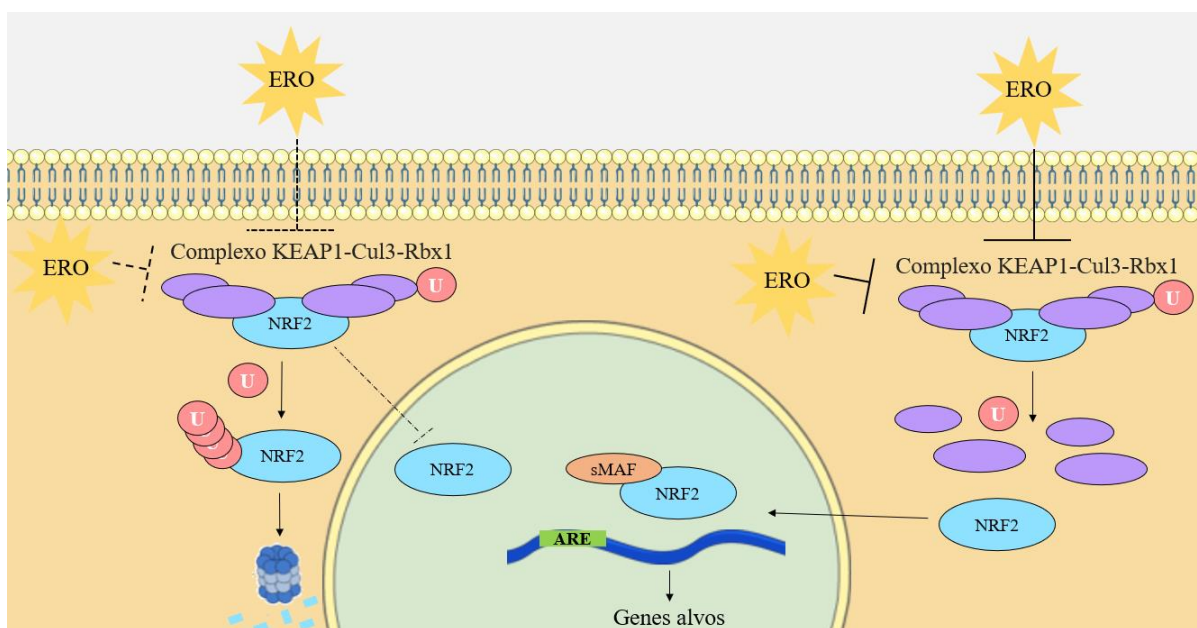
Apesar do sistema intrincado de defesa antioxidante dos eritrócitos estar bem documentado na literatura, os mecanismos regulatórios por trás dessas enzimas antioxidantes ainda não são bem caracterizados. Assim, compreender os mecanismos que atuam na regulação da homeostase redox é de importância extrema para o monitoramento e desenvolvimento de tratamentos possíveis que possam ser utilizados, não só em doenças hematológicas, mas em uma variedade de enfermidades crônicas e/ou degenerativas que apresentam quadros de estresse

oxidativo acentuado nos quais os parâmetros eritrocitários podem ser importantes para o monitoramento clínico (MASSACCESI; GALLIERA; ROMANELLI, 2020).

1.5 Vias de sinalização centrais da biologia redox

Os fatores de transcrição Nrf2 e FoxO3 são expressos através de estímulos estressantes e exercem papéis centrais no controle da expressão de enzimas de defesa antioxidantes (CALNAN; BRUNET, 2008; ISHII et al., 2000; ITOH et al., 1997). Em condições fisiológicas, Nrf2 é degradado constitutivamente através da via ubiquitina-proteassomo, mecanismo no qual o sensor de estresse oxidativo Keap1 serve como um adaptador do complexo ubiquitina ligase Cul3-Rbx. No mecanismo de ativação do Nrf2 (sob estresse oxidativo), o complexo Keap1-Cul3-Rbx1 desconecta-se do Nrf2, permitindo que ele migre para o núcleo e atue como um fator de transcrição, ativando o promotor do Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) e seu heterodímero obrigatório, a proteína Small Maf (sMAF). Esta via, agora chamada de Nrf2-ARE, inicia a transcrição de inúmeros antioxidantes, como SOD1, CAT, GPx1, Hemoxigenase I (HO-1), NADPH-quinona oxidoreductase 1 (NQO1), sulfiredoxina (Srx), tioredoxina redutase (TrxR), PRDX1, 2, 5 e 6 e glutatona *S*-transferase (CHEN et al., 2020; MA, 2013), além de estimular a transcrição de Hemoglobina Fetal (HbF) (MACARI; LOWREY, 2011), como esquematizado na Figura 1 abaixo.

Figura 1. Via de sinalização Nrf2

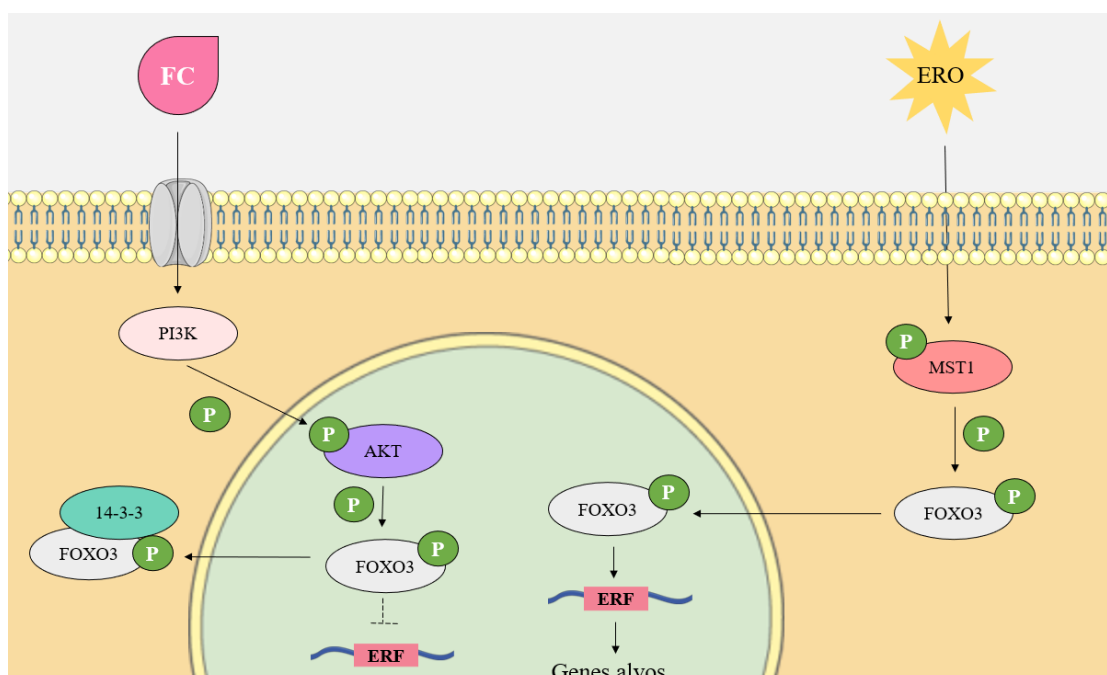


Sem o estresse oxidativo (Lado esquerdo), o Nrf2 é ubiquitinado pelo complexo Keap1-Cul3-Rbx1 e degradado pelo proteassomo. Sob estresse oxidativo (Lado direito), o complexo Keap1-Cul3-Rbx1 desconectam-se do Nrf2, permitindo que ele migre para o núcleo e atue ativando o promotor ARE e seu heterodímero obrigatório, a proteína

Small Maf (sMAF). ARE, Elemento de Resposta Antioxidante; ERO, Espécie reativa de oxigênio; Nrf2, Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; sMAF, proteína Small Maf; U, ubiquitinação. Fonte: Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>).

Já o fator de transcrição FoxO3, tem sua atividade regulada principalmente através de modificações pós-traducionais (MPT) que causam mudanças em sua localização subcelular, resultando em diferentes implicações para sua atividade (Figura 2). Em resposta a estímulos externos, como insulina ou fator de crescimento, a via de sinalização PI3K/AKT é ativada. AKT fosforila o FoxO3 nuclear nos sítios Thr32, Ser253 e Ser315, permitindo a ligação da chaperona 14-3-3, particularmente nos sítios Thr32 e Ser253 fosforilados, o que contribui para mascarar o domínio de ligação ao DNA de FOXO, levando à dissociação desse fator de transcrição do elemento responsivo a FOXO ou ERF. O resultado dessa ligação é a translocação desse fator de transcrição para o citosol, impedindo a transcrição de seus genes-alvo (BOCCITTO; KALB, 2011; KODANI; NAKAE, 2020; WANG; HU; LIU, 2017). Por outro lado, quando a célula é submetida a estresse oxidativo, a quinase MST1 fosforila a Ser207 do FoxO3 citoplasmático, bloqueando a interação com 14-3-3; e, fosforila também os sítios Ser209, Ser215, Ser231 e Ser232 localizados na região FH, um domínio conservado de ligação ao DNA, que ao ser fosforilado aumenta a ligação ao DNA. A fosforilação catalisada por MST1 promove a translocação desse fator para o núcleo e, através da transcrição de seus genes-alvo, FoxO3 controla se a célula entra na via de sobrevivência (por indução dos antioxidantes) ou apoptose (BOCCITTO; KALB, 2011; KODANI; NAKAE, 2020; WANG; HU; LIU, 2017).

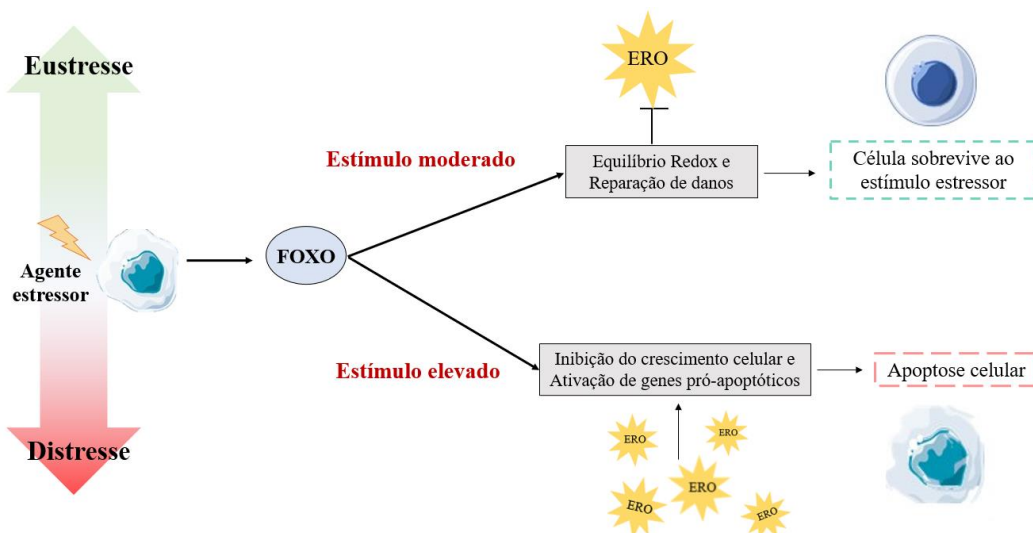
Figura 2. Modificações pós-traducionais e mudanças na localização subcelular de FoxO3



Mecanismos pelos quais o fator de transcrição FOXO3 regula a homeostase celular. Do lado direito, tem-se uma fosforilação do FoxO3 por MST1, proteína quinase ativada por estresse oxidativo, e desencadeia sua realocação do citoplasma para o núcleo, anulando os efeitos de outro conjunto de modificações pós-traducionais (MTP) como a fosforilação por AKT, uma proteína quinase, que fosforila o FoxO3 na presença de fator de crescimento (FC) e desencadeia sua realocação para o citoplasma (ocasionada pela ligação do FoxO3 com a chaperona 14-3-3), impedindo sua atividade transcricional (lado esquerdo). AKT, proteína quinase B; ERF: Elemento responsivo a FOXO; ERO, Espécie reativa de oxigênio; FC, Fator de crescimento; FoxO3, proteína *Forkhead box O*; MST1, Quinase estéril 20 de mamíferos; P, Fosforilação; PI3K, Fosfatidilinositol 3-quinase. Fonte: Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>).

Os genes-alvo transcritos, além de serem estímulo-dependentes (mudanças externas que perturbam a homeostase) também são intensidade-dependente (Figura 3). A título de exemplo, em casos de estresse oxidativo mediano, as proteínas FoxO3 medeiam mecanismos celulares de proteção celular, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes, sendo elas: CAT, GPx1, SOD1 e 2, PRDX1, 2, 3 e 5, Trx e TrxR (CHIRIBAU et al., 2008; KLOTZ et al., 2015; KOPS et al., 2002; MARINKOVIC et al., 2007; NEMOTO; FINKEL, 2002). Por outro lado, sob estresse oxidativo elevado, promovem a inibição do crescimento celular (expressão de vários inibidores de CDK) (DALL'ACQUA et al., 2017; JEONG et al., 2016) e/ou apoptose (ativação de genes pró-apoptóticos) (ESSAFI et al., 2005; SUNTERS et al., 2003; VAN DER VOS; COFFER, 2011). Esta fina regulação da atividade transcricional de FoxO3 demonstra a existência de uma hierarquia entre as MPT que permite uma resposta rápida ao estímulo do estresse oxidativo, consolidando seu papel na biologia redox (TZIVION; DOBSON; RAMAKRISHNAN, 2011).

Figura 3. FOXO e estresse oxidativo



A atividade das proteínas FoxO é controlada de acordo com a intensidade do estresse oxidativo (estímulo externo que atua como agente estressor). Em casos de estímulos de estresse oxidativo moderado (eustresse), as proteínas FoxOs medeiam mecanismos de proteção celular, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes, por exemplo.

Por outro lado, sob estresse oxidativo elevado, o dano oxidativo acumula-se (distresse) e os FoxOs promovem a inibição do crescimento celular (aumentando a expressão de vários inibidores de CDK) e/ou apoptose (genes pró-apoptóticos são ativados). CDK, Quinases dependentes de ciclinas; ERO, Espécie reativa de oxigênio; FC, Fator de crescimento; FoxO, proteína *Forkhead box O*; P, Fosforilação. Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>).

Recentemente, foi demonstrada uma ligação entre os fatores de transcrição Nrf2 e FOXO3, em linhagens de células tumorais humanas. No estudo realizado por Guan e colaboradores (2016), FOXO3 estimulou a transcrição do gene Keap1 e, ao elevar os níveis desse sensor de estresse oxidativo, esse fato de transcrição estaria atenuando a ação do Nrf2. Já em caso de inativação do FOXO3, tem-se uma regulação negativa de Keap1, resultando na ativação da sinalização de Nrf2, enquanto a sinalização constitutivamente ativa de AKT tende a estimular Nrf2, bloqueando a referida atividade FOXO3 (GUAN et al., 2016). O mecanismo por trás dessa regulação envolve a região promotora do gene Keap1, mais especificamente no íntron 1, onde foram encontrados vários elementos de ligação de consenso FOXO (GUAN et al., 2016).

Além disso, outra forma de interação proposta entre esses dois fatores de transcrição é de que FoxO induza uma resposta antioxidante que acarreta na atenuação da oxidação de Keap1 (KLOTZ; STEINBRENNER, 2017). Este *crossstalk* entre FOXO3 e Nrf2 serve para regular várias respostas celulares, incluindo defesa oxidativa, proliferação, sobrevivência, tumorigênese e quimiorresistência, o que é extremamente interessante pois na literatura já há dados apontando que os benefícios da ativação do Nrf2 são dependentes do contexto e que sua ativação persistente, ao exceder um certo limite, pode perturbar a função celular essencial das espécies reativas, sendo assim prejudicial à sobrevivência a longo prazo (TAGUCHI et al., 2010).

1.6 Suplementação terapêutica com antioxidantes

Nas últimas décadas, o estresse oxidativo vem sendo considerado um componente de quase todas as doenças (GÜRKAN, 2008). Atualmente, tem-se bem estabelecido a existência de relação intrínseca entre a gravidade dessas doenças e o desequilíbrio entre pró-oxidantes e defesas naturais, sugerindo que a terapia antioxidante represente um caminho promissor para o manejo terapêutico. Nesse contexto, diferentes agentes foram e estão sendo testados atualmente como suplementação ao tratamento dessas doenças, a estratégia mais utilizada consiste no uso de antioxidantes naturais originados de uma fonte exógena, como alimentos e/ou suplementos dietéticos (por exemplo, a vitamina C) (CARLSEN et al., 2010). Uma segunda alternativa menos explorada envolve a síntese de antioxidantes endógenos, como SOD (GAO et al., 2003).

