

## **Mecanismos redox de adaptação celular e suplementação antioxidante como estratégia terapêutica na Anemia Falciforme: um ensaio pré-clínico**

Lucas Nathan de Souza Nunes<sup>1</sup>, Victoria Simões Bernardo<sup>2</sup>, Flaviene Felix Torres<sup>2</sup>, Bárbara Braga Vieira Marques<sup>2</sup>, Daniela Cagnoto Noronha<sup>3</sup>; Mayara Cristina Moreira Silva<sup>3</sup>; Lucas Gazarini<sup>1</sup>, Edis Belini-Júnior<sup>1</sup>, Marcus Alexandre Finzi Corat<sup>3</sup>, Danilo Grünig Humberto da Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas (UFMS/CPTL), Mato Grosso do Sul, Brasil.*

<sup>2</sup>*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Unesp/IBILCE), São Paulo, Brasil.*

<sup>3</sup>*Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB)/Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.*

**Autor correspondente:** Danilo Grünig Humberto da Silva

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas, Unidade II, Bloco VIII, Av. Ranulpho Marques Leal, 3484 – Distrito Industrial, Código postal: 79613-000, Três Lagoas - MS, Brasil. Número de telefone: + 55 (67) 3509-3764. E-mail: [danilo.grunig@ufms.br](mailto:danilo.grunig@ufms.br)

## Resumo

A perda homeostase redox está relacionada com os mecanismos fisiopatológicos da anemia falciforme (AF). Dessa forma, o entendimento de mecanismos redox de adaptação celular possibilitará a definição de novos alvos e/ou intervenções direcionadas, como alternativas terapêuticas com propriedades antioxidantes. Portanto, a presente proposta avaliou o perfil de expressão de vias de sinalização redox em células progenitoras hematopoiéticas de camundongos humanizados para AF; bem como suas respostas adaptativas sob efeitos da suplementação com melatonina (MEL) e ergotioneína (ERT). Avaliou-se 4 grupos, os quais foram gerados no CEMIB/UNICAMP, durante 60 dias: o controle caracterizado por camundongos transgênicos HbSA+Fetal (SAF); homozigotos para AF (SS) não tratados; tratados com MEL (SS+MEL; V.O. 10mg/kg) e com ERT (SS+ERT; V.O. 35mg/kg). Após a eutanásia (CEUA 5955-1/2022), extraiu-se o RNA das células progenitoras da medula óssea para análise de RT-qPCR, em pseudo quintuplicatas, de alvos centrais da biologia redox: *ATF4*, *NRF2*, *FOXO3*, *MST1*, *YWHAZ*, *TRX*, *TXNIP*, *SLC22A4* (*ETT*), *eIF2α*, *CAT*, *SOD1*, *GPX1*, *PRDX1*; e o endógeno *ACTB*. O *fold change* dos níveis foi calculado usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para as análises estatísticas, adotou-se o GLM, no formato *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Os efeitos significativos observados da doença (SF x SS) foram: indução dos genes *NRF2* (~9x), *FOXO3* (~3x), *MST1* (~7x), *ETT* (~8x), *CAT* (~4x) e *GPX1* (~8x); e inibição dos genes *TRX1* (~2,5x), *SOD1* (~1,4x) e *PRDX1* (~3x), corroborando a robustez do modelo e a atuação fundamental dos elementos centrais da homeostase redox nos processos fisiopatológicos da AF. Os efeitos observados para a suplementação com MEL (SS x SS+MEL) foram: indução da expressão da *YWHAZ* (~2x), *TRX* (~3x), *SOD1* (~2x) e *PRDX1* (~3x) e majoritariamente inibição dos genes *NRF2* (~147x), *FOXO3* (~9x), *MST1* (~9x), *ETT* (~7x), *CAT* (~26x) e *GPX1* (~111x). De modo geral, no grupo SS+MEL, observou-se uma restauração dos níveis de transcritos ao padrão observado no grupo SAF, o que sugere atuação antioxidante direta da MEL, mitigando a ativação das vias redox. Por fim, conclui-se que os mecanismos avaliados desempenham papel crítico na homeostase redox de células progenitoras no modelo testado. Além disso, o tratamento com ERT aparenta possuir uma ação moduladora de amplo espectro associada a eritropoiese, já para o tratamento com MEL tem-se uma ação citoprotetora, mitigando a ativação de vias de sinalização redox acentuadas na doença. Com a suplementação de ERT, os efeitos verificados (SS x SS+ERT) foram: indução dos genes *ATF4* (~3x), *YWHAZ* (~4x), *TRX1* (~3x), *TXNIP* (~6x), *ETT* (~2x), *CAT* (~2x) e *SOD1* (~2x) assim como inibição dos genes *NRF2* (~4x), *FOXO3* (~79x) e *GPX1* (~2x). O padrão inibitório sugere ação antioxidante direta da ERT, mitigando os efeitos causados pela doença, enquanto as induções parecem estar envolvidas com ações indiretas, reforçando seu papel crítico e pouco conhecido durante a hematopoiese, uma vez que *ATF4* e *TXNIP* que vem sendo propostos como novos reguladores da proliferação e diferenciação eritroide.

**Palavras-chave:** Homeostase redox, Ergotioneína, Melatonina, Potencial terapêutico, Adaptação redox.

## 1. Introdução

A anemia falciforme (AF; *HBB*; c.20A>T; rs334) é caracterizada pela presença de hemoglobina S (HbS), que, quando polimerizada, leva ao aumento da hemólise, disfunção endotelial, interação entre eritrócitos, leucócitos e plaquetas [1, 2, 3]. Esse processo torna o eritrócito falciforme mais frágil, suscetível a danos oxidativos e altamente instável, reduzindo sua vida útil em  $\geq 75\%$  [2]. A superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) na doença é causada por vários fatores e, se não for rapidamente contida, pode desencadear uma série de eventos que levam a uma inflamação persistente [3, 4, 5]. Sendo assim conhecida como uma doença inflamatória e oxidativa crônica, na qual sinais de distresse oxidativo podem ser observados em vários tecidos com a produção exacerbada e contínua de ERO pode sobrecarregar o sistema antioxidante [6, 7, 8, 9].

A homeostase redox é essencial para manter diversos processos fisiológicos e sinalizações, seu desbalanço pode levar a diferentes danos, com desfecho de distresse oxidativo que culmina em disfunção celular. Assim, compreender as estruturas operacionais centrais da biologia redox que controlam a expressão de enzimas de defesa antioxidante (como superóxido dismutase 1 [SOD1], catalase [CAT], glutatona peroxidase 1 [GPX1], peroxirredoxina 1 [PRDX1]) pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a AF. Os principais membros das vias de sinalização redox incluem os fatores de transcrição Nrf2 (Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2) e FoxO3 (Forkhead O3) [10]; e outros complexos de sinalização sensíveis ao redox, como TXNIP/Trx – um componente-chave na ligação entre a regulação redox e a patogênese de doenças [11] – e ATF4, um fator de transcrição que é um marcador efetor da resposta integrada ao estresse [12]. O acúmulo de danos oxidativos apresenta uma relação intrínseca com a gravidade da AF [13, 14], levando à suposição de que terapias antioxidantes representam um caminho promissor para tratamentos alternativos, incluindo aqueles que podem regular a expressão de fatores de transcrição no código redox [15, 16, 17].

Portanto, a busca por alternativas farmacoterapêuticas que possam ser usadas isoladamente ou em combinação é válida e necessária para o melhor tratamento da doença. Uma alternativa terapêutica em potencial é a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina; MEL). Essa indolamina apresenta efeitos citoprotetores significativos, inclusive atuando na redução de moléculas de adesão, comumente elevadas na AF [18, 19, 20, 21]. Além disso, a MEL pode atravessar facilmente as membranas celulares e agir como um antioxidante direto, protegendo várias biomoléculas contra danos, gerando metabólitos que ainda apresentam uma alta capacidade redutora gerando assim, uma cascata antioxidante extremamente eficaz [22, 23, 24]. Ainda, ela pode atuar inibindo a atividade e/ou expressão de moléculas oxidantes e, também, é capaz de estimular integrantes do sistema antioxidante [25, 26]. Além do mais, em estudos com murinos, observou-se efeitos protetores nos tecidos, prevenindo a peroxidação lipídica e limitando danos proteicos, ao sustentar a função do sistema redox e estabilizar as membranas dos eritrócitos [27, 28].

