



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Efeitos dos extratos de *Carica papaya* na regulação transcricional e pós-transcricional da hemoglobina fetal

Beatriz da Silva Malainho Canteiro

Orientadores:

Prof. Dr. Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Prof. Dra. Anita Quintal Gomes (ESTeSL, H&TRC)

Tese para obtenção do grau de Mestre
em **Engenharia Biomédica**

(Versão definitiva)

Lisboa, Novembro de 2022

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**Efeitos dos extratos de *Carica papaya* na
regulação transcricional e pós-transcricional da
hemoglobina fetal**

Beatriz da Silva Malainho Canteiro

Orientadores:

Prof. Dr. Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Prof. Dra. Anita Quintal Gomes (ESTeSL, H&TRC)

Júri:

Presidente: Prof. Dra. Cecília da Cruz Calado (ISEL)

Arguente: Prof. Dra. Elsa Teixeira Rodrigues (Faculdade de
Farmácia, Universidade de Lisboa)

Mestrado em **Engenharia Biomédica**

Lisboa, Novembro de 2022



Efeitos dos extratos de *Carica papaya* na regulação transcricional e pós-transcricional da hemoglobina fetal

Beatriz da Silva Malainho Canteiro

2022

Este projeto foi financiado pelo **Instituto Politécnico de Lisboa** para o projeto “*Effects of Carica papaya extracts in epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of fetal hemoglobin. New therapeutic target for hemoglobinopathies*”, registado como IDI&CA-IPL/2021/EpiCa/ESTeSL. O presente trabalho foi desenvolvido no **Health & Technology Research Center (H&TRC)**, localizado na **Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)**, sob supervisão do Professor Doutor Rui Miguel de Brito (ESTeSL) e da Professora Doutora Anita Quintal Gomes (ESTeSL).

O Instituto Politécnico de Lisboa tem o direito ilimitado e intemporal de arquivar e publicar esta dissertação através de cópias digitais ou físicas, ou qualquer outro meio que considerem adequado, com objetivos de investigação ou educação, não comerciais, desde que o autor seja reconhecido para tal.

Copyright © 2022 – Beatriz Canteiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores: o Professor Doutor Miguel Brito e a Professora Doutora Anita Gomes pelo voto de confiança, pelo apoio desde o primeiro dia na realização desta dissertação e pelos ensinamentos que me deram ao longo do último ano.

Aos Professores, Professora Doutora Edna Ribeiro e Professor Doutor Mário Gomes agradeço pelas suas orientações e disponibilidade ao longo destes últimos meses.

À Mariana Delgado, obrigada pela tua paciência, ensinamentos, carinho e por estares sempre pronta a ajudar na concretização desta dissertação.

À minha colega Maria Inês Mendes, agradeço pelo teu apoio, amizade e por termos sido uma boa equipa.

Aos meus Professores, que ao longo do meu percurso académico partilharam os seus conhecimentos.

À Professora Doutora Cecília Calado, por ter sido uma inspiração para mim desde o primeiro dia do mestrado em diversos aspetos.

Ao Sr. Fernando Nunes, obrigada pela cedência das folhas de *C. papaya L.*

Ao Professor Francisco Enguita, obrigada pela sua ajuda na análise bioinformática dos genes alvo dos miRNAs, tendo sido uma ajuda imprescindível.

Aos meus colegas de Mestrado e à equipa de apoio ao laboratório.

Aos meus pais, ao meu pai do coração, ao meu irmão Alexandre e aos meus avós pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e pela vossa sabedoria transmitida.

Aos meus amigos, em especial a Carolina, Raquel e Ana Beatriz, pela amizade, entreajuda e companheirismo nos últimos anos, e ainda à Telma e à Andreia, as minhas amigas de longa data sempre presentes.

A todas as pessoas que se cruzaram no meu caminho e que de alguma forma me ajudaram a concluir este percurso.

Resumo

Introdução: As hemoglobinopatias constituem um dos grupos de doenças monogênicas mais comuns no mundo. Atualmente, um dos tratamentos disponíveis consiste na indução farmacológica da hemoglobina fetal (HbF) através de vários compostos químicos, sendo o mais comum a hidroxiureia (HU). Contudo, o seu custo elevado em países subdesenvolvidos e o seu perfil de segurança limitam a utilização deste composto. Assim, é essencial a descoberta de novos compostos indutores de HbF com menos efeitos secundários e que sejam de fácil acesso, como é o caso dos compostos naturais (ex: Extrato de folha de *Carica papaya L.* e Quercetina).

Objetivo: Avaliar o efeito do extrato metanólico das folhas de *Carica papaya L.* (EMFCP) e da Quercetina em células K562 (linha celular humana mortalizada de leucemia mielóide) ao nível da expressão dos genes *HBG1* e *HBG2*, bem como de genes reguladores.

Material e Métodos: A linha celular K562 foi exposta durante 24 horas ao EMFCP (0,5; 50 e 100 µg/mL) à Quercetina (0,2 e 20 µM) e à HU (25 µg/mL). Após a exposição aos compostos naturais quantificaram-se os efeitos da expressão génica a partir do RNA total, tendo-se recorrido à técnica de RT-qPCR. Analisaram-se os níveis de expressão dos genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*); genes reguladores da HbF (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*), para além de miRNAs envolvidos na regulação da HbF (*miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* e *miR-96-5p*), tendo como referências endógenas o *GAPDH* para os genes codificantes e o *miR-426-3p* para os miRNAs analisados.

Resultados: A proliferação celular é afetada pela Quercetina a 20 µM, ao contrário da viabilidade que não é afetada por nenhum dos compostos nas concentrações estudadas. Através da análise transcricional, demonstrou-se que o EMFCP e a Quercetina apresentam efeitos opostos nos padrões de expressão dos genes *HBB*, *MYB* e *KLF1*, sugerindo-se que estes atuem por diferentes mecanismos de ação. Estes compostos também modulam a expressão de alguns miRNAs estudados, havendo uma correlação inversa, para algumas das concentrações utilizadas, com os valores de expressão dos potenciais genes alvo.

Conclusão: O presente estudo preliminar sugere que o EMFCP e a Quercetina modulam a expressão da HbF, dos genes e de miRNAs reguladores em determinadas concentrações, constituindo assim uma potencial abordagem eficaz na terapêutica das β-hemoglobinopatias.

Palavras-chave: β-hemoglobinopatias, reativação da hemoglobina fetal, *Carica papaya*, Quercetina, Hidroxiureia

Abstract

Introduction: Hemoglobinopathies are within the most common monogenic diseases in the world. Currently, one of the available treatments consists of pharmacological induction of fetal hemoglobin (HbF) through chemical compounds, such as hydroxurea (HU). However, its high cost in underdeveloped countries and its safety profile limit the use of this compound. Thus, it is essential to discover new HbF-inducing compounds with fewer side effects that are easily accessible, such as natural compounds (e.g., *Carica papaya* L. and Quercetin).

Objective: To evaluate the effect of methanolic extract of *Carica papaya* L. leaves. (EMFCP) and Quercetin in K562 cells (human immortalized myeloid leukemia cell line) at the level of expression of the *HBG1* and *HBG2* genes.

Material and Methods: The K562 cell line was exposed for 24 hours to EMFCP (0.5; 50 and 100 µg/mL), to Quercetin (0.2 and 20 µM) and to HU (25 µg/mL). After exposure to natural compounds, the effects of gene expression were quantified from total RNA using RT-qPCR. We have analysed the expression levels of globins (*HBA*, *HBB*, *HBG1* and *HBG2*) were studied; HbF regulatory genes (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* and *BGLT3*) and finally of miRNAs involved in the regulation of HbF (*miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* and *miR-96-5p*), having as reference gene *GAPDH* for coding RNAs and *miR-426-3p* for miRNAs.

Results: Cell proliferation is affected by Quercetin at 20 µM, as opposed to viability that is not affected by any of the compounds in the concentrations studied. The transcriptional analysis has demonstrated that EMFCP and Quercetin have opposite effects on the expression patterns of the *HBB*, *MYB* and *KLF1* genes, suggesting that they act by different mechanisms of action. These compounds also modulate the expression levels of some miRNAs analysed, with some of them exhibiting an inverse correlation to their target genes under certain compound concentrations.

Conclusion: The present preliminary study suggests that EMFCP and Quercetin may modulate the expression of HbF, genes and regulatory miRNAs, being a potential effective approach in the β-hemoglobinopathies.

Keywords: β hemoglobinopathies, reactivation of fetal hemoglobin, *Carica papaya*, Quercetin, Hydroxyurea

Índice geral

Agradecimentos.....	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
Índice geral	X
Índice de Tabelas.....	XIII
Índice de Figuras	XV
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XVIII
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1 Hemoglobinopatias	1
1.1.1 Beta-talassémia	2
1.1.2 Doença das células falciformes.....	4
1.2 Hemoglobina humana.....	5
1.3 Regulação da expressão de hemoglobina	7
1.3.1 A nível transcricional.....	8
1.3.1.1 BCL11A	8
1.3.1.2 KLF1 ou EKLF	9
1.3.1.3 HBSL-1-MYB (HMIP)	10
1.3.1.4 BGLT3	10
1.3.2 A nível pós-transcricional.....	10
1.3.2.1 miR-486-3p	11
1.3.2.2 miR-34a-5p	11
1.3.2.3 miR-210-5p.....	11
1.3.2.4 miR-32-5p.....	12
1.3.2.5 miR-96-5p.....	12
1.4 Terapêuticas	12
1.4.1 Reativação da hemoglobina fetal	13
1.4.1.1 Hidroxiureia.....	14
1.5 Compostos naturais indutores de HbF	15
1.5.1 <i>Carica papaya L.</i>	16
1.5.2 Quercetina	17
Capítulo 2 – Objetivos.....	18
2.1 Questão de investigação.....	18
2.2 Objetivos.....	18

2.2.1 Geral.....	18
2.2.2 Específicos	18
Capítulo 3 - Materiais e métodos.....	19
3.1. Preparação do extrato metanólico de Carica papaya	19
3.2. Linha celular K562	19
3.3.1 Cultura das células K562 e reagentes.....	20
3.3.2 Incubação de células K562 com EMFCP e Quercetina.....	21
3.4 Análise da viabilidade celular e proliferação.....	22
3.5 Extração, quantificação e conversão do RNA total a DNA Complementar (cDNA)	23
3.6 Amplificação de cDNA por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	24
3.7 Análise estatística	26
Capítulo 4 – Resultados.....	27
4.1. Viabilidade celular e proliferação	27
4.2. Análise da expressão génica das globinas.....	30
4.3. Análise da expressão génica dos reguladores transcricionais da HbF	34
4.4. Análise da expressão dos miRNAs reguladores pós-transcricionais da HbF.....	38
Capítulo 5 - Discussão	44
Capítulo 6 – Conclusão.....	52
6.1 Conclusões	52
6.2 Perspetivas futuras	52
Capítulo 7 - Referências bibliográficas	54
Capítulo 8 – Anexos.....	66
Anexo 1: Descongelamento celular.....	66
Anexo 2: Passagem de células em suspensão	67
Anexo 3: Contagem de células com azul de tripano	68
Anexo 4: Extração de RNA	69
Anexo 5: Reação síntese de cDNA (estudo dos miRNA)	71
Capítulo 9 – Apêndices.....	72
Apêndice I: Quantificação de RNA.....	72
Apêndice II: Reação síntese de cDNA (estudos dos genes codificantes).....	73
Apêndice III: Princípio da técnica de PCR quantitativo em tempo real e respetivo procedimento	74

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Sequência de primers utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (estudo de genes).	24
Tabela 3.2 – Sequência de primers utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (estudo de miRNAs).....	25
Tabela 5.1 - Síntese dos efeitos do EMFCP e da Quercetina na transcrição de genes codificantes e a sua potencial ação na indução da HbF.	50
Tabela 5.2 - Síntese dos efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão de miRNAs e os seus potenciais efeitos na indução da HbF.	51
Tabela 8.1 - Volumes dos reagentes utilizados na reação síntese de cDNA.	71
Tabela 9.1 - Resultados da quantificação do RNA presente nas amostras celulares.	72
Tabela 9.2 - Volumes dos reagentes utilizados na reação.	73
Tabela 9.3 - Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação.	73
Tabela 9.4 - Temperaturas e tempos utilizados na reação de síntese de cDNA.	73
Tabela 9.5 - Reagentes utilizados na reação de qPCR (mRNA).	75
Tabela 9.6 - Condições de amplificação da reação de qPCR (mRNA).	76
Tabela 9.7 - Reagentes utilizados na reação de qPCR (miRNAs).	76
Tabela 9.8 - Condições de amplificação da reação de qPCR (miRNAs)	77

Índice de Figuras

Figura 1.1 – (A) Distribuição global das hemoglobinopatias baseados no número de crianças afetadas em cada 1000 nascimentos [2]. (B₁) Prevalência dos portadores de β -talassemia em Portugal [4]. (B₂) Prevalência de portadores de HbS em Portugal [4].	1
Figura 1.2 – Composição da hemoglobina humana. Adaptado de [24].	5
Figura 1.3 – Locus β -globina humano e a sua regulação ao longo do desenvolvimento. (A) Constituição génica dos loci α (cromossoma 16) e β (cromossoma 11). (B) Desenvolvimento humano (em semanas e pós-nascimento) e expressão das cadeias de globina (em % da síntese total), conforme o tecido/órgão humano. Adaptado de [29].	7
Figura 1.4 - Fatores de transcrição, miRNAs e mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão do gene da globina fetal durante o <i>hemoglobin switching</i> . Adaptado de [10].	8
Figura 1.5 – KLF1 regula o Switch da hemoglobina. Adaptado de [44].	9
Figura 1.6 - Terapêuticas para o tratamento das β -hemoglobinopatias. Adaptado de [8]. ..	13
Figura 1.7 – Múltiplos efeitos da administração de Hidroxiureia em indivíduos com anemia falciforme. Adaptado de [1].	15
Figura 1.8 - <i>Carica papaya L.</i> (árvore) e <i>Carica papaya L.</i> (fruto). Retirado de [108,107]..	16
Figura 1.9 - Quercetina em pó. Retirado de [112].	17
Figura 3.1 – (A) Folhas de <i>C. papaya L.</i> (B e C) Processo de extração num evaporador rotativo. (Fotos tiradas durante a realização do projeto).	19
Figura 3.2 – (A) Morfologia da célula K562 na coloração de Giemsa. Retirado de [120]. (B) Células K562 em suspensão com baixa densidade. Retirado de [121]. (C) Células K562 em suspensão com alta densidade. (Foto tirada durante a realização do projeto).	20
Figura 3.3 – (A) Câmara de fluxo laminar. (B) <i>T-flask</i> . (C) Visualização das células. (Fotos tiradas durante a realização do projeto).	21
Figura 3.4 – Tratamentos em placas de 6 poços. (A) Exposição celular ao tratamento com EMFCP a 0,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$. (B) Exposição celular ao tratamento com EMFCP a 100 $\mu\text{g/mL}$ e Controlo negativo. (C) Exposição celular ao tratamento com Quercetina a 0,2 e 20 μM . (D) Exposição celular ao tratamento com a HU e o Veículo. (Fotos tiradas durante a realização do projeto).	22
Figura 3.5 – (A) Câmara de Neubauer (B) Visualização das células numa câmara de Neubauer. (Fotos tiradas durante a realização do projeto).	23

Figura 4.1 – Efeitos do EMFCP na proliferação (A) e na percentagem de células viáveis (B).	28
Figura 4.2 – Efeitos do EMFCP e da Quercetina na proliferação das células K562	28
Figura 4.3 - Efeito do EMFCP e da Quercetina na viabilidade das células K562.	29
Figura 4.4 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene HBA.	30
Figura 4.5 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene <i>HBB</i>	31
Figura 4.6 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene <i>HBG1</i>	32
Figura 4.7 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene <i>HBG2</i>	33
Figura 4.8 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene <i>MYB</i>	34
Figura 4.9 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão do gene <i>KLF1</i>	35
Figura 4.10 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão do gene <i>BCL11A</i>	36
Figura 4.11 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão do gene <i>BGLT3</i>	37
Figura 4.12 – Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do <i>miR-486-3p</i> . ..	38
Figura 4.13 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do <i>miR-34a-5p</i>	39
Figura 4.14 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do <i>miR-210-5p</i> . ..	40
Figura 4.15 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do <i>miR-32-5p</i>	41
Figura 4.16 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do <i>miR-96-5p</i>	42
Figura 9.1 - Fases da curva de amplificação do qPCR (inicial, exponencial, linear e plateau) da quantidade relativa de fluorescência emitida em função do número de ciclos. Adaptado de [127].	75

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A₂₃₀	Absorvância a 230 nm
A₂₆₀	Absorvância a 260 nm
A₂₈₀	Absorvância a 280 nm
BGLT3	Transcrito do locus da β -globina (<i>Beta Globin Locus Transcript 3</i>)
BCL11A	<i>Proteína B-cell leukemia and lymphoma 11a</i>
cDNA	DNA complementar
CO	Monóxido de carbono
CPMLE	<i>Carica papaya methanolic leaf extract</i>
Cq	Ciclo de quantificação
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Fosfatados
EKLF	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EMFCP	Extrato metanólico de folhas de <i>Carica papaya</i>
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
FBS	Soro bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina adulta
HbA₂	Hemoglobina adulta <i>minor</i>
HBA	Gene da α -globina
HbA_s	Genótipo heterozigótico da doença falciforme
Hb_{ss}	Genótipo homozigótico da doença falciforme
HBB	Gene da β -globina

HbF	Hemoglobina fetal
HbF Switch	Mudança da expressão maioritária da HbF para HbA após o parto
HBG	Gene da γ -globina (HbF)
HbS	Hemoglobina S
HMOX1	Gene que codifica a enzima <i>Heme Oxygenase 1</i>
HU	Hidroxiureia
H&TRC	Centro de Investigação de Tecnologia e Saúde de Lisboa (<i>Health and Technology Research Center of Lisbon</i>)
KLF1	Fator de transcrição 1 do tipo Kruppel (<i>Kruppel Like Factor 1</i>)
LCR	<i>Locus control region</i>
Log₂FC	Logaritmo de mudança na expressão génica (Log ₂ fold change)
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i>
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MYB	Família de genes MYB
ncRNA	RNA não codificante
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NRF2	<i>Factor- erythroid factor 2-related factor 2</i>
NQO1	<i>NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1</i>
NO	Óxido nítrico
NTC	<i>No template control</i>
O₂	Oxigénio
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PHFH	Persistência hereditária da hemoglobina fetal
qPCR	PCR (Reação em cadeia da polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativo
RPM	Rotações por minuto

Ta	Temperatura ambiente
Tm	Temperatura de melting
UV	Ultra-violeta

1.1 Hemoglobinopatias

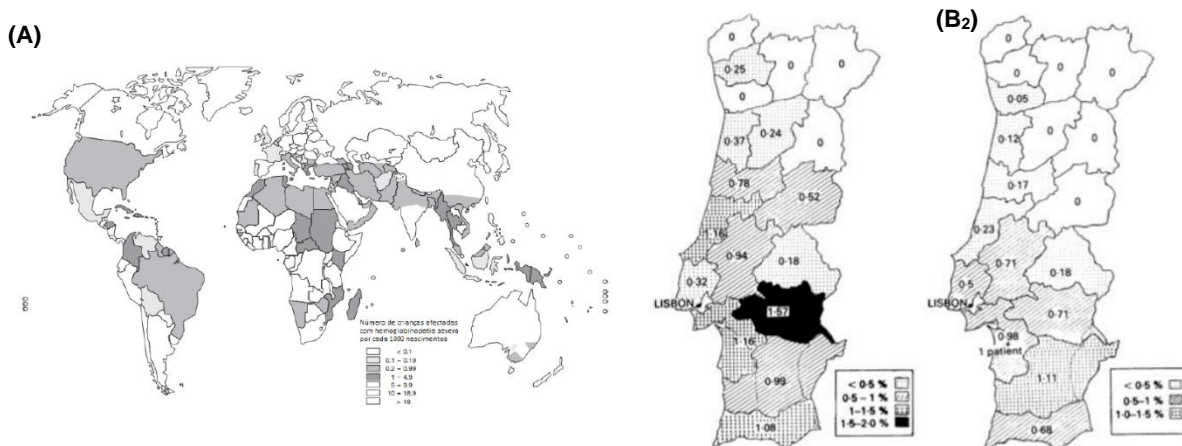
As hemoglobinopatias são um conjunto de perturbações herdadas da hemoglobina resultantes da síntese estruturalmente anormal ou incompleta de subunidades de β -globina (*HBB*)¹.