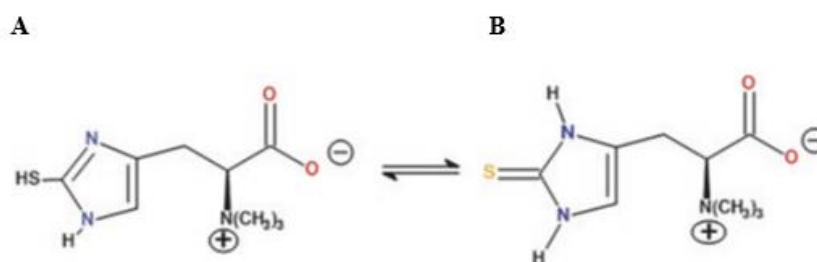
Ambos os métodos apresentam complicações, no primeiro caso temos o efeito adverso decorrido da ingestão de alta concentração de antioxidantes, conhecido como “Paradoxo antioxidante”, como visto em alguns estudos onde o tratamento antioxidante resultou na agravação do dano oxidativo, piorando a saúde do paciente (HALLIWELL, 2000, 2013). Esses efeitos prejudiciais decorrem de uma interação complexa entre enzimas antioxidantes, seus substratos e o ambiente de reação enzimática, ou seja, as enzimas antioxidantes podem contribuir para os resultados paradoxais catalisando a produção de ERO/espécies reativas de nitrogênio (ERN) ou consumindo equivalentes redutores, esgotando ERO/ERN necessários para a sinalização, ou até mesmo tendo funções de sobreposição com outras enzimas (LEI et al., 2015; POLJSAK; MILISAV, 2012). Essa complicação exemplifica um lado pouco explorado do estresse oxidativo, o “estresse redutor” ou “estresse antioxidante”. Termos propostos por Dündar e Aslan (2000) que referem-se a condição de desequilíbrio redox quando os níveis de antioxidantes ultrapassarem os de espécies reativas (DÜNDAR; ASLAN, 2000), situação que pode desencadear efeitos prejudiciais, especialmente nos casos de consumo excessivo de antioxidantes sintéticos (BJELAKOVIC et al., 2012; HALLIWELL, 2013). No segundo, podemos citar o alto custo de produção, a possível imunogenicidade, problemas associados à purificação e estabilidade, indisponibilidade por via oral e propriedades farmacocinéticas pouco satisfatórias, além de toxicidade, efeitos mutagênicos e possíveis efeitos colaterais (AUGUSTYNIAK et al., 2010; HALLIWELL, 1991).

Na busca de uma alternativa, estudos com compostos capazes de modular fatores de transcrição com papel no código redox vêm ganhando destaque ao atuarem na modulação de redes complexas que controlam a sinalização e o metabolismo celular (JONES; SIES, 2015), sendo um mecanismo muito interessante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças nas quais o estresse oxidativo e a inflamação desempenham um papel importante (CUADRADO et al., 2018; FARHAN et al., 2017; LEVONEN et al., 2014). A título de exemplo, pode-se citar o ensaio clínico realizado por Nelson e colaboradores (2006), que demonstraram a eficácia de Protandim, um composto constituído de múltiplos ativadores fitoquímicos sinérgicos de Nrf2, cuja administração promoveu um aumento de 34% da SOD eritrocitária (NELSON et al., 2006). Estudos como esse demonstram que a busca contínua por agentes terapêuticos é essencial para o estabelecimento de alternativas melhores terapêuticas que atendam as características particulares das mais variadas doenças que envolvam danos oxidativos.

1.7 Ergotioneína

A ergotioneína (ERT) (Figura 4) é um aminoácido natural sintetizado por certos fungos e bactérias (MELVILLE, 1959) e pode ser encontrado em uma ampla gama de alimentos, sendo uma fonte importante na dieta humana (HALLIWELL; CHEAH; TANG, 2018). Apesar de sua biossíntese ser restrita a fungos, cianobactérias e micobactérias, a ERT é encontrada de forma onipresente em animais devido a sua ávida captação pelo receptor ETT (transportador de ERT) (GRÜNDEMANN, 2012), um transportador de cátions orgânicos (antigamente chamado de OCTN1), com um cotransporte de 2 ou 3 íons de Na^+ para cada ERT, descoberto pela primeira vez por Gründemann e colaboradores (GRÜNDEMANN et al., 2005). Esse transportador conservado evolutivamente para a captação de ERT é altamente seletivo (TSCHIRKA et al., 2018; TUCKER; CHEAH; HALLIWELL, 2019) e está presente na maioria das células e tecidos de plantas e mamíferos (CHEAH; HALLIWELL, 2012).

Figura 4. Estrutura dos tautômeros de L- Ergotioneína



L- Ergotioneína (2-mercaptohistidina trimetilbetaína; $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) em solução em pH fisiológico existe predominantemente na forma de tiona (b) em vez de tiol (a). Fonte: adaptado de NACHIMUTHU et al., 2019

Além de sua especificidade alta e distribuição, uma outra característica interessante desse composto é sua meia-vida alta apontada por Cheah e colaboradores (2017), que observaram níveis significativamente elevados de ERT (no sangue) por até quatro semanas após a cessação da administração em humanos. Concomitantemente, os níveis excretados (na urina) são extremamente baixos, indicando uma retenção significativa de ERT pelo corpo (CHEAH et al., 2017). Essa capacidade de se acumular no corpo é parcialmente devido à forma predominante da ERT (tiona) ser mais estável em pH fisiológico, em comparação com outros tióis, como a glutatona (CHEAH; HALLIWELL, 2012).

A ERT apresenta uma ampla gama de propriedades únicas, conferindo uma variedade de capacidades citoprotetoras incluindo: I) a capacidade de desativar o oxigênio singlete com uma taxa maior do que outros tióis, como a glutatona reduzida (GSH), por exemplo (ROUGEE et al., 1988; STOFFELS et al., 2017); II) atua como um depletor do radical hidroxila HO^{\bullet}

(AKANMU et al., 1991; FRANZONI et al., 2006), peroxinitrito (ONOO^-) (ARUOMA et al., 1997; FRANZONI et al., 2006), ácido hipocloroso (HOCl) (AKANMU et al., 1991) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FRANZONI et al., 2006); III) É capaz de quelar cátions metálicos divalentes, como ferro e cobre (HANLON, 1971; ZHU et al., 2011); IV) modular inflamação (LAURENZA et al., 2008; SAKRAK et al., 2008); V) inibir a atividade da enzima mieloperoxidase, um componente chave na lesão tecidual devido à inflamação excessiva (ASAHI et al., 2016); VI) Interagir com outros antioxidantes, em condições de estresse oxidativo, por exemplo, favorecendo a redução de glutathiona oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (ARDUINI; EDDY; HOCHSTEIN, 1990), sugerindo a capacidade da ERT de atuar direta ou indiretamente na manutenção dos níveis de tióis *in vivo* (SONG et al., 2010); VII) promover a redução da ferrilmioglobina/hemoglobina (ARDUINI; EDDY; HOCHSTEIN, 1990) e metahemoglobina (metHb), regenerando a forma ativa da Hb (SPICER; WOOLEY; KESSLE, 1950); VIII) não apresenta toxicidade ou efeitos indesejado associados a sua administração, mesmo em altas doses (CHEAH; HALLIWELL, 2012; HALLIWELL; CHEAH; DRUM, 2016).

Tais observações fortalecem a noção de que ERT tem um enorme potencial para opção terapêutica, especialmente quando o dano oxidativo se torna excessivo como observado por Halliwell e colaboradores (2016). Este estudo demonstrou um aumentando na captação de ERT de uma maneira regulada em resposta ao estresse oxidativo excessivo, constituindo em um mecanismo adaptativo *in vivo* desencadeado para minimizar a propagação dos danos oxidativos (HALLIWELL; CHEAH; DRUM, 2016). Ou seja, especula-se que a ERT não interferiria em respostas fisiológicas importantes das espécies reativas em tecidos saudáveis (TAVERNE et al., 2018), transpondo o “paradoxo antioxidante”, comumente observado em terapias antioxidantes (HALLIWELL, 2000). Devido a essas propriedades supracitadas, recentemente a ERT passou a ser classificada como um "alimento funcional" ou nutracêutico (BORODINA et al., 2020). Termo que origina-se de um amálgama de "nutrição" e "farmacêutico" (BROWER, 1998) e refere-se aos benefícios fornecidos para a saúde quando um alimento ou substância derivada é adicionado em níveis maiores do que uma dieta normal geralmente fornece.

1.8 Célula K562 como modelo biológico de células eritrocitárias

A linhagem de células K562 foi inicialmente estabelecida através de efusão pleural de uma paciente de 53 anos com Leucemia Mielóide Crônica (CML) em 1975 por Lozzio & Lozzio (LOZZIO; LOZZIO, 1975), sendo a primeira linhagem celular estabelecida de leucemia mielóide humana imortalizada (DREXLER, 2001). As células K562 possuem um diâmetro de

aproximadamente 20 μm , apresentam um citoplasma escasso sem grânulos, núcleo central e dois ou mais nucléolos proeminentes (KOEFFLER; GOLDE, 1980). Essas células também expressam em sua superfície a glicoforina, uma sialoglicoproteína encontrada exclusivamente em células eritróides na medula óssea humana (ANDERSSON; NILSSON; GAHMBERG, 1979).

Essa linhagem celular apresenta um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação, quando submetida a diferentes agentes químicos (indutores), em células eritroides, com produção de HbF (TSIFTSOGLU; PAPPAS; VIZIRIANAKIS, 2003), cuja síntese é fortemente aumentada pelo tratamento com hemina, hidroxureia, entre outros agentes (HOFFMAN et al., 1980; RUTHERFORD; CLEGG; WEATHERALL, 1979). Estas características fazem desta uma linhagem celular amplamente utilizada como modelo experimental em estudos de linhagens eritróides *in vitro*, auxiliando a elucidar os mecanismos ainda não conhecidos nesses tipos celulares (CHÉNAIS et al., 2000; DE FRANCESCHI et al., 2011; KAWASAKI et al., 1996).

Esta abordagem metodológica permite estudar diferentes vias bioquímicas que regulam a homeostase destas células e como possíveis agentes em estudo poderiam atuar em diferentes doenças hematológicas. Neste contexto, utilizamos as células K562 como modelo biológico, o que permitiu o estudo de mecanismos importantes de adaptação redox e avaliação da ERT como potencial agente citoprotetor, quando estas células são expostas ao agente oxidante H_2O_2 . Este agente estressor é uma espécie oxidante de grande importância biológica, que medeia sinais de regulação redox, como o de inativação temporária das PRDXs (WINTERBOURN, 2018; WINTERBOURN; HAMPTON, 2015) e, quando em excesso, pode causar danos às células e tecidos (WINTERBOURN, 2013), como em situações de inflamação ou infecção extensa. Além disso, o H_2O_2 pode reagir com metais como o ferro dando origem ao radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o qual é extremamente reativo e ataca rapidamente as biomoléculas no local onde é formado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). Esse fato nos levou a investigar os mecanismos de ação pelos quais a ERT pode atuar no combate ao estresse oxidativo ocasionado pela adição de H_2O_2 como agente estressor, com a finalidade de estabelecê-la como um adjuvante, no tratamento de doenças que apresentam estresse oxidativo como consequência fisiopatológica ou mesmo de doenças causadas por estresse oxidativo.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar possíveis efeitos antioxidantes e/ou moduladores da ERT em cultivo de células eritroides K562 submetidas à indução de estresse oxidativo, baseados nos mecanismos de adaptação redox das vias PI3K/AKT/FOXO3 e Keap1/Nrf2/ARE.

2.1 Objetivos Específicos

- 1) Investigar os efeitos de diferentes concentrações de ERT sobre a viabilidade e níveis de transcritos de células eritroides K562 em diferentes períodos do processo de diferenciação celular, 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 ERT sobre os padrões de expressão de cada via de sinalização redox estudada.

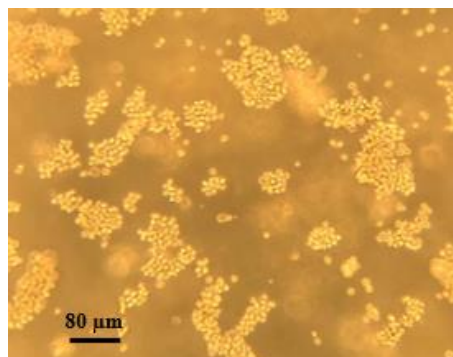
3. METODOLOGIA

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 5) (LOZZIO et al., 1981; LOZZIO; LOZZIO, 1979).

Figura 5. Cultivo de células K562



Células em suspensão de aproximadamente 20μm que foram aglomerados celulares em forma de “cachos de uva” (aumento final de 200X). Fonte: elaborado pelo 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, que 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 e trocando-o quando necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação de células mortas) (**detalhes em 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 hemoglobinas 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 pera, circular, células com vesiculosidades entre outras) (HIETAKANGAS et al., 2003; ISODA et al., 2014; IYAMU et al., 1998; MALIK; CHITAYAT; LANGZAM, 1988; ZHANG et al., 2019). Dessa forma, os compostos indutores foram selecionados, seguindo o protocolo previamente estabelecido por Paula (2020), no qual foi utilizado 50 µM de Hemina e 100 µM 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 hemoglobinas, comprovando a eficácia desses compostos como agentes indutores capazes de reproduzir as características eritroides.

3.3 Indução de 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 (ergotioneína) 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 do processo de diferenciação: antes do início (D0), no início de 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 20 ml de cultura, induzidas à diferenciação eritroides por meio da adição de hemina (50 µM) e hidroxureia (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 ou tratamento com ERT (Referência); células sob indução de estresse com H₂O₂ (100 µM H₂O₂); células tratadas com concentração subfisiológicas de 1 nM (C1) e uma concentração farmacológica 100µM (C2) de ERT, em relação a concentração fisiológica descrita para os eritrócitos (CHAVES et al., 2019); por fim, dois conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados a indução do estresse (C1 + H₂O₂ e C2 + H₂O₂, respectivamente).

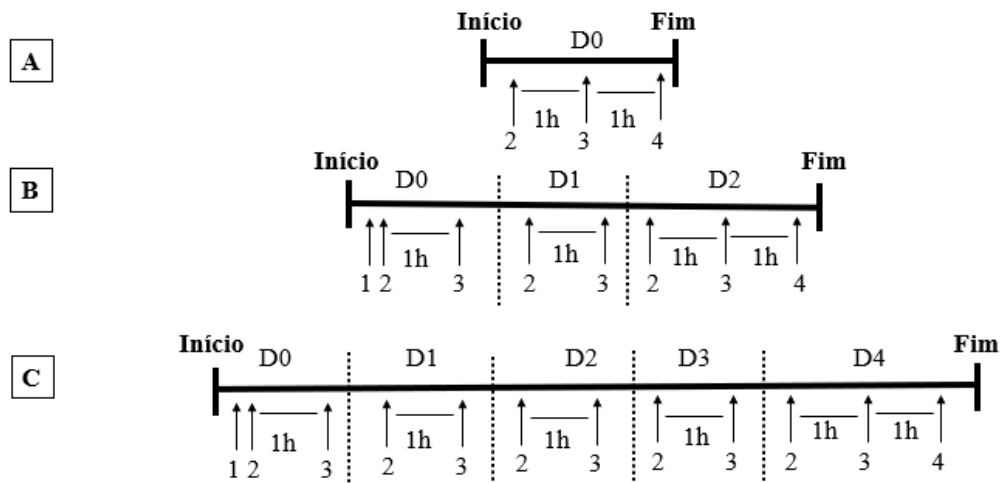
É importante ressaltar que as administrações do antioxidante e do peróxido foram realizadas diariamente e de forma escalonada nos grupos associados (C1+ H₂O₂ e C2+ H₂O₂), ou seja, uma hora após a administração das respectivas concentrações de ERT, foi adicionado o H₂O₂. As amostras foram coletadas após 1 hora da administração do agente estressor, nos dias 0 (D0), 2 (D2) e 4 (D4). Em seguida, o material foi lavado com PBS 1X e centrifugado (13400 rpm a temperatura ambiente por 5 min) para os seguintes fins: i) Contagem de células e determinação da viabilidade celular (TENNANTH, 1964); ii) Identificação da expressão de hemoglobina através do método de benzidina (ROWLEY et al., 1981); iii) Análise de expressão gênica por PCR em tempo real. As condições testadas estão especificadas na Tabela 1 e um resumo do design experimental pode ser observado na figura 6.

