



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

Ilana Luíze Rocha Santana

Impacto do uso de Hidroxicarbamida nas vias de adaptação redox em indivíduos com anemia falciforme

São José do Rio Preto
2023

Ilana Luize Rocha Santana

Impacto do uso de Hidroxicarbamida nas vias de adaptação redox em indivíduos com anemia falciforme

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Evolutiva, 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: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Danilo Grunig Humberto da Silva

Coorientador: Profa. Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio

São José do Rio Preto
2023

S232i	Santana, Ilana Luíze Rocha Impacto do uso de Hidroxicarbamida nas vias de adaptação redox em indivíduos com anemia falciforme / Ilana Luíze Rocha Santana. -- São José do Rio Preto, 2023 47 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Danilo Grunig Humberto da Silva Coorientadora: Larissa Paola Rodrigues Venancio 1. NRF2. 2. ATF4. 3. HbF. 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.

Ilana Luize Rocha Santana

Impacto do uso de Hidroxicarbamida nas vias de adaptação redox em indivíduos com anemia falciforme

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Genética e Biologia Evolutiva, 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: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

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

São José do Rio Preto
06/12/ 2023

AGRADECIMENTOS

O final deste trabalho é, para mim, a concretização de um sonho e o começo de uma história. História essa que me vejo atuando de maneira ativa, utilizando a ciência em busca de novas descobertas, visando ajudar cada vez mais pessoas com Doença Falciforme. É certo que as respostas nem sempre virão, mas tudo bem, afinal, a ciência é mais movimentada quando surgem novas perguntas.

Foram 2 anos de muitos desafios e de contato com realidades que nunca antes tive, e se toda essa experiência foi possível devo agradecer inicialmente ao Programa de Doença Falciforme de Barreiras, em nome da Médica Hematologista Ariadne Godinho, assistente social Sahira Nunes, e enfermeira Florenilda Bueno. Sem o incentivo e apoio de vocês, provavelmente não colheríamos os frutos que colhemos.

Agradeço também às pessoas com Doença Falciforme, que aceitaram participar do nosso estudo e estiveram abertos a compartilhar suas experiências pessoais e traumas, vocês mudaram completamente a pesquisadora que existe em mim.

E se hoje existe uma pesquisadora em mim ela nasceu em meados de 2017-2018, na minha primeira conversa com a Profa. Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio. Nos ensinamentos que me foram transmitidos e em todas as ocasiões que pude aprender um pouco mais. Sem as instruções dessa mãe científica, eu não teria a bagagem que eu tenho.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva, que aceitou me orientar após algumas trocas de email e chamadas no Meet. Por todo seu apoio, suas falas tranquilizadoras e sessões de terapia de graça. Nem as mais fantasiosas idealizações que tive no início desse mestrado chegaram aos pés da magnífica experiência que tive.

Gostaria de agradecer as meninas do grupo de pesquisa BioRedox sempre dispostas a me ajudar e de uma paciência imensurável, à Ana Clara, Flavi, Amandita e, especialmente à Vic, que foi pra mim uma irmã mais velha, sem o seu apoio eu estaria surtando e sem saber por onde começar.

Agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa em Genética Molecular Humana e Animal de Barreiras, aos colegas do NAIVE, em especial pro meu parceiro de congresso e coleta Manoel, nossas conversas sempre deixaram meu dia mais divertido, me incentivaram a continuar e lutar contra a síndrome de impostor, muito obrigada por isso.

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Biociência e a Fapesb pelo financiamento do projeto.

Gostaria de agradecer à minha família e a todos que me incentivaram de alguma forma.

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

*Nossa pele é de Prata
Ele reflete luz,
Um brilho tão intenso que eu me pergunto:
Por que o ouro é tão querido e a prata subvalorizada?
Alguns não de responder que é pela prata ser encontrada com mais facilidade
Refleta:
O Brasil tem uma população de negros maior que a de brancos,
Temos menos valor por ser maioria?
A ironia da maioria virar minoria.
Bluesman, Baco Exu do Blues.*

RESUMO

Dentre os mecanismos de expressão gênica responsáveis por remediar danos celulares ou induzir a apoptose, a via da proteína cinase B (PI3K/AKT), via de sinalização envolvida com os fatores NRF2 e eIF2 α , é uma das mais estudadas, sendo exemplo das estruturas operacionais da biologia redox, cujos preceitos são essenciais para investigação de potenciais alvos terapêuticos em doenças marcadas por inflamação e estresse oxidativo, como na anemia falciforme (AF), que possui, atualmente, como única estratégia medicamentosa a hidroxicarbamida (HC), tal fármaco não apresentando resposta homogênea entre os pacientes. Dessa forma, pretendeu-se investigar a influência do tratamento com HC em vias críticas de adaptação redox em pessoas com AF, analisando expressão gênica em reticulócitos das cinases (*PI3K* e *AKT*) e dos fatores de transcrição (*ATF4* e *NRF2*), que modulam as vias de sinalização propostas, bem como de alguns de seus principais genes alvo (*CAT*, *SOD1*, *GPX1*, *GR*), assim como parâmetros bioquímicos modificadores da doença. Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos com AF, organizados em sob o uso (HC+) ou não (HC-) de hidroxicarbamida, em acompanhamento clínico no Programa de Atenção à Pessoa com Doença Falciforme, da Secretaria Municipal de Saúde de Barreiras - BA. Os pacientes foram avaliados a partir de questionário com critérios de inclusão e exclusão, com suas amostras coletadas somente após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos foram coletados com consulta aos prontuários, e as amostras analisadas por RT-qPCR, com RNA extraído de reticulócitos, após confirmação do genótipo hemoglobínico por PCR-RFLP. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos transcritos correspondentes a NRF2, maiores no grupo HC+, com AKT mostrando padrão de indução, enquanto ATF4, SOD1 e CAT mostraram-se diminuídos para tal. Análises de VIP Score apontaram ATF4 e NRF2 como os principais diferenciadores entre os grupos. Nosso estudo sugere que o uso de HC resulta em uma dinâmica relação entre as vias de sinalização redox como parte da resposta adaptativa do uso da hidroxicarbamida, com possível associação deste com produção de HbF.

Palavras-chave: *NRF2*, *ATF4*, *HbF*.

ABSTRACT

Among the gene expression mechanisms responsible for remedying cellular damage or inducing apoptosis, the protein kinase B (PI3K/AKT) pathway, a signaling pathway involved with the factors NRF2 and eIF2 α , is one of the most studied, being an example of the operational structures of redox biology, whose precepts are essential for the investigation of potential therapeutic targets in diseases marked by inflammation and oxidative stress, such as sickle cell anemia (SCA), which currently has hydroxycarbamide (HC) as its only medication strategy; homogeneous response among patients. Thus, we intended to investigate the influence of HC treatment on critical pathways of redox adaptation in people with SCA, analyzing gene expression in reticulocytes of kinases (*PI3K* and *AKT*) and transcription factors (*ATF4* and *NRF2*), which modulate the proposed signaling pathways, as well as some of their main target genes (*CAT*, *SOD1*, *GPX1*, *GR*), as well as disease-modifying biochemical parameters. Blood samples from individuals with SCA were used, organized into those using (HC+) or not (HC-) hydroxycarbamide, undergoing clinical monitoring in the Care Program for People with Sickle Cell Disease, of the Municipal Health Department of Barreiras - BA. Patients were evaluated using a questionnaire with inclusion and exclusion criteria, with their samples collected only after signing the informed consent form. Data regarding biochemical parameters were collected by consulting medical records, and samples were analyzed by RT-qPCR, with RNA extracted from reticulocytes, after confirmation of the hemoglobin genotype by PCR-RFLP. Statistically significant differences were found in the transcripts corresponding to NRF2, greater in the HC+ group, with AKT showing an induction pattern, while ATF4, SOD1 and CAT were shown to be decreased. VIP Score analyzes pointed out ATF4 and NRF2 as the main differentiators between the groups. Our study suggests that the use of HC results in a dynamic relationship between redox signaling pathways as part of the adaptive response to the use of hydroxycarbamide, with a possible association with HbF production.

keywords: *NRF2*, *ATF4*, *HbF*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura1 – Estágios de maturação do eritrócito na medula óssea esquematizados.	14
Figura 2 - Esquematização de uma ilha eritroblástica.	15
Figura 3 – Hemoglobinas expressas durante o desenvolvimento humano.	16
Figura 4 - Modelo de looping da região LCR com promotores gênicos.	17
Figura 5- Atividade transcricional e mecanismo regulatório de NRF2.	22

ARTICLE - Hydroxycarbamide and sickle cell anemia: paradoxical effects related to redox mechanisms of cellular adaptation.

Figure 1 - Relative expression of the transcription's factors and their modulators in reticulocytes.	30
Figure 2 - Relative expression of essential antioxidants involved in redox adaptation in reticulocytes.	31
Figure 3 - PLS-DA score plot of the two principal componentes.	32

LISTA DE TABELAS

ARTICLE - Hydroxycarbamide and sickle cell anemia: paradoxical effects related to redox mechanisms of cellular adaptation

Table 1 - Descriptive data of study participants	27
Table 2 - Biochemical data of the study participants	28
Table 3 - Regression model analysis	32
Table S1 - Primers used in the study	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
ARE	Do inglês Antioxidante Response Element
ATF4	Do inglês activating Transcription Factor 4
Baso-E	Do inglês basophilic erythrocytes
BCL11A	Do inglês B-cell lymphoma 11A
BFU-E	Do inglês burst-forming unit erythroid
bZip	Do inglês basic leucine zipper
CFU-E	Do inglês erythroid colony forming units
DF	Doença falciforme
DNA	Do inglês deoxyribonucleic acid
eIF2α	Do inglês eukaryotic translation initiation factor 2
EMP	Do inglês <i>erythroblast macrophage protein</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSK-3β	Do inglês Glycogen synthase kinase-3 beta
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina adulta
HBB	Gene que codifica a hemoglobina beta
HbF	Hemoglobina fetal
HC	Hidroxicarbamida

<i>KEAP1</i>	Kelch-like ECH-associated protein 1
LCR	Do inglês locus control region
mRNA	RNA mensageiro
<i>MYB</i>	Do inglês myeloblastosis oncogene
NADPH-oxidase	Complexo enzimático
<i>NRF2</i>	Do inglês nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Ortho-E	Do inglês orthochromatic erythrocytes
PIB	Produto Interno Bruto
<i>PKB/AKT</i>	Do inglês Protein kinase B
PKC	Do inglês Protein Kinase C
Poly-E	Do inglês polychromatic erythrocytes
sMaf	Do inglês small Maf protein
<i>SOX6</i>	Do inglês SRY-box transcription factor 6
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ	Zeta
α_1	Alfa 1
α_2	Alfa 2
ε	Épsilon
γ^G	Gama-guanina
γ^A	Gama-alanina
δ	Delta
$\alpha_2\beta^S_2$	Estrutura HbS
Ca^{2+}	Cálcio
$\text{O}_2\bullet^-$	Radical superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{HO}\bullet$	Radical hidroxil

SUMÁRIO

PREFÁCIO	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Eritropoiese	13
1.2 Ilhas eritroblásticas	14
1.3 Switching	15
1.4 Hemoglobinopatias	18
1.5 Doença falciforme	18
1.6 Hidroxicarbamida	20
1.7 Biologia redox	20
1.8 Oeste da Bahia	22
1.9 Justificativa	23
2. OBJETIVO	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivo específico	24
ARTICLE	25
3. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

PREFÁCIO

O trabalho aqui apresentado está configurado no formato de manuscrito, que será submetido na revista internacional “Free radical Biology and Medicine” sob o título “Hydroxycarbamide and sickle cell anemia: paradoxical effects related to redox mechanisms of cellular adaptation”. A revista acima referida possui fator de impacto (2023) 7,4 e Qualis/CAPES – Ciências Biológicas I – A1.

Para a introdução deste trabalho trazemos uma breve recapitulação sobre conceitos chave a respeito da eritropoiese, ilhas eritroblásticas, destacando o switching, essencial para o entendimento de hemoglobinopatias, com destaque, dentro da doença falciforme, da anemia falciforme. Explanando, posteriormente a respeito da terapia medicamentosa adotada para essa patologia, a hidroxycarbamida, com conseguinte explanação a respeito da biologia redox. Seguimos com objetivo geral e específicos, sendo que, material e métodos, resultados e discussões, bem como conclusões, estão contempladas no corpo do manuscrito.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eritropoiese

O transporte de oxigênio dos pulmões para os demais tecidos corpóreos é realizado por células sanguíneas maduras, os eritrócitos. Tais células passam por um intrincado processo de produção, estritamente regulado por uma variedade de fatores, como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, sendo esse denominado eritropoiese (TANG; WANG, 2023). De acordo com a fase de desenvolvimento do indivíduo, a eritropoiese ocorre em diferentes locais, tendo como local inicial, no desenvolvimento embrionário de mamíferos, o saco vitelínico, com posterior mudança para o fígado fetal, antes de encontrar o seu destino final, a medula óssea (SATISH K. NANDAKUMAR, 2017; TANG; WANG, 2023).