Estas podem ser qualitativas ou quantitativas, sendo que nas qualitativas existem variantes de hemoglobina resultantes da alteração da estrutura de uma cadeia de globina, afetando as cadeias α ou β (por exemplo, HbS, HbC, HbD, etc)¹. Já as hemoglobinopatias quantitativas são designadas por talassémias pois resultam da ausência ou diminuição da síntese de uma cadeia de globina (por exemplo, β -talassémia, α -talassémia, persistência hereditária de hemoglobina fetal – HPFH)².

Do ponto de vista clínico, as principais hemoglobinopatias incluem a doença falciforme e a β -talassemia, com maior incidência destas em África, na Região Mediterrânea, Sudeste Asiático e ainda o Médio Oriente e Extremo Oriente. Cerca de 7% da população mundial é portadora de um tipo de hemoglobinopatia³.

Estima-se que por ano nasçam entre 300000 e 500000 crianças com hemoglobinopatias de significado clínico, sendo que 70% destas crianças têm anemia falciforme. Cerca de 25% das hemoglobinopatias demonstram uma diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, em consequência de deformações nas suas membranas celulares⁴.

Em Portugal, existe uma baixa prevalência das hemoglobinopatias, sendo estas mais frequentes no Centro e Sul do país (**Figura 1.1**).



1.1.1 Beta-talassémia

As β -talassémias ou anemias mediterrâneas são um grupo de doenças sanguíneas, determinadas pela diminuição da síntese ou ausência da cadeia β -globina (*HBB*) em células eritróides humanas^{4,5,6}. Tal leva à acumulação excessiva da cadeia α -globina que afeta a membrana dos eritrócitos, que por sua vez provoca a morte prematura das células eritróides e uma quantidade reduzida de hemoglobina dos eritrócitos, traduzindo-se em anemia crónica^{4,5,6}.

A redução poderá ser total ou apenas parcial, resultando num fenótipo de talassémia 0 ou talassémia +, respetivamente³. Consoante a cadeia cuja síntese é afetada, as talassemias são denominadas por α -, β -, γ -, δ -, $\delta\beta$ -, ou $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemias⁴ (ver secção 1.2). Assim, a redução significativa de um tipo de cadeia de globina altera o equilíbrio normal entre as cadeias α e β , levando à acumulação intracelular de uma delas, traduzindo-se na morte precoce dos precursores eritróides antes de atingirem o estado de completa maturação⁴. Os genes *HBA* e *HBB* são os mais afetados por esta doença, sendo que as α -talassémias tipicamente têm como origem a presença de deleções que envolvam um ou os dois genes α -globínicos de cada cromossoma, enquanto a origem mais frequente das β -talassémias são as mutações pontuais³.

As manifestações clínicas podem variar desde microcitoses assintomáticas a anemias graves, que, por vezes são incompatíveis com a vida, podendo provocar a morte *in útero*⁴.

As β -talassémias podem ser classificadas em 3 grupos, sendo baseadas nos níveis espontâneos de Hb e na tolerância clínica, independentemente do genótipo subjacente: *minor* (traço β -talassémico), *intermédia* e *major* (Doença de *Cooley* ou anemia Mediterrânea)^{7,8}. O tratamento dos sintomas engloba transfusões sanguíneas e quelação do ferro ou transplante da medula óssea².

A talassémia *major* resulta de heterozigotia ou mutação homozigótica para o gene desta globina, sendo que os doentes apresentam anemia grave e necessitam de transfusões de glóbulos vermelhos regulares para sobreviver^{4,8}. Contudo, as transfusões constantes provocam sobrecarga de ferro, originando complicações, como é o caso da disfunção endócrina, cardiomiopatia, doença hepática, e, no pior cenário, morte prematura⁸. A sobrecarga de ferro pode aumentar as taxas de mortalidade, sendo que o desenvolvimento desta se deve a dois mecanismos principais: aumento da absorção de ferro (devido à eritropoiese ineficaz) e transfusões sanguíneas⁵.

A apresentação clínica ocorre entre os primeiros 6-24 meses de vida, período esse em que ocorre a substituição da síntese das cadeias γ pelas cadeias β , nos primeiros meses de vida⁴. As crianças afetadas possuem problemas de crescimento e adquirem uma palidez progressiva, podendo desenvolver problemas na alimentação, diarreia e picos de febre

recorrentes⁴. A regularidade da terapêutica das transfusões possui um papel crucial, uma vez que esta afeta a frequência e severidade das complicações destas β -talassemias⁴.

Os indivíduos com talassemia *major*, na ausência de transfusão, morrem nos primeiros cinco anos de vida, e mesmo com as transfusões, apenas entre 50% e 65% destes vivem para além dos 35 anos em países desenvolvidos^{8,4}.

A β -talassémia intermédia resulta de interações de diversos alelos distintos, em que os indivíduos apresentam uma anemia moderada, podendo apresentar diversas complicações, tais como hipertensão pulmonar, eventos trombóticos, disfunção endócrina, alterações esqueléticas^{4,8}. Tipicamente, estes indivíduos apresentam concentrações de Hemoglobina (Hb) de cerca de 7×10^{10} g/dL e não requerem transfusão regular⁸. Os sintomas podem variar, dependendo do grau de desequilíbrio entre a cadeia alfa e não alfa da globina e fatores ambientais⁸. Nos casos mais severos da doença, as crianças entre os 2 e os 6 anos sobrevivem sem transfusões regulares, contudo apresentam atrasos de crescimento⁴. Por outro lado, nos casos ligeiros, os doentes são tipicamente assintomáticos até à idade adulta, à exceção de anemia ligeira⁴. Estes têm risco de sobrecarga de ferro devido ao aumento da absorção intestinal do mesmo, devido à eritropoiese ineficiente^{4,7}.

Já a β -talassémia *minor* está frequentemente associada a portadores silenciosos assintomáticos, resultando apenas na herança de um gene mutante e geralmente sem sintomas^{4,5}. Estes indivíduos podem ou não apresentar hemogramas sugestivos de anemia microcítica e hipocrômica ligeira, contagem de eritrócitos elevada e concentrações de hemoglobina dispersas⁴. Quando ambos os pais são portadores, existe 25% de risco de homozigotia para a criança⁴. Tipicamente, esta condição apenas é descoberta acidentalmente em exames de rotina ou durante a pesquisa de outras patologias. Durante a gravidez, a presença de anemia moderada pode alertar para a presença de um possível portador⁴.

Alguns estudos demonstraram que é comum os pacientes com β -talassemia apresentarem perturbações metabólicas, contudo, até à data, ainda não existem biomarcadores baseados em metabolitos que possam auxiliar o diagnóstico da doença⁹. Em alguns países mediterrânicos, especialmente em algumas regiões da Ásia e África, as talassemias são um problema de saúde pública, obrigando à implementação de programas de prevenção e diagnóstico pré-natal⁴. Assim, é fundamental a investigação no sentido de serem desenvolvidos novos fármacos para tratar esta patologia, melhorando a qualidade de vida destes indivíduos⁸.

1.1.2 Doença das células falciformes

A doença das células falciformes engloba um grupo de patologias hematológicas hereditárias, caracterizadas por mutações no gene *HBB*, que codifica a subunidade β da hemoglobina humana, resultando numa variante estrutural da Hb_A normal, a hemoglobina S (HbS) ou falciforme^{10,11,12}.

Esta doença deve-se a uma mutação pontual na sequência codificante do gene *HBB* que causa a substituição do aminoácido valina (hidrofóbico) pelo ácido glutâmico (hidrofílico carregado negativamente) na sexta posição da cadeia β -globina (*HBB*) adulta^{11,13,14}. Tal leva à formação de tetrâmeros de hemoglobina falciforme (HbS) que polimerizam e agregam após a desoxigenação, distorcendo os eritrócitos para assumir uma forma de foice, particularmente sob baixa tensão de oxigênio, sendo esta condição conhecida como anemia falciforme^{14,1}. Estes eritrócitos podem bloquear os vasos sanguíneos, diminuindo assim a passagem de oxigênio nos órgãos e tecidos¹⁵. Assim, os eritrócitos estão suscetíveis à hemólise, causando anemia crônica, podendo traduzir-se em crises de dor, complicações respiratórias e lesões de órgãos, levando assim ao surgimento de anemia^{16,17,13}.

O fenótipo pode variar desde uma anemia leve com microcitose presente em heterozigóticos a anemia moderada e anemia grave¹⁸. Os pais que possuem genótipos heterozigóticos (HbAS) são portadores da doença, sendo que os seus descendentes têm 25% de probabilidade de terem um genótipo homozigótico falciforme (HbSS) ou um genótipo normal (HbAA)¹⁶.

Apesar da doença estar associada a uma menor esperança média de vida e uma qualidade de vida comprometida, existe um elevado grau de variação do fenótipo e os mecanismos para tal ainda não são compreendidos^{18,19,20}. Demonstrou-se ainda que a sua incidência está associada com a incidência da malária em regiões tropicais¹⁶.

Quanto ao diagnóstico da doença, este é baseado principalmente na carga elétrica das variantes, podendo recorrer-se aos testes de falciformação e de solubilidade da desoxi-HbS em tampão fosfato de alta molaridade de forma a confirmar-se a doença¹⁷. O principal tratamento centra-se nas transfusões de glóbulos vermelhos, diminuindo a percentagem de hemoglobina S (HbS) na circulação e suprimindo a hematopoiese²¹. Diversos estudos bioquímicos demonstraram que a presença de Hemoglobina fetal (HbF) retarda a polimerização e aumenta a solubilidade da HbS em condições desoxigenadas¹⁴. Assim, terapias que aumentem a HbF são promissoras, como é o caso da hidroxiureia, que tem demonstrado reduzir o número de crises vaso-oclusivas e hospitalizações²¹.

1.2 Hemoglobina humana

Como referido acima, mutações nos genes que codificam as subunidades da hemoglobina estão na origem das hemoglobinopatias, consideradas das doenças hereditárias monogénicas mais frequentes no mundo, estimando-se que cerca de 90% dos recém-nascidos em países de baixo e médio rendimento sejam afetados por estas^{22,23}.

A hemoglobina humana (Hb) (**Figura 1.2**) é a proteína responsável pelo transporte de gases, nomeadamente o oxigénio (O₂), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO)³. O processo de oxigenação ocorre devido a alterações na estrutura quaternária da Hb, sendo que esta pode apresentar-se na forma relaxada (R ou oxi-Hb) ou na forma tensa (T ou desoxi-Hb). Estas alterações estão associadas a alta e baixa afinidade para o oxigénio, respetivamente³.

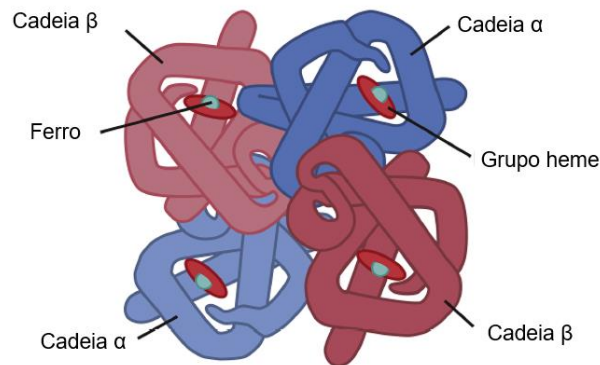


Figura 1.2 – Composição da hemoglobina humana. Adaptado de [24].

A Hb, de peso molecular de 64450 Dalton é constituída por dois dímeros de subunidades de globinas, uma alfa (α), e uma beta (β), e quatro grupos prostéticos heme²⁵. O grupo heme permite o transporte de oxigénio e é composto por um elemento central, o ferro II (Fe²⁺), e por protoporfirinas².

No ser humano, a síntese de hemoglobina é controlada por dois agrupamentos génicos (*clusters*): os do tipo α, situado no braço curto do cromossoma 16 (16p13.3) que contém 3 genes: *HBZ* (ζ), *HBA1* (α1) e *HBA2* (α2); e os do tipo β, situado no braço curto do cromossoma 11 (11p15.5) que contém 5 genes distintos: *HBE1* (ε), *HBG1* (γA), *HBG2* (γG), *HBD* (δ) e *HBB* (β)². Estes são ativados e silenciados ao longo do desenvolvimento humano⁷. Em ambos os clusters, os genes estão dispostos na mesma orientação transcricional e na mesma ordem que serão expressos aquando do desenvolvimento². A expressão diferencial dos genes da globina ao longo do desenvolvimento deve-se a um processo complexo que é, em parte desconhecido. Contudo, sabe-se que a região de

controlo do locus (LCR), juntamente com diversos fatores transcricionais (ativadores e repressores) interagem diretamente com os diversos genes no cluster, de forma sequencial, desde a região 5' do gene ϵ -globina no embrião até à região 3' dos genes δ e β -globina nos adultos². Esta região é composta por cinco locais hipersensíveis à ação da DNase I²⁶. Estes elementos permitem o acesso de fatores de transcrição aos elementos reguladores que medeiam a expressão de cada gene neste cluster, contribuindo para a manutenção da configuração de cromatina aberta (10 nm) do locus².

O LCR, que se encontra perto de promotores importantes do gene *HBB*, atua de forma dinâmica na transcrição génica das globinas e fica mais próximo do gene a ser expresso durante cada fase do desenvolvimento humano^{27,28}. Além disso, os fatores regulatórios positivos (ativadores) ou negativos (silenciadores) ligam-se à região promotora dos genes da globina de forma específica e competem entre si para interagir com a LCR, resultando em diferentes prevalências das Hb's em diferentes fases de desenvolvimento humano: embrionária, fetal e adulta^{29,27,30}. A sua expressão é regulada ativamente de forma a satisfazer as necessidades de oxigénio ao longo da ontogenia, ou seja, ao longo do desenvolvimento de um organismo²⁹.

A troca de hemoglobina no locus do gene *HBB* é complexa e envolve diversos fatores epigenéticos, existindo duas alterações sequenciais³¹. A primeira, durante o primeiro trimestre da gravidez (fase embrionária), em que a hemoglobina embrionária transita para a hemoglobina fetal. A segunda alteração ocorre por volta do nascimento, havendo a transição da hemoglobina fetal para a hemoglobina adulta^{29,14}.

Na fase embrionária, os eritrócitos diferenciam-se no saco vitelino, expressando os genes *HBZ* (locus α) e *HBE1* (locus β), formando assim a Hb embrionária, sendo composta pelas globinas ζ e ϵ ²⁹. Após esta etapa, quando é iniciada a hematopoiese fetal no fígado, o gene da γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) é expresso juntamente com o *HBA*, formando a HbF (codificada pelos genes *HBG1* e *HBG2*)³².

Na fase do nascimento, a hematopoiese passa a ocorrer na medula óssea, e, passam a ser expressos os genes da α -globina e β -globina, formando a Hb adulta (HbA – $\alpha_2\beta_2$); e o gene da δ -globina (*HBD*), formando assim a Hb adulta menor (HbA₂ – $\alpha_2\delta_2$)³². A HbF é predominante durante a fase fetal e nos primeiros meses após o nascimento, decrescendo de forma gradual até cerca de 1% no período adulto, sendo substituída por 97% de HbA e 2-3% de HbA₂^{2,33}. Na **Figura 1.3** é possível observar-se o Locus β -globina humano e a sua regulação ao longo do desenvolvimento²⁹.

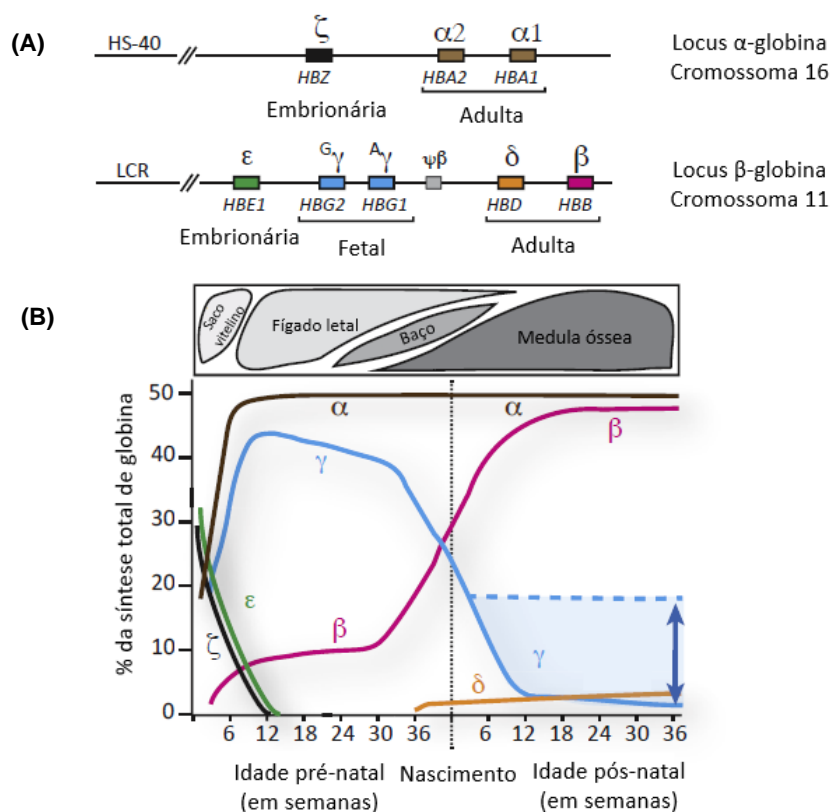


Figura 1.3 – Locus β -globina humano e a sua regulação ao longo do desenvolvimento. **(A)** Constituição génica dos loci α (cromossoma 16) e β (cromossoma 11). **(B)** Desenvolvimento humano (em semanas e pós-nascimento) e expressão das cadeias de globina (em % da síntese total), conforme o tecido/órgão humano. Adaptado de [29].

1.3 Regulação da expressão de hemoglobina

A alteração da expressão de HbF para HbA que ocorre ao longo da vida do ser humano designa-se por *HbF Switch*. Sabendo que a proteína *HBA* encontra-se mutada e disfuncional nos doentes com hemoglobinopatias e que a expressão de HbF permite compensar esta deficiência funcional, é fundamental uma melhor compreensão dos processos moleculares da regulação da globina de forma a desenvolverem-se terapêuticas que induzam a expressão de HbF.