Tabela 1 - Condições testadas no experimento

Células Diferenciadas		
Dia 0	Dia 2	Dia 4
K562 Controle (Referência)	K562 Controle (Referência)	K562 Controle (Referência)
K562 Controle + 100 µM de H ₂ O ₂	K562 Controle + 100 µM de H ₂ O ₂	K562 Controle + 100 µM de H ₂ O ₂
K562 Ergotioneína 1 nM (C1)	K562 Ergotioneína 1 nM (C1)	K562 Ergotioneína 1 nM (C1)
K562 Ergotioneína 1 nM (C1) + 100 µM de H ₂ O ₂	K562 Ergotioneína 1 nM (C1) + 100 µM de H ₂ O ₂	K562 Ergotioneína 1 nM (C1) + 100 µM de H ₂ O ₂
K562 Ergotioneína 100 µM (C2)	K562 Ergotioneína 100 µM (C2)	K562 Ergotioneína 100 µM (C2)
K562 Ergotioneína 100 µM (C2) + 100 µM de H ₂ O ₂	K562 Ergotioneína 100 µM (C2) + 100 µM de H ₂ O ₂	K562 Ergotioneína 100 µM (C2) + 100 µM de H ₂ O ₂

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 6. Design Experimental



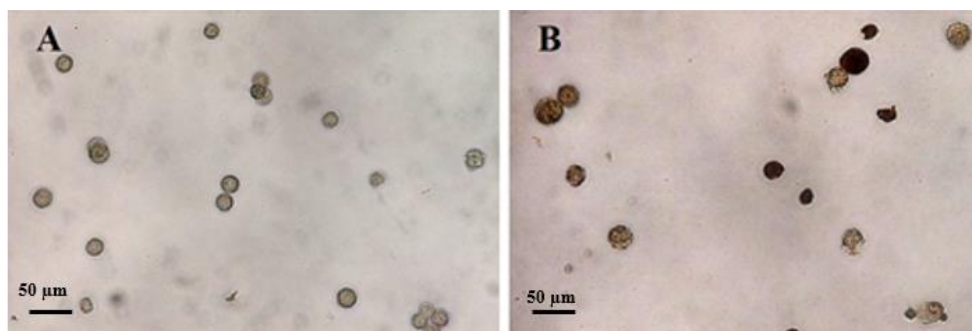
A - Resumo geral do design experimental para os tratamentos avaliados no D0 (dia 0). **B** - Resumo geral do design experimental para os tratamentos avaliados no D2 (dia 2). **C** - Resumo geral do design experimental para os tratamentos avaliados no D4 (dia 4). 1- Indução da diferenciação eritroide foi realizada pela administração dos agentes indutores hemina e hidroxiureia (com exceção do tratamento Referência). 2 – Tratamento com ergotioneína; 3 – Indução do estresse oxidativo pela administração de 100 μ M H₂O₂; 4 – Coleta de material biológico; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: máximo do processo de diferenciação. Fonte: elaborado pelo autor.

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

Para determinação da expressão de hemoglobinas 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 hemoglobina em amostras. O método de benzidina baseia-se na catálise da decomposição do H₂O₂ em água e oxigênio pela hemoglobina 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 ressuscitado 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 (2 mg/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 apresentaram uma cor transparente, muitas vezes levemente marrom, por conta da expressão basal de hemoglobina em células (Figura 7).

Figura 7. Comprovação da diferenciação de células K562 pelo método de benzidina



(A) K562 controle (sem tratamento). (B) K562 4 dias de tratamento com hemina e hidroxiureia (aumento final de 400x). Fonte: elaborado pelo autor

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 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 *DNAse I* (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. 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) (**detalhes no Apêndice B**).

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 μM H_2O_2 , C1 (1nM de ERT), C2 (100 μM de ERT); C1 + 100 μM H_2O_2 ; e C2 + 100 μM H_2O_2 e os dias de coleta de amostras (dia 0, dia 2 e dia 4), enquanto os níveis de transcritos dos genes avaliados foram definidos como variáveis dependentes (QUINN; KEOUGH, 2002).

Como alternativa multivariada de análise de grau de associação, foi adotada a análise de *General Regression Model* (GRM) com desenho de regressão múltipla, implementando mais sobre a relação entre várias variáveis independentes e uma dependente. Essa análise também forneceu a correlação parcial, ou seja, a contribuição individual entre determinada variável e a variável dependente, após o controle para todas as outras variáveis independentes na equação (MCDONALD, 2014). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de seus valores biológicos e $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

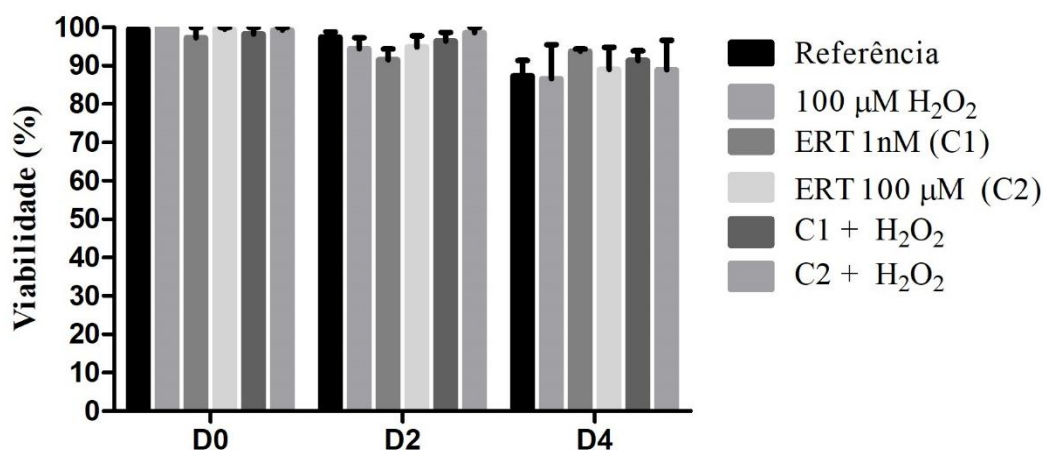
4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular

Ao contrário do esperado, não foi observado qualquer efeito deletério significativo nas células K562 submetidas a indução de estresse oxidativo com H_2O_2 , inviabilizando a avaliação de possíveis efeitos protetores dos tratamentos com ERT sobre a viabilidade celular nos grupos C1 + 100 μM H_2O_2 e C2 + 100 μM H_2O_2 (Figura 8). Por outro lado, é válido destacar que os tratamentos com ERT (C1 e C2) não apresentaram toxicidade com comprometimento da viabilidade das células K562, também em nenhum dos períodos de diferenciação (Figura 8). Assim, a viabilidade variou de 77,7% a 100% em todas as situações experimentais testadas.

Figura 8. Viabilidade das células K562 diferenciada nas diferentes condições experimentais testadas



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100 μM H_2O_2 : Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100 μM de ERT; C1 + 100 μM H_2O_2 e C2 + 100 μM H_2O_2 : conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: máximo do processo de diferenciação. Fonte: elaborado pelo autor

4.2 Análise de expressão gênica de agentes antioxidantes importantes em células eritroides

Como visto anteriormente, a ERT tem sido amplamente estudada pelo seu papel direto e indireto como antioxidante. Seu papel direto de servir como um antioxidante e protetor celular contra vários tipos de espécies reativas de oxigênio é o mais amplamente estudado e reconhecido (BORODINA et al., 2020). Já os estudos que abordam sua via indireta são menos frequentes, mas não deixam de fornecer informações importantes. Os dados gerados por essas pesquisas resultam, atualmente, em uma seleção de determinantes que têm suas concentrações ou atividades alteradas quando a ERT é adicionada ao sistema de interesse.

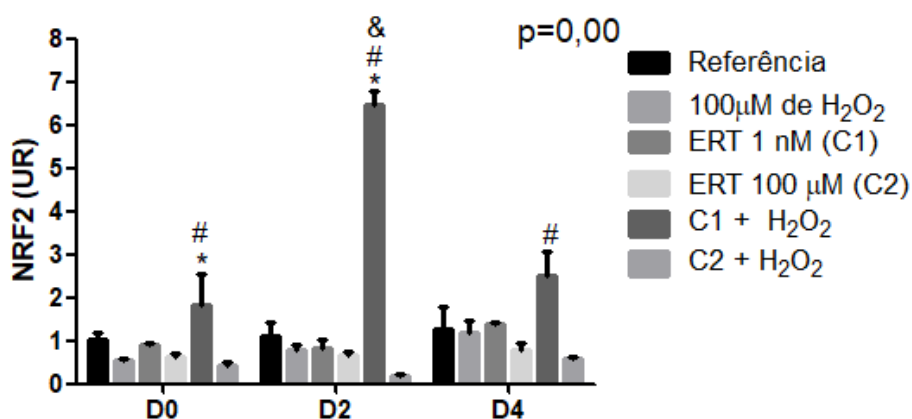
Diante disso, foram quantificados os níveis de transcritos dos genes dos participantes integrais das vias de sinalização Keap1/Nrf2-ARE e MST1-FOXO3, bem como dos genes de

enzimas antioxidantes moduladas por estas vias, que compõe estruturas operacionais centrais da biologia redox, a fim de avaliar se estas são capazes de modular a expressão de enzimas antioxidantes em células K562, bem como quaisquer efeitos do tratamento com ERT em diferentes concentrações. Em resumo, foi analisada a expressão de RNAm através de PCR em tempo real dos genes dos fatores de transcrição Nrf2 e FOXO3, do sensor de estresse oxidativo Keap1, da chaperona 14-3-3, da cinase MST1 e das enzimas antioxidantes: PRDX1, PRDX2, PRDX6, SOD1, CAT, GPx1 e Trx.

4.2.1 Via Keap1/Nrf2/ARE

Dentre as expressões relativas de Nrf2, foi observado que, a expressão nos grupos de referência se mostrou constante ao longo dos períodos de diferenciação avaliados. Por outro lado, a associação da menor concentração testada de ERT (C1 – 1 nM) com o agente estressor (100 μ M de H₂O₂) apresentou os maiores níveis de transcritos observados, revelando efeitos intrigantes como do período de diferenciação (D2) quando comparado aos demais períodos (D0 e D4); efeito do tratamento (C1+H₂O₂) dentro de cada período de diferenciação e efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo dentro de cada período avaliado (Figura 9). Tais observações reforçam o efeito citoprotetor da ERT quando as células estão sob estresse metabólico induzido pelo H₂O₂, sugerindo um condicionamento da ação da ERT.

Figura 9. Expressão relativa do gene Nrf2 em células eritroides K562



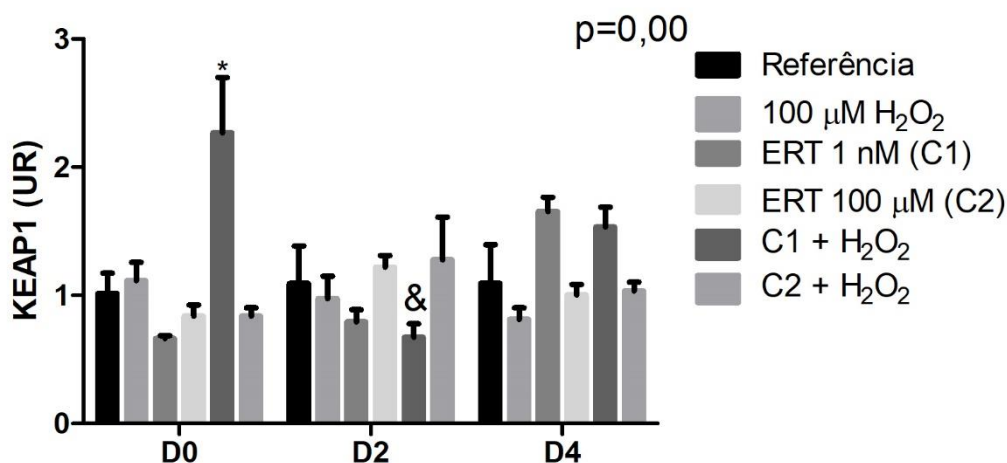
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0. Fonte: elaborado pelo autor

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: *Efeito do tratamento C1 + 100 μ M H₂O₂ dentro de cada período; #Efeito do período de diferenciação (D2) comparado ao mesmo tratamento (C1 + 100 μ M H₂O₂) nos demais períodos de diferenciação; &Efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100 μ M H₂O₂).

Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM). *General Linear Models* (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni

No geral, para o sensor molecular Keap1, proteína responsável pelo controle da expressão de Nrf2 e, conseqüentemente, da indução da expressão de enzimas importantes antioxidantes, também foi observada uma expressão constante ao longo dos períodos de diferenciação avaliados nos grupos de referência. No entanto, um pico de expressão do RNAm desse sensor pode ser observado no dia 0 do tratamento com a menor concentração de ERT (C1) sob indução de estresse (Figura 10), demonstrando um efeito do tratamento (C1+H₂O₂) dentro deste período de diferenciação e efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada à maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo dentro de cada período avaliado. Além disso, esse mesmo tratamento (C1+H₂O₂) há uma redução significativa dos níveis de transcrito no início do processo de diferenciação (D2) em relação ao mesmo tratamento no D0, padrão similar pode ser observado no dia 4, apesar de não significativo.

Figura 10. Expressão relativa do gene Keap1 em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100 μ M H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100 μ M de ERT; C1 + 100 μ M H₂O₂ e C2 + 100 μ M H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: *Aumento dos níveis de transcritos no grupo C1 + 100 μ M H₂O₂ em relação aos demais dentro do período D0 (exceto grupo 100 μ M H₂O₂); &Efeito do período de diferenciação (D2) comparado ao mesmo tratamento (C1 + 100 μ M H₂O₂) apenas no D0.

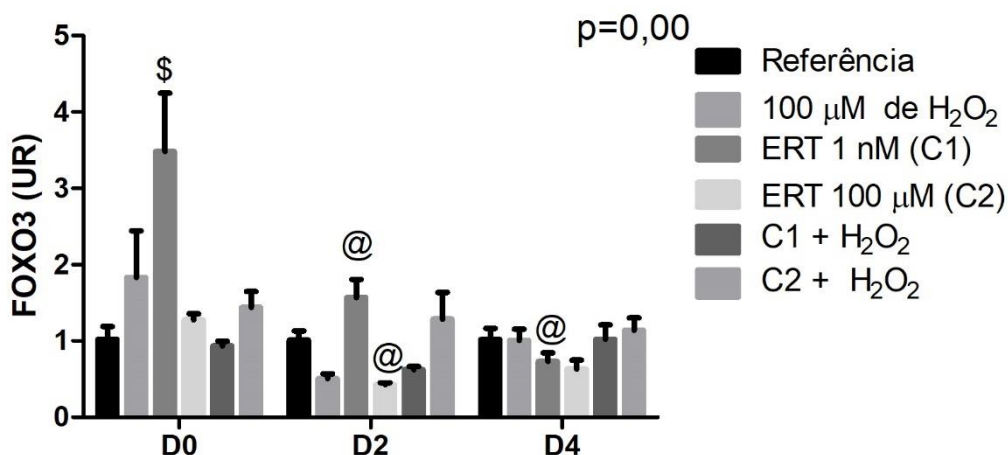
Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.2 FOXO3 e reguladores de sua localização subcelular

Os tratamentos com ERT exerceram diferentes efeitos sobre os níveis de transcritos do gene do FOXO3, de acordo com a concentração testada e período de diferenciação celular, na ausência do agente indutor de estresse. O tratamento com a menor concentração de ERT (C1) promoveu a indução da expressão do FOXO3 quando comparado aos demais tratamentos no mesmo período de diferenciação (D0) e, curiosamente, apenas neste período. Já a maior concentração testada (C2) promoveu uma redução dos níveis de transcritos no início do processo de diferenciação, se mantendo baixa até o final do experimento (Figura 11). Apesar de não significativo, pode-se observar um padrão de redução da expressão desse fator de transcrição no tratamento ERT C1 + 100 μ M H₂O₂ quando comparado com ERT C2 + 100 μ M H₂O₂ (dias 0 e 2).