Outro agente terapêutico potencial que tem sido recentemente destacado em uma ampla gama de estudos é o aminoácido antioxidante dietético L-ergotioneína (ERT, 2-mercaptotriptamina trimetilbetaína) [29, 30]. Com uma química única que proporciona alta estabilidade, degradação lenta e bioacumulação alta, a ERT é amplamente distribuída nos órgãos e nas células sanguíneas, especialmente nas células precursoras hematopoéticas e células eritroides em maturação, onde há alta expressão do transportador específico da ERT (ETT, codificado pelo gene *SLC22A4*) [31, 32, 33, 34]. Sendo capaz de atuar como i) quelante de cátions [35]; ii) fator bioenergético [36]; iii) no

combate de radicais livres; iv) manutenção dos níveis de tiol *in vivo* [37]; v) modula a ativação de vias redox, como Nrf2-ARE e FoxO3, para proteger as células contra o estresse oxidativo *in vitro* [38, 39]; vi) regulador imunológico [40, 41]; e vii) interage com a hemoglobina ligada a proteínas [42]. Portanto, a administração de ERT permite uma infinidade de propriedades citoprotetoras e mitigadoras da doença.

Essas propriedades únicas podem ajudar no tratamento de pacientes com AF, visto que estes demonstraram uma redução de aproximadamente 2 vezes nos níveis de MEL plasmática e ERT intraeritrocitária em comparação com indivíduos saudáveis [43, 44], sugerindo que o estado hiperoxidativo dessa condição culmina no consumo desses antioxidantes endógenos. Assim, neste estudo, investigamos os efeitos da suplementação de MEL e ERT sobre os mecanismos redox de adaptação celular em camundongos transgênicos para AF, avaliando os níveis de expressão de vários genes associados às vias de sinalização TXNIP/Trx, MST1/FoxO3, Keap1/Nrf2/ARE e ATF4 e outros sinalizadores na manutenção da homeostase redox em células progenitoras hematopoéticas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Animais

Os camundongos C57BL/6 foram obtidos no biotério da Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Foram alojados em grupos de no máximo 4 animais por gaiola, com livre acesso a comida e água autoclavada, mantidos em ciclo de claro/escuro de 12:12 horas em uma sala sob condições livres de patógenos a uma temperatura controlada (21–25°C). Camundongos humanizados para AF, bem como o animais SF foram gerados a partir do transplante de células nucleadas da medula óssea de camundongos Berkeley (modelo transgênico para AF; STOCK Hba<sup>tm1Paz</sup> Hbb<sup>tm1Tow</sup> Tg (HBA-HBBs)41Paz/J ou STOCK Hba<sup>tm1Paz</sup> Hbb<sup>tm1Tow</sup> Tg(HBA-HBBs)41Paz/J com a mutação  $\gamma$ -195 (C>G) que causa o tipo brasileiro de persistência hereditária de hemoglobina fetal (HbF)), respectivamente [45], em receptores C57BL/6 irradiados letalmente (5 semanas de idade), conforme descrito a seguir. A eficiência da reconstituição da medula óssea foi analisada dois meses após o transplante por Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC (CDM System, Variant V-II Instrument I). Os camundongos humanizados originados do transplante de medula óssea são referidos doravante como camundongos SS e SF, respectivamente. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP; Protocolo: 5955-1/2022) e realizados de acordo com os Princípios Éticos para a Pesquisa Animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em conformidade com a legislação brasileira nº 11.794. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e utilizar o menor número de animais necessário para produzir resultados reprodutíveis.

### 2.2 Transplante de medula óssea

Células nucleadas da medula óssea femoral de camundongos SF e SS foram colhidas e injetadas ( $1,5 \times 10^6$  células/receptor) através do plexo orbital de animais receptores C57BL/6 (5 semanas de idade) irradiados letalmente (1000 cGy, dose única). Três dias antes da irradiação, todos os camundongos receptores foram suplementados com água contendo antibiótico. Após o procedimento, os animais transplantados foram transferidos para gaiolas estéreis contendo comida e água estéreis. Os camundongos receptores foram suplementados com água antibiótica por mais 10 dias, seguidos por um período de recuperação de 54 dias antes de serem submetidos a outros

experimentos. O tempo de recuperação de aproximadamente dois meses é necessário devido ao tempo mínimo para a substituição completa dos glóbulos vermelhos circulantes (hemácias) pelos de origem do doador, com base em uma sobrevida padrão de hemácias de camundongos de aproximadamente 50 dias [46].

### 2.3 Tratamentos In Vivo

Camundongos foram submetidos à administração com água ultra pura ou 10 mg/kg de peso corporal de MEL ou 35 mg/kg de peso corporal de ERT (fornecida pela Tetrahedron - Vincennes, França), todos através de água potável, ao longo de 60 dias. Inicialmente, a MEL foi dissolvida em etanol a uma concentração aproximada de 0,1%, e o volume desejado foi obtido pela adição de água potável [47]. Portanto, quatro grupos experimentais foram analisados: o controle, constituído por camundongos HbS+HbF (grupo denominado SF; n = 9); camundongos humanizados para AF (SS; n = 6); camundongos transgênicos tratados com MEL (SS+MEL; n = 9) e camundongos transgênicos tratados com ERT (SS+ERT; n = 5). As doses foram escolhidas com base em estudos anteriores nos quais essas doses tiveram efeitos benéficos [48, 49]. Os camundongos foram eutanasiados através do aprofundamento da anestesia com 3% de isoflurano em fração inspirada de oxigênio de 100% [47].

### 2.4 Amostras biológicas

As células hematopoiéticas foram colhidas de ambos os fêmures pelo método de “lavagem” (*flushing*), com base na adaptação do protocolo previamente descrito por Mahajan et al. [50]. Para cada grupo experimental, foi preparado um *pool* de células da medula óssea. Resumidamente, após a extração da medula óssea, as células foram transferidas para tubos Falcon e lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente, foi adicionado RNeasy lysis reagent (Qiagen, EUA) ao pellet obtido para análise da expressão gênica (1:5; células hematopoiéticas: RNeasy lysis reagent).

### 2.5 PCR em Tempo Real

O kit PureLink® RNA Mini (Invitrogen™, EUA) foi utilizado para isolar e purificar o RNA conforme as instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA foram determinadas pela absorbância a 260:280 nm (NanoPhotometer®, IMPLEN) e por eletroforese em gel (90 V por 40 min em gel de agarose a 1,2%). As amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com PureLink®DNase (Invitrogen™, EUA) e transcritas reversamente usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™, EUA). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada com TaqMan Universal PCR Fast Advanced Master Mix e sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo as instruções do fabricante. A variação na expressão de mRNA foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [51], e todos os valores foram normalizados pela expressão do gene da beta-actina (BAC) [52]. Os seguintes genes foram avaliados: Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*NFE2L2*); Forkhead O3 (*FOXO3*); Quinase-1 semelhante à STE20 de mamíferos (*MST1*); Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase zeta, que codifica a proteína 14-3-3ζ (*YWHAZ*); Fator de transcrição ativador 4 (*ATF4*); Fator de iniciação eucariótico 2 (*EIF2α*); Peroxirredoxina-1 (*PRDX1*), Superóxido dismutase 1 (*SOD1*), Glutathione Peroxidase 1 (*GPX1*), Catalase (*CAT*); Proteína de interação com a tiorredoxina (*TXNIP*); Tiorredoxina 1 (*TRX1*); Transportador de ergotioneína - ETT (*SLC22A4*).