A expressão da HbF é complexa, podendo ser influenciada por fatores genéticos, ambientais e por diversos mecanismos moleculares³⁴. Assim, a identificação dos mecanismos envolvidos no *HbF switch* permitem identificar alvos mais específicos e eficazes para a indução da expressão da hemoglobina fetal em doentes com patologias que afetem a quantidade de hemoglobina presente no organismo¹³.

Diversos fatores de transcrição, que se ligam a sequências na proximidade das regiões

promotoras das globinas, regulam o início e a taxa de transcrição de RNA mensageiro (mRNA), ativação ou silenciamento de cada gene que codifica as subunidades da globina²⁵. Estes fatores interagem entre si e com os promotores e potenciadores do gene *HBB*, tal como com os fatores epigenéticos, nomeadamente relacionados com a cromatina¹³. A regulação da expressão da hemoglobina acontece a nível transcricional, através de fatores de transcrição, tais como o *KLF1*, *B Cell Lymphoma 11A (BCL11A)* e o fator regulador hematopoiético *HBSL-1-MYB*, entre outros, e a nível pós-transcricional, através de microRNAs (miRNAs)³⁵. Pode ainda ser regulada através de mecanismos epigenéticos que possuem capacidade de alterar a expressão das Hemoglobinas S (HbS), através da metilação do DNA e a acetilação das histonas¹⁰ (**Figura 1.4**).

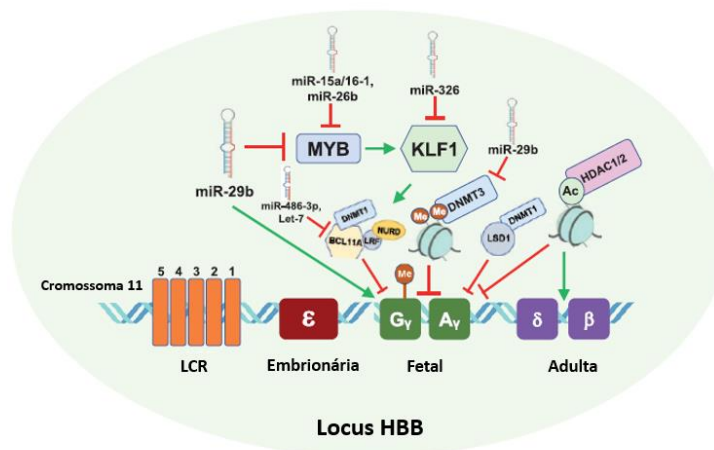


Figura 1.4 - Fatores de transcrição, miRNAs e mecanismos epigenéticos envolvidos na expressão do gene da globina fetal durante o *hemoglobin switching*. Adaptado de [10].

(DNMT: DNA metiltransferase; KLF1: *Krüppel-like factor 1*; BCL11A: *B-cell lymphoma 11A*; LRF: *Leukemia/lymphoma related factor*; NURD: *Nucleosome Remodeling and Deacetylase*; LSD1: Lisina demetilase 1; HDAC1/2: histona desacetilase 1 e 2; LCR: *Locus control region*. Me: grupo metil na histona metilada. Me: grupo metil no DNA metilado. Ac: grupo acetil na histona acetilada. miR: microRNA).

1.3.1 A nível transcricional

1.3.1.1 BCL11A

O gene *BCL11A (B-cell lymphoma/leucemia 11 A)*, localizado em 2p16.1, codifica uma proteína *zincfinger*, sendo esta um principal regulador do *switch* da hemoglobina e do silenciamento de HbF nos humanos³⁶.

O seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido, contudo identificou-se um complexo proteico que interage com o *BCL11A*, incluindo o *GATA-1*, *FOG-1*, *RUNX1*, *KLF1* e *SOX6*³⁷.

A sua expressão é regulada tanto ao nível transcricional, através de fatores de transcrição, como pós-transcricional, através de miRNAs³⁸.

Quanto à regulação através de fatores de transcrição, alguns são ativadores do *BCL11A*, nomeadamente o *KLF1* que ativa diretamente a expressão do gene *HBB* e inibe diretamente a HbF, regulando assim positivamente o *BCL11A*³⁸. O *KLF1* é o principal regulador do gene *BCL11A*, atuando de forma positiva³⁹.

Demonstrou-se num estudo que a inibição do *BCL11A* provocou o aumento dos níveis de HbF nas células K562 e nas células eritróides humanas, tanto no grupo controlo (sem a doença) como no grupo com β -talassemia³⁸.

Assim, pode-se afirmar que o *BCL11A* é um regulador transcricional do *Switch* da hemoglobina e silenciamento de HbF, sendo necessários mais estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sua regulação, de forma a identificar moléculas que possam ser alvos terapêuticos em futuras abordagens clínicas³⁶.

1.3.1.2 KLF1 ou EKLF

O gene *KLF1* ou fator eritróide Krüppel, localizado no locus 19p13.13, é um fator de transcrição essencial no desenvolvimento do eritrócito que regula a eritropoiese^{40,41,36,42}. Além disso, regula o switching da HbF para HbA⁴⁰.

Este pode ligar-se ao promotor do *HBB* atuando como um ativador deste gene, ou, por outro lado, pode ligar-se ao promotor do *BCL11A*, ativando a expressão deste, permitindo assim controlar os níveis de HbF, através da inibição dos genes *HBG1* e *HBG2*⁴⁰. O *KLF1* é assim considerado o principal regulador do gene *BCL11A*, atuando de forma positiva⁴³ (**Figura 1.5**).

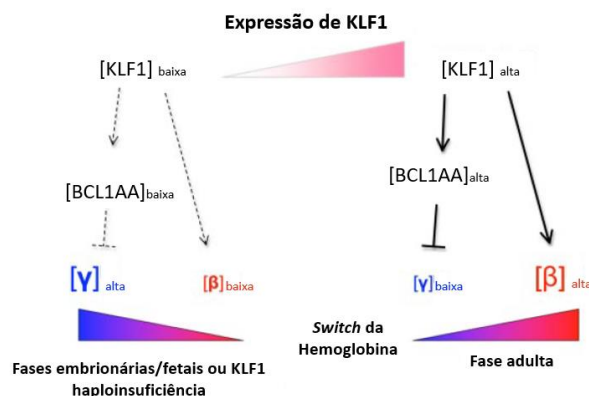


Figura 1.5 – *KLF1* regula o *Switch* da hemoglobina. Adaptado de [44].

Foi sugerido num estudo que a redução controlada de *KLF1* em células progenitoras eritróides adultas pode ativar a expressão de HbF em indivíduos com β -talassemia ou

doença das células falciformes, aliviando assim a sintomatologia destes⁴⁵.

1.3.1.3 HBSL-1-MYB (HMIP)

Entre os genes *HBSL1* e *MYB*, localizados no braço longo do cromossoma 6 (6q23) encontra-se uma região reguladora (HMIP), associada à indução da HbF em humanos^{36,46,47}. A função do *HMIP* no desenvolvimento do eritrócito é ainda indefinida, enquanto o gene *MYB* codifica um fator de transcrição essencial para a diferenciação eritroide e a hematopoiese³⁶.

O *MYB* é um fator de transcrição identificado em aves, sendo considerado um oncogene viral (*v-MYB*), ainda que o mecanismo deste não seja compreendido⁴⁸. Este possui um papel fundamental no controlo do equilíbrio/diferenciação da proliferação/diferenciação celular eritroide e tem a capacidade de regular os níveis de HbF através de um mecanismo ainda indefinido^{36,48}.

Um estudo verificou uma correlação negativa entre os níveis de *MYB* e HbF, tendo-se observado a expressão reduzida deste gene em células eritróides de indivíduos com níveis elevados de HbF⁴⁹. Os níveis mais baixos de *MYB* provocaram a diminuição dos eritrócitos, resultante do reduzido número de ciclos de proliferação, e a um elevado volume corpuscular médio (MCV)⁴⁹.

1.3.1.4 BGLT3

Recentemente descobriu-se que o *long-noncoding RNA* (lncRNA) *BGLT3* (*Beta Globin Locus Transcript 3*) influencia a regulação da HbF⁵⁰. Este encontra-se numa região intergénica no cromossoma 11, a jusante do *HBG1* e a montante do *HBBP1*^{38,40} e tem a capacidade de aumentar a produção de HbF⁵¹ e é expresso durante o desenvolvimento^{52,51}. O seu mecanismo de ação e interações são ainda desconhecidos⁵².

Os lncRNA são moléculas de RNA com mais de 200 nucleótidos, que podem atuar, entre outras funções, como reguladores da transcrição, em resposta a diversos estímulos⁵³.

1.3.2 A nível pós-transcricional

Os miRNAs regulam a expressão da hemoglobina a nível pós-transcricional. Estes são pequenos RNAs não codificantes com cerca de 20 nucleótidos, tendo como função regular negativamente a expressão de genes ao nível pós-transcricional em plantas e animais, através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (RNAm)^{54,55, 56}. Estas moléculas estão associadas a diversos processos biológicos (regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoiese, entre outros) em mamíferos⁵⁶. Assim, a desregulação

dos miRNAs pode afetar estes processos biológicos e originar doenças hematológicas, infecciosas e hepáticas, entre outras^{57,58,59}.

O genoma humano codifica cerca de 2600 miRNAs maduros, sendo que um único miRNA pode regular mais de um mRNA⁵⁷. Estima-se que os miRNAs controlam a expressão de cerca de 30% dos genes que codificam proteínas⁵⁵.

Além disso, recentemente demonstrou-se que os miRNAs contribuem para a regulação da expressão do gene globina e de HbF em células eritropoiéticas^{60,54,61}.

Estas moléculas têm ganho destaque na área das doenças hematológicas, dado que permitem o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico, e ainda, de novas soluções terapêuticas⁶¹.

Sabe-se ainda que os seguintes miRNAs regulam a expressão da HbF: *miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* e *miR-96-5p*.

1.3.2.1 miR-486-3p

O *miR-486-3p*, situado no cromossoma 8 é um inibidor direto da expressão do gene *BCL11A*, que por sua vez, inibe a expressão do gene *HBB*^{62,63,64}.

Este miRNA desempenha assim um papel essencial na regulação dos níveis de HbF na eritropoiese adulta, uma vez que inibe a transcrição do gene *BCL11A*, ativando assim a síntese de HbF^{54,65}.

1.3.2.2 miR-34a-5p

O *miR-34a-5p*, localizado no cromossoma 1 é um miRNA supressor de tumores regulado por p53 associado aos processos de apoptose, diferenciação e vias de transdução de sinal^{66,67}.

Num estudo recente realizado em indivíduos com β -talassemia demonstrou-se pela primeira vez uma associação entre os níveis elevados do *miR-34a-5p* e os níveis elevados de HbF nas células K562, resultantes da inibição do gene *BCL11A*⁶⁷. Além disso, verificou-se que a sobreexpressão deste miRNA inibiu o gene *STAT3*, sugerindo-se um mecanismo indireto da síntese de HbF pelo *miR-34* através do silenciamento deste gene⁶⁷. O *STAT3* é um gene que inibe a transcrição da HbF⁶⁸. Contudo, são necessários estudos para a determinação do potencial do *miR-34a* como um indutor de HbF⁶⁷.

1.3.2.3 miR-210-5p

O *miR-210-5p*, localizado no cromossoma 11p15.5, regula a expressão da HbF nos reticulócitos e nos eritrócitos através da regulação pós-transcricional da expressão do gene *BCL11A*, estando associado a níveis elevados de HbF na linha celular K562^{69,70,71,72}.

Adicionalmente, este miRNA está associado à hipoxia, podendo ser um alvo para a síntese de HbF, para além de terem-se verificado níveis elevados deste durante a persistência hereditária de HbF^{54,73}.

1.3.2.4 miR-32-5p

O *miR-32-5p*, que se encontra no cromossoma 9, está associado à regulação e desenvolvimento de diversos tipos de carcinomas^{65,74}. Apresenta como target o gene *BCL11A*, contudo as evidências até à data apenas foram reportadas através do *Next-Generation Sequencing* (NGS)⁷⁵. São necessários mais estudos sobre este miRNA, de forma a descobrir-se o seu mecanismo.

1.3.2.5 miR-96-5p

O *miR-96-5p*, localizado no cromossoma 7, inibe diretamente a expressão da HbF nos reticulócitos através da eritropoiese humana^{76,70,63,64}. Para além disso, um estudo mostrou que o *miR-96* tem uma correlação positiva com a idade, sendo expresso de forma constante na infância, seguido da sua degradação na idade adulta e da diminuição com o envelhecimento⁶⁴.

1.4 Terapêuticas

Atualmente, o transplante de células estaminais hematopoiéticas é a única cura definitiva para indivíduos com β -hemoglobinopatias (doença das células falciformes e β -talassémia)^{8,77}. Esta consiste na substituição das células hematopoiéticas do doente, provocando a eliminação da eritropoiese ineficaz, o que por sua vez, possibilita a produção de eritrócitos não patológicos⁷⁸. Contudo, apresenta algumas limitações, nomeadamente os riscos de segurança associados, a baixa compatibilidade e ainda o seu custo elevado, tornando difícil a aplicação deste tipo de tratamento^{8,79}.

Já a terapia génica, que utiliza células estaminais hematopoiéticas do doente geneticamente modificadas, representa uma potencial alternativa no tratamento das β -hemoglobinopatias, contornando a necessidade de um dador⁸⁰.

Além disso, as transfusões sanguíneas são outra forma de tratamento destas patologias, sendo que esta melhora a capacidade do transporte de oxigénio e o fluxo e sangue na microcirculação através da diminuição da percentagem da HbS e do nível de hematócrito, prevenindo assim a vaso oclusão^{13,81,12}. Esta terapêutica a longo prazo pode causar sobrecarga de ferro nos pacientes devido à degradação gradual do sangue transfundido, sendo necessário a realização de quelação de ferro, para além do risco de infeções por

agentes virais e bacterianos^{13,11,82,18}.

Por último, outra terapêutica deste tipo de patologias passa pela indução farmacológica da HbF⁸ (**Figura 1.6**).

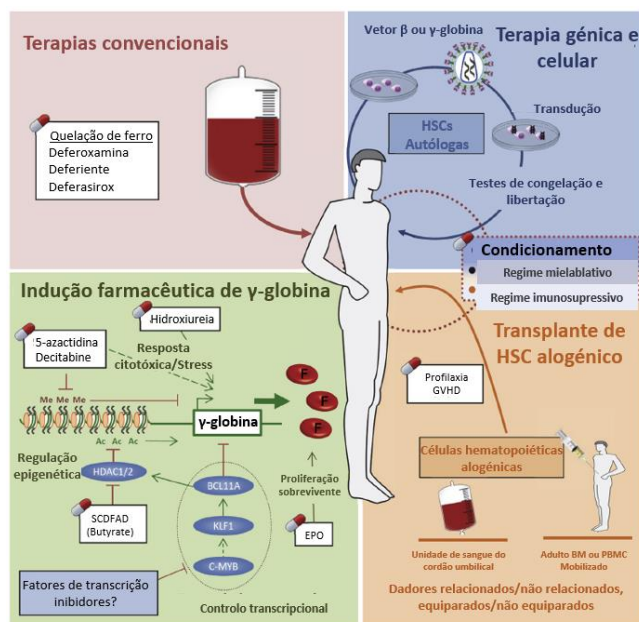


Figura 1.6 - Terapêuticas para o tratamento das β -hemoglobinopatias. Adaptado de [8].

Acredita-se que a polimerização da HbS contribua para a patogênese molecular associada às manifestações da doença das células falciformes⁸³.

O aumento da expressão de HbF provoca a polimerização tardia da HbS, diminuindo assim a hemólise e a inflamação crônica e aumenta a disponibilidade de óxido nítrico⁸⁴. Assim, a vasoconstrição e a adesão ao endotélio diminuem, aliviando alguns dos sintomas da doença^{84,83}.

1.4.1 Reativação da hemoglobina fetal

A primeira visão sobre o papel da HbF nas manifestações clínicas da doença das células falciformes foi feita em 1948 pela pediatra *Janet Watson*, tendo sido observado que os recém-nascidos com a doença das células falciformes raramente manifestavam a doença no primeiro ano de vida⁸⁵. Prevvia-se que os eritrócitos em recém-nascidos com a doença das células falciformes estivessem protegidos contra a doença, comparativamente com bebês mais velhos ou adultos com a doença¹⁴. Os seus eritrócitos necessitam de mais tempo para adquirirem a forma falciforme, traduzindo-se em poucos sintomas. Colocou-se a hipótese de que esta proteção durante o primeiro ano de vida de crianças com a doença se devia à elevada concentração de hemoglobina fetal, permitindo um estado assintomático até a sua quantidade decair fisiologicamente⁸⁶.

Mais tarde, esta hipótese foi apoiada por um estudo no qual se verificaram relatos de

indivíduos com a doença das células falciformes assintomáticos que herdaram uma persistência hereditária do fenótipo da hemoglobina fetal (HPFH). A HPFH é caracterizada por níveis elevados de HbF na idade adulta, tendo como causa deleções no gene *HBB* ou mutações pontuais nos genes *HBG1* e *HBG2* (11p15.5)⁸⁷. Estas mutações estão associadas à remoção de elementos silenciadores entre os genes γ -globina e δ -globina, ou à remoção de elementos promotores na proximidade dos genes *HBG1* e *HBG2*⁸⁷.

Esta patologia foi relatada em 1963 em 79 indivíduos de 15 famílias afro-americanas^{88,89}. Procedeu-se à caracterização dos defeitos moleculares, permitindo o fornecimento de informações sobre a estrutura e função de elementos regulamentares envolvidos no controlo da expressão dos genes *HBB*, *HBG1* e *HBG2*, bem como na comutação da hemoglobina⁸⁸. Percebe-se assim que a HPFH possibilita a diminuição da gravidade da doença das células falciformes e da β -talassemia¹¹.

Assim, tem-se sugerido que o aumento da síntese da HbF através da reativação dos genes *HBG1* e *HBG2* possa ser um potencial tratamento para estas doenças, sendo esperado que possa ser restaurado o equilíbrio da cadeia globina em indivíduos com β -talassemia e ocorra também a inibição da polimerização da HbS em pacientes com a doença das células falciformes^{11,14}. O efeito benéfico da HbF inclui a inibição da polimerização da HbS e a diluição da concentração de HbS nos eritrócitos³¹.

Baixas percentagens de HbF estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de complicações vaso-oclusivas, danos nos órgãos e morte precoce. Assim a indução farmacológica da HbF é uma terapêutica promissora nas β -hemoglobinopatias, uma vez que o seu aumento perante a doença das células falciformes permite a diminuição da HbS na circulação tendo um efeito anti-falciforme e diminui assim as consequências da doença⁸⁹.

1.4.1.1 Hidroxiureia

A Hidroxiureia (HU), também designada por Hidroxicarbamida é um agente citotóxico antimetabólico, inibidor da fase S (replicação do DNA) do ciclo celular e anti-neoplásico^{90,91,92}. Este composto é utilizado no tratamento da doença das células falciformes, uma vez que diminui a frequência de eventos vaso oclusivos e a necessidade de transfusões, tendo sido demonstrada a sua eficácia^{92,1,14}.

Atualmente, a HU é o fármaco mais fiável para a reativação da produção de HbF, sendo o único fármaco indutor de HbF aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (em 1998) e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (em 2007) em crianças com mais de 2 anos, adolescentes e adultos com a doença das células falciformes^{31,14,93}.