As células eritróides do saco vitelínico são nucleadas e de vida curta, derivadas de células mesodérmicas formadas a partir de células epiblasticas. O início da eritropoiese no saco vitelínico dá-se com a interação das células mesodérmicas recém formadas, que adentram esse local primário de eritropoiese, com células do endoderma, sendo que tais células migrantes, além de iniciar seu comprometimento como progenitores eritróides, contribuem na formação das ilhas eritroblásticas (DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013).

Após a quarta semana de gestação, células hematopoiéticas começam a colonizar o fígado recém-formado, que servirá de sede para a hematopoiese pelo restante do último trimestre. Neste, as células estão em estreita associação com macrófagos, expelindo seu núcleo antes de entrar na corrente sanguínea, sendo estas menores do que os derivados do saco vitelínico. Com a entrada do segundo trimestre de desenvolvimento do conceito, começa a mudança do local de eritropoiese do fígado para a medula óssea, que será palco de um complexo processo com vários *rounds* de divisão e síntese de hemoglobina (PALIS; SEGEL, 1998; TANG; WANG, 2023).

Diferentemente do rápido comprometimento das células mesodérmicas migrantes no saco vitelínico, na medula óssea, a linhagem para a formação das células eritróides adultas tem origem em uma hierarquia mais complexa, derivando a partir de células tronco hematopoiéticas, que podem se auto renovar, bem como gerar todos os tipos de células sanguíneas e do sistema imune. O primeiro estágio da diferenciação das células progenitoras comprometidas com a linhagem eritróide é a formação da BFU-E, seguida da formação da CFU-E, com subsequente formação de pró-eritroblastos que avançam por múltiplos estágios de diferenciação, morfologicamente distinguíveis, englobando eritroblastos basófilos, policromáticos, ortocromáticos e por fim com a extrusão do núcleo e lançamento no sangue periférico dos

reticulócitos, estes últimos que se tornarão eritrócitos maduros. Morfologicamente há redução celular e nuclear, com acúmulo de hemoglobina, todo esse processo multietapas ocorrendo em áreas específicas da medula óssea, denominada ilhas eritroblásticas (CAULIER; SANKARAN, 2022; DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013; KOURY; PONKA, 2004; SATISH K. NANDAKUMAR, 2017; TANG; WANG, 2023).

As fases decorrentes à formação do eritrócito humano maduro são esquematizadas abaixo:

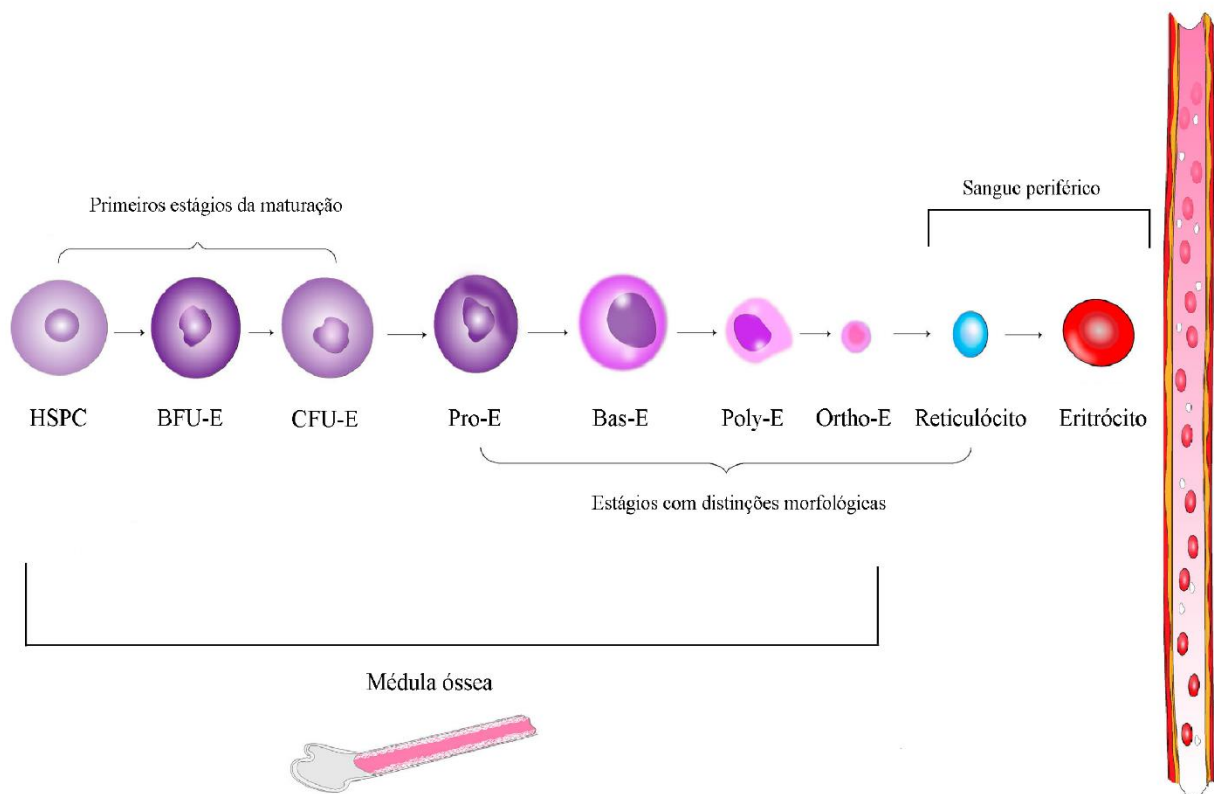


Figura1 – Estágios de maturação do eritrócito na medula óssea esquematizados. Da esquerda para a direita são mostradas as células tronco hematopoiéticas, BFU-E, CFU-E, pró- eritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, todos residentes na medula, diferenciando-se nas ilhas eritroblásticas. Por fim é mostrado o reticulócito, e posteriormente o eritrócito, concluindo a maturação das células sanguíneas. Figura adaptada de Tang & Wang, 2023.

1.2 Ilhas eritroblásticas

Simbolizada por um macrófago central circundado por eritroblastos em desenvolvimento, ilhas eritroblásticas referem-se a um microambiente na medula onde os precursores eritróides interagem com macrófagos, que provêm sobrevivência e diferenciação, com produção de fatores de crescimento, citocinas, além de moléculas de adesão. Eles são responsáveis também por fagocitar e expulsar núcleo, bem como organelas citoplasmáticas, dos eritroblastos (figura 2) (TANG; WANG, 2023).

A formação de eritrócitos funcionais deve-se a íntima associação de eritrócitos e macrófagos, mediada por moléculas de adesão, que também promovem interações eritroblastos/eritroblastos, bem como com a matriz extracelular. Como exemplo dessas moléculas de adesão têm-se a EMP (*erythroblast macrophage protein*), vital para proliferação, maturação e enucleação dos eritrócitos, além de outros receptores responsáveis por promover interações célula-célula, como CD29, ICAM-4, VCAM-1, CD69, CD163, CD51, CD95. Perturbação do arcabouço de ancoramento pode afetar a formação e função das ilhas eritroblásticas (CHASIS; MOHANDAS, 2008; DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013; TANG; WANG, 2023).

A troca dos locais de acontecimento da eritropoiese é acompanhada pela troca da hemoglobina expressa. A primeira troca ocorrendo com a mudança do saco vitelínico para o fígado fetal e, posteriormente, a segunda, 6 semanas após nascimento, com eritropoiese residindo na medula. Tal processo responde as necessidades de oxigênio durante o desenvolvimento e é denominado switching (DIEPSTRATEN; HART, 2019).

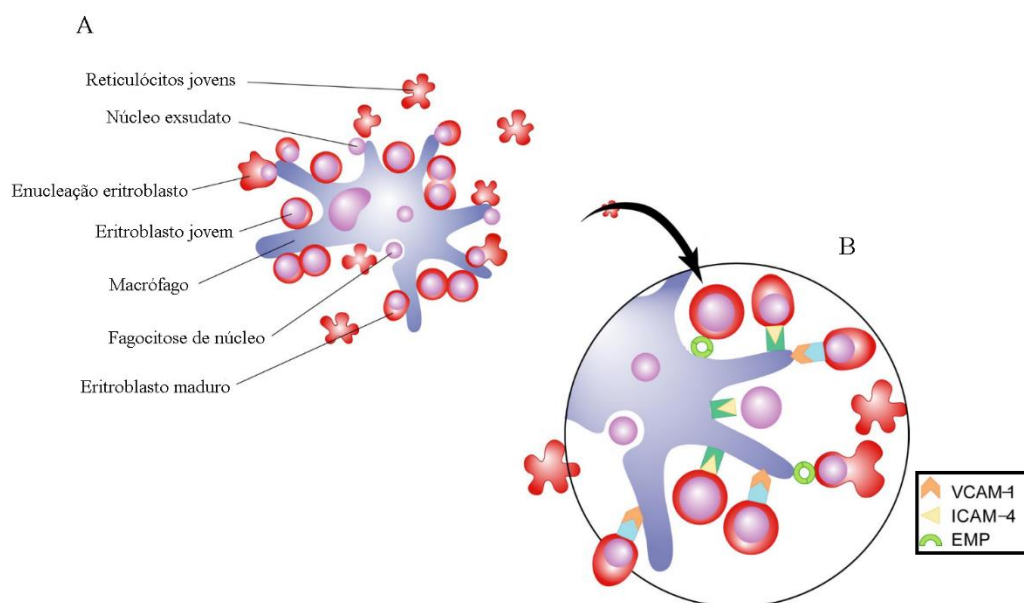


Figura 2 – Esquematização de uma ilha eritroblástica. (A) Processo de proliferação e diferenciação em uma ilha eritroblástica: macrófago demonstrado como a célula central com prolongamentos, em roxo, circundados de eritroblastos em diversos estágios de diferenciação. De cima pra baixo: reticulócitos jovens, demonstrado sem a presença de núcleo; núcleo exsudado; eritroblasto passando por processo de exsudação de núcleo, eritroblasto jovem (célula grande contendo núcleo central); núcleo exsudado sendo fagocitado por macrófago central; eritroblasto maduro (célula menor com núcleo adjacente a membrana plasmática). (B) Moléculas de interação entre eritroblastos e macrófagos. Adaptada de Diepstraten & Hartb, 2018.

1.3 Switching

Caracterizado como um processo conservado em vertebrados, neste há a mudança das proteínas envolvidas no transporte de oxigênio ao longo do fluxo sanguíneo, as hemoglobinas,

em resposta às necessidades de oxigênio durante o desenvolvimento (DIEPSTRATEN; HART, 2019). A hemoglobina é um tetrâmero composto por dois heterodímeros, um pertencente à família α -globina e outro à β -globina, codificados por genes organizados em *clusters*, respectivamente, cromossomo 16 e 11, com organização física correlacionada com a ordem de expressão durante a vida (DIEPSTRATEN; HART, 2019; MILLER, 2002; WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011). No cromossomo 16, que abriga o *cluster* α , têm-se, sequencialmente, os genes que codificam para ζ , α_1 e α_2 , enquanto a família β é composta por ϵ , γ^G , γ^A , δ e β (figura 3), tal *cluster* sendo extensivamente mais estudado (DIEPSTRATEN; HART, 2019; MILLER, 2002).