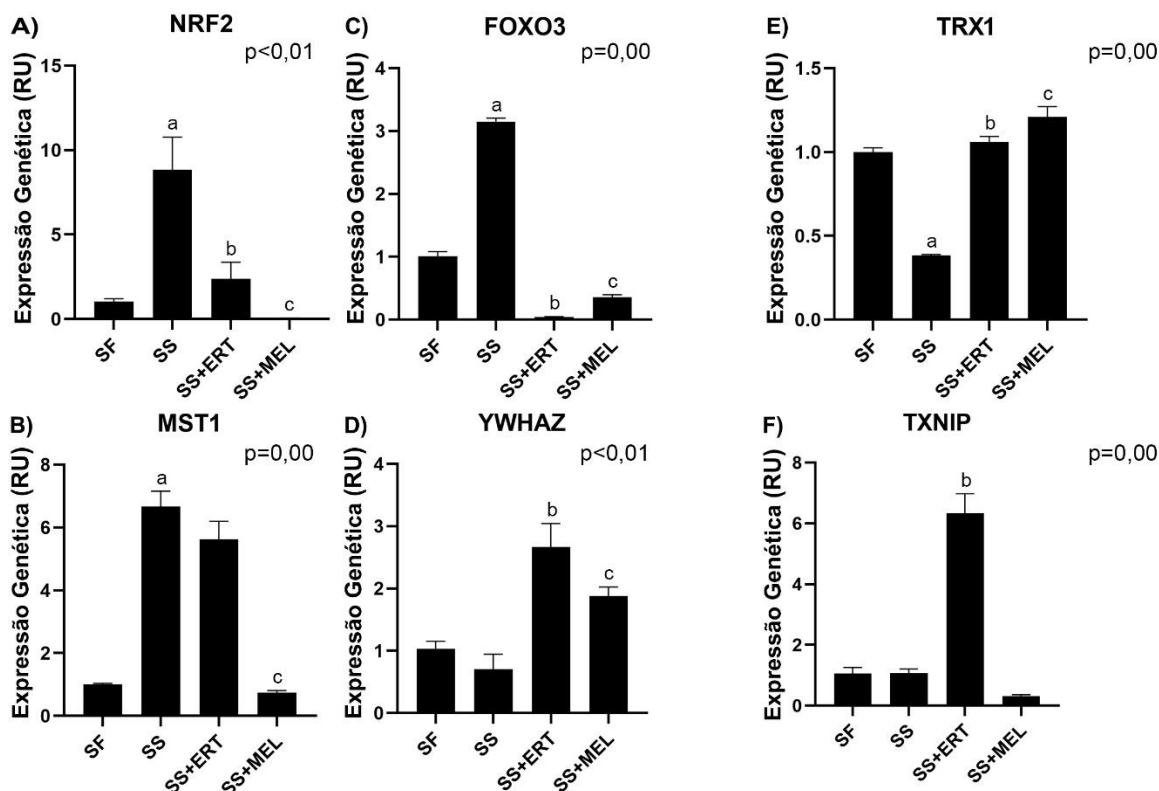
### 2.6 Análises estatísticas

As análises univariadas foram realizadas utilizando o software Statistica 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), enquanto os gráficos foram elaborados com o software GraphPad Prism versão 9 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A normalidade dos dados foi verificada usando o gráfico de probabilidade normal dos resíduos. Para a comparação entre grupos, foram adotados General Linear Models (GLM) no *design* de *one-way* ANOVA, permitindo a verificação do efeito do tratamento sobre as variáveis dependentes. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de seus valores biológicos, sendo todas as análises estatísticas consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Vias de sinalização redox

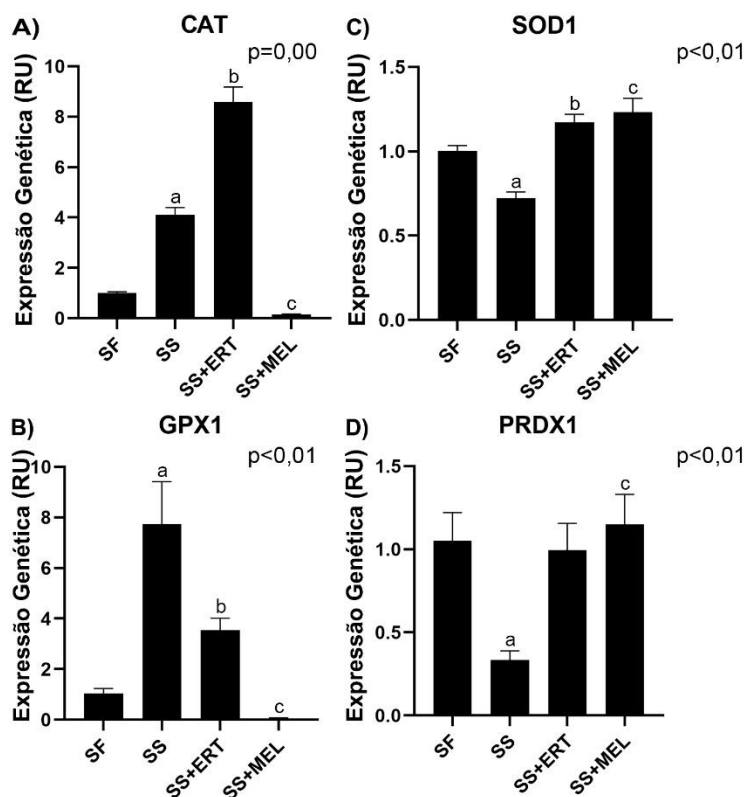
As comparações da expressão gênica relativa das vias de sinalização redox analisadas entre os efeitos da doença (SF x SS), suplementação de ERT (SS x SS+ERT) e suplementação com MEL (SS x SS+MEL) revelaram o seguinte: para os camundongos SS, observou-se uma indução dos fatores de transcrição *NFE2L2* (~9x), *FOXO3* (~3x) e *MST1* (~7x). A elevação de *FOXO3* foi associada a um aumento de quase 7 vezes em *MST1* e uma leve redução em *YWHAZ* (gene codificante da proteína 14-3-3). Os níveis de transcrição de *TRX1* (~2,5x) foram significativamente reduzidos, enquanto o mRNA de *TXNIP* apresentou níveis semelhantes aos do grupo controle. No grupo SS+MEL, houve um aumento de *YWHAZ* (~2x) e uma leve redução em *MST1* (~9x), o que pode explicar a redução observada em *FOXO3* (~9x). Além disso, os níveis de *NFE2L2* (~147x) foram significativamente diminuídos. Os genes que codificam as proteínas redox *TRX1* e *TXNIP* também apresentaram padrões distintos entre os grupos SS e SS+MEL. O tratamento com MEL induziu um aumento em *TRX1* (~3x) e uma leve redução em *TXNIP* (Figura 1-E e F). No grupo SS+ERT, observou-se um aumento da expressão de *YWHAZ* (~3x), enquanto os níveis de *NFE2L2* (~4x) permaneceram semelhantes ao controle. Além disso, houve uma redução significativa nos níveis de transcrição de *FOXO3* (~79x) no grupo tratado. Em contraste, a ERT promoveu a indução da expressão de *TXNIP* (~6x), e da expressão de mRNA de *TRX1* (~3x), mantendo-se semelhante ao grupo controle (Figura 1).



**Fig 1.** Expressão gênica relativa de membros centrais das vias de sinalização da biologia redox em camundongos humanizados com anemia falciforme A) Expressão gênica de *NRF2*, B) *MST1*, C) *FOXO3*, D) *YWHAZ*, E) *TRX* e F) *TXNIP*. SF: camundongos humanizados para o grupo controle; SS: camundongos humanizados para anemia falciforme (AF); SS+MEL: camundongos humanizados para AF tratados com melatonina (MEL, 10 mg/kg por via oral); SS+ERT: camundongos humanizados para AF tratados com ergotioneína (ERT, 35 mg/kg por via oral). RU: Unidade Relativa - variação de expressão (*fold-change*) dos transcritos em relação ao grupo SF (SF x SS) ou grupo SS (SS x SS+ERT) e (SS x SS+MEL)). Os valores representativos de cinco pseudoréplicas foram expressos como média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Modelos Lineares Gerais (GLM) no formato *one-way* ANOVA, complementados pelo teste de Bonferroni. Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: a, efeitos observados da doença (SF x SS), b e c aos tratamentos com suplementação de ERT (SS x SS+ERT) e MEL (SS x SS+MEL), respectivamente.