Contudo, com a administração da HU podem surgir diversos efeitos celulares e vasculares¹, como se pode visualizar na **Figura 1.7**.

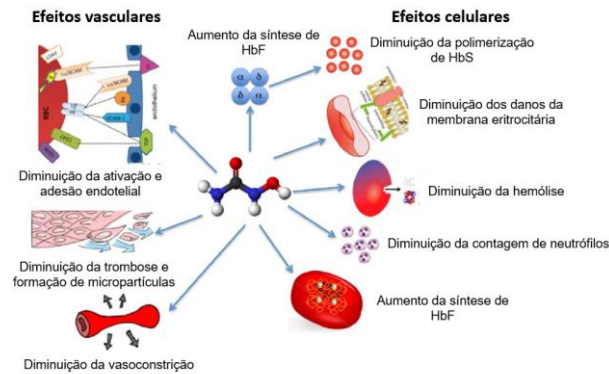


Figura 1.7 – Múltiplos efeitos da administração de Hidroxiureia em indivíduos com anemia falciforme. Adaptado de [1].

Na maioria dos pacientes sujeitos ao tratamento com este fármaco, a HU apresenta um perfil de toxicidade aceitável a curto prazo, tornando-se um dos principais agentes terapêuticos para o tratamento da doença das células falciformes⁹¹.

Contudo, existem diversas limitações, nomeadamente o seu mecanismo de atuação através do qual a HU induz a síntese de HbF ainda não é totalmente compreendido, a sua utilização limitada em países em desenvolvimento devido à escassez de recursos financeiros e hospitalares, como é o caso de África^{94,93}. Adicionalmente, em alguns pacientes a resposta ao fármaco diminui ao longo do tempo apresentam fracos resultados^{70,14,15}. Apresenta ainda efeitos adversos a curto prazo, tais como leucopenia, trombocitopenia, potencial toxicidade reprodutiva e mielosupressão^{95,1,96}. A longo prazo pode ter efeitos na fertilidade e na gravidez uma vez que se trata de um inibidor de fase S que inibe a replicação celular⁹⁷. Relativamente à fertilidade, a HU diminui a espermatogénese, causando anormalidades na contagem de espermatozoides, mobilidade e morfologia¹.

Sugere-se que a espermatogénese e a qualidade do esperma possam ser invertidas após a interrupção da administração da HU⁹³.

Nas gestantes, o seu uso não é aconselhado devido ao potencial teratogénico, tendo-se reportado taxas significativas de retardamento do crescimento intrauterino, morte fetal e prematuridade¹.

Apesar das inúmeras limitações mencionadas a HU é atualmente o fármaco com a melhor relação risco-benefício para o tratamento da doença das células falciformes. Contudo, são necessários novos agentes terapêuticos indutores de HbF com menores efeitos adversos⁹⁶.

1.5 Compostos naturais indutores de HbF

Dois terços da população mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, dependem principalmente de terapêuticas tradicionais como a sua principal forma de cuidados de

saúde, sendo fundamental a descoberta de novos compostos naturais indutores de HbF⁹⁸.

Diversos agentes naturais como Angelicina, Rapamicina, Bergamota, *Fructus trichosanthis*, *Romidepsin*, *Wheat grass*, *Curcuma comosa*, *Astragalus*, *Apicidin*, *Curcuminoid*, Piceatannol e Resveratrol foram reportados ao nível da indução de HbF em pacientes com hemoglobinopatias, contribuindo assim para o tratamento das hemoglobinopatias⁵.

Contudo, são necessárias mais informações sobre a biodisponibilidades destes compostos e os seus efeitos no ser humano⁵.

1.5.1 *Carica papaya L.*

Carica papaya L. pertencente à família Caricaceae, também conhecida como papaia, destaca-se pelas suas propriedades fitoquímicas, biológicas, nutricionais e medicinais, sendo originária do sul do México e da Costa Rica^{99,100}. Das propriedades medicinais sobressaem as atividades anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antivirais, antifúngicas, antitumorais, antibacteriano, diuréticas e anti-falciformação^{101,102,103}. Assim, esta planta tem o potencial de ser utilizada no tratamento de doenças.

Esta árvore, de caule liso e folhas compridas, pode atingir até 20 metros de altura, crescendo principalmente nos trópicos^{104,105}. Diferentes partes da planta (fruto, casca, raiz, sementes, polpa e folha) (**Figura 1.8**) têm inúmeras utilizações terapêuticas, nomeadamente no tratamento da doença das células falciformes^{106,107,16}. Para além disso, esta planta é abundante nutricionalmente em vitaminas A, B e C, bem como ferro e cálcio¹⁰⁶.



Figura 1.8 - *Carica papaya L.* (árvore) e *Carica papaya L.* (fruto). Retirado de [108,107].

1.5.1.1 Folhas de *C. papaya L.*

À semelhança da planta papaia apresentar propriedades medicinais, como já referidas, as folhas desta planta também apresentam estas mesmas propriedades. Um dos compostos presentes nestas folhas são os flavonoides, como por exemplo a quercetina¹⁰². Adicionalmente, as folhas também podem ser utilizadas como um agente nutricional, devido à sua composição de hidratos de carbono, vitaminas, lípidos e proteínas¹⁰⁶.

Estudos recentes afirmam que o extrato da planta reduziu a hemólise e protegeu a

integridade da membrana dos eritrócitos em condições de stress osmótico, impedindo assim que os eritrócitos adquirissem a forma de foice^{16,109}. Outro estudo demonstrou que o extrato de folha de papaia reduziu a polimerização da hemoglobina e a fragilidade osmótica dos eritrócitos em humanos¹⁰⁶.

Salienta-se que a investigação em fitoterapia se tornou uma tendência atual na gestão de doenças tropicais e desordens genéticas, de forma a encontrarem-se fármacos económicos e disponíveis¹⁰⁹.

Estes resultados tornam assim a *Carica papaya* um potencial candidato para a terapia da doença das células falciformes¹⁶.

1.5.2 Quercetina

A quercetina pertence à classe dos flavonoides, sendo tipicamente encontrada em diversas plantas, incluindo a *Carica papaya*¹¹⁰. Este composto apresenta propriedades antioxidantes, antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias e anticarcinogénicas, sendo o flavenoide mais estudado até à data¹¹¹. Este composto sob o formato de pó apresenta uma cor amarelada **(Figura 1.9)**.



Figura 1.9 - Quercetina em pó. Retirado de [112].

Este composto encontra-se em vegetais (cebola, alho e gengibre), maçãs, citrinos, chá e vinho^{113,114}. Adicionalmente, a quercetina pode induzir a HbF, diminuindo o stress oxidativo celular¹¹⁵. Estudos recentes demonstram que esta teve a capacidade de reduzir a citotoxicidade causada pela HU em células endoteliais imortalizadas de rato¹¹⁶.

Apesar das propriedades benéficas da quercetina e de ser considerada como uma substância segura, apresenta uma baixa biodisponibilidade e é insolúvel em água, sendo um nutriente mal absorvido, limitando assim a utilização deste composto em ensaios clínicos^{117,118,119}. Adicionalmente, ainda não sabe se o seu uso a longo prazo ou maiores doses são seguras¹¹⁹.

Desta forma, são necessários mais estudos de forma a avaliar-se os efeitos secundários da quercetina para que este composto possa ser utilizado para fins terapêuticos.

2.1 Questão de investigação

“Poderá o extrato de papaia atuar como potencial indutor da HbF e ser um futuro tratamento das hemoglobinopatias?”

2.2 Objetivos

2.2.1 Geral

Avaliar os efeitos dos extratos de *Carica papaya* na regulação transcricional e pós-transcricional da hemoglobina fetal em linhas celulares humanas

2.2.2 Específicos

- 1) Avaliar a proliferação e a viabilidade celular da linhagem KL562 exposta às diferentes concentrações do extrato metanólico de folhas de *C. papaya L.* e da quercetina (um dos principais componentes das folhas de *C. papaya L.*);
- 2) Avaliar os efeitos da HU na expressão génica das globinas, de reguladores da HbF e de miRNAs na linha celular K562, através de PCR quantitativo em tempo real;
- 3) Avaliar os efeitos das diferentes concentrações do extrato metanólico de folhas de *C. papaya L.* e de quercetina na expressão génica das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), de genes reguladores da HbF (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*) e de miRNAs (*miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* e *miR-96-5p*) na linha celular K562, através de PCR quantitativo em tempo real.

Capítulo 3 - Materiais e métodos

3.1. Preparação do extrato metanólico de *Carica papaya*

As folhas de *C. papaya L.* foram colhidas num quintal doméstico em Faro, Algarve, Portugal, cedidas pelo Sr. Fernando Nunes. Seguidamente, estas foram deixadas secar à temperatura ambiente (T_a) no laboratório sem exposição solar direta e trituradas manualmente até estarem sob a forma de pó.

Extraíram-se cerca de 30 g (27,69 g) de folhas secas de *C. papaya L.* (**Figura 3.1 – A**) com metanol (554 mL) à temperatura ambiente (T_a) durante 48h, com recurso a uma placa de agitação e um magneto. Seguidamente filtrou-se o extrato metanólico de folhas de *C. papaya L.* (EMFCP), através de um funil de *Buchner*, tendo sido posteriormente colocado num evaporador rotativo (Rotavapor R-200 BUCHI, Zurique, Suíça) (**Figura 3.1 – B e C**). Nesta etapa utilizou-se uma temperatura cerca de 40°C sob baixa pressão (cerca de 220 mb) até que a variação de massa do balão de fundo redondo fosse inferior a 100 mg, tendo-se obtido uma massa de 7,84 g que foi dissolvida num volume final de 196 mL de PBS. O EMFCP à concentração final de 40 mg/mL foi armazenado a 4°C.

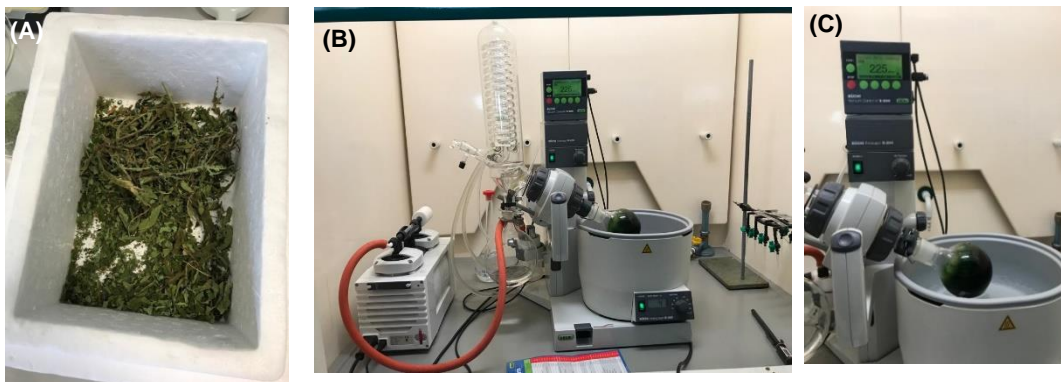


Figura 3.1 – (A) Folhas de *C. papaya L.* **(B e C)** Processo de extração num evaporador rotativo.

(Fotos tiradas durante a realização do projeto).

3.2. Linha celular K562

No presente estudo foi utilizada como amostra a linha celular K562 (**Figura 3.2**), adquirida a partir da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, UK).

A linha K562 trata-se de uma linha de células imortalizadas e adaptadas à cultura *in vitro*, procedentes do fluido pleural de uma paciente de 53 anos de idade com leucemia mieloide crónica (LMC) em crise blástica, tendo sido descobertas em 1975¹²⁰. Estas são facilmente cultivadas e dividem-se de forma ilimitada e uniforme como células únicas indiferenciadas

blástica¹²⁰. Assim, cada célula desenvolve-se individualmente, crescendo em suspensão. Apresentam forma arredondada, com um diâmetro cerca de 20 μm , citoplasma basofílico sem grânulos e possuem dois ou mais nucléolos proeminentes¹²⁰.

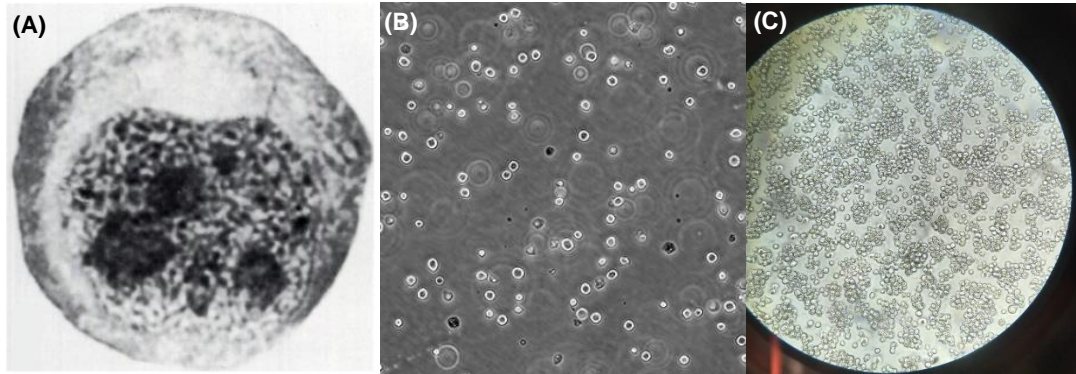


Figura 3.2 – (A) Morfologia da célula K562 na coloração de Giemsa. Retirado de [120]. (B) Células K562 em suspensão com baixa densidade. Retirado de [121]. (C) Células K562 em suspensão com alta densidade. (Foto tirada durante a realização do projeto).

A linha celular K562 foi proposta como um modelo *in vitro* para o estudo dos mecanismos moleculares que regulam a expressão da globina embrionária e fetal humana, para além de avaliar o potencial terapêutico de novos agentes indutores da diferenciação¹²².

Adicionalmente, esta linha é de fácil acesso, com uma baixa manutenção laboratorial e um tempo de subcultura de aproximadamente 3 dias¹²⁰.

Esta torna-se assim adequada para a identificação de indutores de HbF.

3.3.1 Cultura das células K562 e reagentes

Procedeu-se à descongelação das células da linha K562 de acordo com o protocolo descrito em anexo (**Anexo 1**) numa câmara de fluxo laminar (**Figura 3.3 - A**) sob condições estéreis. Seguidamente realizou-se a passagem das células em suspensão através de um *T-flask* (**Figura 3.3 - B**), como descrito em anexo (**Anexo 2**).

Utilizou-se o meio de cultura RPMI 1640 (Catalog Number: L0495-500, Biowest) contendo L-Glutamina e 25mM HEPES e suplementou-se o mesmo com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e com 500 μL de antibiótico (200 mM L-Glutamina, 10000 U penicilina e 10 mg/mL de streptomomicina) (Product Number: G6784, Sigma-Aldrich). Nas passagens celulares utilizou-se o tampão fosfato salino (PBS) (Catalog Number: 51226, Lonza) para as lavagens e o *pellet* celular foi resuspendido em novo meio.

Efetou-se a cultura celular até a densidade estabilizar em 1×10^5 células/mL, sendo que a cada 3 dias realizaram-se subculturas mantidas numa atmosfera humidificada de 5% (v/v) de CO_2 a 37°C (**Anexo 2**). Previamente a cada subcultura observou-se a confluência,

morfologia, proliferação e a viabilidade das células num microscópio invertido com contraste de fase.

Nas experiências com os diferentes tratamentos recorreu-se a células K562 entre as passagens 13 e 18.

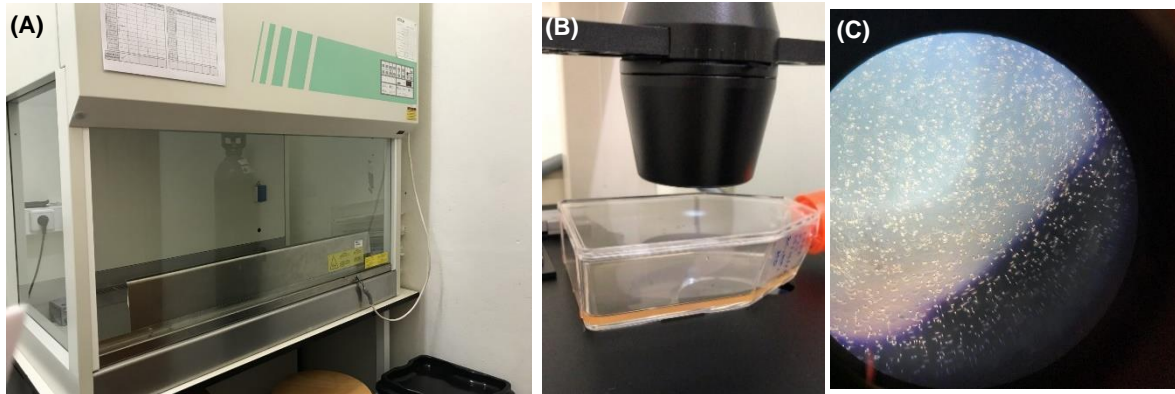


Figura 3.3 – (A) Câmara de fluxo laminar. (B) *T-flask*. (C) Visualização das células.

(Fotos tiradas durante a realização do projeto).

3.3.2 Incubação de células K562 com EMFCP e Quercetina

A partir da solução *stock* prepararam-se quatro soluções com as concentrações de 0,5; 50; 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ de EMFCP para a exposição celular. A solução de EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ foi obtida através da diluição da concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

De forma a avaliar possíveis contaminações do EMFCP no meio de cultura, utilizou-se uma placa de seis poços (3 mL/poço) e expôs-se as células K562 a 500 $\mu\text{g/mL}$ deste composto. Passados 5 dias, visualizou-se a placa ao microscópio ótico, averiguando se existiam indícios de contaminações, tendo-se ainda analisado a proliferação e viabilidade celular.

Relativamente à Quercetina, esta foi comprada em pó, numa embalagem de 10 g (CAS Number: 117-39-5, Sigma-Aldrich). Procedeu-se à sua dissolução em 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), uma vez que a quercetina apresenta maior solubilidade com o DMSO comparativamente com o PBS, obtendo-se uma solução *stock* de 1,3 M¹²³.

Prepararam-se as soluções de trabalho, através da diluição da solução *stock* a 1,3 M em meio RPMI (1:1000). As soluções finais de Quercetina utilizadas possuíam as concentrações de 0,2 e 20 μM .

Após a exposição das células à maior concentração de EMFCP (500 $\mu\text{g/mL}$), procedeu-se à exposição às restantes concentrações do EMFCP (0,5; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e à Quercetina (0,2 e 20 μM). Além disso, as células foram ainda expostas a um controlo positivo, constituído por 25 $\mu\text{g/mL}$ de Hidroxiureia (HU) (HYDREA®, USP) dado que este composto induz a HbF e ainda, a dois controlos negativos, sendo um deles constituído por meio de cultura e o outro

constituído por meio de cultura suplementado com DMSO.

Plaquearam-se as células, tendo-se realizado três replicados biológicos por cada tratamento **(Figura 3.4)**. As células foram incubadas num ambiente húmido a 37°C com 5% (v/v) de CO₂ durante 24 horas (tempo de exposição do tratamento), tendo sido posteriormente recolhidas de modo a avaliar-se a proliferação, a viabilidade celular e analisar-se os resultados transcricionais.