Figura 11. Expressão relativa do gene FOXO3 em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100 μ M H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100 μ M de ERT; C1 + 100 μ M H₂O₂ e C2 + 100 μ M H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

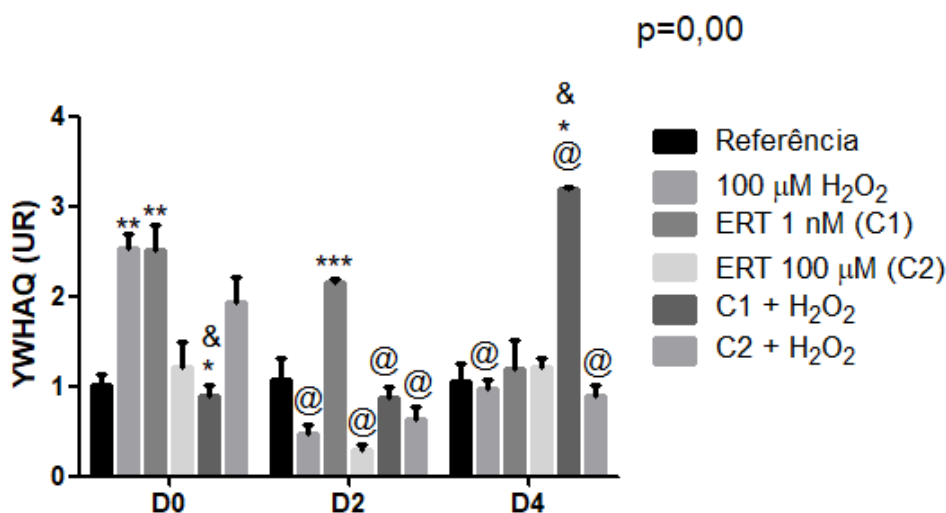
Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: ^{\$}Efeito da menor concentração de ERT (C1) dentro de cada período; [@]Efeito do período de diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0. Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

Em relação a chaperona 14-3-3 (Figura 12), obteve-se um efeito do período de diferenciação, quando comparado a sua contraparte em D0, com uma redução da expressão nos

dias 2 e 4 para o tratamento C2 + 100 μM H_2O_2 e um aumento no dia 4 para o tratamento C1 + 100 μM H_2O_2 . Em outras palavras, a menor concentração (C1) parece induzir a expressão do gene da chaperona durante o processo de diferenciação celular, enquanto o comportamento oposto é observado para a maior concentração de ERT, ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100 μM H_2O_2). Por fim, é possível observar, no dia 0, um aumento da expressão gênica nos tratamentos Peróxido e ERT C1, quando comparada com a referência, demonstrando um efeito desses tratamentos que não é mais observado nos demais períodos avaliados.

Figura 12. Expressão relativa do gene YWHAQ em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100 μM H_2O_2 : Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100 μM de ERT; C1 + 100 μM H_2O_2 e C2 + 100 μM H_2O_2 : conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: *Efeito do tratamento C1 + 100 μM H_2O_2 dentro de cada período, comparado aos tratamentos com peróxido (100 μM H_2O_2) e ERT C1; ** Efeito do tratamento dentro de cada período, comparado a referência; *** Efeito do tratamento dentro de cada período, comparado ao tratamento com peróxido; & Efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100 μM H_2O_2); @ Efeito do período da diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0.

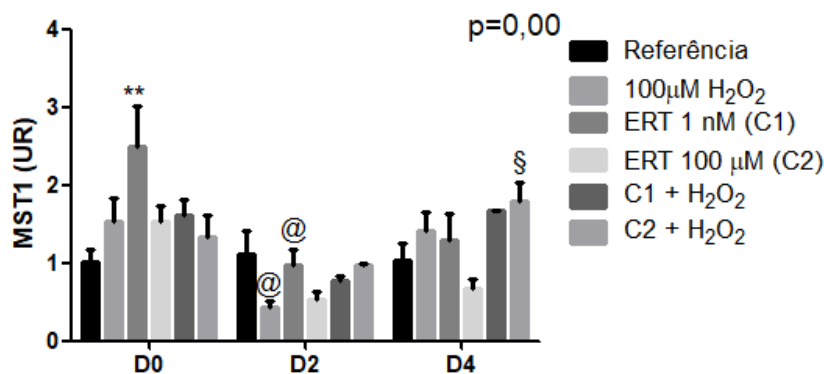
Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

A expressão do gene da cinase MST1 (Figura 13), se manteve constante ao longo dos dias na referência, seguindo o mesmo padrão da chaperona e do FOXO3. Nos tratamentos peróxido e ERT C1 foi observada uma diminuição da expressão dessa cinase no dia 2. Ainda no dia 2, é possível observar um possível efeito citoprotetor da ERT. Essa ação protetora pode ser sugerida pela combinação dos perfis de expressão dos grupos, em relação ao FOXO3 e as

duas proteínas moduladoras de sua localização subcelular analisadas (MST1 e 14-3-3), principalmente no tratamento ERT C2 + H₂O₂, pois observa-se um aumento FOXO3 e MST1, concomitantemente com uma diminuição da 14-3-3, padrão sugestivo de ativação da via.

Figura 13. Expressão relativa do gene MST1 em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: ** Efeito do tratamento ERT C1 dentro de cada período, comparado referência; § Efeito da maior concentração de ERT (C2) associada à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂) comparada ao tratamento C2; @ Efeito do período de diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0.

Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

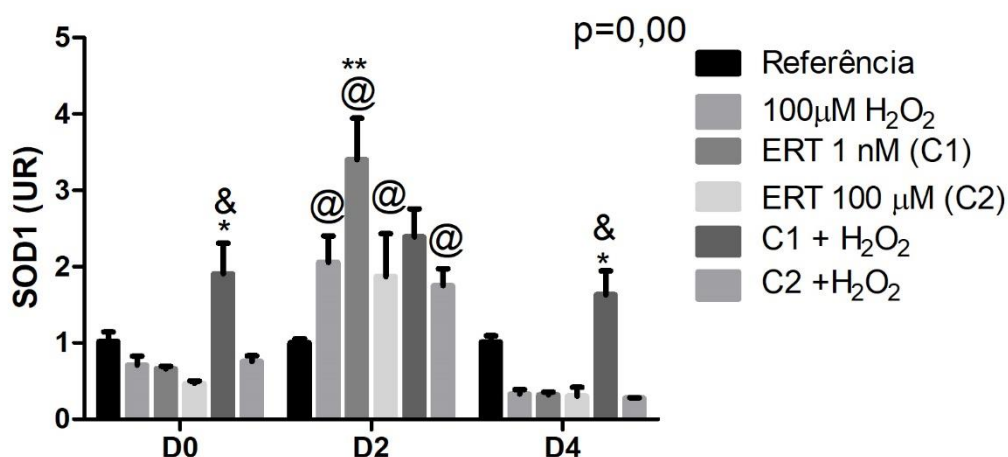
General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.3 Expressão dos genes das enzimas antioxidantes

4.2.3.1 Superóxido Dismutase 1

Como apresentado na figura 14, foi observado um aumento da expressão do gene da enzima antioxidante SOD1 no dia 2 nos tratamentos Peróxido, ERT C1, ERT C2 e ERT C2 + 100µM H₂O₂, enquanto nos demais tratamentos (Referência e ERT C1 + 100µM H₂O₂) foi observado uma manutenção da expressão do gene SOD1, ou seja, se manteve estável independente do período de diferenciação. Também é possível observar um aumento da expressão no tratamento ERT C1, no dia 2, quando comparado com a referência, e um aumento nos dias 0 e 4 no tratamento ERT C1 + 100µM H₂O₂, quando comparado com tratamento com peróxido. Por fim, pode-se observar um efeito combinado da menor concentração de ERT e peróxido (C1 + 100µM H₂O₂) quando comparado aos tratamentos Peróxido e ERT C2 + 100µM H₂O₂.

Figura 14. Expressão relativa do gene Superóxido Dismutase (SOD1) em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: *Efeito do tratamento C1 + 100µM H₂O₂ dentro de cada período, comparado a tratamento com peróxido (100µM H₂O₂); **Efeito do tratamento C1 comparado a referência; & Efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂); @ Efeito do período de diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0 e D4.

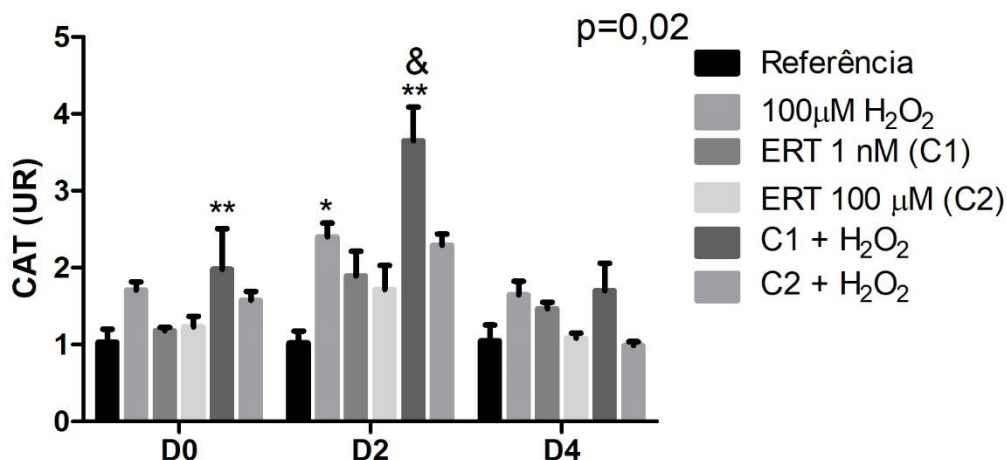
Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.3.2 Catalase

Foi observado um aumento da expressão do gene CAT, no dia 2 do tratamento Peróxido, quando comparado com a referência. Também pode-se verificar um aumento da expressão relativa desse RNAm, nos dias 0 e 2, do tratamento ERT C1 + 100µM H₂O₂, em comparação com a referência e com o tratamento ERT C2 + 100µM H₂O₂ (dia 2), como pode ser observado na figura 15. Neste último caso, observamos um efeito da ERT dependente da adição de peróxido (100µM H₂O₂).

Figura 15. Expressão relativa do gene Catalase (CAT) em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associadas com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: *Efeito do tratamento Peróxido, no dia 2, comparado a referência; **Efeito do tratamento C1 + 100µM H₂O₂ dentro de cada período, comparado referência; & Efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂).

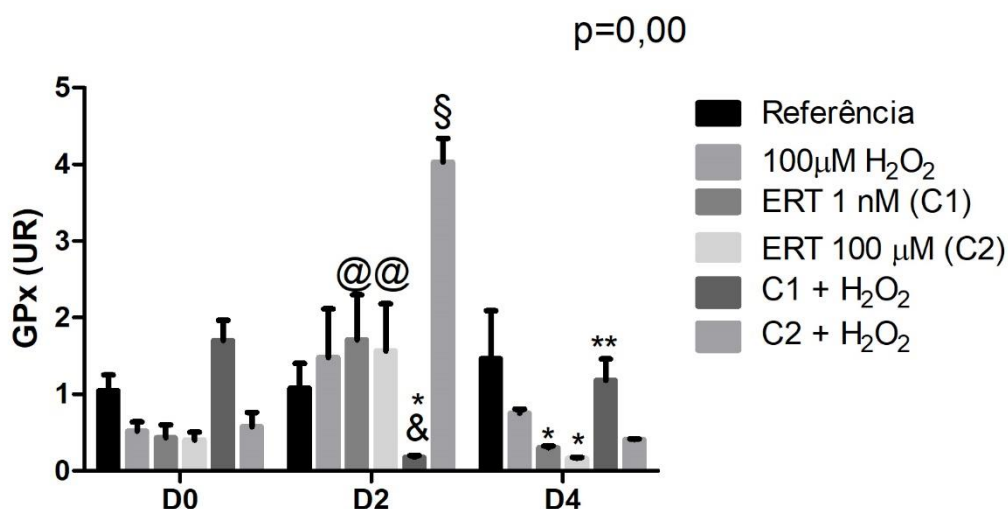
Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.3.3 *Glutathione Peroxidase 1*

No presente trabalho, pode-se observar que nos tratamentos ERT C1 e C2, houve um aumento da expressão desse gene no dia 2, quando comparado ao D0 e D4, demonstrando um efeito do período de diferenciação. Um efeito muito interessante pode ser observado, no dia 2, no qual as alterações na transcrição desse gene dependem da concentração de ERT administrada, sendo que a menor concentração (C1) inibiu, drasticamente, a expressão desse gene, enquanto na maior concentração (C2), vemos um aumento substancial do mesmo (Figura 16), ambas sob indução de tratamento com H₂O₂, enquanto o oposto pode ser observado de forma mais sutil no dia 4 e, apesar de não significativo o mesmo pode ser observado no dia 0.

Figura 16. Expressão relativa do gene Glutathiona Peroxidase 1 (GPx1) em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associadas com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: @ Efeito do período de diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0 e D4. *Efeito do tratamento, dentro de cada período, comparado ao tratamento com peróxido (100µM H₂O₂); **Efeito da menor concentração de ERT (C1), no dia 4, comparado a maior concentração (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂); & Diminuição da expressão gênica resultante do efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂). § Aumento da expressão gênica resultante do efeito da maior concentração de ERT (C2) comparada a menor (C1), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂).

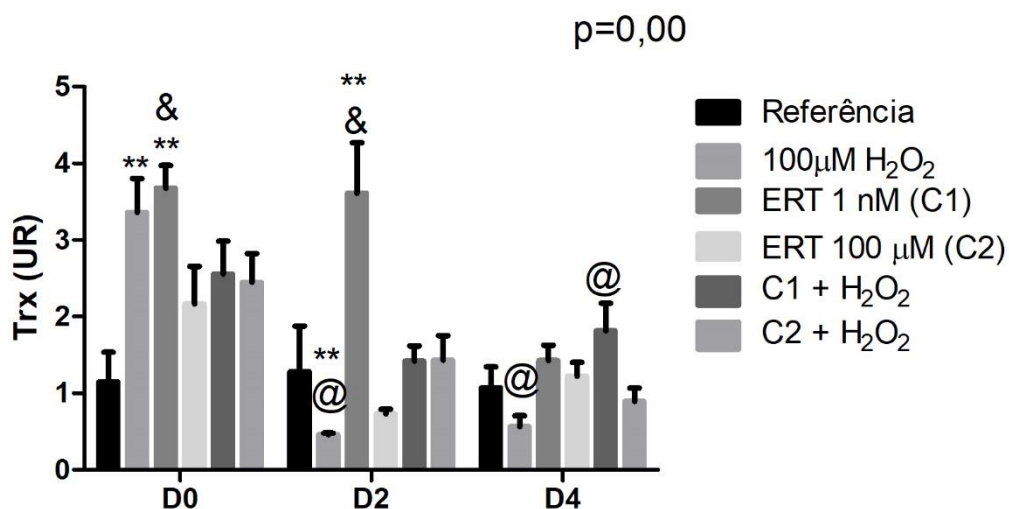
Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.3.3 Tiorredoxina (*Trx*)

No tratamento Peróxido, pode-se observar uma diminuição do RNAm de *Trx* nos dias 2 e 4 demonstrando um efeito da diferenciação eritroide. No tratamento ERT C1 pode-se observar um aumento da expressão dessa enzima nos dias 0 e 2, em relação a referência. Além disso, pode-se observar um aumento da expressão em ERT C1 quando comparado com o tratamento ERT C2, no dia 2. Por fim, apesar de não significativo, nos tratamentos C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂ pode-se observar um padrão de prevenção da redução da expressão relativa do gene desta enzima (dia 2), quando comparada ao tratamento Peróxido (Figura 17).