### 3.2 Antioxidantes

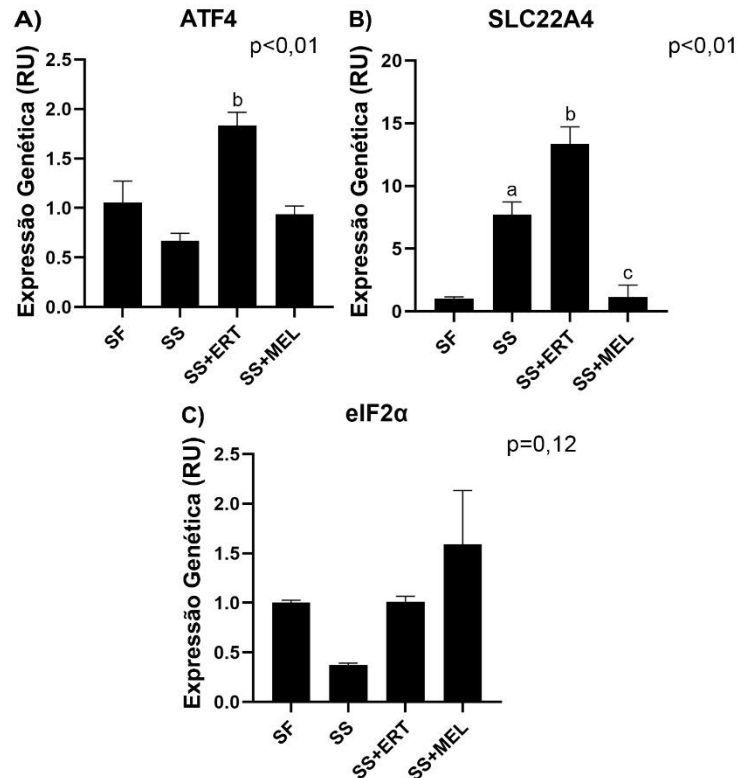
O grupo SS apresentou um aumento nos níveis de transcritos das enzimas antioxidantes *CAT* (~4x) e *GPX1* (~8x). Ao mesmo tempo, os níveis de *SOD1* (~1,4x) e *PRDX1* (~3x) foram reduzidos nesse grupo. No entanto, *CAT* (~26x) e *GPX1* (~111x) apresentaram, inesperadamente, expressões relativas mais baixas sob tratamento com MEL em comparação ao controle e ao grupo não tratado, mas ainda com induções para *SOD1* (~2x) e *PRDX1* (~3x). No grupo SS+ERT, observou-se um aumento na expressão de *CAT* (~2x) e *SOD1* (~2x), enquanto os níveis de *PRDX1* permaneceram similares ao controle. Em contrapartida, os níveis de *GPX1* (~2x) foram inibidos. Para o grupo tratado, esses últimos antioxidantes apresentaram níveis semelhantes ao controle.



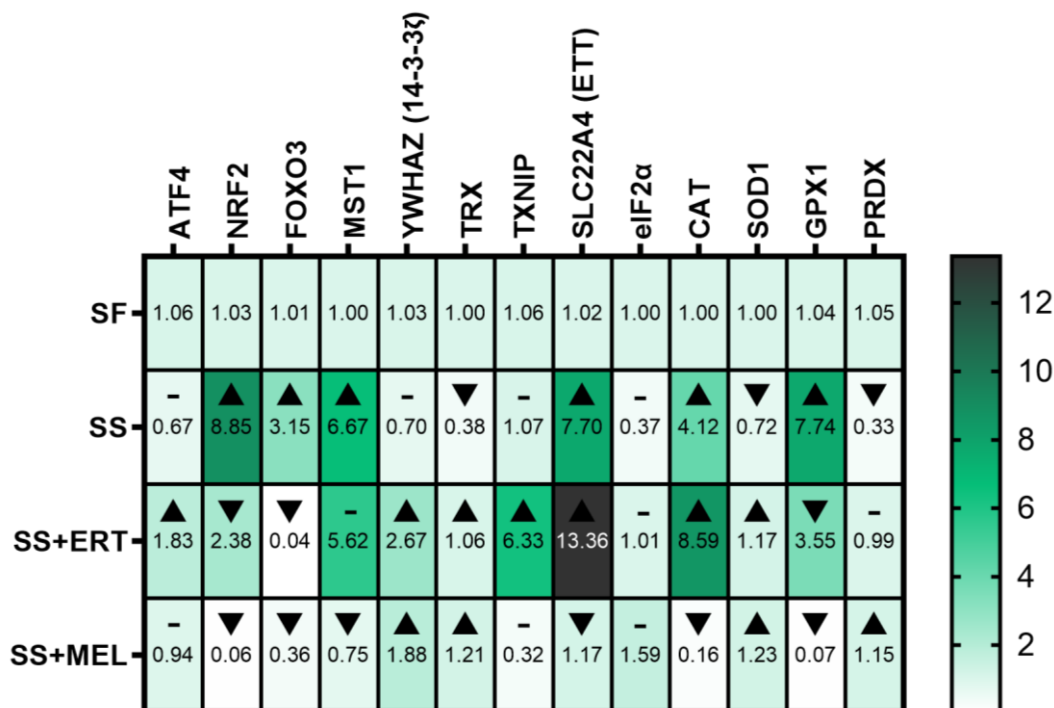
**Fig 2.** Expressão relativa de genes codificadores de enzimas antioxidantes e proteínas redox: A) CAT, B) GPX1, C) SOD1 e D) expressão gênica de PRDX1. SF: camundongos humanizados para o grupo controle; SS: camundongos humanizados para anemia falciforme (AF); SS+MEL: camundongos humanizados para AF tratados com melatonina (MEL, 10 mg/kg por via oral); SS+ERT: camundongos humanizados para AF tratados com ergotioneína (ERT, 35 mg/kg por via oral). RU: Unidade Relativa - variação de expressão (*fold-change*). Os valores representativos de cinco pseudoréplicas foram expressos como média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Modelos Lineares Gerais (GLM) no formato *one-way* ANOVA, complementados pelo teste de Bonferroni. Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: a, efeitos observados da doença (SF x SS), b e c aos tratamentos com suplementação de ERT (SS x SS+ERT) e MEL (SS x SS+MEL) respectivamente.

### 3.3 Inter-players moleculares

Para o grupo SS, houve uma indução da expressão de *SLC22A4* (~8x). Ao mesmo tempo, observou-se uma inibição de *ATF4*, mas sem significância estatística. Em relação ao *ATF4*, o grupo SS+MEL, em menor grau, apresentou níveis de transcritos inferiores ao grupo controle, mas sem significância (Figura 3-A). Houve uma inibição de *SLC22A4* (~7x), com níveis mantidos semelhantes ao controle (SF) (Figura 3-B). Quanto ao gene *EIF2S1* (*eIF2 $\alpha$* ), que codifica um fator de iniciação necessário para a maioria das formas de iniciação da tradução eucariótica, embora sem significância estatística, podemos observar um claro padrão de indução da expressão gênica sob tratamento com ERT e MEL, e uma redução para o grupo SS (Figura 3-C). Isso demonstra um comprometimento na tradução nos animais não tratados. No grupo SS+ERT, houve um aumento da expressão de *ATF4* (~3x). Observou-se uma indução da expressão de *SLC22A4* (~2x) (Figura 1). Os altos níveis de *SLC22A4* em ambos os grupos sugerem que esse antioxidante se acumula amplamente nas células hematopoiéticas. Além disso, o pico de expressão de mRNA para o transportador específico de ERT nos camundongos tratados sugere uma maior internalização desse antioxidante após sua administração prolongada. Além disso, os dados foram sumarizados em um Heatmap (Figura 4).