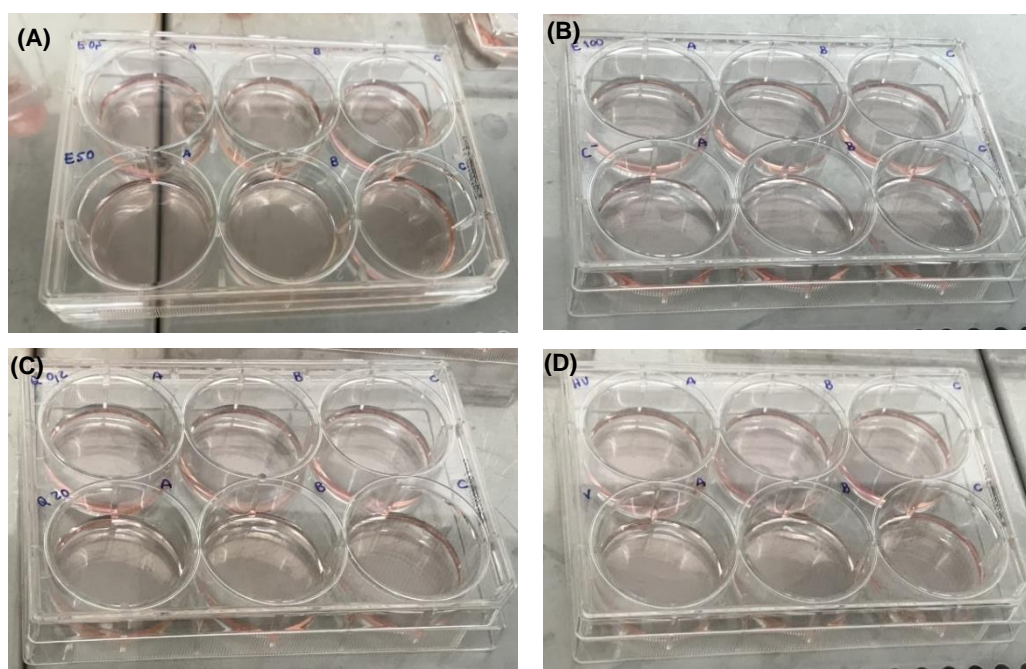


Figura 3.4 – Tratamentos em placas de 6 poços. (A) Exposição celular ao tratamento com EMFCP a 0,5 e 50 µg/mL. (B) Exposição celular ao tratamento com EMFCP a 100 µg/mL e Controlo negativo. (C) Exposição celular ao tratamento com Quercetina a 0,2 e 20 µM. (D) Exposição celular ao tratamento com a HU e o Veículo.

(Fotos tiradas durante a realização do projeto).

3.4 Análise da viabilidade celular e proliferação

De forma a avaliar os efeitos citotóxicos após as 24h de exposição, efetuou-se o ensaio de exclusão do azul de tripano segundo o protocolo em anexo **(Anexo 3)**. Neste é determinado o número de células viáveis presentes numa suspensão celular, recorrendo à câmara de *Newbauer* ou hemacitómetro **(Figura 3.5 - A)**. Foi adicionada uma solução de suspensão celular com 0,4% de azul de tripano (CAS Number: 72-57-1, Sigma-Aldrich).

Após este ensaio, é possível observar que as células vivas possuem uma membrana celular intacta e impermeável a corantes, enquanto as células mortas são permeáveis ao corante, apresentando a coloração azul. Deste modo, aquando da visualização ao microscópio,

observa-se que as células vivas são translúcidas e apresentam uma forma definida, enquanto que as não viáveis têm coloração azul no citoplasma (**Figura 3.5 – B**).

Após a visualização das células na câmara de *Newbauer* num microscópio invertido com contraste de fase (ampliação de 20x), procedeu-se à contagem do número de células, e ao cálculo da taxa de proliferação e à percentagem da viabilidade celular através das fórmulas descritas no protocolo presente no **Anexo 3**, como já referido.



Figura 3.5 – (A) Câmara de *Newbauer* **(B)** Visualização das células numa câmara de *Newbauer*.

(Fotos tiradas durante a realização do projeto).

3.5 Extração, quantificação e conversão do RNA total a DNA Complementar (cDNA)

Extraíu-se o RNA total do pellet das células K562 obtido após o tratamento com as soluções indicadas e respetivo armazenamento a -80°C . Para este procedimento, utilizou-se o kit *miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen*), cujo protocolo está descrito no **Anexo 4**. Esta etapa tem como objetivo a extração, isolamento e purificação de RNA presente numa dada cultura celular. A extração pode definir-se em quatro etapas fundamentais, 1) rutura da membrana celular, 2) desnaturação de proteínas nucleases, 3) inativação das ribonucleases (RNases) endógenas e a remoção dos contaminantes (DNA e proteínas). No final da extração do RNA, ressuspendeu-se o mesmo em 40 μL de *RNase-free water*.

Seguidamente, realizou-se a quantificação do RNA extraído com recurso ao equipamento NanoDrop-ONE (Thermo Scientific). Através deste foi possível quantificar o RNA e avaliar a sua pureza, tendo-se colocado um volume de 1 μL de amostra. Através das medições da absorvância a 260 nm (A_{260}) determinou-se a concentração de RNA presente na amostra. Além disso, foram também avaliadas as contaminações através da absorvância a 280 nm (A_{280}) e a 230 nm (A_{230}), dado que estes são indicadores de contaminações pelo ião fenolato, tiocianatos e outros compostos orgânicos no caso da A_{230} ¹²⁴ ou ainda por proteínas, carboidratos ou polifenóis no caso da A_{280} ¹²⁵. Para a avaliação da pureza do RNA, esta foi determinada através da razão A_{260}/A_{280} . Idealmente deverá obter-se um valor próximo de 2 de RNA, dado que valores inferiores e superiores estão associados a possíveis

contaminações por proteínas, fenóis ou surfactantes¹²⁶. No **Apêndice I** encontra-se descrita a concentração de RNA (ng/μL) presente em cada amostra.

Seguidamente, utilizaram-se 2,0 μg de RNA total para ser convertido em cDNA. Para esta reação utilizou-se o kit “*SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System*” (Catalog Number: 18091050, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.) juntamente com *primers* de hexâmeros aleatórios, num volume final de 20 μL, seguindo as instruções do fabricante. A preparação desta reação e os volumes dos reagentes utilizados encontram-se descritos no **Apêndice II**.

Por fim, utilizou-se o termociclador Bio-Rad iCycler®, com as seguintes condições: 25°C durante 10 minutos (hibridação dos primers ou *annealing*), 37°C durante 30 minutos (síntese de cDNA a partir do RNA total pela RT), 95°C durante 5 minutos e paragem a 4°C.

Para a síntese de cDNA do estudo dos miRNAs utilizou-se o miRCURY LNA RT Kit (Catalog Number: 339340, Qiagen) com os reagentes *5x Reaction Buffer*, *Nuclease free water*, *Enzyme mix* e *UniSP6 Spike-in*, estando a preparação desta reação descrita no **Anexo 5**.

3.6 Amplificação de cDNA por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizado no sistema de Detecção de PCR em tempo real CFX Connect™ (Bio-rad), tendo-se recorrido ao kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) e aos primers concretos para cada gene mencionados na **Tabela 3.1**. Realizaram-se triplicados para cada replicado biológico. Os primers para o estudo da expressão génica foram elaborados pela equipa do H&TRC.

O procedimento e o fundamento desta técnica encontram-se descritos no **Apêndice III**.

Tabela 3.1 – Sequência de primers utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (estudo de genes).

Função	Gene	Sequência do primer (5' → 3')		Tamanho (pb)	Temperatura <i>melting</i> (°C)
<i>Housekeeping</i>	GAPDH	<i>Forward</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCGTA	295	54,7
		<i>Reverse</i>	GCAGAGATGATGACCCTTTTG		53,7
Globinas	HBA	<i>Forward</i>	TCCCACCACCAAGACCTAC	63	64,0
		<i>Reverse</i>	CCTTAACCTGGGCAGAGCC		62,0
	HBB	<i>Forward</i>	GCACGTGGATCCTGAGAACT	117	62,0
		<i>Reverse</i>	GCCACCACTTTCTGATAGGC		62,0
	HBG1	<i>Forward</i>	TGGATGATCTCAAGGGCAC	258	58,0
		<i>Reverse</i>	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTT GA		47,2
	HBG2	<i>Forward</i>	GATGCCATAAAGCACCTGGAT	274	49,7

			G		
		Reverse	TTGCAGAATAAAGCCTATCCTT		47,2
			GA		
Sinalização	MYB	Forward	CCCAAGTCTGGAAAGCGTCA	130	57,5
		Reverse	TTCGATTCGGGAGATAATTGGC		55,0
	KLF1	Forward	GGTGTGATAGCCGAGAC	164	52,2
		Reverse	GCGTATGGCTTCTCCC		52,8
	BCL11A	Forward	ATTCGGCGTAGTACCC	191	51,0
		Reverse	CAACGGCTTCTTGGAG		50,4
	BGLT3	Forward	ACAAACCAGCATCCTGAACC	148	55,6
		Reverse	GTCTCATGTGCTGCACGTCT		57,7

Na **Tabela 3.2** estão descritos os primers utilizados para o estudo dos miRNAs, sendo estes comercializados pela bioNova científica s.l.

Tabela 3.2 – Sequência de primers utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (estudo de miRNAs).

Primer	Referência
hsa-miR-486-3p	YP00204107
hsa-miR-34a-5p	YP00204486
hsa-miR-210-5p	YP02104321
hsa-miR-32-5p	YP00204792
hsa-miR-96-5p	YP00204417
hsa-miR-423-3p	YP00204488
UniSp6	YP00203954

No presente estudo comparou-se a expressão génica entre as amostras. Para tal, recolheram-se os dados obtidos no *software CFX Manager* (C_{qs}) e procedeu-se à análise destes através da quantificação relativa de RNA por RT-qPCR. Através desta é possível determinar a diferença relativa entre a expressão do gene de referência e a expressão do gene em estudo. Utilizou-se o gene *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) para normalização dos dados. Assim, fez-se a normalização dos valores de C_q do gene de interesse com os valores de C_q do gene *GAPDH*. Para o cálculo da diferença relativa entre as expressões génicas utilizaram-se as seguintes expressões (através do método $\Delta\Delta C_q$):

$$\Delta C_{q(\text{amostra})} = C_{q(\text{gene de interesse})} - C_{q(\text{GAPDH})}$$

$$\Delta C_{q(\text{referência})} = C_{q(\text{calibrador})} - C_{q(\text{GAPDH})} \quad * \quad \Delta\Delta C_q = \Delta C_{q(\text{amostra})} - \Delta C_{q(\text{referência})}$$

$$\text{Quantificação relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

*No tratamento em ambas as concentrações de Quercetina utilizou-se a solução veículo (meio de cultura + DMSO) como calibrador e nos restantes tratamentos utilizou-se o controlo negativo (células não tratadas) como calibrador.

Como já referido, cada reação foi executada em triplicados de modo a aumentar o poder estatístico do valor de C_q obtido em cada amostra. Posteriormente, analisou-se a média e o desvio padrão dos valores obtidos dos três replicados por cada réplica biológica.

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos do nível de expressão génica na linha celular K562 foi realizada recorrendo ao *software Microsoft Excel 365*.

Avaliaram-se as diferenças significativas entre tratamentos e concentrações do mesmo tratamento através do teste t, tendo-se definido *p-value* < 0,05 como valores estatisticamente significativos.

Capítulo 4 – Resultados

Sabe-se que as β -hemoglobinopatias se manifestam entre os primeiros 6 a 24 meses de vida, sendo que nesse período dá-se a troca da hemoglobina fetal para a hemoglobina adulta^{4,29}. Desde a descoberta que a HbF alivia a sintomatologia destas patologias, dado que retarda a polimerização e aumenta a solubilidade da HbS em condições desoxigenadas, tentam-se descobrir soluções capazes de reverter o *switch* entre estas hemoglobinas¹⁴.

No *Switch* da hemoglobina participam diversas proteínas reguladoras e vários miRNAs que controlam os níveis de expressão da HbF. Os genes sujeitos à regulação são as formas adultas das Hemoglobinas (*HBA* e *HBB*) e as formas letais (*HBG1* e *HBG2*), sendo os genes reguladores, o *MYB*, o *KLF1*, o *BCL11A* e o *BGLT3* que codificam fatores de transcrição. Quanto aos miRNAs, encontram-se os seguintes que podem regular quer diretamente os genes que codificam a HbF como é o caso do *miR-96-5p*, quer indiretamente, através da repressão dos níveis dos seus reguladores, como acontece com os miRNAs: *miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p* e *miR-32-5p*.

No presente estudo avaliaram-se os efeitos *in vitro* do extrato metanólico de folhas de *Carica papaya* L. (EMFCP) e da quercetina na reativação transcricional dos genes *HBG1* e *HBG2*, que levam à formação da HbF.

Analisaram-se assim os padrões de expressão de genes relacionados, como as globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), os genes silenciadores da HbF (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A*), ativadores da HbF (*BGLT3*), e ainda os níveis de expressão dos miRNAs reguladores (*miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* e *miR-96-5p*).

A avaliação dos efeitos dos compostos foi estudada em células K562.

4.1. Viabilidade celular e proliferação

Inicialmente expôs-se as células K562 à concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ do EMFCP, durante 3 dias, tendo-se de seguida medido a taxa de proliferação e a respetiva viabilidade celular.

A taxa de proliferação consiste no rácio entre o número de células viáveis após a exposição o número de células inicial ($6,1 \times 10^3$). A viabilidade celular é obtida através da divisão do número de células viáveis pelo número total de células, multiplicando este resultado por 100, obtendo assim uma percentagem.

Os resultados mostram que as células expostas à concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentam uma taxa de proliferação de $5,33 \pm 2,90$, enquanto em células controlo (células não expostas ao tratamento) o valor é de $12,30 \pm 1,16$ (**Figura 4.1**). Quanto à viabilidade celular, observaram-se efeitos negativos pois menos de 50% das células eram viáveis ($44,8\% \pm$

16,20), significando que esta concentração do extrato foi tóxica para as células. Tendo em conta os resultados da proliferação e da viabilidade celular, excluiu-se esta concentração de EMFCP dos ensaios transcrpcionais, devido às evidências de citotoxicidade.

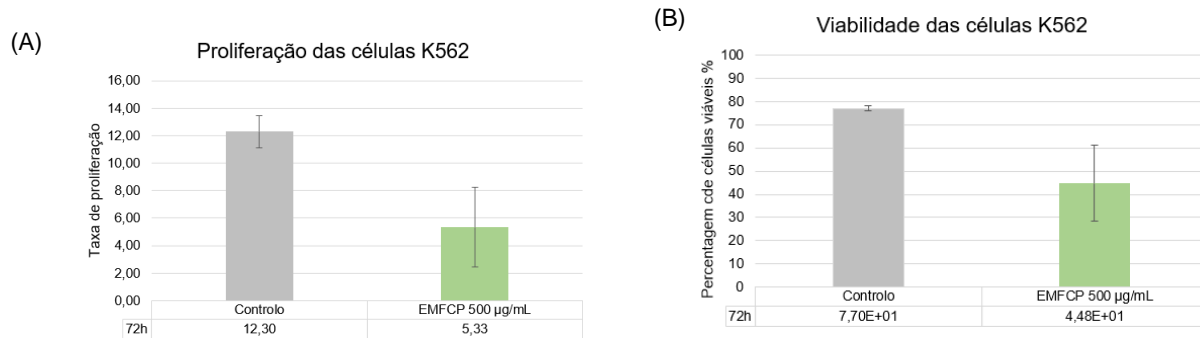


Figura 4.1 – Efeitos do EMFCP na proliferação **(A)** e na percentagem de células viáveis **(B)**.

Após esta experiência inicial, expôs-se as células K562 durante 24h, a três concentrações de EMFCP (0,5; 50 e 100 µg/mL) e a duas concentrações de Quercetina (0,2 e 20 µM) (previamente diluídas em DMSO). Como controlo positivo, utilizou-se a Hidroxiureia (HU) a 25 µg/mL, uma vez que este composto induz a expressão de HbF³¹.

Após o período de exposição, determinou-se a proliferação e a viabilidade celular, podendo observar-se na **Figura 4.2** os resultados obtidos ao nível da proliferação celular.

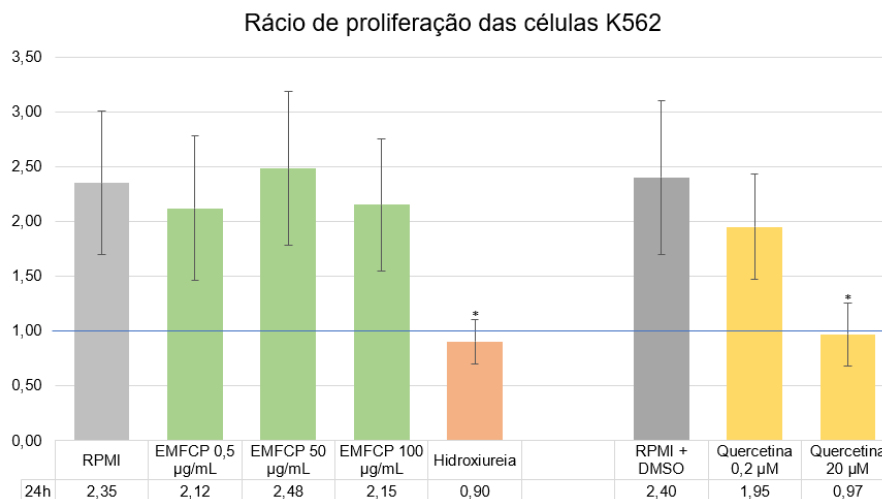


Figura 4.2 – Efeitos do EMFCP e da Quercetina na proliferação das células K562.

Proliferação das células K562 após 24h de exposição ao meio de cultura RPMI (controlo), meio de cultura RPMI + DMSO (veículo), EMFCP com concentração de 0,5 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL, e quercetina com a concentração de 0,2 µM e 20 µM. As variações estatisticamente significativas em relação ao controlo são avaliadas através do teste-t, sendo representadas como ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05.

Observa-se que os rácios de proliferação do EMFCP de 0,5; 50 e 100 100 µg/mL assumiram

os valores 2,12; 2,48 e 2,15, respetivamente. Para as concentrações de Quercetina de 0,2 e 20 μM , os rácios de proliferação foram de 1,95 e 0,97, respetivamente.

O maior aumento da proliferação celular deu-se aquando da exposição das células ao EMFCP à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Verificaram-se variações estatisticamente significativas na exposição com a HU ($p = 0,021$) e com a quercetina a 20 μM ($p = 0,031$), relativamente à diminuição da proliferação celular em relação ao controlo negativo (meio de cultura) e à solução RPMI+DMSO, respetivamente.

Seguidamente avaliaram-se os potenciais efeitos citotóxicos do EMFCP e da quercetina nas células K562, através do ensaio de exclusão por azul de tripano (**Figura 4.3**).