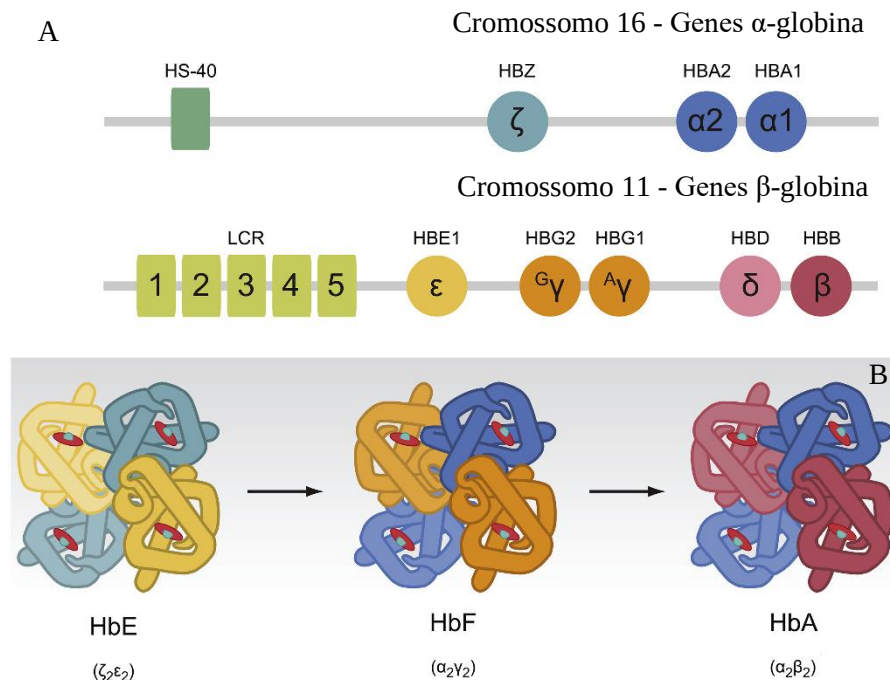


Figura 3 – Hemoglobinas expressas durante o desenvolvimento humano. (A) Disposição espacial dos genes do cluster α e β . (B) Esquematização estrutural das diferentes hemoglobinas formadas ao longo do desenvolvimento. HbE – Hemoglobina embrionária, HbF- Hemoglobina fetal e HbA – Hemoglobina adulta. Adaptada de Diepstraten & Hartb, 2018.

Dessa forma, nos primeiros estágios da gestação, a hemoglobina embrionária (HbE/Gower1) é sintetizada no saco vitelínico, composta por dois heterodímeros de ϵ e ζ -globina, essa é a forma mais predominante neste estágio, entretanto, existem outras duas, também encontradas no saco vitelínico, sendo Gower2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$) (PALIS; SEGEL, 1998). Ocorre, na quinta semana, expressão do gene da γ -globina no fígado fetal e silenciamento do gene embrionário, com hemoglobina embrionária gradativamente substituída

por hemoglobina fetal (HbF), α -globina e γ -globina. A expressão do gene da β -globina acontece aproximadamente 6 semanas após o nascimento, anteriormente expressa em menores proporções, os níveis de γ -globina diminuem, resultando na diminuição da HbF, e síntese da hemoglobina adulta (HbA), α e β -globina, na medula óssea. O decréscimo de HbF é progressivo de forma que, com dois anos de idade, esta esteja em menor proporção nas células sanguíneas de pessoas saudáveis (DIEPSTRATEN; HART, 2019; JANE; CUNNINGHAM, 1996; WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011).

A regulação ocorre por intermédio da região *enhancer* chamada LCR (locus control region), responsável pelo processo transcricional, com interação individual deste com as sequências promotoras gênicas, através do *looping* cromossômico. LCR ativa um gene do locus por vez, transitando entre os genes durante o switch (JANE; CUNNINGHAM, 1996; WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011). Múltiplos elementos *cis* reguladores e fatores de transcrição influenciam a troca de HbF para HbA. Elementos como BCL11A, SOX6, KLF1, variantes intergênicas entre HBSL1 e MYB, tem sido extensivamente estudados no intuito de estabelecer terapias gênicas que aumentem os níveis de HbF (figura 4), visto que essa pode melhorar a severidade de hemoglobinopatias como β -talassemia e doenças falciforme (DAME; JUUL, 2000; SANKARAN, 2016; WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011).

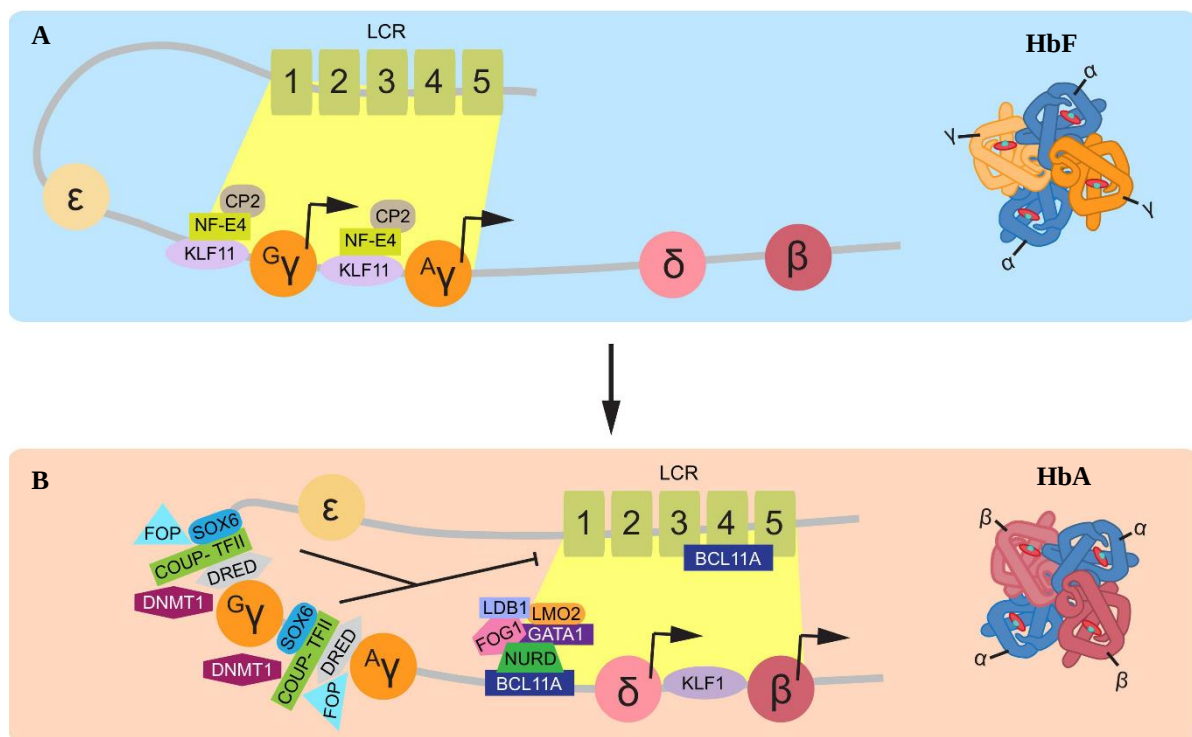


Figura 4- Modelo de looping da região LCR com promotores gênicos. (A) Modelo proposto para a expressão do gene γ -globina, e formação da hemoglobina fetal (HbF). (B) Organização do LCR com genes β -globina para formação da hemoglobina adulta (HbA), com repressores ligando-se ao promotor de γ -globina. Adaptada de Diepstraten & Hartb, 2018.

1.4 Hemoglobinopatias

Consistindo no grupo de doenças genéticas mais comuns em todo o mundo, em geral são herdadas de maneira autossômica recessiva, podendo ser caracterizadas ou pela diminuição da síntese da hemoglobina, no caso das talassemias, ou pela mudança estrutural da hemoglobina, como nas doenças falciforme (MAMAS *et al.*, 2022). A maioria dessas variantes patogênicas ocorre nos genes que codificam os quatro polipeptídios da hemoglobina adulta (HbA), com alterações *em α -globina* ou *β -globina*, sendo que, dentre essas, as de maior destaque são as talassemias maior e doenças falciforme, essa última afetando milhões de pessoas ao redor do mundo, especialmente afrodescendentes, com grande variabilidade clínica (HARTEVELD *et al.*, 2022; KATO *et al.*, 2018; MAMAS *et al.*, 2022; WANG; ZENNADI, 2021).

1.5 Doença falciforme

Doença falciforme (DF) é um termo genérico que define um grupo de doenças hereditárias, incluindo anemia falciforme (AF), HbSC e HbS β -talassemia, caracterizadas por mutações no gene que codifica a subunidade β da hemoglobina (JAMES V NEEL, 1949). As DF são caracterizadas por uma alteração genética da hemoglobina (Hb) causada pela mutação pontual no gene da globina beta (BUNN, 1997; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

O gene da hemoglobina β está localizado no braço curto do cromossomo 11 e é responsável pela síntese das cadeias globínicas β que compõem a Hb adulta normal (HbA - $\alpha_2\beta_2$) (BUNN, 1986). Entretanto, a troca do vigésimo nucleotídeo, no sexto códon do exon 1 do gene, acarreta a substituição do ácido glutâmico (com características hidrofílicas) por uma valina (com características hidrofóbicas) resultando na formação de uma proteína com estrutura e características bioquímicas diferentes, conhecida como HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) (INGRAM, 1957; PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, 1960; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A valina, presente na cadeia da HbS, produz regiões hidrofóbicas de contato no tetrâmero desoxigenado, ligando-se a outros aminoácidos hidrófobos, como alanina, fenilalanina e/ou leucina da molécula de HbS adjacente, que resulta na ligação entre esses aminoácidos, produzindo um polímero que se estende e preenche o eritrócito, rompendo a arquitetura e flexibilidade eritrocitária (FRONTICELLI; GOLD, 1976; WISHNER *et al.*, 1975).

A polimerização da HbS é o mecanismo patogênico primário, que fornece um ambiente determinístico para a evolução das manifestações clínicas da doença (NOGUCHI;

SCHECHTER, 1981; SERJEANT, G. R.; PETCH, M. C.; SERJEANT, 1973; VEKILOV, 2007). Dessa forma, a presença da HbS, a polimerização seguida de falcização alteram drasticamente as propriedades mecânicas e reológicas das hemácias, prejudicando o fluxo sanguíneo através da microvasculatura (FRENETTE, 2002; KAUL; FABRY; NAGEL, 1989).

Sucessivo as alterações das propriedades mecânicas e reológicas, as hemácias falciformes apresentam auto-oxidação instável da Hb e altas exigências metabólicas devido aos ciclos recorrentes de polimerização e despolimerização da HbS que exacerbam a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BANERJEE; KUYPERS, 2004; WANG; ZENNADI, 2021). Somado a isso têm-se eritrócitos falcêmicos gerando ERO enzimaticamente por intermédio da NADPH-oxidase (GEORGE *et al.*, 2013).

A atividade da NADPH-oxidase parece ser regulada pela proteína quinase C (PKC), Rac GTPase e níveis de Ca^{2+} (GEORGE *et al.*, 2013). Dessa forma, as hemácias falciformes geram pelo menos duas vezes mais $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , radicais hidroxil ($\text{HO}^{\bullet}$) e produtos de oxidação lipídica em relação a eritrócitos contendo Hb A (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000; HEBBEL *et al.*, 1982; RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986; SHENG; SHARIFF; HEBBEL, 1998). A capacidade antioxidante prejudicada das células falcêmicas contribui significativamente para a ruptura da homeostase metabólica destas células, culminando em hemólise (CHAVES *et al.*, 2019).

Embora grandes avanços tenham sido feitos na compreensão da patologia molecular da DF a base genética da sua heterogeneidade clínica está muito distante de ser completamente compreendida (HABARA; STEINBERG, 2016; MENZEL; THEIN, 2019), sendo escarças as alternativas terapêuticas para essa doença.

No Brasil, o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme”, aprovado pela Portaria Conjunta nº 05, de 19 de fevereiro de 2018, regulamenta e estabelece os critérios de inclusão e exclusão, esquema de administração medicamentosa e de monitoramento de toxicidade dos tratamentos disponíveis para pessoas com DF (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Resumidamente, o Protocolo estabelece as diretrizes para profilaxia antibiótica, tratamentos adjuvantes usados na prevenção de complicações e no tratamento de intercorrências incluem ácido fólico (uso contínuo), analgésicos, anti-inflamatórios e quelantes de ferro. Define as diretrizes à respeito de tratamentos não medicamentosos, como regime de transfusão de sangue, e transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), sendo esse, o único tratamento curativo da DF; e o uso de hidroxycarbamida (HC), até o momento, considerada a única terapia medicamentosa eficaz da DF (ANDERSON, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; PLATT, 2008).