Figura 17. Expressão relativa do gene Tiorredoxina (Trx) em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: ** Efeito do tratamento dentro de cada período, comparado referência; & Efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), dentro de cada período; @ Efeito do período de diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0.

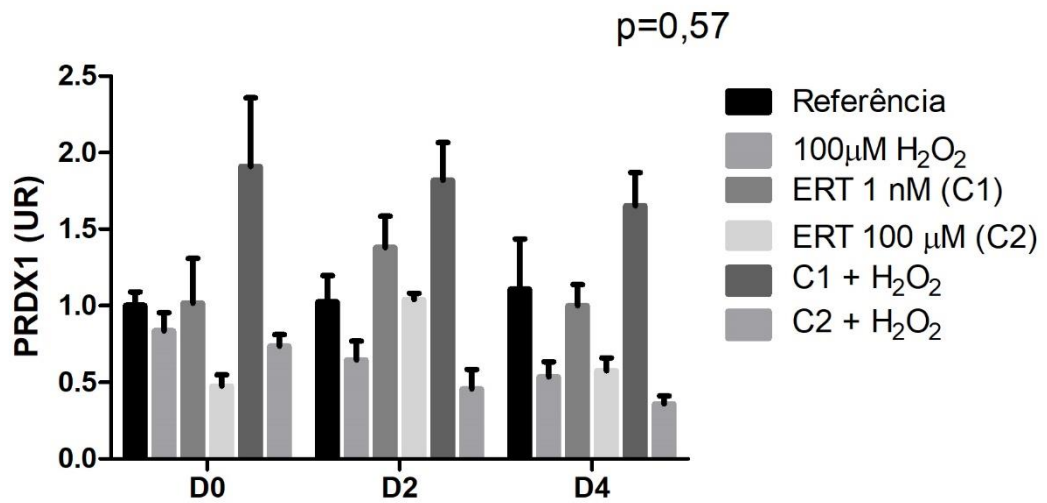
Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM).

General Linear Models (GLM) com formato ANOVA *two-way*, complementado pelo teste de Bonferroni. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.3.4 Peroxirredoxinas (PRDXs)

Como pode ser observado na figura 18, a expressão da PRDX1 não apresentou variações estatisticamente significativas entre os tratamentos ou períodos de diferenciação. Apesar disto, pode-se observar um padrão antagônico de expressão do gene desta enzima de acordo com a concentração de ERT administrada, sempre em associação com o peróxido. Em outras palavras, um padrão de indução na menor concentração e de inibição da expressão na maior concentração de ERT, principalmente nos dias 2 e 4.

Figura 18. Expressão relativa do gene Peroxirredoxina 1 (PRDX1) em células eritroides K562

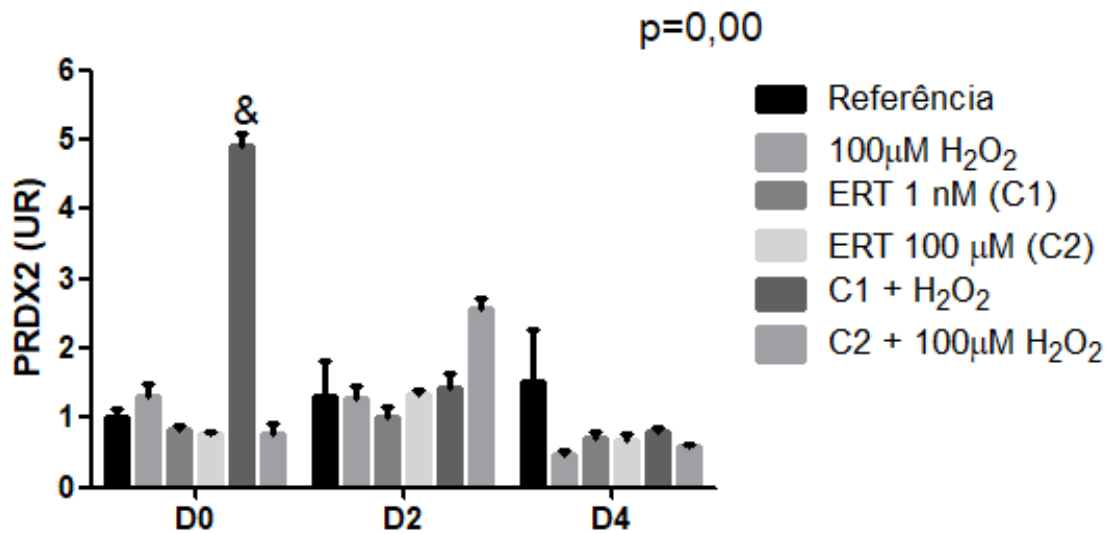


Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM). *General Linear Models* (GLM) com formato ANOVA *two-way*. Fonte: elaborado pelo autor

Já quando analisada a expressão da PRDX2 (Figura 19), pode-se observar que, no geral, este antioxidante apresentou expressão constante, em torno de 1, em todos os tratamentos no decorrer dos dias, com exceção do tratamento ERT C1 + 100µM H₂O₂ (dia 0), tratamento no qual há um aumento da expressão relativa do gene desta enzima e, apesar de não significativo um mesmo padrão pode ser observado, no dia 2, para o tratamento ERT C2 + 100µM H₂O₂.

Figura 19. Expressão relativa do gene Peroxirredoxina 2 (PRDX2) em células eritroides K562



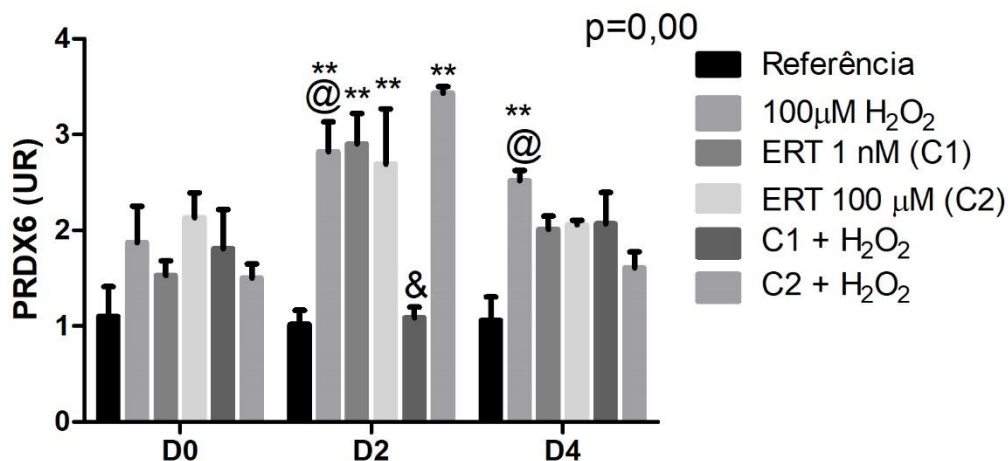
Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

O símbolo indica a seguinte diferença estatística: & Efeito do tratamento ERT C1 + 100µM H₂O₂ comparada a todos os tratamentos.

Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM). *General Linear Models* (GLM) com formato ANOVA *two-way* Fonte: elaborado pelo autor

Quando analisada a expressão da PRDX6 (Figura 20), pode-se observar uma manutenção da expressão do gene desse antioxidante na referência e um aumento da expressão decorrente do efeito do período da diferenciação no tratamento Peróxido. Além disso, pode-se observar um aumento dos níveis de transcritos nos tratamentos Peróxido, ERT C1, ERT C2 e ERT C2 + 100µM H₂O₂, no dia 2, em relação a referência. Também é possível observar um efeito interessante da menor concentração de ERT (C1) e peróxido, no dia 2, no qual temos uma diminuição da expressão do gene desta enzima antioxidante, sendo restaurada a concentração fisiológica (semelhante ao observado na referência).

Figura 20. Expressão relativa do gene Peroxirredoxina 6 (PRDX6) em células eritroides K562



Referência: Células K562 sem indução de estresse oxidativo e não tratadas com ERT; 100µM H₂O₂: Células sob indução de estresse com peróxido de hidrogênio; C1: células tratadas com 1 nM de ergotioneína (ERT); C2: células tratadas com 100µM de ERT; C1 + 100µM H₂O₂ e C2 + 100µM H₂O₂: conjuntos de células tratados com as mesmas concentrações de ERT associados com a indução do estresse; D0: antes do processo de diferenciação, D2: início de diferenciação celular; D4: final do processo; UR: Unidade Relativa – *fold-change* dos transcritos relativos ao subgrupo Referência no D0.

Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: ** Efeito do tratamento dentro de cada período, comparado referência; & Efeito da menor concentração de ERT (C1) comparada a maior (C2), ambas associadas à indução de estresse oxidativo (100µM H₂O₂). @ Efeito do período de diferenciação dentro de cada tratamento, comparado a sua contraparte em D0.

Os valores representativos das três pseudorréplicas foram expressos como média com erro padrão (\pm SEM). *General Linear Models* (GLM) com formato ANOVA *two-way*. Fonte: elaborado pelo autor

4.2.4 Associações entre as expressões gênicas dos membros de vias redox e dos antioxidantes analisados em células eritróides

A análise de GRM fornece o grau de associação entre um conjunto de variáveis independentes inter-relacionadas e uma variável dependente, por meio de associação múltipla (R). Em outras palavras, o coeficiente R indica a contribuição do grupo indicado como independente no aumento ou diminuição dos níveis do dependente. Dentre os resultados de GRM, destaca-se a importância das vias redox analisadas na produção de genes de enzimas antioxidantes (com exceção da PRDX6 cuja correlação não foi significativa) e, conseqüentemente, da manutenção da integridade celular e homeostase redox em células eritroides K562. Os resultados obtidos nesta análise podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Associação múltipla entre as expressões relativas de membros de vias redox essenciais para a defesa antioxidante em células eritroides e suas respectivas enzimas antioxidantes

Variável dependente	Variáveis Independentes
	<i>Membros da via FOXO3 e Nrf2</i>
PRDX1	R= 0,81; P=0,00
PRDX2	R= 0,77; P=0,00
PRDX6	R= 0,35; P=0,24
SOD1	R= 0,46; P=0,03
CAT	R= 0,66; P=0,00
GPx1	R= 0,45; P=0,04
Trx	R= 0,75; P=0,00

R: coeficiente da associação múltipla (análise *General Regression Model*, design regressão múltipla); P < 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo (em negrito). Fonte: elaborado pelo autor

Foi possível, ainda observar as associações individuais de cada variável independente testada sobre a variável dependente (r), como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Associações individuais entre os membros das vias de sinalização redox e os genes dos antioxidantes analisados

Variável dependente	Variáveis independentes				
	<i>Nrf2</i>	<i>Keap1</i>	<i>FOXO3</i>	<i>MST1</i>	<i>14-3-3</i>
PRDX1	r = 0,72; P=0,00	r = 0,49; P=0,00	r = 0,23; P=0,10	r = -0,25; P=0,06	r = 0,18; P=0,03
PRDX2	r = 0,28; P=0,04	r = 0,69; P=0,00	r = 0,29; P=0,03	r = 0,07; P=0,58	r = -0,25; P=0,00
SOD1	r = 0,31; P=0,02	r = 0,15; P=0,27	r = 0,11; P=0,41	r = -0,32; P=0,01	r = 0,08; P=0,49
CAT	r = 0,63; P=0,00	r = 0,10; P=0,45	r = 0,08; P=0,55	r = -0,19; P=0,18	r = -0,07; P=0,46
GPx1	r = -0,24; P=0,08	r = 0,33; P=0,01	r = 0,09; P=0,49	r = -0,20; P=0,15	r = -0,10; P=0,41
Trx	r = 0,04; P=0,74	r = 0,26; P=0,06	r = 0,45; P=0,00	r = -0,04; P=0,76	r = 0,49; P=0,00

r: coeficiente de correlação parcial que demonstra o efeito individual de cada variável independente testada. P<0,05 foi considerado como estatisticamente significativo (em negrito). Fonte: elaborado pelo autor

Dentre os resultados de GRM, vale destacar as associações individuais entre os níveis de transcritos dos genes PRDX1, SOD1 e CAT com o do fator de transcrição Nrf2. Em outras palavras, a via Keap1/Nrf2/ARE apresentou maior contribuição ou envolvimento na produção dos RNAm dessas enzimas. Já a via FOXO3-MST1 parece estar associada com a produção das enzimas PRDX2 e Trx, em as células eritroides K562.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As propriedades únicas do aminoácido de ocorrência natural, *L*-ergotioneína (ERT; 2-mercaptotimidina trimetilbetaína), desde sua descoberta, intrigaram os pesquisadores por mais de um século (CHEAH; HALLIWELL, 2012). Apesar de seu papel fisiológico ainda não estar bem estabelecido, há cada vez mais indícios do seu envolvimento na homeostase de células eritroides. Estudos em modelos eritroides demonstraram que a ausência de seu transportador implicou no comprometimento dos processos de proliferação e diferenciação em células K562 (NAKAMURA et al., 2007); é abundantemente acumulado em células hematopoiéticas (TSCHIRKA et al., 2018), sendo inclusive o segundo tiol mais abundante em eritrócitos maduros (SUH et al., 2009), cujas razões para esta abundância em tecidos hematopoiéticos ainda são desconhecidas. Curiosamente, a HbS, que aumenta a atividade pró-oxidante da Hb, esgota seletivamente a ERT em relação a GSH, sugerindo uma função especializada na proteção de hemácias (KUYPERS, 2014), principalmente as falcêmicas, uma vez que essas apresentam níveis duas vezes diminuídos desse antioxidante (CHAVES et al., 2019).

Além disso, estudos têm sugerido que a ERT é preferencialmente acumulada em tecidos predispostos ao estresse oxidativo e à inflamação e pode até mesmo estar concentrada em locais de lesão tecidual por modulação celular dos níveis de ETT (CHEAH et al., 2016; HALLIWELL; CHEAH; DRUM, 2016; HALLIWELL; CHEAH; TANG, 2018; TANG et al., 2018). Essas capacidades únicas da ERT, que foram relatadas em uma ampla gama de estudos em células, modelos animais e também estudos populacionais, sugerem que as habilidades citoprotetoras de ERT podem ser úteis contra inúmeros distúrbios humanos (CHEAH; HALLIWELL, 2020). Mediante ao exposto, o presente estudo, até onde sabemos, produziu uma oportunidade única para compreensão de mecanismos possíveis de ação da ERT sobre processos de proliferação, diferenciação e adaptação redox em células eritroides K562, com a finalidade de fornecer subsídios para o seu uso como um adjuvante no tratamento de doenças hematológicas que apresentam estresse oxidativo como consequência fisiopatológica.

Durante todos os dias experimentais foi mantida uma viabilidade celular alta, independente da adição do agente protetor (ERT) e do agente estressor (H_2O_2). A baixa mortalidade observada no tratamento com o agente estressor ($100 \mu M H_2O_2$) pode ser explicada pela produção endógena de agentes antioxidantes durante a diferenciação induzida por hemina (CHÉNAIS et al., 2000). Essa produção é associada ao conjunto de alterações morfológicas e fisiológicas desencadeadas pelo processo de diferenciação celular induzido pela administração de hemina e hidroxireia que resultam em um aumento da complexidade desse tipo celular

(HIETAKANGAS et al., 2003; ISODA et al., 2014; IYAMU et al., 1998; MALIK; CHITAYAT; LANGZAM, 1988; ZHANG et al., 2019).

O fator de transcrição FOXO3 está envolvido na regulação de atividades cruciais para a manutenção das células eritroides, podendo ser considerado fator imprescindível para a manutenção da homeostase celular durante o processo de hematopoiese. As redes de sinalização de FOXO3, seus reguladores e coativadores em células-tronco hematopoiéticas e em progenitoras eritroides atuam de modo a integrar e transmitir múltiplos sinais que cooperam para regular o programa de expressão gênica das células eritroides (LIANG; MENON; GHAFFARI, 2019; MENON; GHAFFARI, 2018). Dentre as atividades exercidas por esse fator de transcrição, podemos citar a proliferação, diferenciação e regulação transcricional na maturação eritroblástica terminal (MENON; GHAFFARI, 2018; MIYAMOTO et al., 2007; THANUTHANAKHUN et al., 2017; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

Neste contexto, por mecanismo ainda não elucidado, Nakamura e colaboradores (2007) apresentaram dados que sugerem a atuação da ERT nos processos de diferenciação, maturação e/ou crescimento de células eritroides, uma vez que a ausência desse tiol culminou na diminuição destes processos em células K562 (NAKAMURA et al., 2007). Assim, o presente trabalho possibilitou, pela primeira vez na literatura, a sugestão de um mecanismo regulatório para essa associação entre ERT e FOXO3 em células eritroides. Assim, propõe-se que a menor concentração de ERT atue, indiretamente, na proliferação eritroide, através da indução da expressão gênica do fator de transcrição FOXO3 associada à indução de um de seus genes-alvos, a Trx, evidenciado pela elevação dos níveis de transcritos desses genes nos dias 0 e 2 do tratamento ERT C1.