**Fig 3.** Expressão relativa dos mediadores moleculares e do transportador específico para a captação de ergotioneína em camundongos humanizados com anemia falciforme. A) Expressão gênica de *ATF4*, B) Expressão gênica de *SLC22A4*, e C) Expressão gênica de *EIF2A*. SF: camundongos humanizados para o grupo controle; SS: camundongos humanizados para anemia falciforme (AF); SS+MEL: camundongos humanizados para AF tratados com melatonina (MEL, 10 mg/kg por via oral); SS+ERT: camundongos humanizados para AF tratados com ergotioneína (ERT, 35 mg/kg por via oral). RU: Unidade Relativa - variação de expressão (*fold-change*). Os valores representativos de cinco pseudoréplicas foram expressos como média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Modelos Lineares Gerais (GLM) no formato *one-way* ANOVA, complementados pelo teste de Bonferroni. Os símbolos indicam as seguintes diferenças estatísticas: a, efeitos observados da doença (SF x SS), b e c aos tratamentos com suplementação de ERT (SS x SS+ERT) e MEL (SS x SS+MEL), respectivamente.



**Fig 4.** Heatmap destacando os efeitos observados da doença (SF x SS) e dos tratamentos com ERT (SS x SS+ERT) e MEL (SS x SS+MEL). SF: camundongos humanizados para o grupo controle; SS: camundongos humanizados para anemia falciforme (AF); SS+MEL: camundongos humanizados para AF tratados com melatonina (MEL, 10 mg/kg por via oral); SS+ERT: camundongos humanizados para AF tratados com ergotioneína (ERT, 35 mg/kg por via oral). RU: Unidade Relativa - variação de expressão (*fold-change*). Os valores representativos de cinco pseudoréplicas foram expressos como média com erro padrão. *General linear models (GLM)* no formato *one-way* ANOVA, complementados pelo teste de Bonferroni.

#### 4. Discussão

As estimativas atuais indicam que aproximadamente 300.000 recém-nascidos com doença falciforme (DF) nasçam anualmente, e espera-se um crescimento exponencial desses números até 2050 [53], o que pode sobrecarregar significativamente os recursos de saúde em todo o mundo. Embora tenham ocorridos avanços significativos nos últimos 50 anos no entendimento da fisiopatologia complexa da DF, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas tem sido consideravelmente lento e complexo [53, 54]. Modelos murinos de AF oferecem uma maneira rápida de investigar uma gama mais ampla de questões em um ambiente *in vivo*, em contraste com o número limitado de experimentos que podem ser realizados em humanos. Portanto, espera-se que os camundongos transgênicos com AF sejam cruciais para o avanço do nosso conhecimento sobre a fisiopatologia da AF e para fornecer uma visão mecanicista da ação de possíveis tratamentos eficazes, como o objetivo do nosso trabalho.

Nossos resultados demonstram que o modelo usado no estudo foi adequado para a análise de expressão gênica, uma vez que seus resultados sugerem perfil hiperoxidativo característicos da doença, devido a níveis significativamente mais elevados de *NRF2* e *FOXO3* junto ao *MST1* no grupo SS. A atividade transcricional do fator de transcrição *FOXO3* é controlada principalmente por modificações pós-traducionais (PTM), que resultam na translocação da proteína do núcleo para o citoplasma [67], realizada pela chaperona 14-3-3. O *MST1* atua como antagonista da anterior e, sob estresse oxidativo, é ativado, permitindo que o *FOXO3* inicie a transcrição dos genes-alvo

[55]. No tratamento de MEL (SS+MEL) esses fatores de transcrição apresentaram expressões mais baixas e *YWHAZ* níveis com comportamento de indução, sugerindo que a via redox do FOXO3 foi inibida. No grupo SS+ERT, os níveis de *NFE2L2* foram mantidos em níveis semelhantes ao controle, e a expressão de *FOXO3* foi notavelmente inibida. Dare et al. (2021) demonstraram, *in silico*, que a ERT pode se ligar diretamente ao Nrf2, o que levaria à dissociação do complexo Nrf2-Keap1, levando à acumulação nuclear do Nrf2 e consequentemente, à ativação de genes antioxidantes [56]. No entanto, os níveis de *eIF2a* apresentaram um padrão de indução em comparação com o grupo SS, o que pode sugerir que a restauração aos níveis basais de transcrição (semelhantes aos do grupo SF) pode ter sido alcançada através de uma síntese *de novo* de FOXO3 e Nrf2, como sugerido por estudos anteriores [57].

Os camundongos não tratados (SS) apresentaram níveis elevados dos transcritos de *CAT* e *GPx1* em comparação com os controles SF, o que indica uma resposta redox ao aumento do estresse oxidativo. Com o tratamento de MEL observa-se que o estresse oxidativo sistêmico foi reduzido junto com suas supressões, semelhantes a estudos em camundongos com Alzheimer [58]. Em ratos com pinealectomia que receberam MEL exógena no qual teve seu aumento na medula óssea e no soro, os autores relataram um aumento significativo na capacidade de neutralizar significativamente o efeito oxidativo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células-tronco de sangue periférico [59, 60]. Sendo assim, nossos achados sugerem que a MEL agiu diretamente na detoxificação de espécies reativas no modelo utilizado, sem ativar as vias de sinalização redox e as enzimas antioxidantes; efeito menos pronunciado no tratamento com ERT.

Em relação as outras enzimas antioxidantes, como *SOD1*, *PRDX1* e *TRX1*, elas têm seus níveis reduzidos no grupo SS, diferentemente dos grupos tratados (SS+MEL e SS+ERT). Envolvidas em vários outros processos celulares suas funções podem variar de diversas formas que são preservados pelas restaurações a níveis semelhantes ao controle. Como a *SOD1* pode ter um papel significativo como fator de transcrição nuclear na regulação da resposta geral ao estresse oxidativo, e, notavelmente, a *PRDX1* foi um dos genes regulados pela *SOD1* nuclear [61]. A *PRDX1* demonstrou funcionar como imunomodulador, regulador de transcrição, chaperona molecular [62, 63, 64] e influenciar a longevidade dos eritrócitos [65]. Quanto à *TRX1*, ela é essencial para muitos outros processos celulares, incluindo síntese de DNA, proliferação, regulação da expressão gênica e controle da apoptose [66], além de contribuir para uma maior longevidade em camundongos transgênicos C57BL/6 que superexpressam essa proteína [67, 68].

Junto com o aumento de *TXNIP* sob administração de ERT pode reforçar a hipótese de que esse aumento de mRNA de *TXNIP* estão relacionados à diferenciação eritroide junto com a manutenção dos níveis de *SOD1* e *PRX1* [69]. Seguindo as atividades imunomoduladoras, Yoshida et al. relataram propriedades imunoestimulantes associadas à administração de ERT como um potenciador da sinalização do receptor do tipo Toll (TLR) [70]. *ATF4* e *TXNIP* têm sido propostos como novos reguladores da proliferação e diferenciação eritroide [71, 72, 73]. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* relataram um aumento rápido e significativo de *TXNIP* (níveis de transcrito e proteína) em células de leucemia eritroide de camundongos tratadas com indutores de diferenciação eritroide, aumento este que não foi abolido pela adição do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) [72]. O que demonstra novamente que níveis minimamente mais baixos de *TXNIP*, como os observados no grupo SS+MEL, podem ser benéficos no contexto da doença, sugerindo outra camada de proteção conferida pela MEL. Zheng et al., demonstra papel do *ATF4* na medula óssea em que células hematopoiéticas deficientes em *ATF4* de camundongos exibem defeitos na diferenciação eritroide, levando a anemia hipoplásica [73], reforçando o papel da ERT devido a indução de *ATF4*.