1.6 Hidroxicarbamida

A HC (também conhecida como hidroxiureia) é um agente citostático e, na DF, seu principal mecanismo de ação é a indução da produção de hemoglobina fetal (HbF), que reduz a polimerização da HbS. O mecanismo exato pelo qual a HC induz a geração de Hb F não é claro, mas há evidências que sugerem que a ativação dependente de óxido nítrico da guanilil ciclase solúvel em células eritroides pode estar envolvida. Além disso, a HC reduz a contagem de leucócitos e reticulócitos, previne a ativação do sistema complemento, diminui a hipercoagulabilidade e as interações de adesão celular e tem efeitos anti-inflamatórios imediatos independentes dos níveis de HbF (COLELLA *et al.*, 2012; ROUMENINA *et al.*, 2020; WARE *et al.*, 2017), levando a uma redução na incidência de crises álgicas e de síndrome torácica aguda, bem como à diminuição das taxas de hospitalização, de transfusão de sangue e de mortalidade entre pessoas com DF.

Mesmo com os mecanismos incitados por esse medicamento alguns indivíduos não apresentam uma resposta terapêutica eficiente, geralmente devido às limitações da adesão ao tratamento, mas também, devido a fatores fisiológicos, metabólicos, socioeconômicos e ambientais e, possivelmente, por razões farmacogenômicas (HUSAIN; HARTMAN; DESAI, 2017; WALSH *et al.*, 2014). Recentemente, estudos com pessoas com DF mostraram que, além das variações genômicas no gene *HBB*, variantes em genes modificadores fora do *HBB* também estão significativamente associadas ao aumento dos níveis de HbF e, conseqüentemente, à resposta e à tolerância ao tratamento com HC. Estas questões implicam diretamente na variabilidade clínica observada entre as pessoas com DF (GRAVIA *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2007; SEBASTIANI *et al.*, 2008).

1.7 Biologia Redox

As células eucarióticas reconhecem e processam diversos sinais de estresse para suscitar mecanismos de expressão gênica responsáveis por remediar danos celulares ou, alternativamente, induzir apoptose (WEK; JIANG; ANTHONY, 2006). Várias vias de sinalização convergem para maquinaria translacional para regular tais funções e, até o momento, o papel da via da fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B (PI3K/AKT) na regulação da tradução está entre os mecanismos mais bem compreendidos e estudados (ROUX; TOPISIROVIC, 2018).

É bem conhecido que a ativação da via de sinalização PI3K/AKT desempenha um papel significativo na ativação do fator de transcrição NRF2, a qual é feita pela fosforilação da

glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β) (ZHANG *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2014). Ademais, dados recentes sugerem seu envolvimento na fosforilação do eIF2 α e, consequentemente, na regulação de sua cascata de sinalização (ROUX; TOPISIROVIC, 2018). A fosforilação do eIF2 reduz a síntese proteica global concomitantemente com a indução da tradução de mRNAs específicos, como aqueles que codificam o fator de ativação transcricional 4 (ATF4) da família de fatores de transcrição do tipo zíper de leucina de região básica (bZip). Níveis elevados de ATF4 levam à indução de reguladores de transcrição bZIP adicionais, que juntos induzem um programa de expressão gênica importante para homeostases redox e metabólica, e apoptose (HARDING *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2004; LU; HARDING; RON, 2004; VATTEM; WEK, 2004; WEK; JIANG; ANTHONY, 2006).

NRF2 desempenha papel central no controle da expressão de enzimas de defesa antioxidantes (ISHII *et al.*, 2000; ITOH *et al.*, 1997). Ele dimeriza com uma das pequenas proteínas Maf (sMaf), formando o heterodímero NRF2-sMaf, que liga-se ao elemento de resposta antioxidante 2 ou elemento de resposta eletrofílica (ARE) localizado nas regiões reguladores de muitos genes de enzimas citoprotetoras (ITOH *et al.*, 1997; RUSHMORE; MORTON; PICKETT, 1991). Desta forma, esse fator de transcrição ativa uma ampla gama de processos de defesa celular, eliminando substâncias nocivas. Ele também é influenciado pela proteína KEAP1, que atua como subunidade de reconhecimento de substrato de ligase de ubiquitina E3 atingindo-o especificamente (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Na ausência de estresse, o NRF2 é eficientemente ubiquitinado pela Keap1-Cul3 E3 ligase e degradado rapidamente através da via do proteassoma, de tal forma que sua atividade celular é suprimida constitutivamente. Por exposição a estresses oxidativo ou eletrofílico, o KEAP1 perde sua capacidade de ubiquitinar o NRF2, permitindo seu acúmulo no núcleo e ative seus genes-alvo (figura 5) (SUZUKI; YAMAMOTO, 2017). Este tipo de regulação é um dos exemplos de estruturas operacionais centrais da biologia redox (JONES; SIES, 2015).

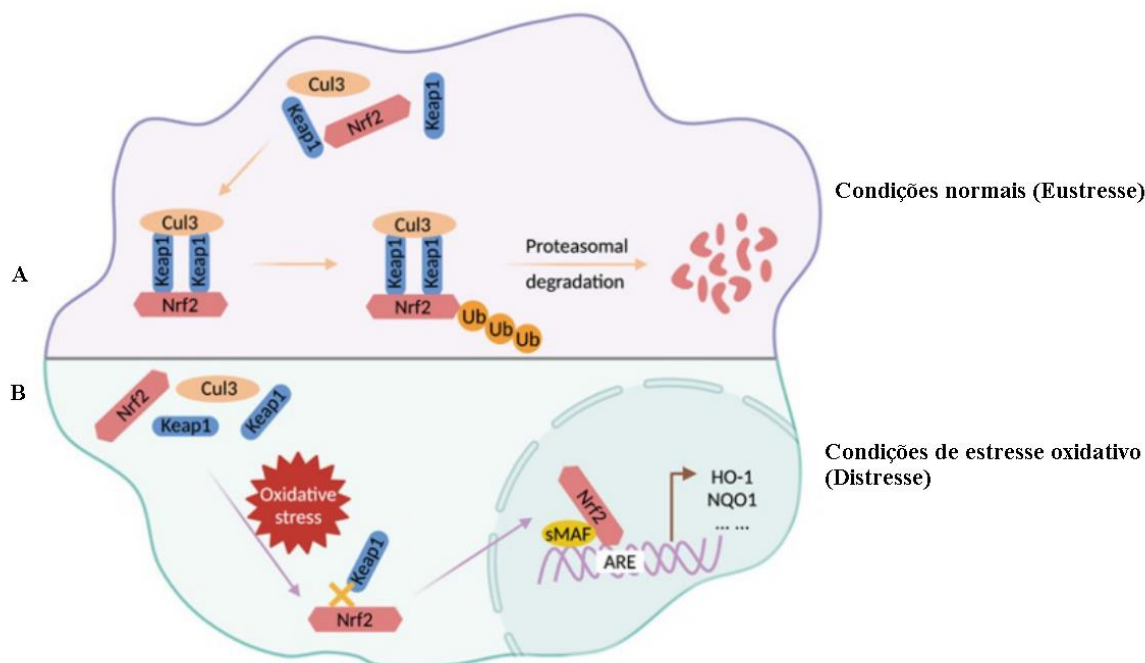


Figura 5- Atividade transcricional e mecanismo regulatório de NRF2. (A) Em condições normais (eustresse) KEAP1 se liga a NRF2 ubiquitinando-o eficientemente, por intermédio da via proteossomal. (B) Dentro de condições de estresse oxidativo (distresse) KEAP1 não se liga a NRF2, este sendo translocado para o núcleo, formando heterodímero com proteínas sMAF e ligando ao elemento de resposta antioxidantes (ARE), incitando um programa transcricional de importantes genes que codificam para enzimas antioxidantes. Adaptada de Zhang *et al*, 2022.

Ao contrário dos códigos genético e de histonas, responsáveis pelo armazenamento e transferência de informações, os códigos epigenéticos e redox definem as operações dos códigos genéticos e de histonas na estrutura organizacional, diferenciação e adaptação de um organismo (JONES; SIES, 2015). Portanto, o “paradigma da biologia redox”, refere-se ao papel desempenhado pelos antioxidantes que modulam as redes complexas que controlam a sinalização e o metabolismo celular. Este dogma central da regulação redox permite a compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, potencialmente atraentes como alvo terapêutico para doenças, nas quais o estresse oxidativo e a inflamação desempenham um papel importante (GROEGER; FREEMAN, 2010; LEVONEN *et al.*, 2014; YATES; KENSLER, 2007), como na DF.

1.8 Oeste da Bahia

Diferentemente das demais regiões do estado, o Oeste da Bahia é marcado por peculiaridades econômicas, bem como características naturais e agentes de territorialização responsáveis pela identidade atualmente assumida pela região (REBOUÇAS; BARBOSA; GIUDICE, 2007). Tal região possui 35 municípios localizados à margem esquerda do Rio São

Francisco, abrangidos quase que em sua totalidade em áreas de domínio do cerrado (APARECIDA; OLIVEIRA, 2015), dentre esses têm-se Barreiras como pólo regional em importância econômica (REBOUÇAS; BARBOSA; GIUDICE, 2007).

Com população estimada, em 2018, de 153.831 habitantes, Barreiras é o 11º município mais populoso do estado, sendo o 18º do interior da região nordeste. Categorizada em 2007 como capital regional C na hierarquia urbana do Brasil, é importante polo agropecuário, econômico, turístico, educacional e médico da região Oeste (SOBRE BARREIRAS, 2023), com importante centro médico, Hospital do Oeste, para atendimento de alta complexidade, situado neste município, atendendo toda a região Oeste, bem como cidades do Piauí (HOSPITAL GERAL DO OESTE, 2020). Destaca-se, além do supracitado, o centro médico de saúde Leonídia Ayres de Almeida, que abarca importantes programas de atenção a patologias específicas como Doença de Chagas, Tuberculose, Hanseníase e de Doença Falciforme (CENTRO DE SAÚDE LEONÍDIA AYRES DE ALMEIDA É REFERÊNCIA EM ATENDIMENTO DE MÉDIA COMPLEXIDADE PARA BARREIRAS E OESTE DA BAHIA, 2017).

1.9 Justificativa

Dessa forma, considerando o supracitado, e observando a heterogeneidade clínica da supracitada doença, as alternativas terapêuticas escarças no tratamento desta, bem como a importância da biologia redox em doenças marcadas por estresse oxidativo e inflamação, características centrais na DF, pretende-se gerar conhecimentos específicos sobre importantes mecanismos de adaptação redox indispensáveis para homeostase e sobrevivência celular, alavancando preceitos fundamentais para futura implementação de antioxidantes como alternativas terapêuticas no tratamento de indivíduos com DF e ampliando a compreensão sobre a variabilidade fenotípica e resposta diferencial ao uso de HC em pessoas com AF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a influência do tratamento com HC em vias críticas de adaptação redox em pessoas com AF, analisando expressão gênica em reticulócitos, associando tais influências com parâmetros bioquímicos modificadores da doença.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica das cinases (*PI3K e AKT*) e dos fatores de transcrição (*ATF4 e NRF2*) que modulam as vias de sinalização propostas, bem como de seus principais genes-alvo (*PRDX1, GPX1, CAT, SOD1*);
- Verificar a influência do tratamento com HC sobre as vias de adaptação e homeostase celular avaliadas;
- Investigar a contribuição desses mecanismos de adaptação redox sobre parâmetros bioquímicos modificadores da doença.

ARTICLE

Hydroxycarbamide and sickle cell anemia: paradoxical effects related to redox mechanisms of cellular adaptation

Ilana Luize Rocha Santana¹; Victoria Simões Bernardo¹; Edis Belini Junior²; Larissa Paola Rodrigues Venancio³; Danilo Grünig Humberto da Silva^{1,2}

1 Department of Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brazil.

2 Campus de Três Lagoas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CPTL/UFMS), Mato Grosso do Sul, Brazil.

3 Campus Reitor Edgard Santos, Barreiras, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Bahia, Brazil.

Abstract:

Sickle cell anemia (SCA) is a hemolytic anemia characterized by a chronic redox imbalance. In this study, we aimed to determine the influence of hydroxycarbamide (HC) treatment, the primary medication used for this disease to date, on the redox mechanisms of cellular adaptation in patients with SCA. We analyzed ten patients treated (HC⁺) and nine not treated (HC⁻) with the HC. We evaluated, by RT-qPCR, the transcript levels of the transcription factor NRF2 and ATF4, their modulators (KEAP1, AKT, and PI3K), as well as essential antioxidants involved in redox adaptation (SOD1, CAT, PRDX1, and GPX1). We also collected data on biochemical parameters such as total leukocyte number, direct and indirect bilirubin, lactic acid dehydrogenase (LDH), and fetal hemoglobin (HbF%) levels by analyzing the participants' medical records. Among the results obtained, it is noteworthy that NRF2 presented increased expression in the HC⁺ group but reduced ATF4, CAT, and SOD1 mRNA levels. Multivariate statistical analysis ranked NRF2 and ATF4 as the markers that most characterized the groups studied. Therefore, taking together our results and the literature, we suggest that HC use results in a dynamic relationship between the redox signaling pathways of the investigated transcription factors triggered as part of an adaptive response to this medication, possibly associated with their involvement in Hb F production.