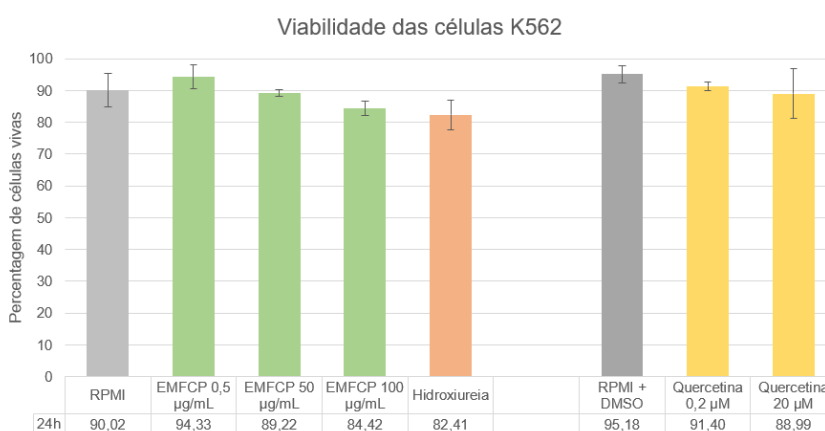


Figura 4.3 - Efeito do EMFCP e da Quercetina na viabilidade das células K562.

Proliferação das células K562 após 24h de exposição ao meio de cultura RPMI, meio de cultura RPMI + DMSO, EMFCP com concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, e quercetina com a concentração de 0,2 μM e 20 μM . As variações estatisticamente significativas em relação ao controlo são avaliadas através do teste-t, sendo representadas como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Analisando os resultados, verifica-se que para as várias doses do mesmo tratamento não existem variações estatisticamente significativas quanto à viabilidade celular. O mesmo se verifica em relação às condições experimentais e os respetivos controlo, ou seja, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as células expostas ao EMFCP e o controlo (meio de cultura RPMI), nem entre as células expostas à Quercetina e o respetivo controlo (RPMI+DMSO).

Observa-se ainda que o RPMI+DMSO apresentou a maior taxa de viabilidade celular (95,18% \pm 2,76) e que a HU afetou a viabilidade celular das células expostas a este composto (82,41% \pm 4,69), tendo diminuído a mesma.

4.2. Análise da expressão génica das globinas

Através da análise dos resultados da expressão relativa do gene *HBA* (Figura 4.4 – A e B) verifica-se o aumento da expressão do gene *HBA* na maioria dos tratamentos, exceto no tratamento com a Quercetina a 20 μM , em que houve a diminuição da transcrição deste gene. Estes dados são mais evidenciados na Figura 4.4 – B correspondente à análise relativa dos níveis de expressão sob a forma de Log_2 .

Os dados mostram que todas as concentrações do EMFCP provocaram o aumento da expressão deste gene, sendo este aumento estatisticamente significativo para o EMFCP a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com $p < 0,0001$ e a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com $p = 0,040$. O maior aumento transcripcional regista-se aquando da exposição ao EMFCP à concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Log_2FC (EMFCP 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) = $3,791 \pm 0,135$), ultrapassando o valor obtido no controlo positivo (Log_2FC (HU) = $0,885 \pm 0,275$).

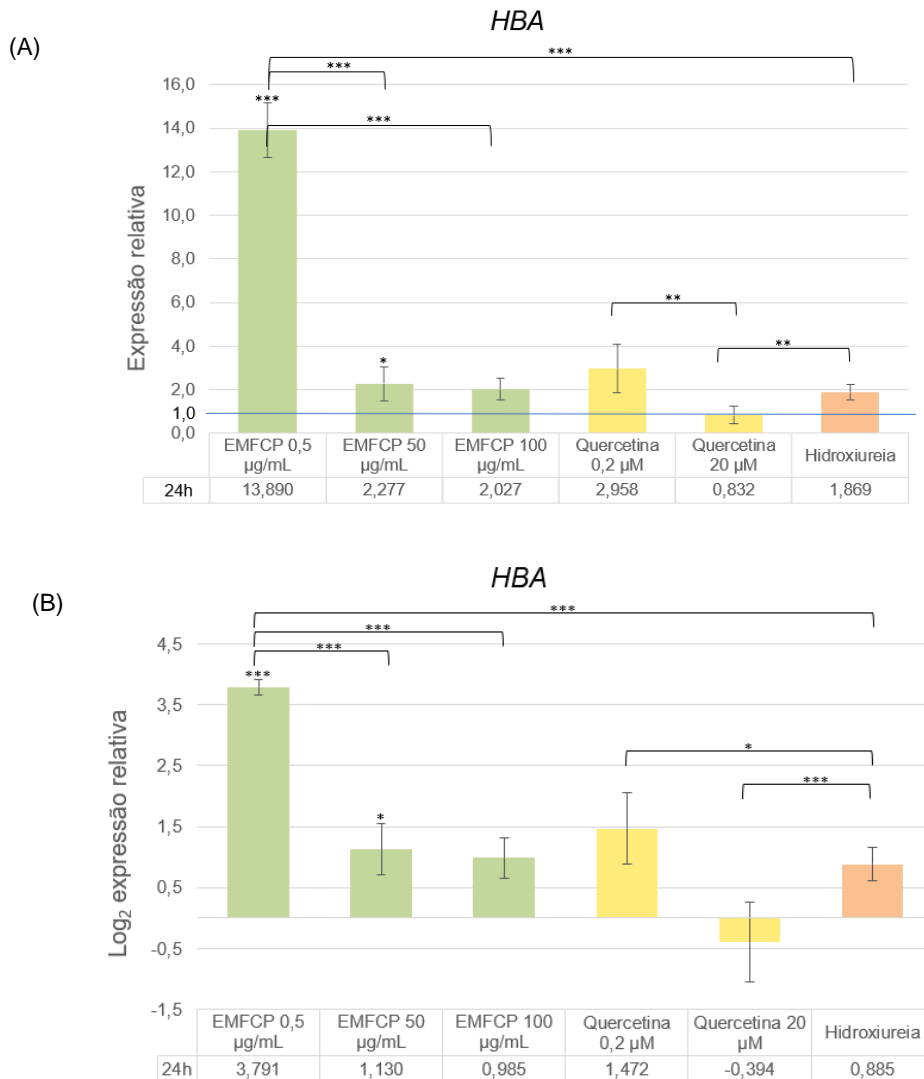


Figura 4.4 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene *HBA*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBA* após exposição ao EMFCP,

à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Através da análise dos resultados da transcrição do gene *HBB* (**Figura 4.5 A e B**) observa-se o aumento da expressão do gene *HBB* em todas as concentrações de EMFCP e na HU, enquanto se verifica uma diminuição da expressão deste gene em ambas as concentrações de Quercetina.

A análise do Log_2 da expressão relativa do gene *HBB* (**Figura 4.4 – B**) evidencia estes resultados mostrando que o EMFCP aumenta a expressão deste gene em todas as concentrações, sendo os aumentos estatisticamente significativos no EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$), no EMFCP a 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,029$) e no EMFCP a 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,016$).

O maior aumento transcricional do gene *HBB* verifica-se no EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Log_2FC (EMFCP 0,5 $\mu\text{g/mL}$) = $4,271 \pm 0,954$), sendo este valor superior ao obtido na HU (Log_2FC (HU $\mu\text{g/mL}$) = $1,492 \pm 0,424$).

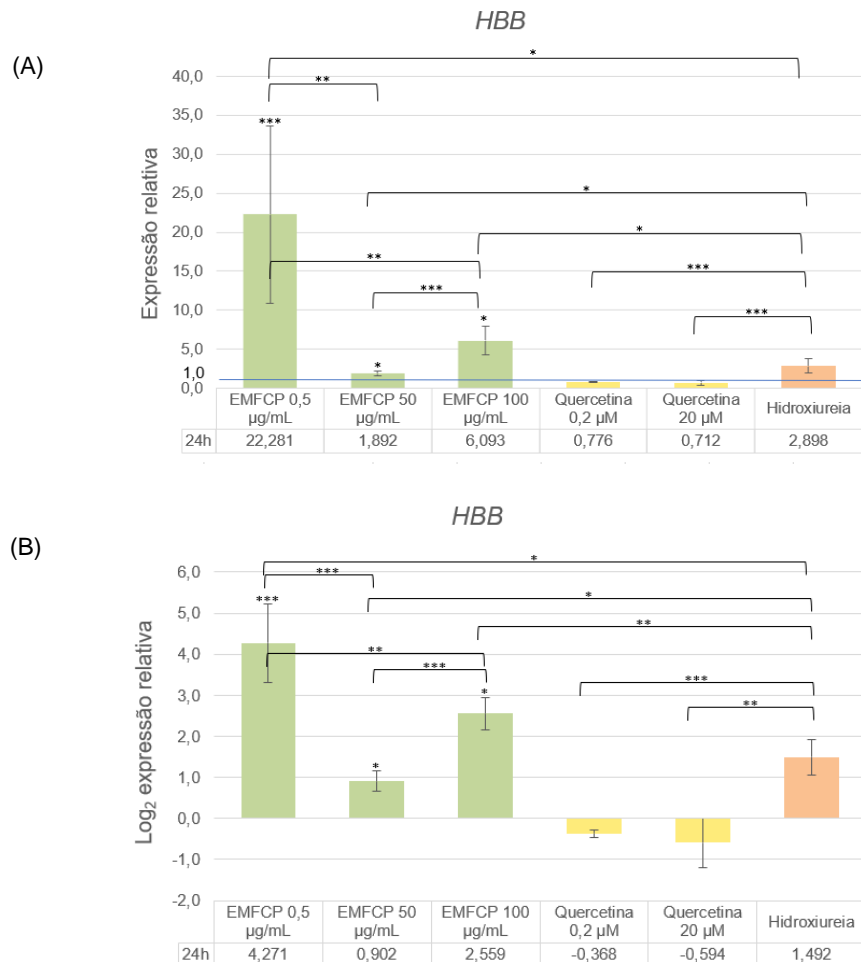


Figura 4.5 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene *HBB*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBB* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Através da análise dos resultados da expressão relativa do gene *HBG1* (**Figura 4.6 – A e B**) verifica-se o aumento da expressão do gene *HBG1* no EMFCP na menor concentração (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na Quercetina em ambas as concentrações e na HU. Já o EMFCP com as concentrações 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tiveram um efeito inibitório na transcrição do gene. Estes resultados são estatisticamente significativos na Quercetina a 20 μM ($p < 0,0001$) e na HU ($p < 0,0001$), sendo no tratamento com este último composto que se verifica o maior aumento transcripcional deste gene ($\text{Log}_2\text{FC (HU)} = 1,867 \pm 0,706$).

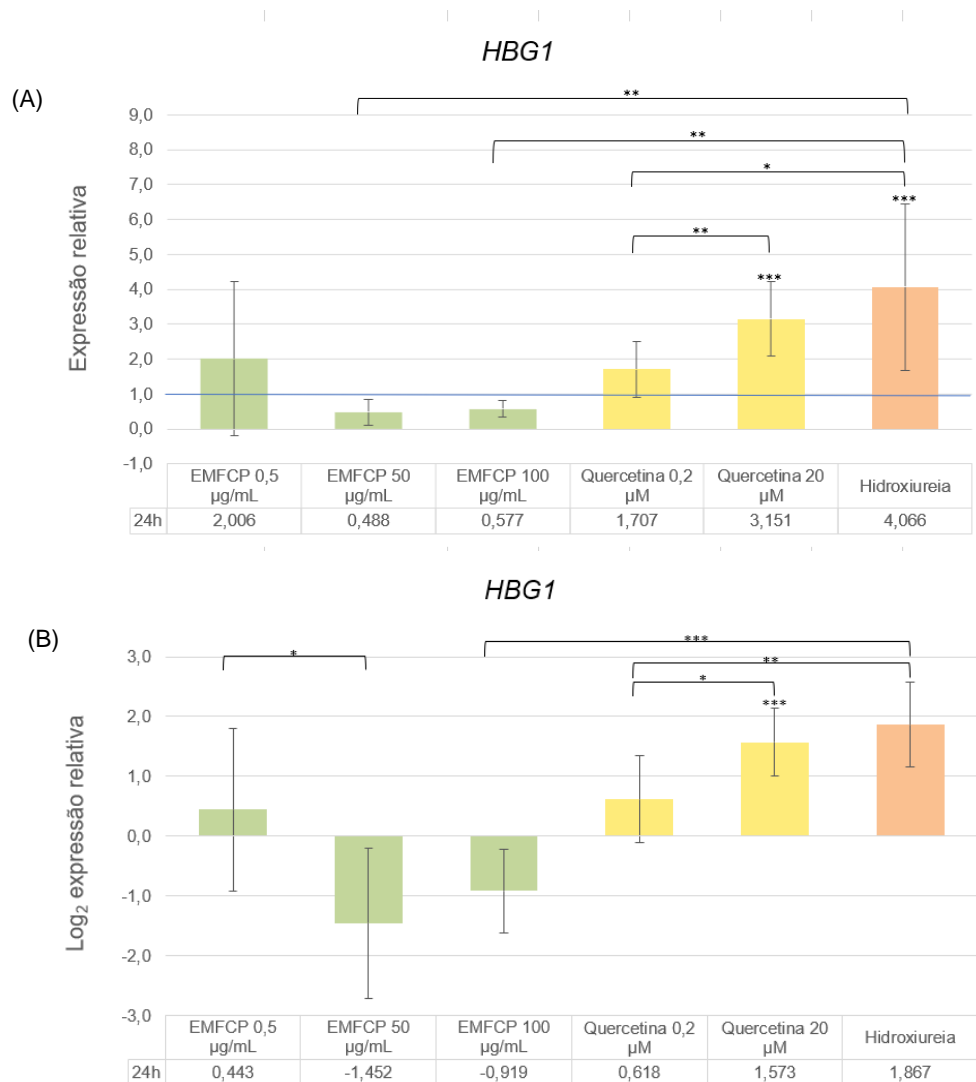


Figura 4.6 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene *HBG1*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBG1* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Observando os resultados obtidos do gene *HBG2* (**Figura 4.7 – A e B**), todos os tratamentos aumentaram a expressão deste gene.

Constata-se que o aumento da expressão deste gene é estatisticamente significativo no tratamento com EMFCP a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0,031$) e no tratamento com ambas as concentrações de Quercetina (Q 0,2 μM $p = 0,005$) e (Q 20 μM $p = 0,002$). O maior aumento da expressão gênica é observado no tratamento com a HU ($\text{Log}_2\text{FC}(\text{HU}) = 2,398 \pm 1,107$).

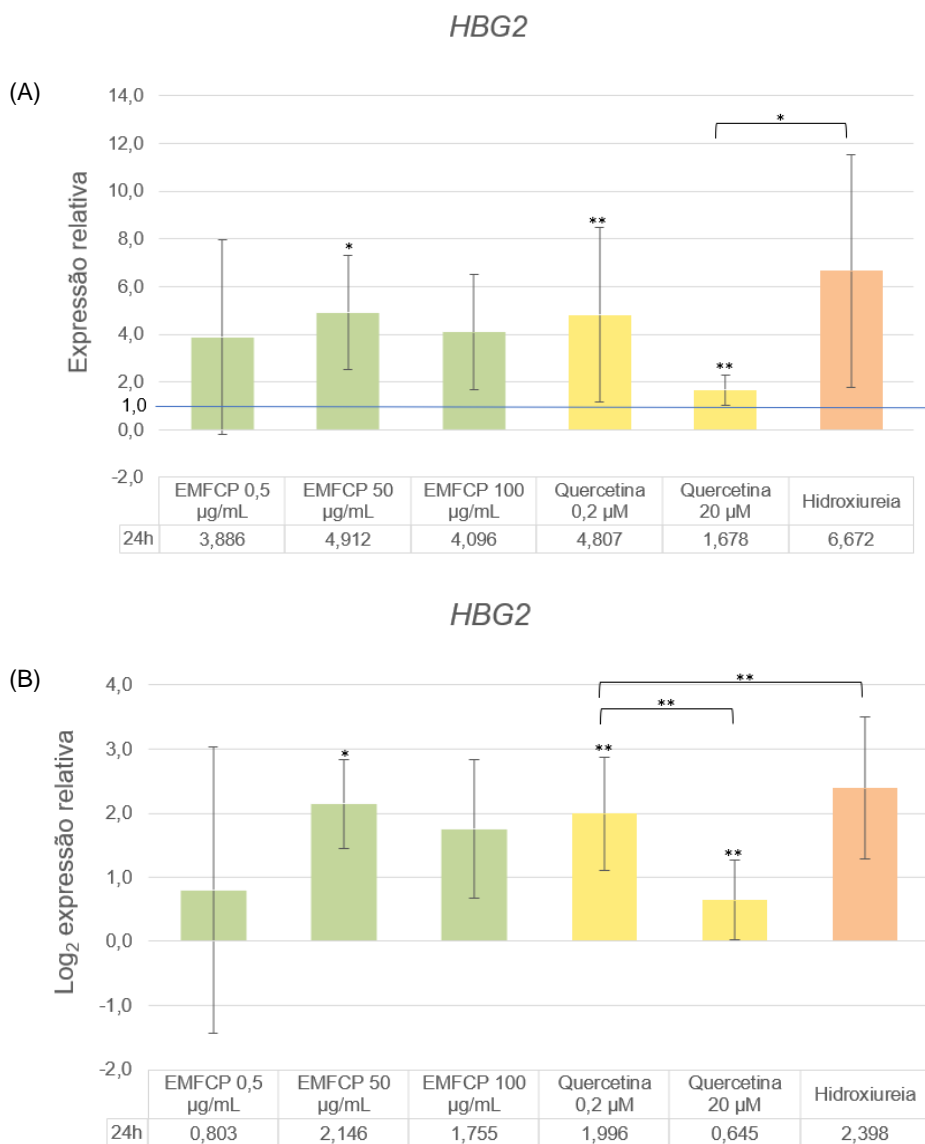


Figura 4.7 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene *HBG2*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *HBG2* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão génica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

4.3. Análise da expressão génica dos reguladores transcricionais da HbF

Observando a análise transcricional relativa do gene *MYB* (**Figura 4.8 – A e B**), verifica-se o aumento da expressão do gene *MYB* no tratamento com todas as concentrações de EMFCP, enquanto as células expostas à Quercetina e à HU apresentam uma diminuição da expressão do gene.

O maior aumento transcricional do *MYB* deu-se nas células expostas ao EMFCP à concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Log_2FC (EMFCP 100 $\mu\text{g/mL}$) = $1,289 \pm 0,663$).