Além de modular diferentes processos celulares, incluindo a proliferação celular (XIE et al., 2019), a Trx é um dos principais tampões redox celulares, tem sua expressão relativa comprovadamente associada a FOXO3, como demonstrado pela análise de associação múltipla, que até o presente momento havia sido reportada em células endoteliais de aorta bovina (OLMOS et al., 2013). A partir desses resultados, há evidências importantes para o estabelecimento da ERT como um potencial agente terapêutico ao modular a expressão de FOXO3, um regulador positivo não apenas da diferenciação eritroide, mas também da expressão de γ -globina (ZHANG et al., 2018), cuja administração seria especialmente benéfica para hemoglobinopatias, como a doença falciforme, grupo de doenças hereditárias cuja opções terapêuticas disponíveis atualmente são extremamente limitadas (TORRES; CONRAN, 2018). A relação ERT-FOXO3-Trx também é importante para a manutenção da homeostase redox,

pois ao controlar a biodisponibilidade da Trx, essa via contribui, indiretamente, com as reações de redução das PRDXs (com exceção da PRDX 6, que é reduzida pela GSH) (WINTERBOURN, 2018; WINTERBOURN; HAMPTON, 2015), o que reforça os benefícios terapêuticos da ERT.

A influência da ERT sobre o fator de transcrição Nrf2 já havia sido relatada na literatura por Hseu e colaboradores (2015), estudo no qual os autores demonstraram que o tratamento com 125-500 nM de ERT induziu a ativação a via Nrf2-ARE em queratinócitos submetidos a irradiação de 15 J/cm² UVA, protegendo estas células contra o estresse oxidativo (HSEU et al., 2015). Em células eritroides K562, a ERT apresentou um papel citoprotetor interessante contra o meio oxidativo gerado pela adição de peróxido, por meio da ativação da via NFR2-ARE. As células K562 tratadas com a menor concentração de ERT e submetidas a estresse oxidativo (Tratamento C1 + 100µM de H₂O₂) apresentaram aumento dos níveis de transcritos do NRF2, PRDX1, SOD1 e CAT em todos os dias avaliados e PRDX2 no dia 0. A associação desse fator de transcrição com o padrão de expressão desses antioxidantes foi confirmada por meio da análise de GRM.

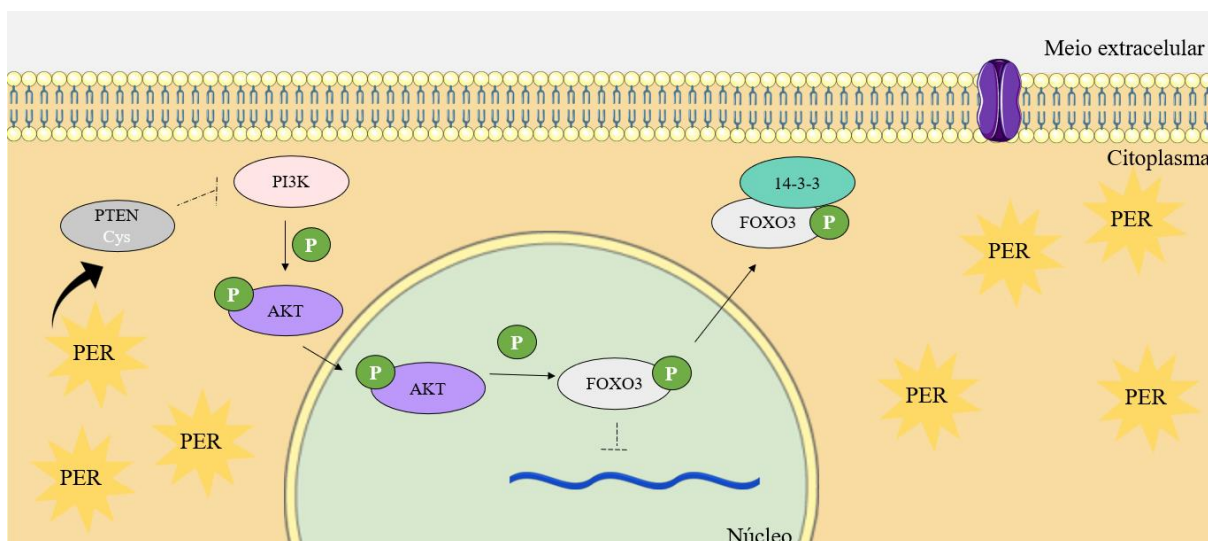
Já nas células K562 tratadas com a maior concentração de ERT testada, quando submetidas ao tratamento com H₂O₂ (C2 + 100 µM de H₂O₂), pode-se observar uma relação interessante entre ERT, o fator de transcrição FOXO3 e seus reguladores de localização subcelular. Dados que demonstraram que no tratamento ERT C2 + 100 µM H₂O₂, o fator de transcrição FOXO3 parece estar relacionado com a indução das expressões dos genes da PRDX2 e 6 e GPx1, no dia 2, sugerindo possível ação indireta da ERT no combate do H₂O₂, ao estimular a expressão do fator FOXO3 e da cinase MST1 e diminuir a expressão da chaperona 14-3-3, consequentemente ativando a via de proteção redox MST1-FOXO3.

Os resultados apresentados no presente trabalho possibilitaram a proposição de um mecanismo regulatório no qual a ERT influencia na expressão de enzimas antioxidantes e, consequentemente na resposta antioxidante de células eritroides incubadas com 100 µM de H₂O₂, partindo do pressuposto de que padrões semelhantes aos dos transcritos estejam expressos em nível proteico. Além disso, o modelo de regulação proposto sugere a existência de uma relação dinâmica entre as vias de sinalização redox dos fatores de transcrição investigados acionados como parte de uma resposta adaptativa a adição do H₂O₂.

Esse mecanismo regulatório proposto é complexo e envolve múltiplas etapas, iniciando-se com a sinalização celular gerada pelo próprio peróxido, composto internalizado através de canais de aquaporinas (KINGSLEY et al., 2013; WEI et al., 2015), resultando em um meio

intracelular oxidativo. O H_2O_2 tem a capacidade de causar a oxidação reversível de resíduos Cys redox-sensíveis nos sítios ativos de PTEN (proteína modificadora da localização subcelular de FoxO3 – atua como importante inibidora da PI3K e, conseqüentemente um regulador negativo da AKT) inativando-as de forma transitória, o que resulta na modulação negativa do FoxO3 mediada pela sua translocação do núcleo para o citoplasma (Figura 21) (CZECH; LAWRENCE; LYNN, 1974; MAHADEV et al., 2001; STEINBRENNER, 2013; SZYPOWSKA; BURGERING, 2011).

Figura 21. Sinalização celular gerada por peróxido de hidrogênio e seu efeito modulatório sobre o fator de transcrição FOXO3



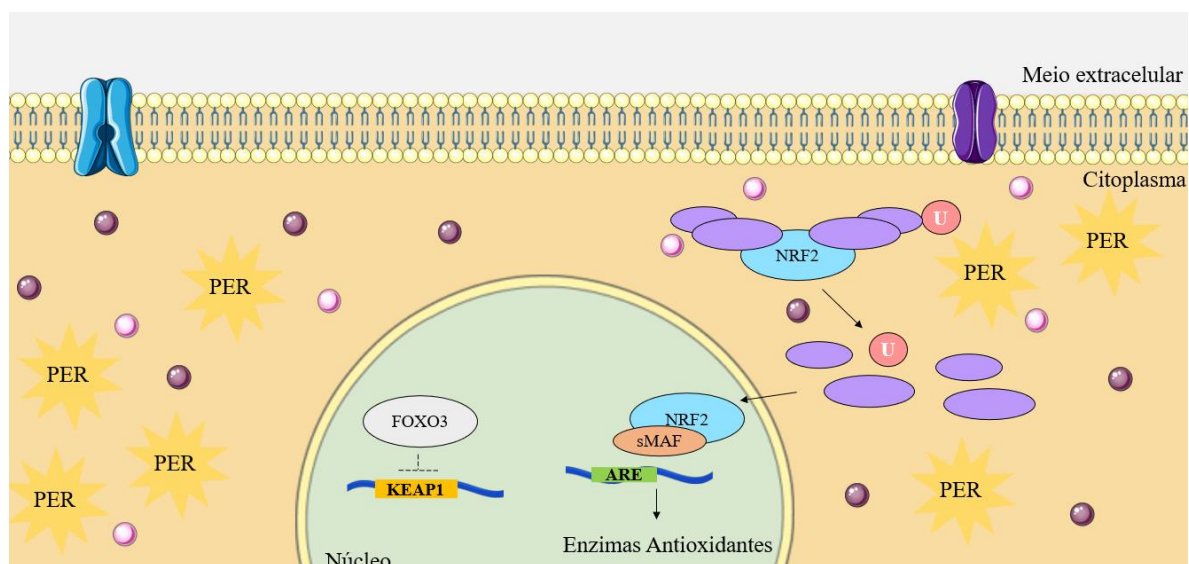
O peróxido é internalizado pela célula (através de canais de aquaporina específicos - AQP1 - representado em roxo, no lado direito da figura) resultando em um meio intracelular oxidativo. A PTEN é inativada de forma transitória ao ser oxidada de forma reversível nos seus resíduos de cisteína (Cys) redox-sensíveis. A inativação transitória dessa inibidora da PI3K e, regulador negativo da AKT, resulta na modulação negativa do FoxO3 mediada pela sua translocação do núcleo para o citoplasma (ativação interrompida da via PI3K/AKT). AKT: Proteína quinase B; P: Fosforilação; PER: Peróxido de hidrogênio; PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase; PTEN: Fosfatase e homólogo de tensina no cromossomo dez; FOXO3, proteína *Forkhead box O*. Linha contínua: via ativa; Linha tracejada: via inativada. Fonte: Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>).

A ERT, assim como o peróxido, também é internalizada pelas células K562, pelo seu transportador específico ETT. Sua captação aumenta linearmente em células K562, o que permite a pressuposição de que ambas as concentrações administradas são internalizadas minutos após sua administração (NAKAMURA et al., 2007). Supõe-se que na concentração subfisiológica (tratamento ERT C1 + $100\mu M H_2O_2$), a ERT não é capaz de reduzir a sinalização intracelular gerada pelo H_2O_2 , dessa forma a via PI3K/AKT modula a translocação de FoxO3 do núcleo para o citoplasma (primeiro nível regulatório). Vale a pena ressaltar que a cinética de

ação demonstra que a ERT é o agente antioxidante mais ativo para várias ERO, como relatado no estudo comparativo (ERT, GSH, trolox e ácido úrico) realizado por Franzoni e colaboradores (2006) (FRANZONI et al., 2006).

A modulação do fator de transcrição FOXO3, permite a proposição de que tenha acontecido uma ativação da expressão de um segundo fator de transcrição, o Nrf2. A ativação do Nrf2 pode estar relacionada a i) uma regulação dinâmica entre FOXO3-Keap1-Nrf2, apresentada pela primeira vez por Guan e colaboradores, que descrevem uma regulação negativa de Keap1 ocasionada depleção de FoxO3 (tratamento ERT C1 + H₂O₂ induz o nível de transcrito de FOXO3 abaixo da referência no dia 2 e níveis elevados de Nrf2) e, conseqüentemente a ativação da sinalização de Nrf2 (GUAN et al., 2016); e/ou ii) pela atuação dos intermediários oxidados da ERT (formas sulfonada (ESO₃H), dessulfurada (EH), também conhecido como, hercinina, e dissulfeto (ESSE)) oriundos da detoxificação direta do H₂O₂, como relatado por Servillo et al (2015) (SERVILLO et al., 2015), que poderiam interagir com o complexo Keap1-Cul3-Rbx1, desestabilizando-o (oxidação das cisteínas do Keap1), estimulando a acumulação nuclear de Nrf2 (Figura 22).

Figura 22. Mecanismos de ação propostos para ativação da via Nrf2-ARE no tratamento com a menor concentração de Ergotioneína em células eritroides K562 sob estresse oxidativo



O peróxido é internalizado pela célula (através de canais de aquaporina específicos - AQP1 - representado em roxo, no lado direito da figura) resultando em um meio intracelular oxidativo. A ERT (círculo roxo – forma reduzida; círculo rosa – forma oxidada) é internalizada pelo seu transportador específico ETT (representado em azul, no lado esquerdo da figura) e age de forma direta, detoxificando o peróxido de hidrogênio no citoplasma. A ativação do fator de transcrição Nrf2 pode estar relacionada a dois mecanismos: i) uma regulação negativa de Keap1 ocasionada depleção de FoxO3 que resulta em uma ativação da sinalização de Nrf2; ii) a ERT-oxidada interage com o complexo Keap1-Cul3-Rbx1, desestabilizando-o (oxida os resíduos de cisteína de Keap1),

estimulando acumulação nuclear de Nrf2. ARE: Elemento de Resposta Antioxidante humano; ERT: ergotioneína; Keap1: Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch; Nrf2, Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; P: fosforilação; PER: peróxido de hidrogênio; sMAF, proteína Small Maf; U, ubiquitinação. Linha tracejada: via inativada; Linha contínua: via ativa; FoxO3, proteína *Forkhead box O*. Fonte: Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>).

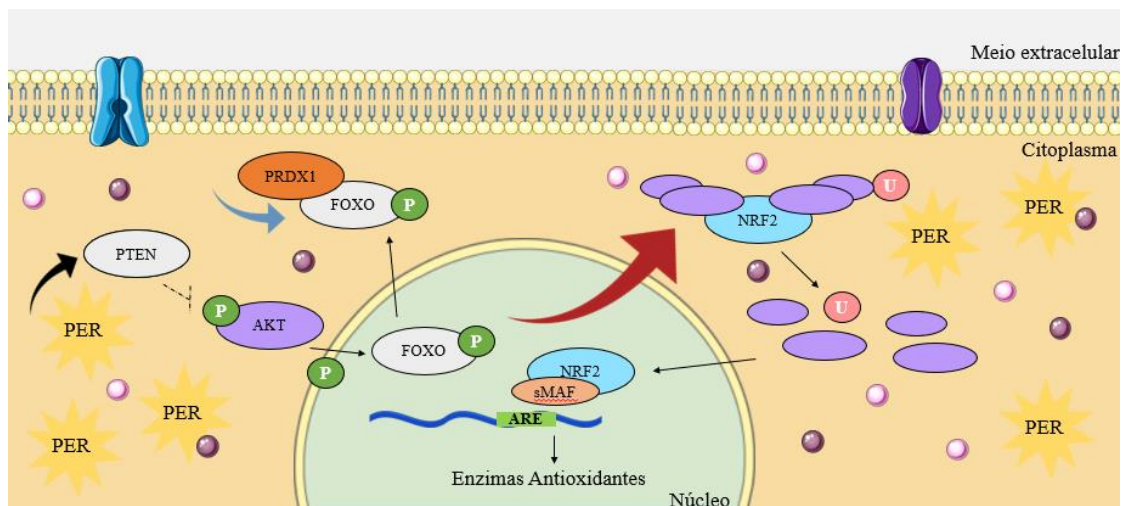
Independentemente da ação de um ou ambos os mecanismos propostos, tem-se uma maior expressão de RNAm do Nrf2, sugerindo um provável acúmulo de Nrf2 no núcleo, local onde atuará como um regulador positivo do ARE e, assim iniciando a transcrição de genes de enzimas antioxidantes pela via Nrf2-ARE (ITOH et al., 1997), constituindo um segundo nível do mecanismo regulatório proposto. Dessa forma, podemos concluir que indiretamente a concentração de ERT administrada influencia na seleção da via redox ativada para combate do estresse oxidativo.