Keywords: *hemoglobinopathies, redox homeostasis, antioxidants, transcript levels, HbF, NRF2, ATF4.*

1. Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a hemolytic anemia characterized by a punctual mutation (*HBB*:c.20A>T; rs334) in homozygosis that produces the hemoglobin S (HbS) [1–4]. The HbS is responsible for most of the reactive oxygen species (ROS) generated in these cells (approximately double the amount compared to the red blood cells), causing extensive oxidative damage [5,6]. Despite its well-defined molecular characterization, SCA presents many complications, such as chronic inflammation and oxidative stress [7], resulting in a clinical heterogeneity that is not fully understood [8–11]. Thus, redox homeostasis disruption forms an essential part of the complex pathology of this disease, with signs of oxidative stress observed in various tissues [7]. Therefore, highlighting the importance of redox biology in SCA and emphasizing that studies that aim to understand this disease's redox signaling network are

crucial [12–14]. In this scenario, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) is one of the central players controlling the oxidative stress response [15].

Under oxidative stress, the NRF2 translocates to the nucleus and initiates the transcription of numerous antioxidant genes with the Antioxidant Response Element (ARE) promoter, such as superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (GPX1), peroxiredoxins 1 (PRDX1) [16,17]. Under physiological conditions, NRF2 is degraded through the ubiquitin-proteasome pathway, a mechanism triggered by the KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), an oxidative stress sensor [18]. Unlike what we observed for KEAP1, other elements, such as proteins protein kinase (PKB/AKT) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K), stabilize NRF2 and, consequently, suppress NRF2' degradation [15,18]. Therefore, as a master regulator of the antioxidant processes, the NRF2/ARE signaling pathway is protective in multiple diseases with redox imbalance conditions, such as SCA [19].

Unfortunately, few disease-modifying agents that target the underlying pathophysiology of SCA exist. And even fewer are approved for use. The first Food and Drug Administration (FDA)-approved drug (and still the primary medication used to date) was Hydroxycarbamide (HC), a compound that decreases intracellular HbS polymerization [20]. This oral drug has been shown to have many other beneficial effects for treating SCA, including improvement of sickle cell metabolism, reducing inflammation and oxidative stress [21,22]. However, despite decades of study, HC's action mechanism still needs to be fully understood to explain the different patients' responses to its use, which fascinates scientists to this day [23].

Recently, Santana et al. (2020) provided evidence that HC directly neutralizes free radicals and stimulates the production of antioxidant genes via activating the NRF2 signaling pathway, using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [24]. In addition, Huang et al. (2020) identified transcription factor Activating transcription factor 4 (ATF4), a known HRI-regulated protein, as a novel gamma (γ)-globin regulator. ATF4 directly stimulates the transcription of BCL11A, a repressor of γ -globin transcription, by binding to its enhancer and fostering enhancer-promoter contacts [25]. Furthermore, gene expression analysis of patients with SCA during vaso-occlusive crises and in a steady state, compared with age-matched healthy patients, highlights both NRF2 and ATF4 differential expressions, indicating they are possible candidates involved in the severity of this pathology [26]. Thus, observing the beneficial effects of HC in the treatment of individuals with SCA and viewing the scarce knowledge involving its influence on redox homeostasis, this study aimed to determine the influence of HC treatment on critical pathways of redox adaptation in patients with SCA and their association with biochemical disease modifiers and gene expression on reticulocytes.

2. Material and methods

2.1 Biological Samples

Blood samples (4mL) were collected through venipuncture in EDTA tubes from SCA patients, aged between 18-40 years old, enrolled in the Sickle Cell Disease Program in Barreiras, Bahia, Brazil, located at the Leonídia Ayres de Almeida health center. According to Brazilian Regulations, the Data Safety Monitoring Board (DSMB) approved this study (CAAE

n° 29075620.6.0000.5026). After giving their informed consent, all patients answered a questionnaire to screen them according to the following exclusion criteria: transfusion in the last 120 days, pregnancy and bone marrow transplant, and presenting pain on the collection day. Individuals were grouped according to HC use (n=10) or not (n=9). The use of other medications, the history of pain crises in the collection year, and the number of transfusions performed throughout life were investigated (Table 1). After consulting the corresponding medical records, we obtained patients' information on biochemical parameters (Table 2).

Table 1. Descriptive data of study participants

Characteristics	HC⁺ (N=10)	HC⁻ (N=9)
Age (Years)	26.8±7.17	21±3.24
<i>Gender</i>		
Female	6	5
Male	4	4
<i>Transfusion history</i>		
0-10	5	7
11-20	0	0
21-30	4	1
31-40	1	1
>40	0	0
<i>Clinical history</i>		
<i>Number of pain crises in the last year</i>		
0-2	9	6
3-5	1	3
>5	0	0
<i>Number of infections in the last year</i>		
0-2	10	9
3-5	0	0
>5	0	0
<i>Number of hospitalizations in the last year</i>		
0-2	10	9
3-5	0	0
>5	0	0
Mean dose mg/kg per day	20 mg/kg	-

For age, the mean value with standard deviation is indicated. HC⁺ refers to the group using the medication and the HC group without it. Mean dose of hydroxyurea obtained with the mean dose to the group.

Table 2. Biochemical data of the study participants

Characteristics	HC ⁺	HC ⁻	P value
Total leukocytes	7550±5.08	12750±3.48	0.07
Indirect bilirubin	1.97±2.23	3.30±2.07	0.16
Direct bilirubin	0.65±0.20	0.90±1.50	0.36
Hb F%	13.50±7.69	10.55±8.67	0.76
LDH	728±3.48	916±5.05	0.79

Biochemical parameters were collected from patient records. The indicated values refer to the mean and standard deviation, analyzed individually by group, using hydroxycarbamide (HC⁺) and without the medication (HC⁻). Hb F% percentage of fetal hemoglobin. LDH lactate dehydrogenase. The P-value was obtained from the General Linear Model (GLM) analysis.

2.2 Hemoglobin phenotypes and genotypes

The Hb fraction quantification was obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) using Ultra 2 Resolution equipment (Trinity Biotech), according to the manufacturer's instructions. We confirmed the Hb genotype in all patient samples by molecular analysis using PCR–RFLP. The PCR–RFLP reactions were standardized in a SimpliAmp gradient thermocycler (Applied Biosystems). From this, the defined reaction conditions were: 10X buffer; 1.25 mM dNTP; 25 mM MgCl₂; 10 µM of HBS1 primer (5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3'), 10 µM of HBS2 primer (5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'); 5 U of Platinum Taq (Invitrogen™) and ~100 ng of total genomic DNA, in a final reaction volume of 24 µL. The amplicon obtained was digested by FastDdeI® (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) restriction endonuclease, according to the manufacturer's instructions.

2.3 Sample transport and preparation

The samples were stored in an iced styrofoam box and sent to the Laboratory of Infectious Agents and Vectors (LAIVE) at the Federal University of West Bahia (UFOB), Campus Rector Edgard Santos, for reticulocytes separation following the protocol used in The New York Blood Center. The obtained pellet was immersed in 1mL of RNA Lateral solution. The RNA was extracted following the TRI reagent™ protocol (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions, and its concentration was measured by spectrophotometry using Varioskan™ multimode microplate reader (Thermo Scientific).

2.4 Real-time PCR

The cDNA synthesis was carried out through the reverse transcription reaction, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions. The primers for the genes that encode the transcription factors NRF2 and ATF4, their modulators (KEAP1, AKT, and PI3K), as well as the antioxidants (SOD1, CAT, PRDX1, and GPX1), were obtained from the literature (Table S1 – Supplementary material). The samples were amplified in

triplicate with real-time amplification detection performed in the QuantStudio 5 equipment (Applied Biosystems), using the PowerUp™ SYBR™ Green PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems). Except for SOD1, which had a temperature of 62°C for 1 min, all other analyzed genes followed a standard melting temperature of 60°C for 1 min. The fold change in mRNA levels was calculated using $2^{-\Delta\Delta CT}$, and all the values were normalized to the expression of the *beta-actin* (BAC) gene [25].

2.5 Statistical analysis

We performed the analysis using Statistica 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Graphics used GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). For the univariate analysis, we assessed data normality using Normal Probability Plots of Residuals. Thus, all data were logarithmically transformed ($\log_{10}$). We used General Linear Models (GLM) for comparison analysis because these approaches generalize to unbalanced designs with more factors, including crossed and nested, and combinations of categorical and continuous variables. Thus, we have established the groups (HC- and HC+) as predictors with adjustment for gender, age at investigation, and HC dose, and the transcript levels and biochemical parameters as dependent variables.

We also performed a multivariate analysis on all markers studied (mRNA levels and clinical follow-up) based on a supervised clustering/classification method, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), using the MetaboAnalyst 3.0 software (<http://www.metaboanalyst.ca>) [26], essentially as previously described. As a multivariate alternative for analyzing the degree of association, the General Regression Model (GRM) analysis with multiple regression design was adopted, implementing more about the relationship between several independent variables and a dependent one. This analysis also provided the partial correlation, that is, the individual contribution of a certain independent variable from the set on the dependent one, after the control for all the other variables in the equation. The results were expressed as mean $\pm$ 95% of the confidence intervals of their values, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Gene expression of the redox signaling pathways

We found statistically significant reduced expression of ATF4, SOD1, and CAT transcripts of 2, ~1.3, and ~1.5-fold, respectively, in the HC⁺ group compared with HC⁻. Additionally, mRNA levels of NRF2 increased by ~3-fold in the HC⁺ group compared to HC⁻. Although not statistically significant, a similar pattern of increased expression was observed for AKT in the HC⁺ group (figure 1).

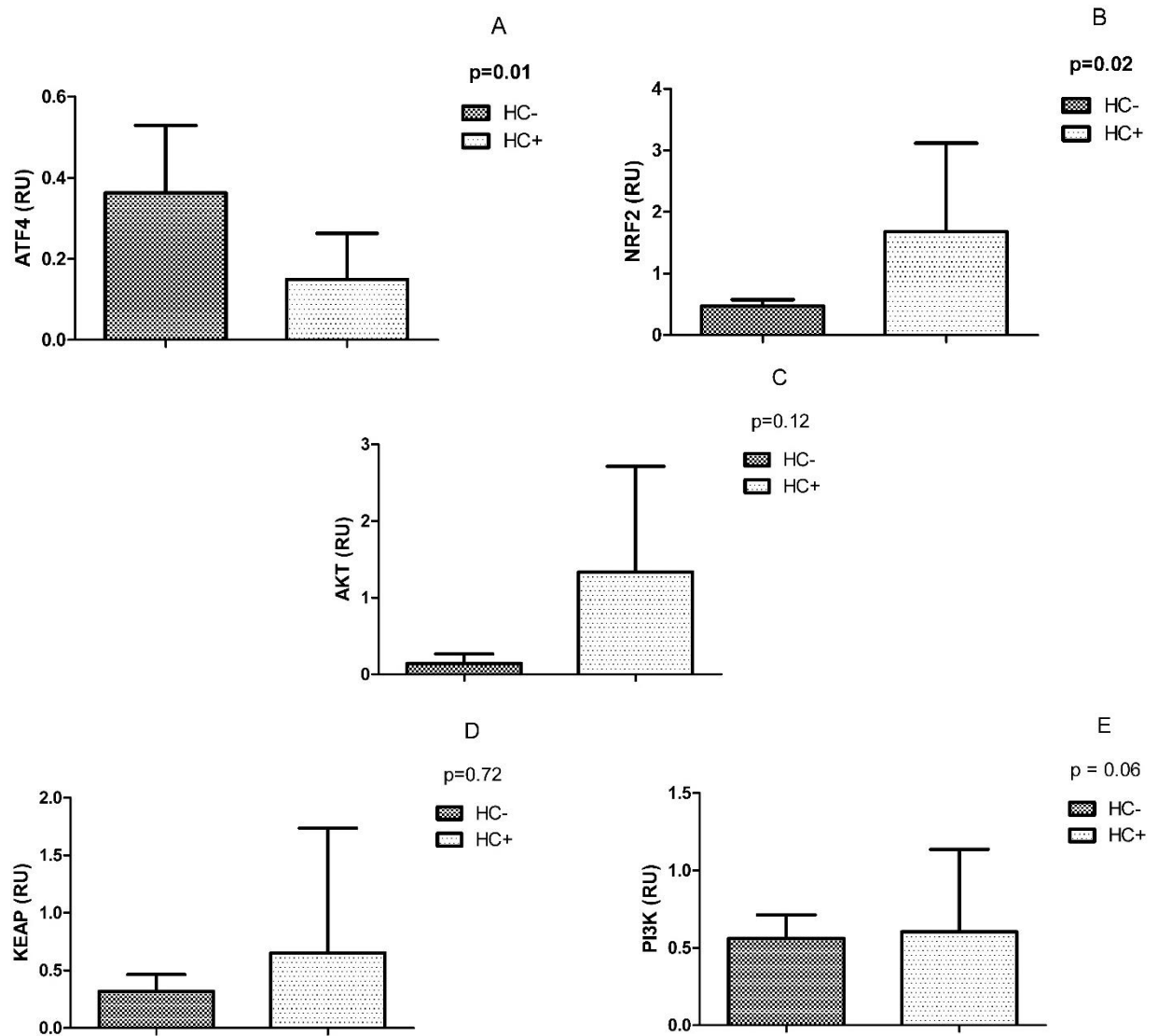


Figure 1. Relative expression of the transcription's factors and their modulators in reticulocytes. Results were generated with General Linear Model (GLM) analysis. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant (in bold) (*). **(A)** Activating Transcription Factor 4 (ATF4). **(B)** NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2). **(C)** Protein kinase B (PKB/AKT). **(D)** Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1). **(E)** Phosphoinositide-3-kinase (PI3K).