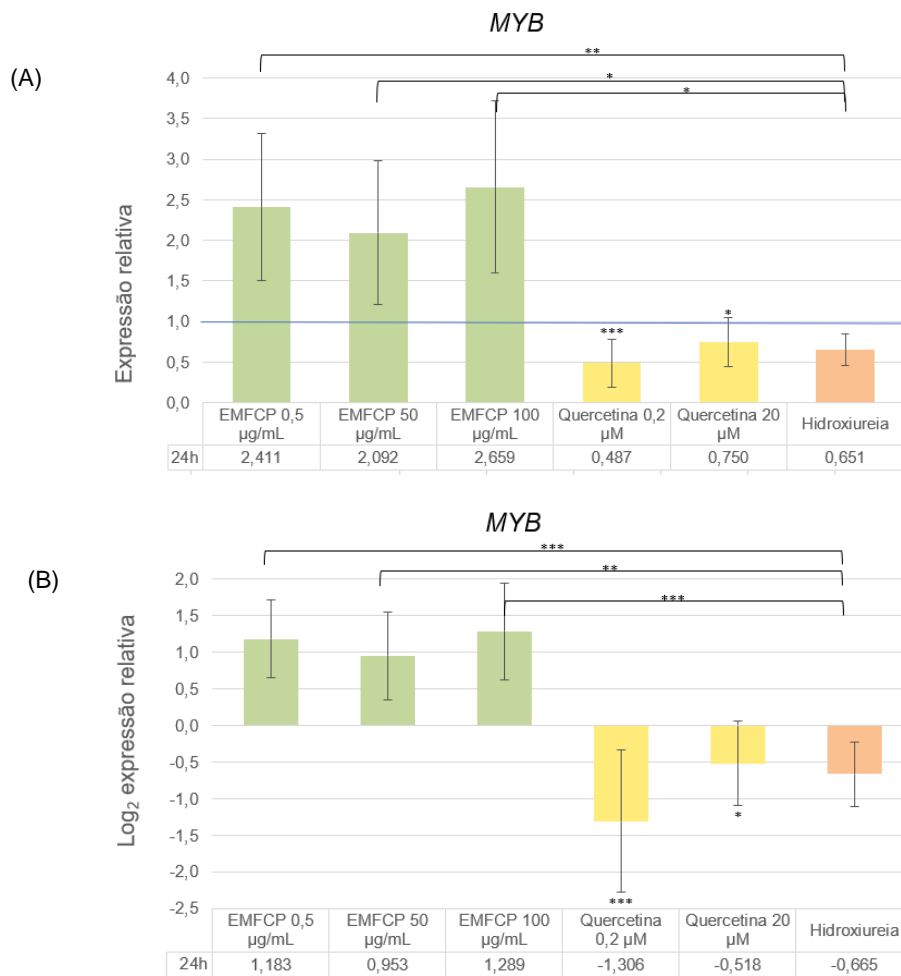


Figura 4.8 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do gene *MYB*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *MYB* após exposição ao EMFCP,

à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Analisando os resultados da expressão relativa do gene *KLF1* (**Figura 4.9 – A e B**), percebe-se que os tratamentos com o EMFCP em todas as concentrações e a HU provocaram o aumento da expressão deste gene, ao contrário da Quercetina, em ambas as concentrações utilizadas, sendo que a redução da expressão na Quercetina a 0,2 μM é estatisticamente significativa ($p = 0,013$). O maior aumento transcripcional aconteceu nas células expostas ao EMFCP na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Log_2FC (EMFCP 0,5 $\mu\text{g/mL}$) = $1,711 \pm 0,795$).

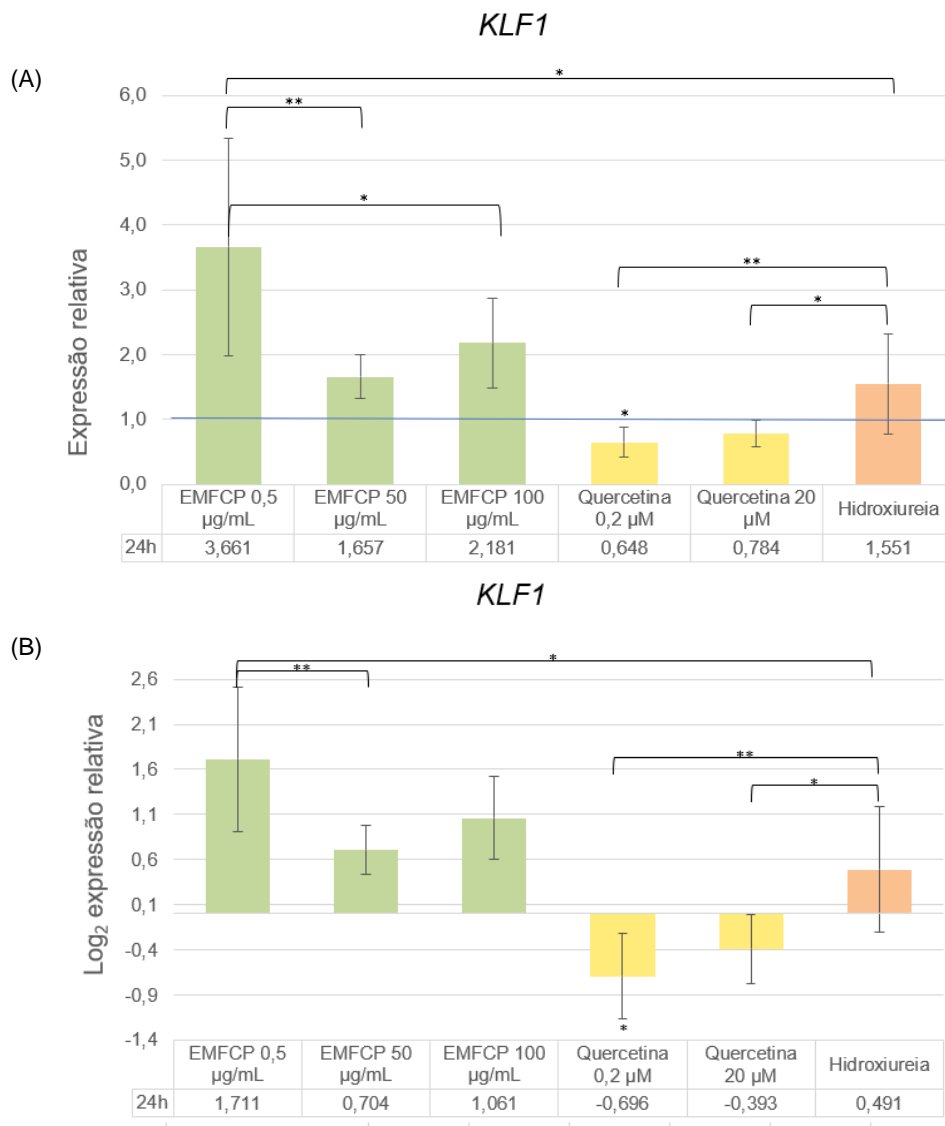


Figura 4.9 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão do gene *KLF1*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *KLF1* após exposição ao EMFCP,

à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão génica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Observando a análise transcricional do gene *BCL11A* (**Figura 4.10 – A e B**), verifica-se a redução da expressão deste em todos os tratamentos.

Esta diminuição é estatisticamente significativa nas células expostas ao EMFCP na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,021$) e na Quercetina a 0,2 μM ($p = 0,004$).

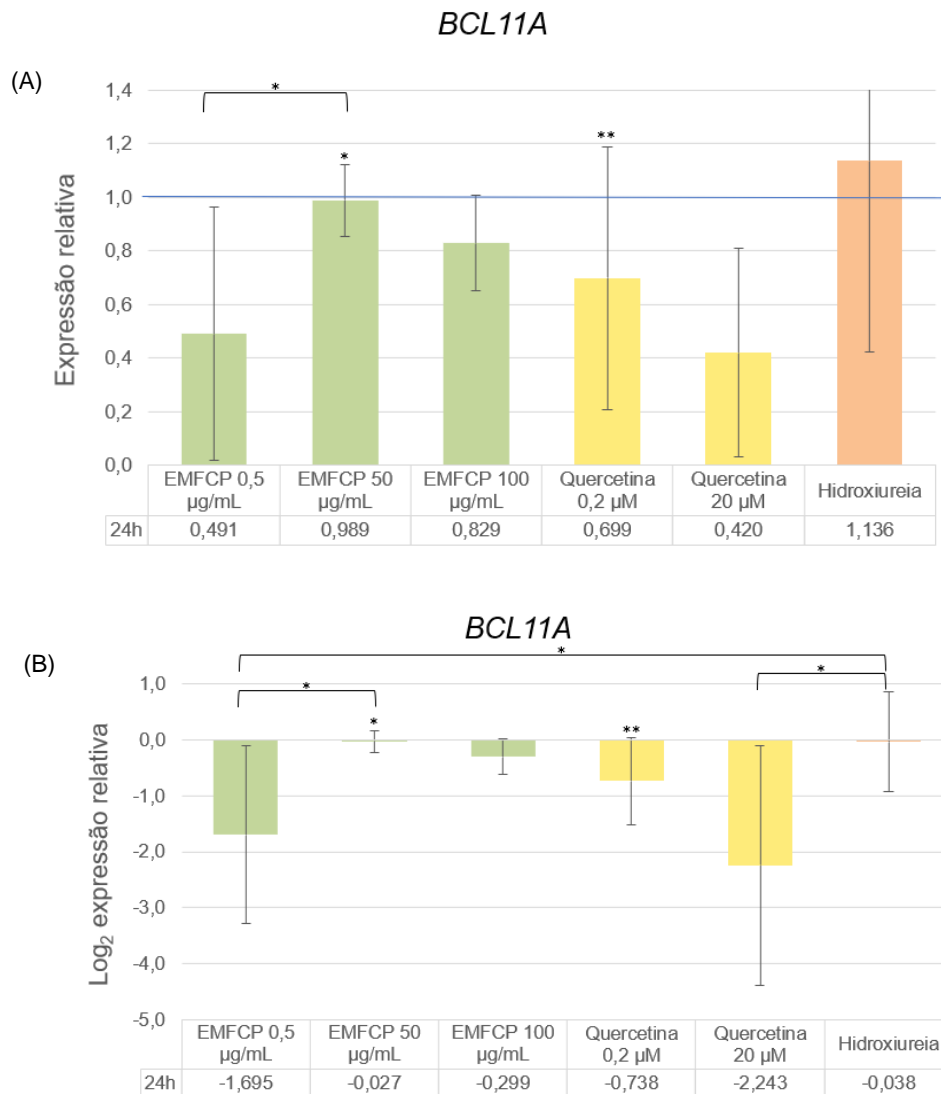


Figura 4.10 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão do gene *BCL11A*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *BCL11A* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão génica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência

e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Observando a expressão relativa do gene *BGLT3* (**Figura 4.11 – A e B**) para os diversos tratamentos, verifica-se o aumento da expressão no EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, em ambas as concentrações da Quercetina e na HU. Nas restantes concentrações do EMFCP (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) observa-se a diminuição da expressão deste gene.

Verifica-se que a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a transcrição deste gene de forma estatisticamente significativa ($p = 0,020$). Para além disso, esta concentração apresenta ainda o maior aumento transcricional deste gene (Log_2FC (EMFCP 0,5 $\mu\text{g/mL}$) = $1,971 \pm 0,389$), sendo este valor superior ao observado nas células expostas ao controlo positivo (Log_2FC (HU) = $0,122 \pm 0,217$).

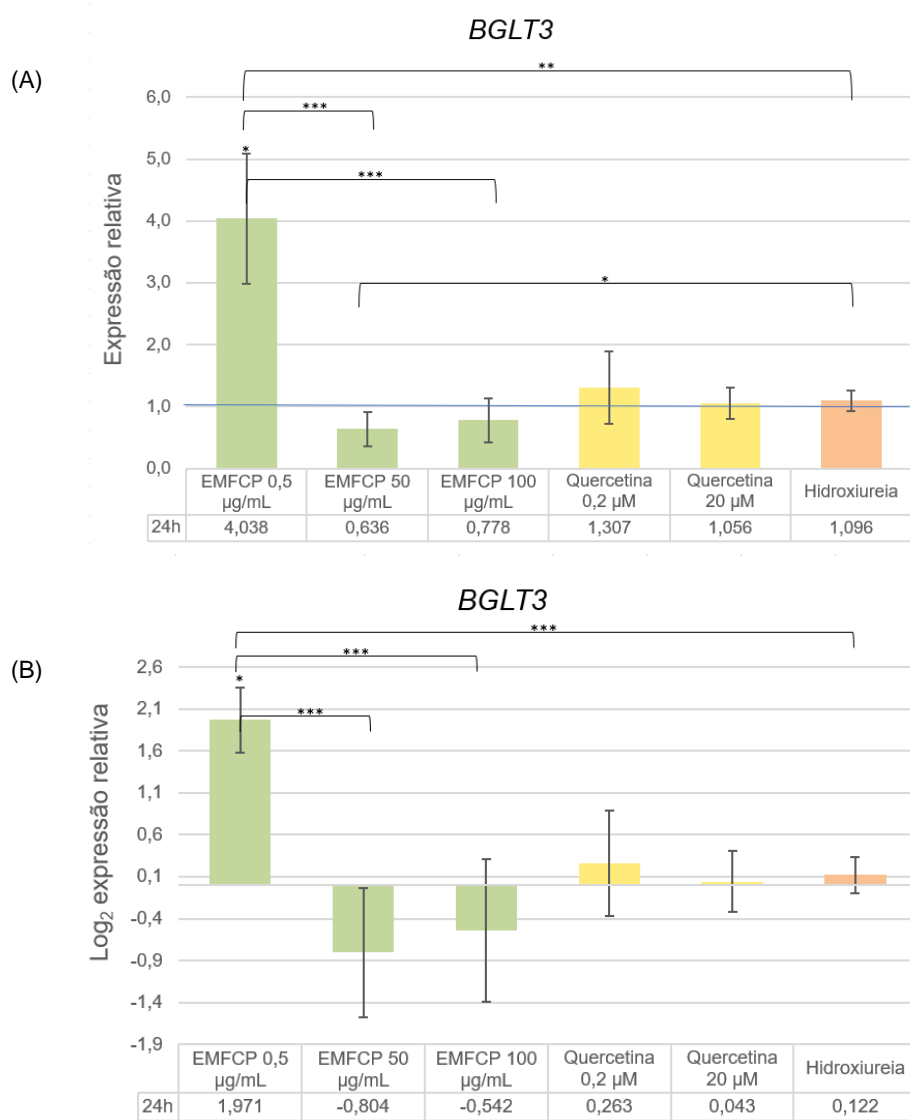


Figura 4.11 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão do gene *BGLT3*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do gene *BGLT3* após exposição ao

EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão gênica após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média da expressão relativa e do Log_2 da expressão relativa, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

4.4. Análise da expressão dos miRNAs reguladores pós-transcricionais da HbF

Relativamente à análise transcricional do *miR-486-3p* (Figura 4.12 – A e B) nos diferentes tratamentos, verifica-se a diminuição da expressão deste miRNA em todas as concentrações do EMFCP, tendo este composto o mesmo comportamento que a HU. Já aquando da exposição à Quercetina, verifica-se o aumento da expressão deste miRNA.

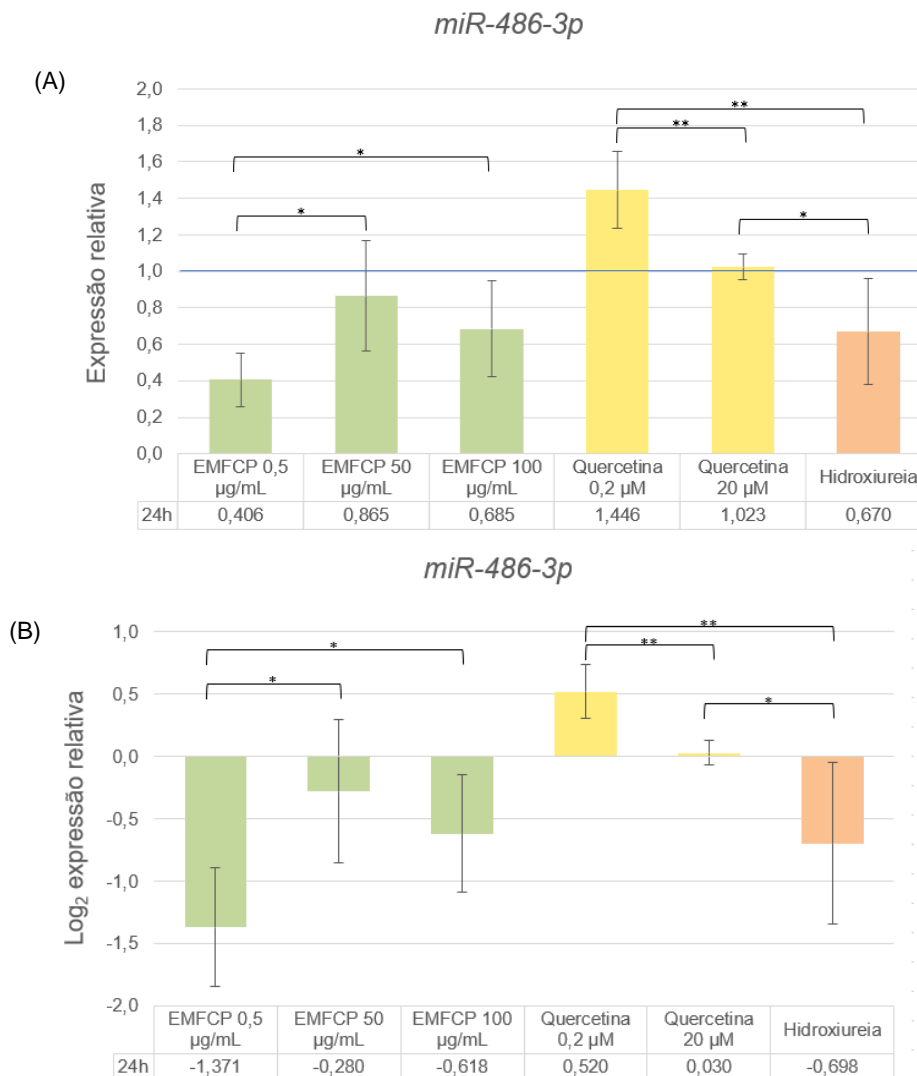


Figura 4.12 – Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do *miR-486-3p*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do *miR-486-3p* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da

expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *miR-423-3p* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do Log2 fold change, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Através da análise dos resultados do *miR-34a-5p* (Figura 4.13 – A e B) observa-se a diminuição da expressão do *miR-34a-5p* no EMFCP em todas as concentrações e na Quercetina a 0,2 μM , tendo um comportamento semelhante da HU. Por outro lado, a Quercetina a 20 μM provocou o aumento da expressão deste miRNA.

Verifica-se que a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do EMFCP reduziu a transcrição deste miRNA de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), assim como a concentração de 20 μM da Quercetina que provocou um aumento estatisticamente significativo do *miR-34a-5p* ($p = 0,047$).

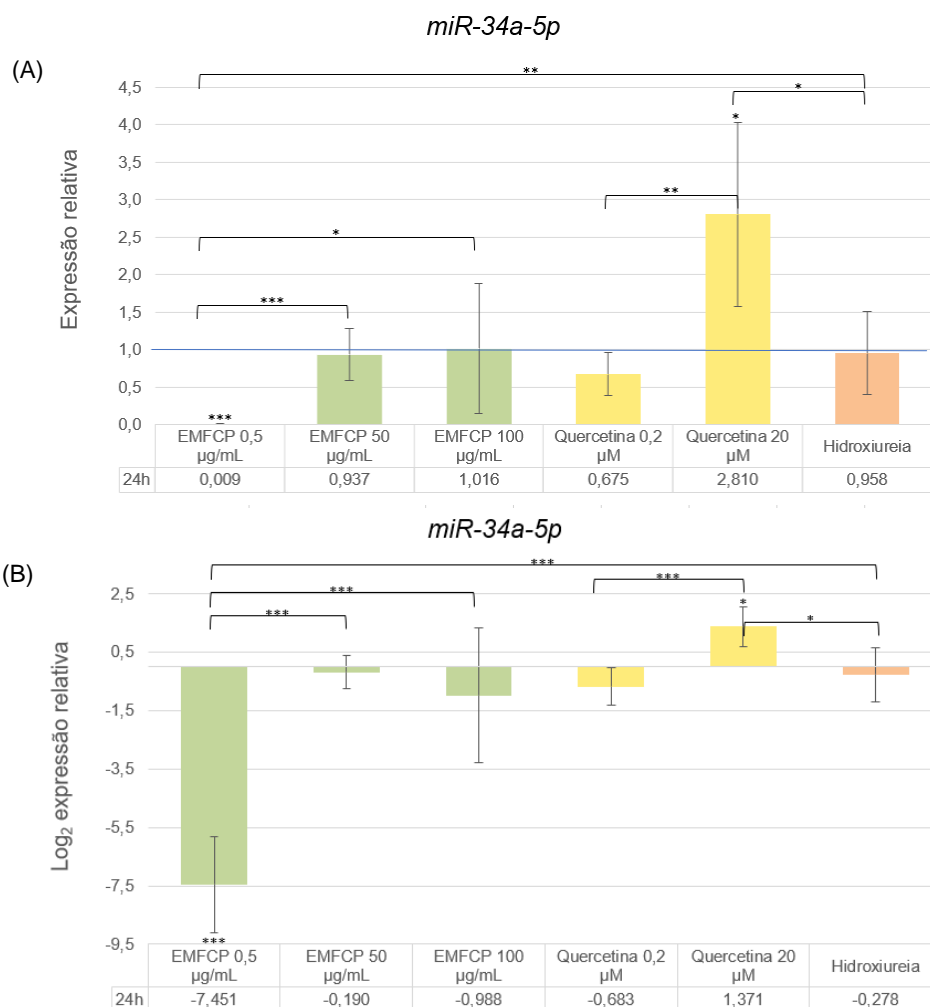


Figura 4.13 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do *miR-34a-5p*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do *miR-34a-5p* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log₂ da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a

0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL e à Quercetina a 0,2 µM e 20 µM. O *miR-423-3p* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do Log₂ fold change, representadas como *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, foram calculadas através do teste t.