Os níveis de expressão do gene *SLC22A4* são elevados em diversos tecidos, inclusive na medula óssea, demonstrando que ERT é altamente acumulado em células hematopoiéticas, corroborando estudos anteriores [74, 75] e possibilitando também avaliar se a MEL poderia reduzir o estresse oxidativo na medula óssea. No grupo SS, uma elevação na expressão de *SLC22A4* sugere um estresse significativo [76, 77, 78]. A MEL mitigou essa resposta, já que o grupo SS+MEL manteve níveis de transcrição semelhantes ao controle (inibição de ~7x), sugerindo uma ação direta da MEL na redução do estresse oxidativo. Maeda et al. demonstraram que a expressão de *SLC22A4* é regulada por vários fatores de transcrição, como a proteína de especificidade 1 (Sp1), fator de transcrição relacionado a Runt 1 (RUNX1) e fator nuclear Kappa B (NF-κB) [79], sendo todos importantes no contexto das células eritroides. Corroborando com nossos dados onde a captação de ERT parece ser rigidamente regulada nos camundongos SS+ERT em resposta à administração prolongada, indicando um mecanismo de *feedback* positivo na medula óssea. Isso sugere um mecanismo adaptativo *in vivo* que reforça o papel crítico da ERT durante a hematopoiese.

A suplementação com ERT ou MEL oferece vantagens sociais e econômicas significativas, particularmente no contexto da saúde pública e dos sistemas de saúde. Ambas podem ser sintetizadas comercialmente, e a melatonina já foi aprovada como suplemento alimentar pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, além de possuir o status “Geralmente Reconhecida como Segura” (GRAS) atribuído pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. Contudo, a ergotioneína (ERT), apesar de amplamente reconhecida por suas propriedades antioxidantes, ainda não recebeu aprovações regulatórias específicas pela ANVISA, FDA ou pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Com um perfil de segurança excepcional, sem toxicidade ou efeitos adversos observados, mesmo em doses elevadas, o baixo custo de produção e a ausência de efeitos colaterais significativos posicionam essas substâncias como abordagens altamente inovadoras [81, 82]. O potencial de reduzir os custos com saúde, ao minimizar a frequência de complicações como crises vaso-oclusivas, hospitalizações e danos orgânicos de longo prazo, torna essas opções economicamente viáveis para sistemas de saúde pública, desde que a eficácia e segurança sejam validadas por ensaios clínicos e incluídas em diretrizes de tratamento oficiais. Além disso, esforços para ampliar a produção, seja por meio de síntese química ou métodos biotecnológicos, como a fermentação por leveduras [83, 84], poderiam reduzir os custos de fabricação e garantir acesso generalizado.

Os potenciais efeitos terapêuticos de medicamentos antioxidantes e anti-inflamatórios, novos e estabelecidos, em pacientes com AF devem ser investigados mais a fundo, dado o crescente número de evidências que ligam o estresse oxidativo à patogênese da doença. A MEL e a ERT são antioxidantes promissores que podem ser úteis no tratamento da AF, tendo sido estudada tanto em modelos humanos quanto animais, com apenas efeitos colaterais leves da MEL, como dores de cabeça, náusea e sonolência, e sem propriedades aditivas [85]. Antioxidantes são notáveis por serem acessíveis e facilmente obtidos, o que os torna especialmente atraentes, dado que a AF é mais comum em regiões com poucos recursos, como demonstrado por dados de estudos africanos, que mostram que 50–90% das crianças morrem de AF antes dos cinco anos de idade [2]. Portanto, a implementação de intervenções acessíveis e de múltiplas ações, como a MEL e ERT, é de extremo interesse.

## 5. Conclusão

Em conclusão, a administração de MEL e ERT em camundongos SS demonstrou efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, tanto diretos quanto indiretos, por meio da modulação das principais vias redox, com base na expressão gênica dos transcritos avaliados. Este estudo ressalta o potencial promissor da MEL e da ERT como terapias antioxidantes para a anemia falciforme (AF), evidenciando sua capacidade de restaurar o equilíbrio redox, modular biomarcadores-chave e oferecer proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Especificamente, a suplementação com MEL mostrou-se eficaz na normalização da expressão gênica associada ao estresse oxidativo. Seu papel duplo como antioxidante e imunomodulador fornece uma base sólida para avanços em ensaios clínicos de fase 2, especialmente considerando seu perfil de segurança favorável e seu potencial para complementar terapias existentes, atuando em múltiplas vias na AF.

No caso da ERT, suas propriedades promissoras atreladas ao perfil de segurança de seu consumo, mesmo em altas doses, oferecem uma alternativa viável para futuros ensaios clínicos. Além disso, ambas as substâncias se destacam por sua acessibilidade e facilidade de obtenção, tornando-as opções atraentes para suplementação em larga escala. Portanto, é essencial que estudos clínicos sejam conduzidos para validar sua eficácia e possibilitar sua inclusão nas diretrizes de tratamento da AF, contribuindo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes de forma global.

### **Declarações**

### **Financiamento**

Este estudo foi apoiado por FUNDECT (TO número 155/2024) e CNPq (número 406700/2021-4) para DGHS.

### **Conflitos de Interesse**

Os autores declaram que receberam ERGONEINE® de Tetrahedron para a condução do estudo. No entanto, Tetrahedron não influenciou o desenho do estudo, a coleta e interpretação dos dados ou a preparação do manuscrito.

### **Aprovação ética**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP; Protocolo: 5955-1/2022) deu aprovação ética.

### **Referências**

- [1] P.S. Frenette, G.F. Atweh, Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 850–858.
- [2] G.J. Kato, F.B. Piel, C.D. Reid, et al., Sickle cell disease, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 (2018).
- [3] R. Vona, N.M. Sposi, L. Mattia, et al., Sickle cell disease: Role of oxidative stress and antioxidant therapy, *Antioxidants* 10 (2021) 1–27.
- [4] T.N. Williams, S.L. Thein, Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 19 (2018) 113–147.
- [5] F.I. Aboderin, T. Oduola, G.M. Davison, O.O. Oguntibeju, A Review of the Relationship between the Immune Response, Inflammation, Oxidative Stress, and the Pathogenesis of Sickle Cell Anaemia, *Biomedicines* 11 (2023) 2413.

- [6] S. Voskou, M. Aslan, P. Fanis, M. Phylactides, M. Kleanthous, Oxidative stress in  $\beta$  -thalassaemia and sickle cell disease, *Redox Biol.* 6 (2015) 226–239. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>.
- [7] V.M. Barodka, E. Nagababu, J.G. Mohanty, D. Nyhan, D.E. Berkowitz, J.M. Rifkind, J.J. Strouse, New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease, *Blood Cells, Mol. Dis.* 52 (2014) 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.10.004>.
- [8] J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind, Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.* 5 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>.
- [9] E. Fibach, E. Rachmilewitz, The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia, *Curr. Mol. Med.* 8 (2008) 609–619.
- [10] T. Gui, B.M.T. Burgering, FOXOs: masters of the equilibrium, *FEBS J.* (2021) 1–22. <https://doi.org/10.1111/febs.16221>.
- [11] E. Yoshihara, S. Masaki, Y. Matsuo, Z. Chen, H. Tian, J. Yodoi, Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases, *Front. Immunol.* 4 (2014) 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00514>.
- [12] G. Neill, G.R. Masson, A stay of execution: ATF4 regulation and potential outcomes for the integrated stress response, *Front. Mol. Neurosci.* 16 (2023) 1– 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1112253>.
- [13] N.A. Chaves, T.G.P. Alegria, L.S. Dantas, L.E.S. Netto, S. Miyamoto, C.R. Bonini Domingos, D.G.H. da Silva, Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 141 (2019) 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.034>.
- [14] R. Vona, N.M. Spasi, L. Mattia, L. Gambardella, E. Straface, D. Pietraforte, Sickle cell disease: Role of oxidative stress and antioxidant therapy, *Antioxidants* 10 (2021) 1–27. <https://doi.org/10.3390/antiox10020296>.
- [15] J.F. Doss, J.C. Jonassaint, M.E. Garrett, A.E. Ashley-koch, M.J. Telen, J. Chi, Phase 1 Study of a Sulforaphane-Containing Broccoli Sprout Homogenate for Sickle Cell Disease, *PLoS One* 11 (2016) e0152895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152895>.
- [16] C.A. Ihunnah, S. Ghosh, S. Hahn, A.C. Straub, S.F. Ofori-Acquah, Nrf2 Activation With CDDO-Methyl Promotes Beneficial and Deleterious Clinical Effects in Transgenic Mice With Sickle Cell Anemia, *Front Pharmacol* 13 (2022) 880834. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.880834>.
- [17] Z. Ahmadi, M. Ashrafizadeh, Melatonin as a potential modulator of Nrf2, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 34 (2020) 11–19.
- [18] D.M. Chitimus, M.R. Popescu, S.E. Voiculescu, et al., Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease, *Biomolecules* 10 (2020) 1–28.
- [19] A. Galano, D.X. Tan, R.J. Reiter, Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination, *J. Pineal Res.* 51 (2011) 1–16.
- [20] Ş. Kantar, N. Türközkan, F.S. Bircan, Ö.T. Paşaoğlu, Beneficial effects of melatonin on serum nitric oxide, homocysteine, and ADMA levels in fructose-fed rats, *Pharm. Biol.* 53 (2015) 1035–1041.