Therefore, it is possible to assume that the NRF2 pathway is active in the HC+ group. However, the absence of an increase in the transcripts of the antioxidant enzymes evaluated suggests that its main role did not involve ROS resistance in reticulocytes (figure 2).

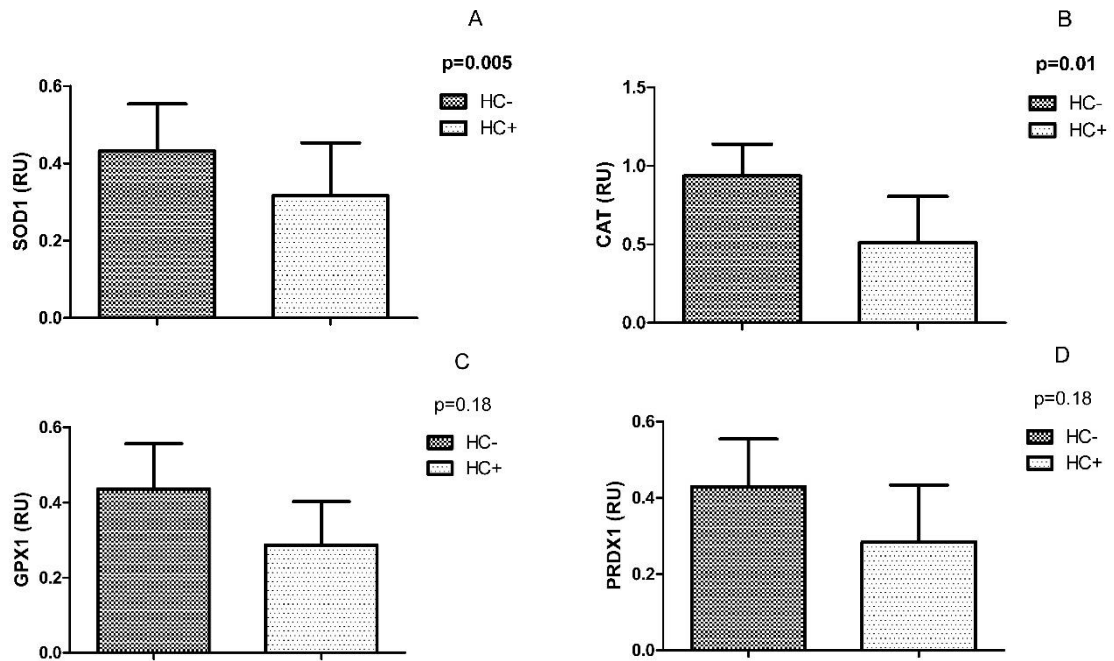


Figure 2. Relative expression of essential antioxidants involved in redox adaptation in reticulocytes. Results were generated with General Linear Model (GLM) analysis. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant (in bold) (*). **(A).** Superoxide dismutase 1 (SOD1). **(B).** Catalase (CAT) **(C).** Glutathione Peroxidase 1 (GPX1). **(D).** Peroxyredoxin-1 (PRDX1).

3.2 Metabolic separation of sickle cells with or without HC use

We investigated if the dataset of evaluated biomarkers would be able to distinguish HC⁻ and HC⁺ groups, according to their data distribution, through a multivariate statistical analysis. We found a differentiation pattern between groups, but not as characteristic in the PLS-DA score plot, primarily because of the high variability among the patients under HC treatment (Figure 3-A). In addition, the analysis identified the most critical features ranked based on the projection of important variables (VIP) scores that contributed to validating the biomarkers evaluated (Figure 3-B). Despite the low score values, the transcription factor levels were the variable that most depicted the studied groups, with statistical differences in the univariate analysis.

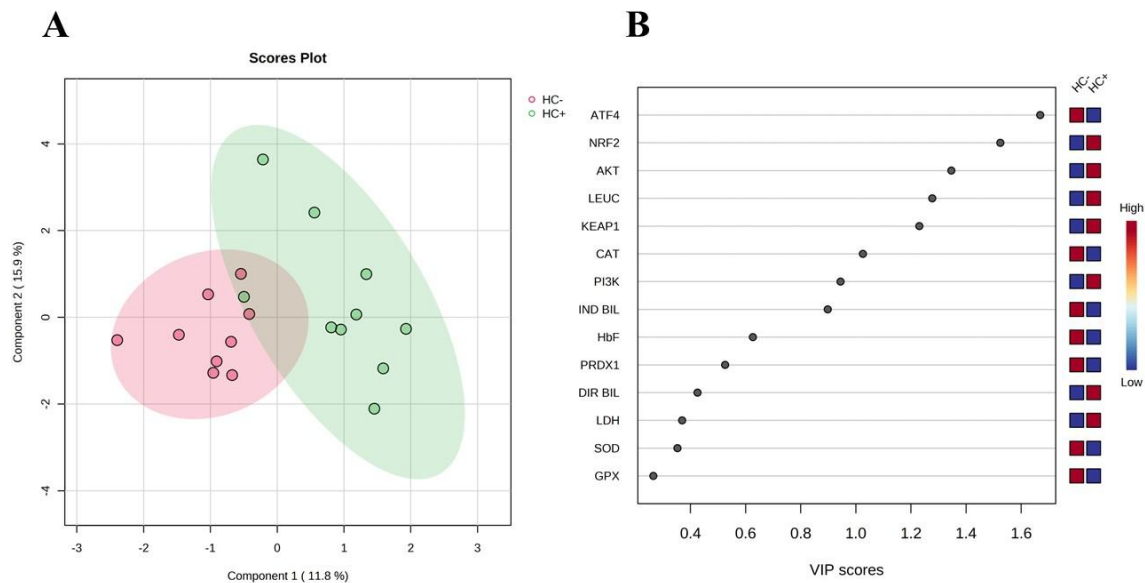


Figure 3. PLS-DA score plot of the two principal components. (A) Shaded elliptical areas indicate regions with 95% confidence. Green dots indicate patients using HC (HC⁺), and red dots indicate patients not using the drug (HC⁻) **(B).** VIP Score ranked the most important features. On the y-axis, left corner of the image, all the variables studied for the groups (HC⁺ vs HC⁻) are shown. The analyzed genes, Activating Transcription Factor 4 (ATF4), Protein kinase B (PKB/AKT), Phosphoinositide-3-kinase PI3K., NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), Peroxyredoxin-1 (PRDX1), Superoxide dismutase 1 (SOD1), Glutathione Peroxidase 1 (GPX) Catalase (CAT); biochemical parameters, fetal hemoglobin (HbF), leucocytes, direct bilirubin (DIR. BIL), lactate dehydrogenase (LDH), indirect bilirubin (IND. BIL). The miniheatmap on the right represents concentration variations within groups. **Source:** Metaboanalyst.

3.3 Association degree results

We investigated any relationship between the mRNA levels obtained to transcriptions factors and their modulators, the antioxidants and the HbF levels to expand the understanding of the redox homeostasis contribution to the SCA phenotypic variability. We verified whether the data distribution of the transcript factors and their modulators (as independent variables) showed any effect on the expression of their downstream target-genes, and on HbF levels. We did not find any association (Table 3).

Table 3. Regression model analysis

Dependent Variable	Independent Variable
	ATF4/NRF2/AKT/KEAP1/PI3K
Hb F%	R= 0.85; p= 0.35
CAT	R= 0.74; p= 0.24
SOD1	R= 0.72; p= 0.22
GPX1	R= 0.83; p= 0.05
PRDX1	R=0.49; p=0.74

Multiple associations between the mRNA levels obtained to transcriptions factors their modulators, the antioxidants and the HbF analyzed in the study. Dependent variables being the antioxidants and HbF and independent ones such transcriptions factors and their modulators analyzed in the study. R: multiple association coefficient (General Regression Model analysis, multiple regression design); $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

4. Discussion

HC was the first and only FDA-approved drug for treating SCD from 1998 to 2017 [27]. Notably, while other drugs have been studied over the past decades, HC is still considered the pillar for the pharmacological treatment of SCD due to its multifactorial protection mechanism for sickle RBC alterations. HC is a compound with a multifactorial mechanism of action whose beneficial effects are associated with several underlying pathophysiology of this disease, including an increase in the cell's antioxidant capacity [28–33]. To our knowledge, our study is the first to use reticulocytes to establish the transcript levels to investigate the impacts of HC use on the gene expression of critical cellular redox pathway members. Therefore, the present study aimed to establish how HC interferes with redox mechanisms indispensable for cellular homeostasis.

As previously mentioned, NRF2 is a transcription factor central to redox homeostasis [15,18,34,35], whose expression was increased in the HC⁺ group. A similar induction pattern was reported for AKT, known to be responsible for maintaining the integrity of NRF2 [18], indicating greater activation of the NRF2/ARE redox pathway in this group. However, unlike expected, a greater expression of the evaluated antioxidants genes downstream of this transcription factor was not observed in the HC⁺ group, especially considering studies like Santana et al., 2020, which observed induction of the expression of antioxidant genes induced by the NRF2 pathway in PBMCs and HUVECs cells [24].

We found a decrease in the antioxidant transcripts levels SOD and CAT in the HC⁺ group. Previously reported studies associated greater expression and even enzyme activity (mainly for SOD) in SCD with HC use [36–38], like some studies in cellular models showed an increase in the enzymatic activity of SOD1 [24], with authors such as Silva et al. (2011) reporting a decrease of ~30% in CAT activity in the group without HC, *in vivo* [32]. Therefore, we demonstrated the high levels of NRF2 transcripts in the HC⁺ group were not associated with a redox response, as seen in table 3 where transcription factors and their modulators did not influence the antioxidants studied. We hypothesize that the high NRF2 levels is associated with Hb F induction, even though our correlation analyzes didn't show significant results, this could be justified by other factors that affect HbF expression and were not analyzed in the present study, since this correlation is well defended in the literature.

It is important to highlight that in the present study, we evaluated gene expression in reticulocytes, which are immature forms of RBC in the final stages of differentiation (i.e., cells without the presence of the nucleus) [39], from SCA patients while the work by Santana et al. was with PBMCs, from healthy volunteers (HbAA genotype), and HUVECs, which still have a nucleus as well as cytoplasmic organelles [35,36], which may be one of the reasons for the different expression pattern found. In addition to those mentioned earlier, it is important to consider that, according to Kleiveland (2015), standard *in vivo* conditions to which cells are exposed differ from *in vitro* experiments with PBMC cell cultures [40].

NRF2 has been reported as an inducer of HbF, as it contains a consensus sequence with the locus control region of the β -globin cluster. Thus, it forms a heterodimer with the sMAF protein and mediates looping between LCR and γ -globin promoters, activating transcription [41,42]. Such action is not independent, requiring specific posttranscriptional modifications of NRF2 that do not occur without the presence of KEAP1, such as the interaction of NRF2 with the MAPK pathway [17], a pathway widely involved in the transmission of redox signaling [43]. Thus, considering the role of NRF2 related to the increase in HbF [17,42] and its activation through signaling cascades such as p38 MAPK [43] also known for increasing the expression of HbF [44,45], we hypothesize that the response to HC use would be associated with NRF2, preventing interaction with KEAP1 and favoring your translocation to nucleus.