Uma das enzimas antioxidantes que tem a expressão aumentada é a PRDX1 (dado corroborado pelo GRM), um sensor de estresse oxidativo e sinalizador celular que tem atuação proposta na terceira frente regulatória do mecanismo proposto. Como apresentado na seção introdutória deste trabalho, a PRDX1, além de atuar como enzima antioxidante detoxificando o peróxido, é capaz de interagir com o FoxO3 de uma forma dependente do estresse oxidativo, que influencia na localização subcelular desse fator de transcrição como descrito por Hopkins e colaboradores, ao relatar que a forma reduzida da PRDX1 atuaria como chaperona, concentrando o FoxO3 no citoplasma (HOPKINS et al., 2018). Além de sua função como enzima antioxidante e chaperona molecular, as PRDX1 podem atuar na propagação de sinais mediados por peróxido, função exercida por uma pequena fração de PRDX1 associada a jangadas lipídicas, que podem ser fosforiladas (*i.e* no sítio Thr90 pela Cdk1) resultando na inativação de atividade peroxidase. Essa inativação espacialmente confinada fornece uma forma de gerar gradientes de H₂O₂ em torno locais onde proteínas de sinalização são concentradas, minimizando o acúmulo geral de H₂O₂ para níveis que perturbariam o potencial redox global da célula (LEI et al., 2015; WOO et al., 2010).

Estas características permitem que o H₂O₂ seja acumulado em níveis substanciais sob certas circunstâncias, facilitando assim a sinalização dependente de H₂O₂ (WOO et al., 2010; WOOD; POOLE; KARPLUS, 2003). Além disso, também foi proposto que a taxa lenta de reativação das PRDXs hiperoxidadas via redução dependente de sulfiredoxina (Srx) seria um mecanismo embutido que permitiria tempo suficiente para o H₂O₂ se acumular intracelularmente e propagar seu sinal (RHEE; WOO, 2011). Dessa forma, no tratamento C1 + 100µM H₂O₂, supõe-se que a PRDX1 atue na concentração citoplasmática do FoxO3, cuja retenção citoplasmática pode

estar associada à reciclagem ou à degradação. A figura 23, resume as três etapas do mecanismo regulatório proposto para este tipo celular sob indução de estresse e tratamento com ERT C1.

Figura 23. Mecanismo de ação proposto para ação citoprotetora da menor concentração de Ergotioneína em células eritroides K562 sob estresse oxidativo



O peróxido é internalizado pela célula (através de canais de aquaporina específicos (AQP1 - representado em roxo, no lado direito da figura) resultando em um meio intracelular oxidativo. A ERT (círculo roxo – ERT reduzida; círculo rosa – ERT oxidada) é internalizada pelo seu transportador específico ETT (representado em azul, no lado esquerdo da figura) e age diretamente detoxificando o peróxido de hidrogênio (citoplasma), no entanto a concentração de peróxido resultante é o suficiente para ativar a via de sinalização PI3K/AKT (seta preta grossa), que resulta na concentração citoplasmática de FoxO3. A expressão reduzida de FOXO3 resulta na expressão de um segundo fator de transcrição, o Nrf2 (seta vermelha) que uma vez ativado, atua na transcrição de enzimas antioxidantes (via Nrf2-ARE), dentre elas a PRDX1, um sensor de estresse oxidativo e sinalizador celular que atua na última etapa desta regulação (seta azul), auxiliando na manutenção citoplasmática de FoxO3. ARE: Elemento de Resposta Antioxidante humano; ERT: ergotioneína; Nrf2, Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; P: fosforilação; PER: peróxido de hidrogênio; sMAF, proteína Small Maf; U, ubiquitinação. Linha tracejada: via inativada; Linha contínua: via ativa; FoxO, proteína *Forkhead box O*. Fonte: Esta figura foi criada pela autora adaptando imagens da *Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License* (<http://smart.servier.com>).

Já no tratamento ERT C2 + 100 μ M H₂O₂, supõe-se que na concentração farmacológica a ERT detoxifica peróxido de forma a reduzir significativamente a sua sinalização e, conseqüentemente, a ativação da via PI3K/AKT. Dessa forma, supõe-se não haver uma translocação do FoxO3 para o citoplasma (retenção nuclear desse fator). Assim, sua concentração nuclear e o aumento dos transcritos, no dia 2, resultariam em uma diminuição da expressão gênica do fator de transcrição Nrf2 (pela relação dinâmica entre FOXO3 e Nrf2 explicada anteriormente).

Assim, tem-se uma ação indireta da ERT ao diminuir a sinalização gerada H₂O₂ e modular a expressão de FOXO3 e de MST1 (aumenta a expressão), esta última uma quinase que promove a translocação desse fator de transcrição de volta para o núcleo (também se observa uma diminuição da expressão de RNAm 14-3-3) e, conseqüentemente a transcrição de seus

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir:

- 1) A administração de ERT em células eritroides K562 apresentou um padrão de efeito período e dose-dependentes contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂, com ações direta sobre a detoxificação do agente estressor e indireta sobre os níveis dos transcritos avaliados que possibilitou a proposição do mecanismo regulatório FOXO3-Keap1-Nrf2 com papel fundamental na homeostase redox e processo de diferenciação celular no modelo biológico estudado;
- 2) Via de sinalização redox Nrf2-ARE é a principal envolvida na homeostase redox, enquanto FOXO3 está envolvido tanto na homeostase redox quanto na proliferação e diferenciação eritroide para o modelo estudado;
- 3) Sugere-se que a ERT deve ser considerada um elemento-chave em futuras investigações de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças hematológicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKANMU, D. et al. The antioxidant action of ergothioneine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 288, n. 1, p. 10–16, 1991.
- ANDERSSON, L. C.; NILSSON, K.; GAHMBERG, C. G. K562—A human erythroleukemic cell line. **International Journal of Cancer**, v. 23, n. 2, p. 143–147, 1979.
- ARDUINI, A.; EDDY, L.; HOCHSTEIN, P. The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: A novel function for ergothioneine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 281, n. 1, p. 41–43, 1990.
- ARUOMA, O. I. et al. Antioxidant action of ergothioneine: Assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 231, n. 2, p. 389–391, 1997.
- ASAHI, T. et al. A mushroom-derived amino acid, ergothioneine, is a potential inhibitor of inflammation-related DNA halogenation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 2, p. 313–317, 2016.
- AUGUSTYNIAK, A. et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1216–1262, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BENFEITAS, R. et al. Hydrogen peroxide metabolism and sensing in human erythrocytes: A validated kinetic model and reappraisal of the role of peroxiredoxin II. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 74, p. 35–49, 2014.
- BJELAKOVIC, G. et al. The effect of antioxidant supplements for preventing mortality in patients with various diseases. **Cochrane Database Syst Rev**, v. Mar 14, n. 3, p. CD007176, 2012.
- BOCCITTO, M.; KALB, R. Regulation of Foxo-Dependent Transcription by Post-Translational Modifications. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 9, p. 1303–1310, 2011.
- BORODINA, I. et al. The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. **Nutrition Research Reviews**, n. May, p. 1–28, 2020.
- BRADSHAW, P. C. Cytoplasmic and mitochondrial NADPH-coupled Redox systems in the regulation of aging. **Nutrients**, v. 11, p. 1–34, 2019.
- BROWER, V. Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? **Nature Biotechnology**, v. 16, n. August, p. 728–731, 1998.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2276–2288, 2008.
- CARLSEN, M. H. et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages,

- spices, herbs and supplements used worldwide. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2010.
- CHAVES, N. A. et al. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, n. March, p. 34–46, 2019.
- CHEAH, I. K. et al. Liver ergothioneine accumulation in a guinea pig model of non-alcoholic fatty liver disease. A possible mechanism of defence? **Free Radical Research**, v. 50, n. 1, p. 14–25, 2016.
- CHEAH, I. K. et al. Administration of Pure Ergothioneine to Healthy Human Subjects: Uptake, Metabolism, and Effects on Biomarkers of Oxidative Damage and Inflammation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 26, n. 5, p. 193–206, 2017.
- CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 784–793, 2012.
- CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Could ergothioneine aid in the treatment of coronavirus patients? **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 1–32, 2020.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 2, p. 192–208, 2004.
- CHEN, X. et al. PRDX5 as a novel binding partner in Nrf2-mediated NSCLC progression under oxidative stress. **Aging**, v. 12, n. 1, p. 122–137, 2020.
- CHÉNAIS, B. et al. Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 1, p. 18–27, 2000.
- CHIRIBAU, C. B. et al. FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 13, p. 8211–8217, 2008.
- COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, p. 246–255, 2002.
- CUADRADO, A. et al. Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: A systems medicine approach. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 348–383, 2018.
- CZECH, M. .; LAWRENCE, J. .; LYNN, W. . Hexose transport in isolated brown fat cells. A model system for investigating insulin action on membrane transport. **J Biol Chem**, v. 249, n. 17, p. 5421–5427, 1974.
- DALL'ACQUA, A. et al. CDK6 protects epithelial ovarian cancer from platinum-induced death via FOXO3 regulation. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1415–1433, 2017.
- DE FRANCESCHI, L. et al. Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in β -thalassemic erythropoiesis. **Haematologica**, v. 96, n. 11, p. 1595–1604, 2011.
- DREXLER, H. G. **The Leukemia-Lymphoma Cell Line FactsBook**. [s.l.] Academic Press, 2001.

- DÜNDAR, Y.; ASLAN, R. Antioxidative stress. **Eastern J Med.**, v. 5, n. 2, p. 45–47, 2000.
- EDWARDS, C. J.; FULLER, J. Oxidative stress in erythrocytes. **Comparative Haematology International**, v. 6, n. 1, p. 24–31, 1996.
- ESSAFI, A. et al. Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. **Oncogene**, v. 24, p. 2317–2329, 2005.
- FARHAN, M. et al. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 7, p. 815–827, 2017.
- FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 609–619, 2008.
- FRANZONI, F. et al. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, n. 8, p. 453–457, 2006.
- GAO, B. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of a chimeric recombinant superoxide dismutase: SOD2/3. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, p. 917–925, 2003.
- GIROTTI, A. W. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. v. 44, n. 6, p. 956–968, 2009.
- GRÜNDEMANN, D. et al. Discovery of the ergothioneine transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5256–5261, 2005.
- GRÜNDEMANN, D. The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity — A review. **Preventive Medicine**, v. 54, p. S71–S74, 2012.
- GUAN, L. et al. FoxO3 inactivation promotes human cholangiocarcinoma tumorigenesis and chemoresistance through Keap1-Nrf2 signaling. **Hepatology**, v. 63, n. 6, p. 1914–1927, 2016.
- GÜRKAN, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. n. January, 2008.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819–1828, 1995.
- HALLIWELL, B. Drug antioxidant effect. A Basis for Drug Selection? **Drugs**, v. 42, n. 4, p. 569–605, 1991.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179–1180, 2000.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637–644, 2013.
- HALLIWELL, B.; CHEAH, I. K.; DRUM, C. L. Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 470, n. 2, p. 245–250, 2016.
- HALLIWELL, B.; CHEAH, I. K.; TANG, R. M. Y. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. **FEBS Letters**, v. 592, n. 20, p. 3357–3366, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] International Union of Crystallography, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, n. 2, p. 501–514, 1986.

HAN, Y. H. et al. Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 3, p. 427–432, 2012.

HANLON, D. P. Interaction of ergothioneine with metal ions and metalloenzymes. **J. Med. Chem**, v. 14, n. 11, p. 1084–1087, 1971.

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.

HOFFMAN, R. et al. Hemin control of heme biosynthesis and catabolism in a human leukemia cell line. **Blood**, v. 56, n. 3, p. 567–570, 1980.

HOLMGREN, A. et al. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 6, p. 1375–1377, 2005.

HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 120–124, 2010.

HOPKINS, B. L. et al. A Peroxidase Peroxiredoxin 1-Specific Redox Regulation of the Novel FOXO3 microRNA Target let-7. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 28, n. 1, p. 62–77, 2018.

HOPKINS, B. L.; NEUMANN, C. A. Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response. **Redox Biology**, v. 21, n. August 2018, p. 101104, 2019.

HSEU, Y. C. et al. Dermato-protective properties of ergothioneine through induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated Human keratinocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. 102–117, 2015.

ISHII, T. et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 21, p. 16023–16029, 2000.

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. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 2, p. 313–322, 1997.

IUCHI, Y. Anemia Caused by Oxidative Stress. In: **Anemia**. [s.l.] IntechOpen, 2012.

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.
- JEONG, O. S. et al. Long noncoding RNA linc00598 regulates CCND2 transcription and modulates the G1 checkpoint. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–11, 2016.
- JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4- 5 SPEC. ISS., p. 340–352, 2005.
- JOHNSON, R. M. et al. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 1407–1417, 2005.
- JONES, D. P.; SIES, H. The Redox Code. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 9, p. 734–746, 2015.
- KANIAS, T.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells - The struggle with hemoglobin oxidation. **FEBS Journal**, v. 277, n. 2, p. 343–356, 2010.
- KAWASAKI, N. et al. Control of hemoglobin synthesis in erythroid differentiating K562 cells I. Role of iron in erythroid cell heme synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 2, p. 289–294, 1996.
- KINGSLEY, P. D. et al. Ontogeny of erythroid gene expression. **Blood**, v. 121, n. 6, p. e5–e13, 2013.
- KLOTZ, L. O. et al. Redox regulation of FoxO transcription factors. **Redox Biology**, v. 6, p. 51–72, 2015.
- KLOTZ, L. O.; STEINBRENNER, H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. **Redox Biology**, v. 13, n. August, p. 646–654, 2017.
- KODANI, N.; NAKAE, J. Tissue-Specific Metabolic Regulation of FOXO-Binding Protein: FOXO Does Not Act Alone. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 702, 2020.
- KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. **Blood**, v. 56, n. 3, p. 344–351, 1980.
- KOPS, G. J. P. L. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. **Nature**, v. 419, n. 6904, p. 316–321, 2002.
- KUYPERS, F. A. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 155–179, 2014.
- LAURENZA, I. et al. Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action. **BioFactors**, v. 33, n. 4, p. 237–247, 2008.
- LEI, X. G. et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 307–364, 2015.
- LEVONEN, A.-L. et al. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: Implications for electrophile therapeutics. **Free Radic Biol Med.**, v. 71, p. 196–207, 2014.
- LIANG, R.; MENON, V.; GHAFFARI, S. Following Transcriptome to Uncover FOXO Biological Functions. **Methods Mol Biol.**, v. 1890, p. 219–227, 2019.

- LOW, F. M. et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2611–2617, 2007.
- 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.
- LOZZIO, C.; LOZZIO, B. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321–334, 1975.
- MA, Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 2013.
- MACARI, E. R.; LOWREY, C. H. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5987–5997, 2011.
- MAHADEV, K. et al. Hydrogen Peroxide Generated during Cellular Insulin Stimulation Is Integral to Activation of the Distal Insulin Signaling Cascade in 3T3-L1 Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48662–48669, 2001.
- MALIK, Z.; CHITAYAT, S. D.; LANGZAM, Y. Hemin dependent morphological maturation and endogenous porphyrin synthesis by K562 leukemic cells. **Cancer Letters**, v. 41, n. 2, p. 203–209, 1988.
- MARINKOVIC, D. et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 8, p. 2133–2144, 2007.
- MASSACCESI, L.; GALLIERA, E.; ROMANELLI, M. M. C. Erythrocytes as markers of oxidative stress related pathologies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 191, n. May, p. 111333, 2020.
- MCDONALD, J. H. **Handbook of biological statistics**. 3rd. ed. Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing, 2014.
- MELVILLE, D. B. Ergothioneine. **Vitamins & Hormones**, p. 155–204, 1959.
- MENON, V.; GHAFARI, S. Transcription factors FOXO in the regulation of homeostatic hematopoiesis. **Curr Opin Hematol**, p. 1–9, 2018.
- MITTLER, R. et al. ROS signaling: The new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300–309, 2011.
- MIYAMOTO, K. et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. **Cell Stem Cell**, v. 1, p. 101–112, 2007.
- MUELLER, S.; RIEDEL, H. D.; STREMMEL, W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4973–4978, 1997.
- NACHIMUTHU, S. et al. L-Ergothioneine: A Potential Bioactive Compound from Edible Mushrooms. **Medicinal Mushrooms**, p. 391–407, 2019.