- [21] J.L. Mauriz, P.S. Collado, C. Veneroso, R.J. Reiter, J. González-Gallego, A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: Recent insights and new perspectives, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 1–14.
- [22] A. Galano, R.J. Reiter, Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection, *J. Pineal Res.* 65 (2018) 1–33.
- [23] R.J. Reiter, D.X. Tan, C. Osuna, E. Gitto, Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review, *J. Biomed. Sci.* 7 (2000) 444–458.
- [24] R. Hardeland, Melatonin's antioxidant properties: Molecular mechanisms, *Melatonin Melatonergic Drugs Clin. Pract.* (2014) 17–26.
- [25] N. Ferlazzo, G. Andolina, A. Cannata, et al., Is melatonin the cornucopia of the 21st century?, *Antioxidants (Basel)* 9 (2020) 1088.
- [26] R. Hardeland, D.P. Cardinali, V. Srinivasan, et al., Melatonin - A pleiotropic, orchestrating regulator molecule, *Prog. Neurobiol.* 93 (2011) 350–384.
- [27] N. Kurhaluk, A. Sliuta, S. Kyriienko, P.J. Winklewski, Melatonin restores white blood cell count, diminishes glycated haemoglobin level and prevents liver, kidney and muscle oxidative stress in mice exposed to acute ethanol intoxication, *Alcohol Alcohol.* 52 (2017) 521–528.
- [28] N. Kurhaluk, H. Tkachenko, O. Lukash, P.J. Winklewski, M. Wszedybyl-Winklowska, Melatonin maintains the function of the blood redox system at combined ethanol-induced toxicity and subclinical inflammation in mice, *Sleep Breath.* 25 (2021) 1045–1054.
- [29] B. Halliwell, R.M.Y. Tang, I.K. Cheah, Diet-Derived Antioxidants: The Special Case of Ergothioneine, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 14 (2023). <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060822-122236>.
- [30] T.T. Fu, L. Shen, Ergothioneine as a Natural Antioxidant Against Oxidative Stress-Related Diseases, *Front. Pharmacol.* 13 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.850813>.
- [31] I.K. Cheah, B. Halliwell, Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822 (2012) 784–793. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.09.017>.
- [32] I.K. Cheah, B. Halliwell, Ergothioneine, recent developments, *Redox Biol.* (2021) 101868. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101868>.
- [33] D. Gründemann, S. Harlfinger, S. Golz, A. Geerts, A. Lazar, R. Berkels, N. Jung, A. Rubbert, E. Schömig, Discovery of the ergothioneine transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5256–5261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408624102>.
- [34] S. Grigat, S. Harlfinger, S. Pal, R. Striebing, S. Golz, A. Geerts, A. Lazar, E. Schömig, D. Gründemann, Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.04.015>.
- [35] D.P. Hanlon, Interaction of ergothioneine with metal ions and metalloenzymes, *J. Med. Chem.* 14 (1971) 1084–1087. <https://doi.org/doi:10.1021/jm00293a017>.
- [36] S. Kiho, T. Yoshida, I. Katsuragawa, M. Sakushima, M. Usui, S. Ukai, Studies on Ergothioneine. VII. Some Effects of Ergothioneine on Glycolytic Metabolism in Red Blood Cells from Rats, *Chem. Pharm. Bull.* 17 (1994) 1460–1462. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb1993/17/11/17\\_11\\_1460/pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb1993/17/11/17_11_1460/pdf/-char/ja).
- [37] T.Y. Song, C.L. Chen, J.W. Liao, H.C. Ou, M.S. Tsai, Ergothioneine protects against neuronal injury induced by cisplatin both in vitro and in vivo, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 3492–3499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.030>.

- [38] Y.C. Hseu, H.W. Lo, M. Korivi, Y.C. Tsai, M.J. Tang, H.L. Yang, Dermatoprotective properties of ergothioneine through induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated Human keratinocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 86 (2015) 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.026>.
- [39] V.S. Bernardo, F.F. Torres, C.P. de Paula, J.P.M. de O. da Silva, E.A. de Almeida, A.F. da Cunha, Danilo Grünig Humberto da Silva, Potential Cytoprotective and Regulatory Effects of Ergothioneine on Gene Expression of Proteins Involved in Erythroid Adaptation Mechanisms and Redox Pathways in, *Genes (Basel)*. 13 (2022) 2368.
- [40] I. Rahman, P.S. Gilmour, L.A. Jimenez, S.K. Biswas, F. Antonicelli, O.I. Aruoma, Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$  B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 860–864. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00224-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00224-9).
- [41] I. Laurenza, R. Colognato, L. Migliore, S. Del Prato, L. Benzi, Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an antiinflammatory action, *BioFactors* 33 (2008) 237–247. <https://doi.org/10.1002/biof.5520330401>.
- [42] B. Halliwell, I.K. Cheah, R.M.Y. Tang, Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential, *FEBS Lett.* 592 (2018) 3357–3366. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13123>.
- [43] E.L.T. Shimauti, D.G.H. Silva, E.A. Almeida, et al., Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia, *Blood Cells Mol. Dis.* 45 (2010) 297–301.
- [44] N.A. Chaves, T.G.P. Alegria, L.S. Dantas, L.E.S. Netto, S. Miyamoto, C.R. Bonini Domingos, D.G.H. da Silva, Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 141 (2019) 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.034>.
- [45] A.F. Da Cunha, A.F. Brugnerotto, M.A. Finzi Corat, E.E. Devlin, A.P. Gimenes, M. Barbosa De Melo, L.A. Corra Passos, D. Bodine, S.T.O. Saad, F.F. Costa, High levels of human  $\gamma$ -globin are expressed in adult mice carrying a transgene of the Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin ( $A\gamma$  -195), *Hemoglobin* 33 (2009) 439–447. <https://doi.org/10.3109/03630260903344176>.
- [46] G. Hoffmann, J. Mysliwietz, W. Mortlbauer, H.J. Zeitler, E. Eberle, U. Hiinle, S. Thierfelder, Biotin labeling as an alternative nonradioactive approach to determination of red cell survival, *Ann. Hematol.* 67 (1993) 81–87.
- [47] Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados, 1st ed., Brasília, 2013.
- [48] A. Dare, M.L. Channa, A. Nadar, L-ergothioneine and its combination with metformin attenuates renal dysfunction in type-2 diabetic rat model by activating Nrf2 antioxidant pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141 (2021) 111921. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111921>.
- [49] E. Mitra, B. Bhattacharjee, P. Pal, A. Ghosh, S. Mishra, A. Chattopadhyay, D. Bandyopadhyay, Melatonin protects against cadmium-induced oxidative damage in different tissues of rat: a mechanistic insight, *Melatonin Research* 2 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.32794/mr11250018>.
- [50] M.M. Mahajan, B. Cheng, A.I. Beyer, U.S. Mulvaney, M.B. Wilkinson, M.E. Fomin, M.O. Muench, A quantitative assessment of the content of hematopoietic stem cells in mouse and human endosteal-bone marrow: A simple and rapid method for the isolation of mouse central bone marrow, *BMC Hematol.* 15 (2015) 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12878-015-0031-7>.