Another exciting result is decreased ATF4 transcription factor expression within the HC⁺ group. This transcription factor is widely documented as a central player in the stress response and regulation of other physiological and pathological processes [46]. It has also been demonstrated to be necessary for erythroid differentiation through the HRI-eIF2-ATF4 pathway by regulating the translation of globins and preventing excessive synthesis [47]. Recent studies have correlated ATF4 and BCL11A, a known repressor of γ -globin genes. Thus, ATF4 promotes the transcription of BCL11A and leads to HbF repression [25], acting opposite to NRF2. Our results, highlighted by the VIP score analysis, showed that ATF4 strongly correlated with the HC⁻ group, while NRF2 was strongly associated with the HC⁺ group, corroborating the previously mentioned studies. Therefore, we suggest that one of the main action mechanisms of HC could involve central redox pathways.

5. Conclusion

Our study suggests that HC use results in a dynamic relationship between the redox signaling pathways of the investigated transcription factors triggered as part of an adaptive response to this medication, possibly associated with its role in HbF production. Other factors that influence HbF were not analyzed.

Funding: This study was supported by FAPESB (grant PET0006/2022) to LPRV and CAPES (graduate scholarship) to ILRS.

Acknowledgments: The authors thank the members of the Barriers Sickle Cell Disease Program, hematologist Ariadne Carvalho Godinho, social worker Sahira Ribeiro Nunes do Carmo, and nurse Florenilda Bueno Fernandes for their contribution and support in the development of the research.

6. Reference

- [1] Herrick JB, James B. Peculiar Physical. Arch Intern Med 1910;6:517.
- [2] Linus Pauling HAJSS and ICW. "Sickle cell anemia, a molecular disease." Science (80-) 1999;286:1488–90. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1488>.
- [3] Piccin A, Murphy C, Eakins E, Rondinelli MB, Daves M, Vecchiato C, et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. Eur J Haematol 2019;102:319–30. <https://doi.org/10.1111/ejh.13212>.
- [4] Brandow AM, Liem RI. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. J Hematol Oncol 2022;15:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01237-z>.

- [5] Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Prim* 2018;4:1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.
- [6] Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol* 2015;6:226–39. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>.
- [7] Fibach E, Rachmilewitz E. Fibach, E., & Rachmilewitz, E. (2008). The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current molecular medicine*, 8(7), 609-619. 2008:609–19.
- [8] Chaves NA, Alegria TGP, Dantas LS, Netto LES, Miyamoto S, Bonini Domingos CR, et al. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 2019;141:34–46. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.05.034>.
- [9] Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med* 2016;241:689–96. <https://doi.org/10.1177/1535370216636726>.
- [10] Carden MA, Little J. Emerging disease-modifying therapies for sickle cell disease. *Haematologica* 2019;104:1710–9. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207357>.
- [11] Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol* 2012;87:795–803. <https://doi.org/10.1002/ajh.23232>.
- [12] Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxidants Redox Signal* 2015;23:734–46. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>.
- [13] Biswal S, Rizwan H, Pal S, Sabnam S, Parida P, Pal A. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. *Hematology* 2019;24:1–9. <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1498441>.
- [14] Feelisch M, Cortese-Krott MM, Santolini J, Wootton SA, Jackson AA. Systems Redox Biology in Health and Disease. *EXCLI J* 2022;21:623–46. <https://doi.org/10.17179/excli2022-4793>.
- [15] He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>.
- [16] Fão L, Mota SI, Rego AC. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev* 2019;54:100942. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100942>.
- [17] Macari ER, Lowrey CH. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood* 2011;117:5987–97. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314096>.
- [18] Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol* 2020;40:1–23. <https://doi.org/10.1128/mcb.00099-20>.
- [19] Zhang J, Pan W, Zhang Y, Tan M, Yin Y, Li Y, et al. Comprehensive overview of Nrf2-related epigenetic regulations involved in ischemia-reperfusion injury. *Theranostics* 2022;12:6626–45. <https://doi.org/10.7150/thno.77243>.
- [20] Wong TE, Brandow AM, Lim W, Lottenberg R. Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. *Blood* 2014;124:3850–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-435768>.
- [21] Husain M, Hartman AD, Desai P. Pharmacogenomics of sickle cell disease: Steps toward personalized medicine. *Pharmgenomics Pers Med* 2017;10:261–5. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S123427>.
- [22] Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: A systematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics* 2008;122:1332–42. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0441>.

- [23] Ambrose EE, Latham TS, Songoro P, Charles M, Lane AC, Stuber SE, et al. Hydroxyurea with dose escalation for primary stroke risk reduction in children with sickle cell anaemia in Tanzania (SPHERE): an open-label, phase 2 trial. *Lancet Haematol* 2023;10:e261–71. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(22\)00405-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(22)00405-7).
- [24] Santana SS, Pitanga TN, de Santana JM, Zanette DL, Vieira J de J, Yahouédéhou SCMA, et al. Hydroxyurea Scavenges Free Radicals and Induces the Expression of Antioxidant Genes in Human Cell Cultures Treated With Hemin. *Front Immunol* 2020;11:1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01488>.
- [25] Huang P, Peslak SA, Lan X, Khandros E, Yano JA, Sharma M, et al. The HRI-regulated transcription factor ATF4 activates BCL11A transcription to silence fetal hemoglobin expression. *Blood* 2020;135:2121–32. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005301>.
- [26] Zanette DL, Santiago RP, Leite IPR, Santana SS, da Guarda C, Maffili V V., et al. Differential gene expression analysis of sickle cell anemia in steady and crisis state. *Ann Hum Genet* 2019;83:310–7. <https://doi.org/10.1111/AHG.12290>.
- [27] Cronin RM, Lin CJ, Chiang C, MacEwan SR, DeBaun MR, Hyer JM. The use of FDA-approved medications for preventing vaso-occlusive events in sickle cell disease. *Blood Adv* 2023;7:3114–6. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008965>.
- [28] Renó CO, Barbosa AR, de Carvalho SS, Pinheiro MB, Rios DR, Cortes VF, et al. Oxidative stress assessment in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Ann Hematol* 2020;99:937–45. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03987-7>.
- [29] Van Zwieten R, Verhoeven AJ, Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radic Biol Med* 2014;67:377–86. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.022>.
- [30] Agil A, Hossein Sadrzadeh SM. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Rep* 2000;5:29–34. <https://doi.org/10.1179/rev.2000.5.1.29>.
- [31] Neto PFT, Gonçalves RP, Elias DBD, de Araújo CP, Ferreira Magalhães HI. Analysis of oxidative status and biochemical parameters in adult patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea, Ceará Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33:207–10. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110055>.
- [32] Silva DGH, Belini Junior E, Torres L de S, Ricci Júnior O, Lobo C de C, Bonini-Domingos CR, et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cells, Mol Dis* 2011;47:23–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2011.03.004>.
- [33] Torres L de S, da Silva DGH, Belini Junior E, de Almeida EA, Lobo CL de C, Cançado RD, et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;34:421–5. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20120106>.
- [34] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2018;1865:721–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>.
- [35] Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, Hayes JD, Cousin SP, Rumsey WL, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:295–317. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0008-x>.
- [36] Vona R, Spasi NM, Mattia L, Gambardella L, Straface E, Pietraforte D. Sickle cell disease: Role of oxidative stress and antioxidant therapy. *Antioxidants* 2021;10:1–27. <https://doi.org/10.3390/antiox10020296>.
- [37] Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebel IH, Santin AP, Brandão VDM, Wagner S, et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc* 2008;100:897–902. [https://doi.org/10.1016/s0027-9684\(15\)31402-4](https://doi.org/10.1016/s0027-9684(15)31402-4).

- [38] Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* 2012;64:72–80. <https://doi.org/10.1002/iub.584>.
- [39] J.F. KOEPKE MD & J.A. KOEPKE MD. Reticulocytes. *Clini Lab Haemat* 1986;8:169–17923.
- [40] Charlotte R. Kleiveland. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Cham (CH), editor. *Impact Food Bio-Actives Gut Heal.*, Springer; 2015, p. 161–7. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15.
- [41] Zhu X, Li B, Pace BS. NRF2 mediates γ -globin gene regulation and fetal hemoglobin induction in human erythroid progenitors. *Haematologica* 2017;102:e285. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2016.160788>.
- [42] Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9926–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>.
- [43] Wang Z, Ka SO, Lee Y, Park BH, Bae EJ. Butein induction of HO-1 by p38 MAPK/Nrf2 pathway in adipocytes attenuates high-fat diet induced adipose hypertrophy in mice. *Eur J Pharmacol* 2017;799:201–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.021>.
- [44] Witt O, Sand K, Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 2000;95:2391–6. https://doi.org/10.1182/blood.v95.7.2391.007k21_2391_2396.
- [45] Pace BS, Qian X-H, Sangerman J, Ofori-Acquah SF, Surendra Baliga B, Han J, et al. p38 MAP kinase activation mediates γ -globin gene induction in erythroid progenitors. *Exp Hematol* 2003;31:1089–96.
- [46] Li J, Lv A, Chen M, Xu L, Huang H. Activating transcription factor 4 in erythroid development and β -thalassemia: a powerful regulator with therapeutic potential. *Ann Hematol* 2023. <https://doi.org/10.1007/s00277-023-05508-8>.
- [47] Suragani RNVS, Zachariah RS, Velazquez JG, Liu S, Sun CW, Townes TM, et al. Heme-regulated eIF2 α kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood* 2012;119:5276–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-388132>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>BAC</i>	5'- CAAGCAGG AGTATGACG AGTC-3'	5'- GCCATGCCAATC TCATCTTG-3'
<i>PRDX1</i>	5'- TGTAATGA CCTCCCTGT TGG-3'	5'- TATCACTGCCAG GTTTCCAG-3'
<i>CAT</i>	5'- TGAATGAGG AACAGAGG AAACG-3'	5'- GTACTTGTCCAG AAGAGCCTG-3'
<i>SOD1</i>	5'- GGGCAAAG GTGGAAATG AAG-3'	5'- CAGCTAGCAGGA TAACAGATGAG- 3'
<i>GPX1</i>	5'- TTCCAGACC ATTGACATC GAG-3'	5'- CACCTCATAGA TGAAAACCCC-3'
<i>ATF4</i>	5'- CACTAGGTA CCGCCAGAA GA-3'	5'- AATCCGCCCTCT CTTTTAGA-3
<i>NRF2</i>	5'- GCTACGTGA TGAAGATGG AAAAC -3'	5'- AGCTCAGAAAAG GTCAAATCCTC- 3'
<i>KEAP1</i>	5'- AACAGAGA CGTGGACTT TCG-3'	5'- GTGTCTGTATCT GGGTCGTAAC-3'
<i>AKT</i>	5'- TCTATGGCG CTGAGATTG TG-3'	5'- TCTATGGCGCTG AGATTGTG-3'
<i>PI3K</i>	5'- GGTTGTCTG TCAATCGGT GACTGT-3'	5'- GAACTGCAGTGC ACCTTTCAAGC-3'

Information genes analyzed in the study. Sequences for the forward and reverse primers of the genes used. Control endogenous beta-actin (BAC), transcription factors: Activating Transcription Factor 4 (ATF4), NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2). Expression modulators of NRF2, Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), protein kinase B (PKB/AKT) and phosphoinositide-3-kinase PI3K, antioxidants superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT), peroxyredoxin-1 (PRDX1) e Glutathione Peroxidase 1 (GPX1).