- NAKAMURA, T. et al. Decreased proliferation and erythroid differentiation of K562 cells by siRNA-induced depression of OCTN1 (SLC22A4) transporter gene. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 9, p. 1628–1635, 2007.
- NELSON, S. K. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 341–347, 2006.
- NEMOTO, S.; FINKEL, T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. **Science**, v. 295, p. 2450–2452, 2002.
- OLMOS, Y. et al. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 13, p. 1507–1521, 2013.
- 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.
- PRABHAKAR, R. et al. Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: A density functional study. **Biochemistry**, v. 44, n. 35, p. 11864–11871, 2005.
- 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.
- RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–90, 2012.
- REEVE, C. *In*: <https://www.christopherreeve.org/>. **Christopherreeve**. Disponível em: <https://www.christopherreeve.org/pt/international/portuguese-hub>. Acesso: 28 fev. 2021
- RHEE, S. G.; KIL, I. S. Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 5.1-5.27, 2017.
- RHEE, S. G.; WOO, H. A. Multiple functions of peroxiredoxins: Peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 781–794, 2011.
- ROUGEE, M. et al. Deactivation of Singlet Molecular Oxygen By Thiols and Related Compounds, Possible Protectors Against Skin Photosensitivity. **Photochemistry and Photobiology**, v. 47, n. 4, p. 485–489, 1988.
- ROWLEY, P. T. et al. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. **Experimental hematology**, v. 9, n. 1, p. 32–37, 1981.

RUTHERFORD, T. R.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. **K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin** *Nature*, 1979.

SAKRAK, O. et al. Ergothioneine Modulates Proinflammatory Cytokines and Heat Shock Protein 70 in Mesenteric Ischemia and Reperfusion Injury. **Journal of Surgical Research**, v. 144, n. 1, p. 36–42, 2008.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453–462, 2014.

SERVILLO, L. et al. An uncommon redox behavior sheds light on the cellular antioxidant properties of ergothioneine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, p. 228–236, 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SONG, T. Y. et al. Ergothioneine protects against neuronal injury induced by cisplatin both in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3492–3499, 2010.

SPICER, S. S.; WOOLEY, J. G.; KESSLE, V. Ergothioneine depletion in rabbit erythrocytes and its effect on methemoglobin formation and reversion. **Arch. Biochem.**, v. 27, p. 418–420, 1950.

STEINBRENNER, H. Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1538–1547, 2013.

STOFFELS, C. et al. Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: Resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, n. October, p. 385–394, 2017.

STUHLMEIER, K. M. et al. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 2, p. 334–341, 2003.

SUH, J. H. et al. Clinical assay of four thiol amino acid redox couples by LC-MS/MS: utility in thalassemia. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 877, n. 28, p. 3418–3427, 2009.

SUNTERS, A. et al. FoxO3a Transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49795–49805, 2003.

SZYPOWSKA, A. A.; BURGERING, B. M. T. The peroxide dilemma: Opposing and mediating insulin action. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 1, p. 219–232, 2011.

TAGUCHI, K. et al. Genetic Analysis of Cytoprotective Functions Supported by Graded Expression of Keap1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 12, p. 3016–3026, 2010.

TANG, R. M. Y. et al. Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

TAVERNE, Y. J. et al. Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life. **BioEssays**, p. 1–9, 2018.

- TENNANTH, J. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 685–694, 1964.
- THANUTHANAKHUN, N. et al. Investigation of FoxO3 dynamics during erythroblast development in β -thalassemia major. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 2017.
- TORRES, L.; CONRAN, N. Emerging pharmacotherapeutic approaches for the management of sickle cell disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 2, p. 173–186, 2018.
- TSCHIRKA, J. et al. Substrate selectivity check of the ergothioneine transporter. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 46, n. 6, p. 779–785, 2018.
- 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.
- TUCKER, R. A. J.; CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Specificity of the ergothioneine transporter natively expressed in HeLa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 513, n. 1, p. 22–27, 2019.
- TZIVION, G.; DOBSON, M.; RAMAKRISHNAN, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 11, p. 1938–1945, 2011.
- VAN DER VOS, K. E.; COFFER, P. J. The extending network of FOXO transcriptional target genes. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, n. 4, p. 579–592, 2011.
- VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biology**, v. 6, p. 226–239, 2015.
- WANG, H. et al. Knockdown of transcription factor forkhead box O3 (FOXO3) suppresses erythroid differentiation in human cells and zebrafish. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 4, p. 923–930, 2015.
- WANG, X.; HU, S.; LIU, L. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically? **Oncology Letters**, v. 13, n. 5, p. 2867–2872, 2017.
- WANG, Z.; YU, T.; HUANG, P. Post-translational modifications of FOXO family proteins (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 6, p. 4931–4941, 2016.
- WEI, M. et al. The over-expression of aquaporin-1 alters erythroid gene expression in human erythroleukemia K562 cells. **Tumor Biology**, v. 36, p. 291–302, 2015.
- WINTERBOURN, C. C. **The biological chemistry of hydrogen peroxide**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 528
- WINTERBOURN, C. C. Biological production, detection, and fate of hydrogen peroxide. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 29, n. 6, p. 541–551, 2018.
- WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Redox biology: Signaling via a peroxiredoxin sensor. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 5–6, 2015.
- WOO, H. A. et al. Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized H₂O₂ Accumulation for Cell Signaling. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 517–528, 2010.

- WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650–653, 2003.
- XIE, W. et al. Overview of thioredoxin system and targeted therapies for acute leukemia. **Mitochondrion**, v. 47, p. 38–46, 2019.
- YANG, J. et al. Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Impair Cardiac Post-Ischemic Recovery Through an Arginase-Dependent Modulation of Nitric Oxide Synthase and Reactive Oxygen Species. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 3, n. 4, p. 450–463, 2018.
- YAWATA, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. **Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model**, p. 133–150, 2003.
- 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, Y. et al. Metformin induces FOXO3-dependent fetal hemoglobin production in human primary erythroid cells. **Blood**, v. 132, n. 3, p. 321–333, 2018.
- ZHOU, Z. et al. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 72, n. 7, p. 769–780, 2018.
- ZHU, B. Z. et al. Ergothioneine prevents copper-induced oxidative damage to DNA and protein by forming a redox-inactive ergothioneine-copper complex. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 30–34, 2011.

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 contém 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 soro bovino fetal. 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 2 g 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 foram colocados no fluxo e deixados 30 minutos expostos à luz UV. O meio RPMI e o soro bovino fetal 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 soro bovino fetal (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, dessa forma minimiza 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 soro bovino fetal por um dia. O soro bovino fetal é um complemento do meio de cultura, contém fatores de crescimento, hormônios, proteínas, peptídeos, nucleosídeos e lipídeos importantes para a proliferação celular. Após o descongelamento foi utilizado 20% de soro por um dia a fim de promover um meio ambiente rico para a recuperação ao estresse causado durante o congelamento e descongelamento das células.

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 soro bovino fetal, que induziria a diferenciação 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 600g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso em aproximadamente 10 ml de meio RPMI fresco suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após ressuspenso as células o conteúdo foi colocado novamente no frasco de cultivo e deixado em estufa úmida a 37°C 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 soro bovino fetal e trocando-o quando julgar necessário (em casos de mudança de pH ou precipitação de células mortas).

Congelamento de células K562

Após alguns dias de cultivo, aproximadamente 1 semana, congelamos uma parte das células. Primeiramente, foi preparada a solução criopreservante (DMSO 10% e soro bovino fetal 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 600g com desaceleração 0-2 e temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso com a o volume desejado de solução criopreservante para um número de células de $3,1 \times 10^6$ células/ml. A solução foi adicionada gelada de 1 em 1 ml e homogeneizado com cuidado. Após ressuspenso, o conteúdo foi alíquotado em tubos criopreservantes com um volume de aproximadamente 1ml contendo 2×10^6 células/ ml. Os tubos foram armazenados em freezer - 80°C 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 (BUSTIN et al., 2009).

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. 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'-TGGGCTTAATCGTGTCCTG-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'-CACCCTCATAGATGAAAACCCC-3'
<i>TRX1</i>	5'-GGTGAAGCAGATCGAGAGCAAAGA-3'	5'-ACCACGTGGCTGAGAAGTCAACTA-3'
<i>FOXO3</i>	5'-GCGTGCCCTACTTCAAGGATAAG-3'	5'-GACCCGCATGAATCGACTATG-3'
<i>MST1</i>	5'-CCTCCCACATTCCGAAAACCA-3'	5'-GCACTCCTGACAAATGGGTG-3'
<i>YWHAQ</i> (14-3-3)	5'-GGGTTGCATCTCTTTCTTGC -3'	5'-GCACTCCTGACAAATGGGTG-3'
<i>NRF2</i>	5'-GCTACGTGATGAAGATGGAAAAC-3'	5'-AGCTCAGAAAAGGTCAAATCCTC-3'
<i>KEAP1</i>	5'-AACAGAGACGTGGACTTTCG-3'	5'-GTGTCTGTATCTGGGTCGTAAC-3'

Fonte: Próprio autor

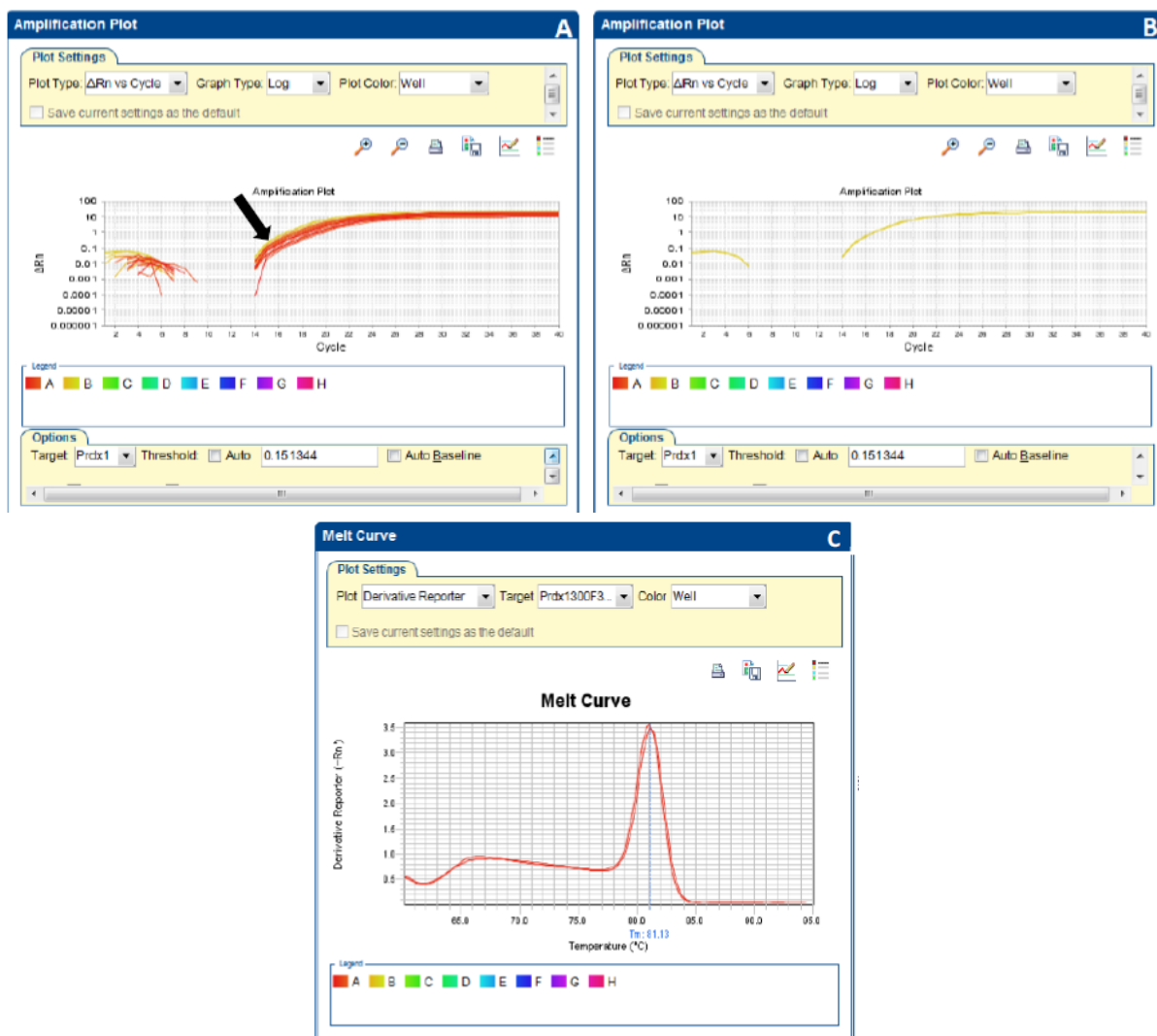
Além do desenho, a quantidade de primer a ser usada é outro fator essencial que interfere na eficiência das reações. É importante que seja utilizada uma combinação de concentração de *primers forward* e *reverse* mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra, 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 *primers* 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.

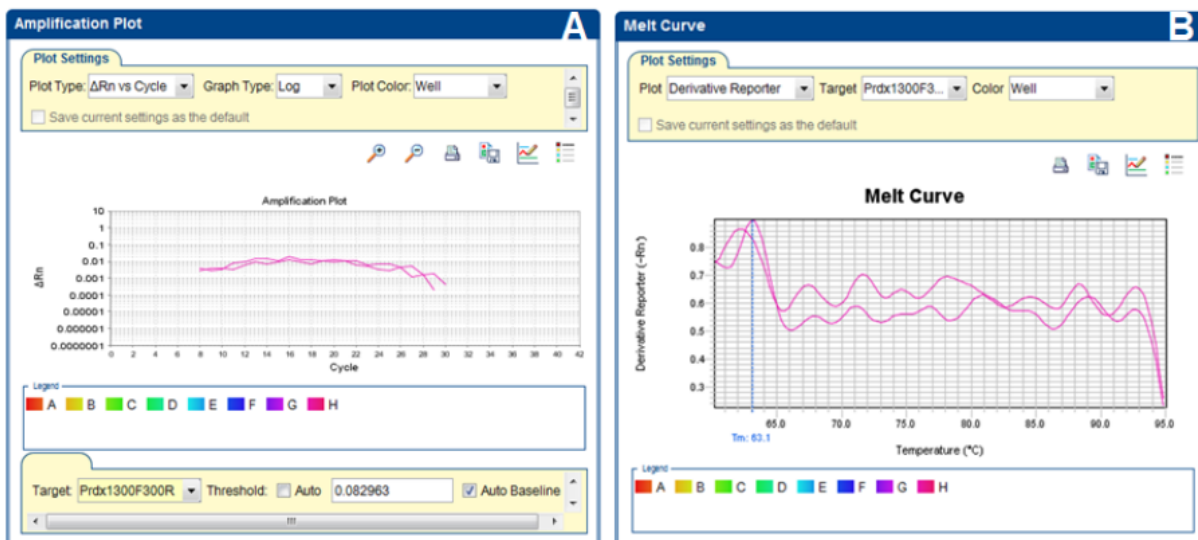
Figura B1 – Padronização dos primers PRDX1



(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, (B) 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%, quanto mais próximo de 100% mais eficiente é a reação. Foram realizadas diluições seriadas de 1:5 partindo de uma amostra de cDNA à 200 ng 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 R^2 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 200 ng 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 R^2 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 às 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 conseqüentemente 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>
BAC	300/150	0,098701	101,31
SOD1	150/150	0,058913	96,57
GPX1	300/150	0,070705	96,50
CAT	150/300	0,122229	101,92
PRDX1	300/300	0,060659	95,43
PRDX2	300/300	0,096587	95,19
PRDX6	100/100	0,107838	98,96
TRX	300/150	0,069943	97,59
NRF2	150/150	0,058913	96,08
KEAP1	300/300	0,101843	98,69
FOXO3	300/150	0,101487	95,69
YWHAQ (14-3-3)	150/300	0,101237	100,55
MST1	100/150	0,084251	101,76

Fonte: Próprio autor