- [51] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [52] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods* 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [53] G.S. Cisneros, S.L. Thein, Recent advances in the treatment of sickle cell disease, *Front. Physiol.* 11 (2020) 435.
- [54] S. Kapoor, J.A. Little, L.H. Pecker, Advances in the treatment of sickle cell disease, *Mayo Clin. Proc.* 93 (2018) 1810–1824.
- [55] V.S. Bernardo, F.F. Torres, D.G.H. da Silva, FoxO3 and oxidative stress: a multifaceted role in cellular adaptation, *J. Mol. Med.* 101 (2023) 83–99.
- [56] A. Dare, M.L. Channa, A. Nadar, Cardioprotective Effects and in-silico Antioxidant Mechanism of L-Ergothioneine in Experimental Type-2 Diabetic Rats, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 20 (2022) 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111921>.
- [57] G. Covas, H.S. Marinho, L. Cyrne, F. Antunes, Activation of Nrf2 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: De novo synthesis versus nuclear translocation, *Methods Enzymol.* 528 (2013) 157–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00009-4>
- [58] J.M. Olcese, C. Cao, T. Mori, et al., Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease, *J. Pineal Res.* 47 (2009) 82–96.
- [59] D.X. Tan, L.C. Manchester, R.J. Reiter, et al., Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance, *Biochim. Biophys. Acta* 1472 (1999) 206–214.
- [60] K. Greish, I. Sanada, A.E.D. Saad, et al., Protective effect of melatonin on human peripheral blood hematopoietic stem cells against doxorubicin cytotoxicity, *Anticancer Res.* 25 (2005) 4245–4248.
- [61] C.K. Tsang, Y. Liu, J. Thomas, Y. Zhang, X.F.S. Zheng, Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3446.
- [62] W. Lee, K.S. Choi, J. Riddell, et al., Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: The unique presence of Cys83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22011–22022.
- [63] J.R. Riddell, X.-Y. Wang, H. Minderman, S.O. Gollnick, Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4, *J. Immunol.* 184 (2010) 1022–1030.
- [64] H. Nassour, Z. Wang, A. Saad, et al., Peroxiredoxin 1 interacts with and blocks the redox factor APE1 from activating interleukin-8 expression, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29389.
- [65] C.A. Neumann, D.S. Krause, C.V. Carman, et al., Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression, *Nature* 424 (2003) 561–565.
- [66] T. Oberacker, L. Kraft, M. Schanz, J. Latus, S. Schrick, The importance of Thioredoxin-1 in health and disease, *Antioxidants (Basel)* 12 (2023) 1078.
- [67] A. Mitsui, J. Hamuro, H. Nakamura, et al., Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span, *Antioxid. Redox Signal.* 4 (2002) 693–696.
- [68] V.I. Pérez, L.A. Cortez, C.M. Lew, et al., Thioredoxin 1 overexpression extends mainly the earlier part of life span in mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 66 (2011) 1286–1299.
- [69] E.C.A. Eleutherio, R.S. Silva Magalhães, A. de Araújo Brasil, J.R. Monteiro Neto, L. de Holanda Paranhos, SOD1, more than just an antioxidant, *Arch. Biochem. Biophys.* 697 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>.

- [70] S. Yoshida, H. Shime, K. Funami, H. Takaki, M. Matsumoto, M. Kasahara, T. Seya, The anti-oxidant ergothioneine augments the immunomodulatory function of TLR agonists by direct action on macrophages, *PLoS One* 12 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169360>.
- [71] D.M. Wojchowski, E. Jachimowicz, R. Asch, EPO Modulation of Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP), and Key Roles for TXNIP during EPO-Dependent Human Erythroid Progenitor Cell Growth and Development, *Blood* 126 (2015) 2129. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.2129.2129>.
- [72] J.J. Gasior, M. Mikhael, D. Garcia-Santos, S.T. Hui, P. Ponka, V. Blank, Thioredoxin-interacting protein regulates the differentiation of murine erythroid precursors, *Exp. Hematol.* 43 (2015) 393–403.e2. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.01.003>.
- [73] Z. Zheng, S. Yang, F. Gou, C. Tang, Z. Zhang, P. Jiang, P. Qian, P. Zhu, H. Cheng, T. Cheng, The ATF4-RPS19BP1 Axis Modulates Ribosome Biogenesis to Promote Erythropoiesis, 2023. <https://doi.org/10.1182/blood-2023-184592>.
- [74] B. Halliwell, I.K. Cheah, C.L. Drum, Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470 (2016) 245–250.
- [75] R.M.Y. Tang, I.K.M. Cheah, T.S.K. Yew, B. Halliwell, Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20021-z>.
- [76] I.K. Cheah, R. Tang, P. Ye, T.S.Z. Yew, K.H.S. Lim, B. Halliwell, Liver ergothioneine accumulation in a guinea pig model of non-alcoholic fatty liver disease. A possible mechanism of defence?, *Free Radic. Res.* 50 (2016) 14–25. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1099642>.
- [77] I.K. Cheah, R.M.Y. Tang, T.S.Z. Yew, K.H.C. Lim, B. Halliwell, Administration of Pure Ergothioneine to Healthy Human Subjects: Uptake, Metabolism, and Effects on Biomarkers of Oxidative Damage and Inflammation, *Antioxidants Redox Signal.* 26 (2017) 193–206. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6778>.
- [78] L. Pochini, M. Galluccio, M. Scalise, et al., OCTN1: A widely studied but still enigmatic organic cation transporter linked to human pathology and drug interactions, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 914.
- [79] T. Maeda, M. Hirayama, D. Kobayashi, K. Miyazawa, I. Tamai, Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 394–401. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012112>.
- [80] D. Turck, J. Bresson, B. Burlingame, T. Dean, S. Fairweather-tait, M. Heinonen, K.I. Hirschernst, I. Mangelsdorf, H.J. Mcardle, A. Naska, M. Neuh, M. Stern, D. Tom, K. Pentieva, Y. Sanz, A. Siani, A. Sj, M. Vinceti, P. Willatts, K.H. Engel, R. Marchelli, P. Annette, M. Poulsen, J. Schlatter, R. Ackert, H. Van Loveren, Safety of synthetic L-ergothioneine (Ergoneine®) as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97, *EFSA J.* 14 (2016) 4629. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4629>.
- [81] R. Forster, F. Spézia, D. Papineau, C. Sabadie, I. Erdelmeier, M. Moutet, J.C. Yadan, Reproductive safety evaluation of L-Ergothioneine, *Food Chem. Toxicol.* 80 (2015) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.019>.
- [82] P.A. Marone, J. Trampota, S. Weisman, A Safety Evaluation of a NatureIdentical l - Ergothioneine in Sprague Dawley Rats, *Int. J. Toxicol.* 35 (2016) 568–583. <https://doi.org/10.1177/1091581816653375>.

- [83] S.A. Van Der Hoek, B. Darbani, K.E. Zugaj, B.K. Prabhala, I. Borodina, Engineering the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of L- (+) - Ergothioneine, *Front Bioeng Biotechnol* 7 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00262>.
- [84] Y.H. Yu, H.Y. Pan, L.Q. Guo, J.F. Lin, H.L. Liao, H.Y. Li, Successful biosynthesis of natural antioxidant ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae* required only two genes from *Grifola frondosa*, *Microb. Cell Fact.* 19 (2020) 1– 10. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01421-1>.
- [85] L.P.H. Andersen, I. Gögenur, J. Rosenberg, R.J. Reiter, The safety of melatonin in humans, *Clin. Drug Investig.* 36 (2016) 169–175.

**Guia do autor do periódico escolhido - Free Radical Biology and Medicine, ScienceDirect Elsevier.**

<<https://www.sciencedirect.com/journal/free-radical-biology-and-medicine/publish/guide-for-authors>>