3. CONCLUSÃO

- ✓ Houve maiores expressões do fator de transcrição NRF2, com padrão de indução para AKT, com menores expressões de ATF4, SOD1 e CAT, no grupo HC+;
- ✓ Uso de HC mostrou influencia na via NRF2;
- ✓ Não foi vista influência das vias de adaptação redox sob os parâmetros bioquímicos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, N. Hydroxyurea therapy: improving the lives of patients with sickle cell disease. **Pediatric nursing**, v. 32, n. 6, p. 541–543, 2006.
- APARECIDA, M.; OLIVEIRA, B. A formação territorial do oeste da Bahia e as políticas territoriais do estado no período de. p. 43–58, 2015.
- ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 375–391, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06201.X>
- BANERJEE, T.; KUYPERS, F. A. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. **British journal of haematology**, v. 124, n. 3, p. 391–402, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2003.04781.X>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- BUNN, H. . and B. . F. Sickle cell disease-molecular and cellular pathogenesis. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**, p. 453–501, 1986.
- BUNN, H. F. **Pathogenesis and treatment of sickle cell disease**. 11. ed. [S. l.]: N Engl J Med, 1997.
- CAULIER, A. L.; SANKARAN, V. G. Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis. **Blood**, v. 139, n. 16, p. 2450–2459, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.2021011044>
- Centro de Saúde Leonídia Ayres de Almeida é referência em atendimento de média complexidade para Barreiras e Oeste da Bahia.** . [s. l.], 2017. Disponível em: <https://barreiras.ba.gov.br/centro-de-saude-leonidia-ayres-de-almeida-e-referencia-em-atendimento-de-media-complexidade-para-barreiras-e-oeste-da-bahia/>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- CHASIS, J. A.; MOHANDAS, N. Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 470–478, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077883>
- CHAVES, N. A.; ALEGRIA, T. G. P.; DANTAS, L. S.; NETTO, L. E. S.; MIYAMOTO, S.; BONINI DOMINGOS, C. R.; DA SILVA, D. G. H. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, p. 34–46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.05.034>
- COLELLA, M. P.; DE PAULA, E. V.; CONRAN, N.; MACHADO-NETO, J. A.; ANNICCHINO-BIZZACCHI, J. M.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O.; TRAINA, F. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 9, p. 1967–1970, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04861.x>
- DAME, C.; JUUL, S. E. The switch from fetal to adult erythropoiesis. **Clinics in Perinatology**, v. 27, n. 3, p. 507–526, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0095-5108\(05\)70036-1](https://doi.org/10.1016/S0095-5108(05)70036-1)
- DIEPSTRATEN, S. T.; HART, A. H. Modelling human haemoglobin switching. **Blood Reviews**, v. 33, p. 11–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.06.001>
- DZIERZAK, E.; PHILIPSEN, S. Erythropoiesis : Development and Differentiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
- FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 2, p. 101–106, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00062752-200203000-00003>

- FRONTICELLI, C.; GOLD, R. Conformational relevance of the beta6Glu replaced by Val mutation in the beta subunits and in the beta(1-55) and beta(1-30) peptides of hemoglobin S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 16, p. 4968–4972, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33208-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33208-8)
- GEORGE, A.; PUSHKARAN, S.; KONSTANTINIDIS, D. G.; KOOCHAKI, S.; MALIK, P.; MOHANDAS, N.; ZHENG, Y.; JOINER, C. H.; KALFA, T. A. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 2099–2107, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441188>
- GRAVIA, A.; CHONDROU, V.; SGOUROU, A.; PAPANTONI, I.; BORG, J.; KATSILA, T.; PAPACHATZOPOULOU, A.; & PATRINOS, G. P. Individualizing fetal hemoglobin augmenting therapy for β -type hemoglobinopathies patients. **Pharmacogenomics**, v. 15, p. 1355–1364, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/PGS.14.101> ©
- GROEGER, A. L.; FREEMAN, B. A. Signaling Actions of Electrophiles. **Molecular Interventions**, v. 10, n. 1, p. 39–50, 2010.
- HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 689–696, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1535370216636726>
- HARDING, H. P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WEK, R.; SCHAPIRA, M.; RON, D. Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. **Molecular cell**, v. 6, p. 1099–1108, 2000.
- HARTEVELD, C. L.; ACHOUR, A.; ARKESTEIJN, S. J. G.; TER HUURNE, J.; VERSCHUREN, M.; BHAGWANDIEN-BISOEN, S.; SCHAAP, R.; VIJFHUIZEN, L.; EL IDRISSI, H.; KOOPMANN, T. T. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, n. S1, p. 28–36, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijlh.13885>
- HEBBEL, R. P.; EATON, J. W.; BALASINGAM, M.; STEINBERG, M. H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 70, n. 6, p. 1253–1259, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI110724>
- Hospital Geral do Oeste**. . [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/hospital/hospital-geral-do-oeste/>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- HUSAIN, M.; HARTMAN, A. D.; DESAI, P. Pharmacogenomics of sickle cell disease: Steps toward personalized medicine. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 10, p. 261–265, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/PGPM.S123427>
- INGRAM, V. M. Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Group Nature Publishing**, v. 180, p. 756–757, 1957.
- ISHII, T.; ITOH, K.; TAKAHASHI, S.; SATO, H.; YANAGAWA, T.; KATOH, Y.; BANNAI, S.; YAMAMOTO, M. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16023>
- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
- JAMES V NEEL. The inheritance of Sickle Cell Anemia. **SCIENCE**, v. 110, p. 64–66, 1949. Disponível em: <https://doi.org/10.4324/9780429284618-1>
- JANE, S. M.; CUNNINGHAM, J. M. Molecular mechanisms of hemoglobin switching. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, n. 11, p. 1197–1209, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00058-1)
- JIANG, H.-Y.; WEK, S. A.; MCGRATH, B. C.; LU, D.; HAI, T.; HARDING, H. P.; WANG,

- X.; RON, D.; CAVENER, D. R.; WEK, R. C. Activating Transcription Factor 3 Is Integral to the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Stress Response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 3, p. 1365–1377, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.24.3.1365-1377.2004>
- JONES, D. P.; SIES, H. The Redox Code. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 9, p. 734–746, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>
- KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; SMITH, W. R.; PANEPINTO, J. A.; WEATHERALL, D. J.; COSTA, F. F.; VICHINSKY, E. P. Sick cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>
- KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: Pathophysiological implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 9, p. 3356–3360, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.9.3356>
- KOBAYASHI, A.; KANG, M.-I.; OKAWA, H.; OHTSUJI, M.; ZENKE, Y.; CHIBA, T.; IGARASHI, K.; YAMAMOTO, M. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7130–7139, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7130-7139.2004>
- KOURY, M. J.; PONKA, P. New insights into erythropoiesis: The roles of folate, vitamin B 12, and iron. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 105–131, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306>
- LEVONEN, A. L.; HILL, B. G.; KANSANEN, E.; ZHANG, J.; DARLEY-USMAR, V. M. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: Implications for electrophile therapeutics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 196–207, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.025>
- LU, P. D.; HARDING, H. P.; RON, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. **Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 1, p. 27–33, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>
- MA, Q.; WYSZYNSKI, D. F.; FARRELL, J. J.; KUTLAR, A.; FARRER, L. A.; BALDWIN, C. T.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Genetic determinants of response to hydroxyurea. **Pharmacogenomics Journal**, v. 7, n. 6, p. 386–394, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500433>
- MAMAS, T.; KAKOUREOU, G.; VRETTOU, C.; TRAEGER-SYNODINOS, J. Hemoglobinopathies and preimplantation diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, n. S1, p. 21–27, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijlh.13851>
- MENZEL, S.; THEIN, S. L. Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin in Sickle Cell Disease. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 23, n. 2, p. 235–244, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S40291-018-0370-8>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- MILLER, J. L. Hemoglobin switching and modulation : genes , cells , and signals. **Hematology**, v. 9, p. 87–92, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme**. [s. l.], 2018.
- NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. The Intracellular Polymerization of Sickle Hemoglobin and Its Relevance to Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 58, n. 6, p. 1057–1068, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V58.6.1057.1057>
- PALIS, J.; SEGEL, G. B. Developmental biology of erythropoiesis. **Blood Reviews**, v. 12, n. 2, p. 106–114, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(98\)90022-4](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(98)90022-4)
- PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.;

- NORTH, A. Structure of haemoglobin. **Nature**, v. 185, n. 13, p. 416–421, 1960. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/185416a0>
- PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 13, p. 1362–1369, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMCT0708272>. Acesso em: 17 nov. 2023.
- REBOUÇAS, F. dos R.; BARBOSA, M. A. L.; GIUDICE, D. S. Análise Da Criação Do Estado Do Rio São Francisco Sob a Caracterização Socioeconômica Da Região Oeste Do Estado Da Bahia. p. 1–10, 2007.
- RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S. C.; BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. **Biochemical Journal**, v. 237, n. 1, p. 265–269, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj2370265>
- ROUMENINA, L. T. *et al.* Complement activation in sickle cell disease: Dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 5, p. 456–464, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.25742>
- ROUX, P. P.; TOPISIROVIC, I. Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 38, n. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.00070-18>
- RUSHMORE, T. H.; MORTON, M. R.; PICKETT, C. B. The antioxidant responsive element: Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 18, p. 11632–11639, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)99004-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)99004-6)
- SANKARAN, A. B. and V. G. Regulation of the fetal hemoglobin silencing factor BCL11A. **HHS Public Access**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.13024>. Regulation
- SATISH K. NANDAKUMAR, J. C. U. and V. G. S. Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives. **Physiology & behavior**, v. 63, n. 8, p. 1–18, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bjh.13938>. Advances
- SEBASTIANI, P.; WANG, L.; NOLAN, V. G.; MELISTA, E.; MA, Q.; BALDWIN, C. T.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Bayesian modeling of genetic associations. **American Journal of Hematology**, v. 83, n. 3, p. 189–195, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.21048>
- SERJEANT, G. R.; PETCH, M. C.; SERJEANT, B. E. The in vivo sickle phenomenon: a reappraisal. **J Lab Clin Med**, v. 81, n. 6, p. 850–6, 1973.
- SHENG, K.; SHARIFF, M.; HEBBEL, R. P. Comparative Oxidation of Hemoglobins A and S. **Blood**, v. 91, n. 9, p. 3467–3470, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V91.9.3467>
- Sobre Barreiras**. . [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.crcba.org.br/servicos/delegacias/delegacia-de-barreiras/sobre-barreiras/>. Acesso em: 7 dez. 2013.
- STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 87, n. 8, p. 795–803, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/AJH.23232>. Acesso em: 29 ago. 2023.
- SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1–Nrf2 system during cellular stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 41, p. 16817–16824, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.800169>
- TANG, P.; WANG, H. Regulation of erythropoiesis: emerging concepts and therapeutic implications. **Hematology**, v. 28, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2250645>
- VATTEM, K. M.; WEK, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 101, n. 31, p. 11269–11274, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0400541101>

VEKILOV, P. G. Sick cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sick cell anaemia? **British Journal of Haematology**, v. 139, n. 2, p. 173–184, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06794.x>

WALSH, K. E.; CUTRONA, S. L.; KAVANAGH, P. L.; CROSBY, L. E.; MALONE, C.; LOBNER, K.; BUNDY, D. G. Medication adherence among pediatric patients with sick cell disease: A systematic review. **Pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 1175–1183, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1542/peds.2014-0177>

WANG, Q.; ZENNADI, R. The role of rbc oxidative stress in sick cell disease: From the molecular basis to pathologic implications. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10101608>

WARE, R. E.; DE MONTALEMBERT, M.; TSHILOLO, L.; ABOUD, M. R. Sick cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12566499/>?report=abstract. Acesso em: 17 nov. 2023.

WEK, R. C.; JIANG, H.-Y.; ANTHONY, T. G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 1, p. 7, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bst20060007>

WILBER, A.; NIENHUIS, A. W.; PERSONS, D. A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching : new therapeutic opportunities. v. 117, n. 15, p. 3945–3953, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-316893>

WISHNER, B. C.; WARD, K. B.; LATTMAN, E. E.; LOVE, W. E. Crystal structure of sick cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 1, p. 179–194, 1975. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80108-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80108-2)

YATES, M. S.; KENSLER, T. W. Chemopreventive promise of targeting the Nrf2 pathway. **Drug News and Perspectives**, v. 20, n. 2, p. 109–117, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1358/dnp.2007.20.2.1083437>

ZHANG, X. L.; YUAN, Y. H.; SHAO, Q. H.; WANG, Z. Z.; ZHU, C. G.; SHI, J. G.; MA, K. L.; YAN, X.; CHEN, N. H. DJ-1 regulating PI3K-Nrf2 signaling plays a significant role in bibenzyl compound 20C-mediated neuroprotection against rotenone-induced oxidative insult. **Toxicology Letters**, v. 271, p. 74–83, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2017.02.022>

ZHUANG, C. Le; MAO, X. Y.; LIU, S.; CHEN, W. Z.; HUANG, D. D.; ZHANG, C. J.; CHEN, B. C.; SHEN, X.; YU, Z. Ginsenoside Rb1 improves postoperative fatigue syndrome by reducing skeletal muscle oxidative stress through activation of the PI3K/Akt/Nrf2 pathway in aged rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 480–487, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.06.040>