Através da análise da expressão relativa do *miR-210-5p* (**Figura 4.14 – A e B**) para os diversos tratamentos, verifica-se a diminuição da expressão deste miRNA no EMFCP a 0,5 e 50 µg/mL, enquanto que nos restantes tratamentos (EMFCP a 100 µg/mL, Quercetina a 0,2 e 20 µM e a HU) se verifica o aumento da expressão do *miR-210-5p*. A HU diminuiu a expressão de forma estatisticamente significativa (p=0,010). Além disso, verifica-se ainda que a Quercetina a 0,2 µM apresenta o maior aumento transcripcional deste miRNA (Log₂FC (Q 0,2 µM) =1,710 ± 0,556).

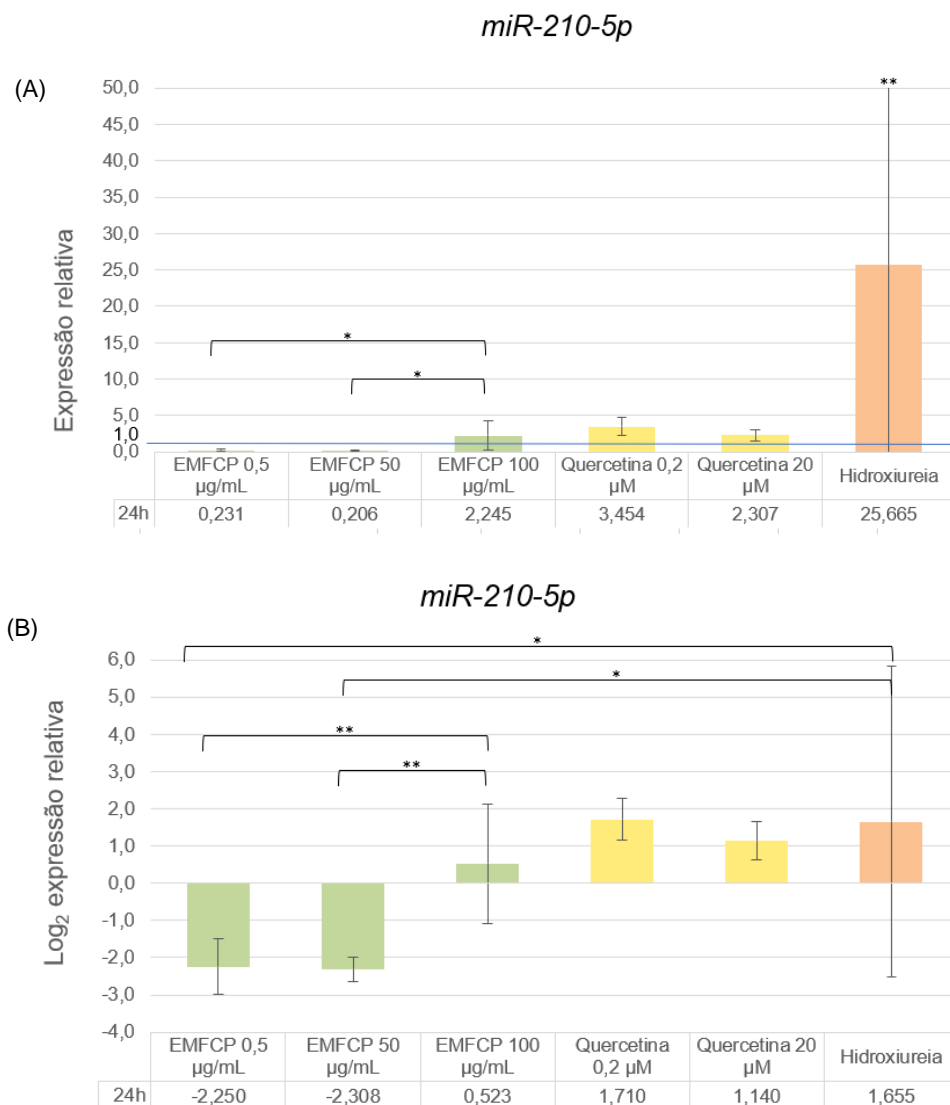


Figura 4.14 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do *miR-210-5p*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do *miR-210-5p* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log₂ da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a

0,5 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL e à Quercetina a 0,2 µM e 20 µM. O *miR-423-3p* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do Log2 fold change, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Observando a análise transcricional do *miR-32-5p* (Figura 4.15 – A e B), verifica-se a diminuição da expressão do *miR-32-5p* em todas as concentrações do EMFCP, à semelhança da HU. Já a Quercetina provocou o aumento da transcrição deste miRNA, sendo que o maior aumento acontece na concentração de 0,2 µM.

Verifica-se que o EMFCP a 0,5 diminuiu a expressão deste miRNA de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), à semelhança da HU ($p = 0,009$). Por outro lado, a Quercetina a 0,2 e 20 µM aumentaram de forma estatisticamente significativa a expressão ($p < 0,0001$ e $p = 0,039$, respetivamente).

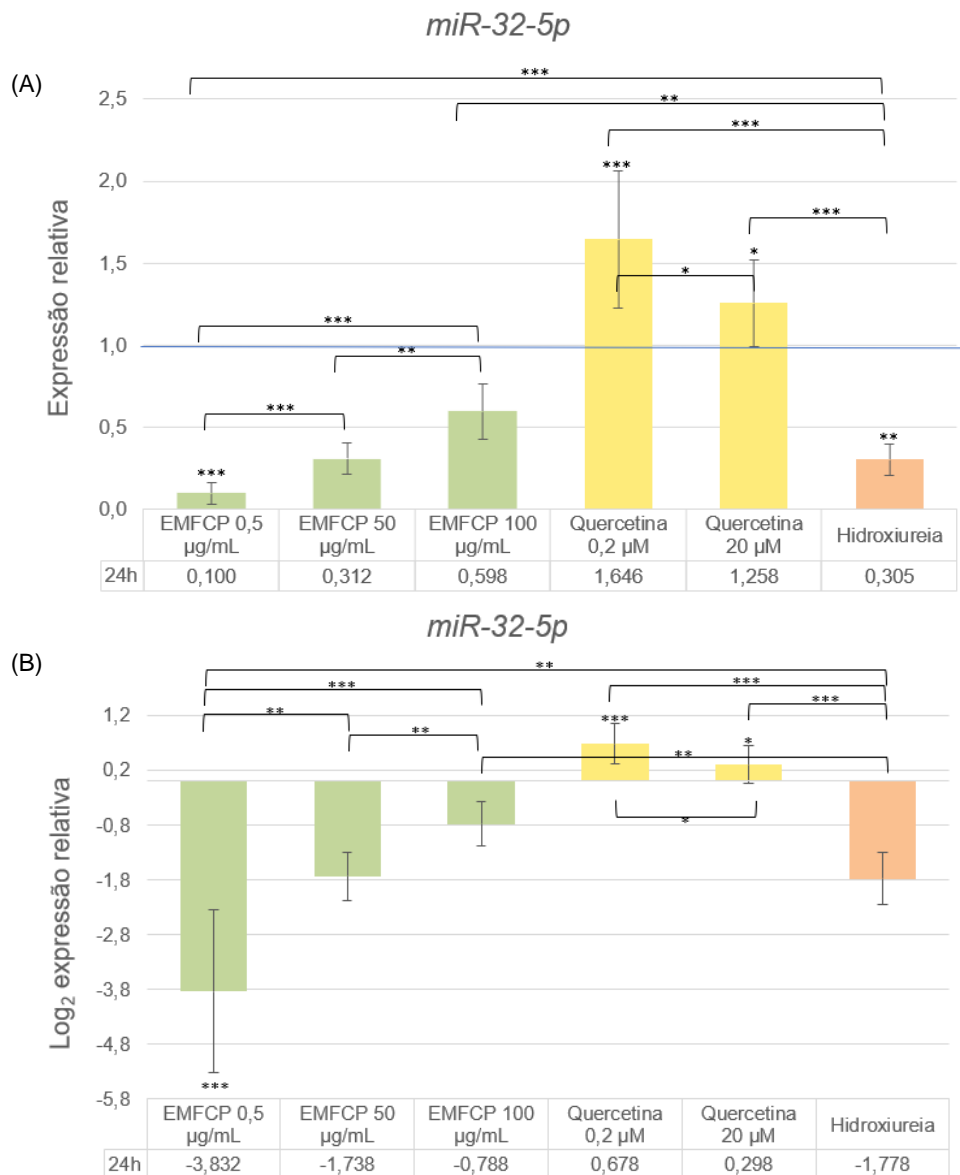


Figura 4.15 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do *miR-32-5p*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do *miR-32-5p* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *miR-423-3p* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do Log_2 fold change, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Através da análise transcricional do *miR-96-5p* (**Figura 4.16 – A e B**), observa-se a diminuição da expressão do *miR-96-5p* em todas as concentrações do EMFCP, assim como no tratamento com a HU. Já em ambas as concentrações da Quercetina, ocorreu o aumento da expressão deste miRNA, sendo que o maior aumento transcricional acontece na concentração de 0,2 μM .

O EMFCP a 0,5 e a 50 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a expressão deste miRNA de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ e $p = 0,001$, respetivamente). Já o tratamento com a Quercetina em ambas as concentrações provocaram um aumento estatisticamente significativo da expressão deste miRNA ($p = 0,08$ em ambas as concentrações).

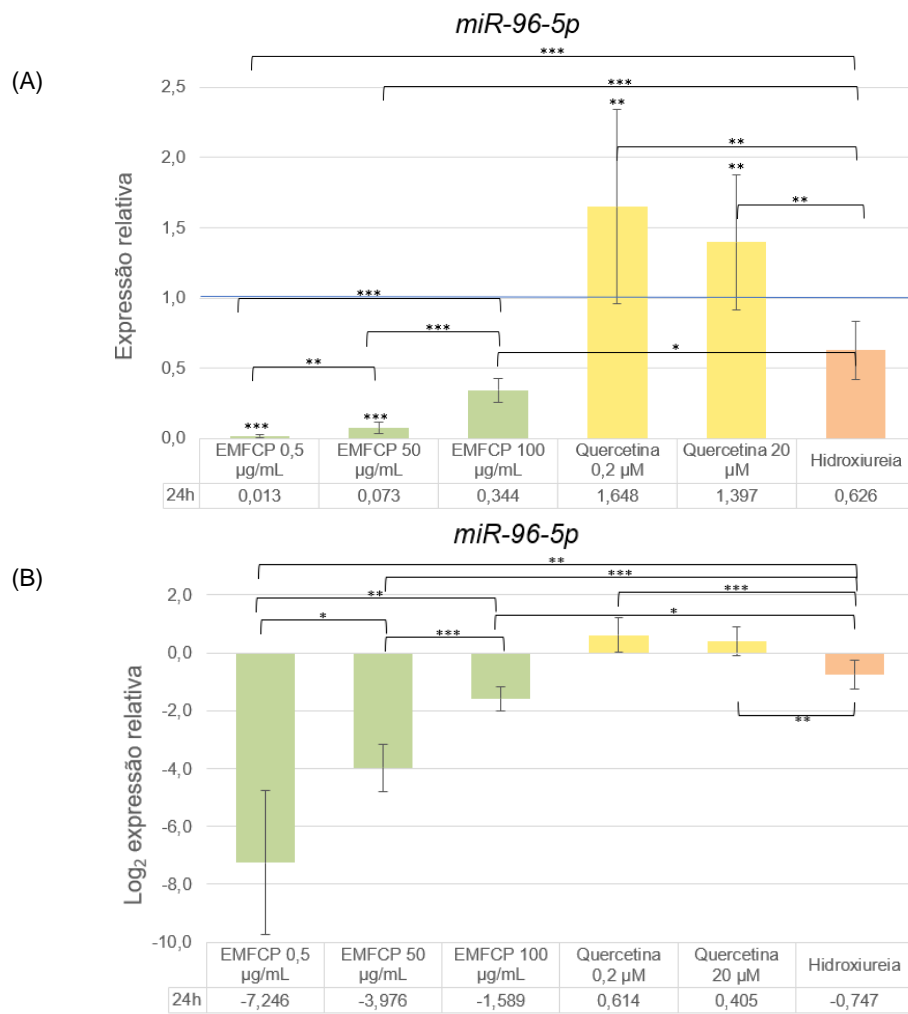


Figura 4.16 - Efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão relativa do *miR-96-5p*.

Representação gráfica da análise por PCR quantitativo em tempo real do *miR-96-5pp* após exposição ao EMFCP, à Quercetina (Q) e à Hidroxiureia (HU). **(A)** Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão), **(B)** Log_2 da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desvio padrão) da expressão do miRNA após 24 horas de exposição ao EMFCP a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e à Quercetina a 0,2 μM e 20 μM . O *miR-423-3p* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas da média do Fold change e do Log_2 fold change, representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, foram calculadas através do teste t.

Capítulo 5 - Discussão

Os objetivos deste estudo incidiram na avaliação do potencial de dois compostos naturais (EMFCP e Quercetina) ao nível da regulação da expressão de genes das globinas, de genes reguladores/silenciadores da HbF, e de miRNAs reguladores da HbF em células K562, expostas ao EMFCP a 0,5; 50 e 100 µg/mL, à Quercetina a 0,2 e 20 µM e a 25 µg/mL de HU, durante 24 horas, tendo os mesmos sido atingidos.

No presente estudo foi possível responder à questão científica colocada inicialmente sobre a possibilidade do extrato de papaia atuar como potencial indutor da HbF, dado que os resultados obtidos do EMFCP mostraram que este parece atuar a nível transcricional e em mecanismos pós-transcricionais na potencial indução da HbF.

Tendo em conta a alta incidência, mortalidade e morbilidade das β-hemoglobinopatias, a pesquisa por novos agentes indutores de HbF com menos efeitos secundários do que os compostos já existentes tem sido cada vez maior por parte da comunidade científica⁵². Para além disso, as terapêuticas existentes apresentam algumas limitações, nomeadamente o elevado custo, dificultando o seu acesso em países subdesenvolvidos. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas que melhorem a qualidade de vida destes doentes, mas que garantam a acessibilidades dos tratamentos.

O desafio atual prende-se na descoberta dos mecanismos de ação dos compostos indutores da HbF. Assim, estudar-se os potenciais intervenientes das vias de regulação da HbF pode ajudar a prever de que forma estas são modulados por estes compostos. A hidroxiureia é um fármaco indutor da HbF, sendo o único fármaco aprovado pela FDA no tratamento da doença das células falciformes, através da indução da HbF¹⁴.

Os compostos bioativos dietéticos têm a capacidade de alterar a expressão génica através de alterações ao nível da estrutura da cromatina, ncRNAs e ativação de fatores de transcrição¹²⁷.

Atualmente, a indução farmacológica da HbF é uma das terapêuticas com maior potencial no tratamento das β-hemoglobinopatias, destacando-se a HU, o fármaco mais viável na reativação da produção da HbF^{31,14,93}. Contudo, o seu mecanismo de atuação não é totalmente compreendido^{94,70,14,95}. Para além disso, a resposta ao tratamento pode diminuir ao longo do tempo nalguns pacientes, para além dos efeitos adversos, como a potencial toxicidade reprodutiva e leucopenia^{94,70,14,95}, sugerindo-se que o p38 MAPK seja das principais proteínas de sinalização utilizada para ativar diretamente a HbF em células K562¹²⁸.

Deste modo, é essencial a descoberta de novos agentes indutores de HbF. Numa revisão científica realizada por *Mukherjee* e colaboradores, estes investigadores abordaram compostos naturais que têm demonstrado aumentar a HbF significativamente, entre os quais

a quercetina e o resveratrol¹²⁹.

Os extratos de folhas de *C. papaya* têm demonstrado aplicações na medicina tradicional quanto ao tratamento de doenças, nomeadamente a malária, dengue e a doença das células falciformes^{102,16}. É fundamental avaliar-se o perfil de segurança deste composto, de modo a prever a sua citotoxicidade e determinar-se a dose segura para o uso humano. Tendo em conta esta necessidade, no presente estudo avaliou-se inicialmente a proliferação e a viabilidade do EMFCP em células K562, sendo que os resultados demonstraram que a exposição das células ao EMFCP à concentração de 500 µg/mL aparentou ser citotóxica, tendo sido excluída. Já as restantes concentrações do EMFCP não mostraram indícios de citotoxicidade, permitindo a continuação do estudo. É importante referir a exposição das células ao EMFCP à concentração de 500 µg/mL teve uma duração de 72h, ao contrário do ensaio com os restantes tratamentos com uma duração de 24h. Assim, o menor rácio de proliferação no **Gráfico 4.2** em comparação com o **Gráfico 4.1** parece dever-se ao menor tempo de exposição, dado que as células K562 tiveram menos tempo para proliferarem.

Adicionalmente, um estudo realizado por *Ismail* e colaboradores demonstrou que doses de extrato de folha de *C. papaya* superior a 2g/kg da massa corporal não demonstraram efeitos tóxicos, quando administradas oralmente em ratos durante 13 semanas¹³⁰.

A Quercetina é um flavonóide abundante em vegetais e frutas e na *C. papaya*, sendo que este composto induz a HbF^{110,113,115}. Quanto ingerida através da dieta, a Quercetina encontra-se em concentrações nanomolares (<100 nM) no plasma, enquanto que com a sua suplementação a concentração deste composto pode aumentar, atingindo a gama nanomolar alta ou a gama baixa do micromolar¹³¹.

No presente estudo expuseram-se as células à Quercetina nas concentrações 0,2 e 20 µM e os resultados demonstraram que a exposição à Quercetina a 0,2 µM não afeta a proliferação celular, ao contrário da exposição com a Quercetina a 20 µM, em que a proliferação é afetada.

Os resultados da Quercetina a 20 µM estão de acordo com um estudo de *Srivastava* e colaboradores que demonstrou uma redução da proliferação celular com o aumento da concentração da Quercetina¹³². Adicionalmente, não se observam efeitos citotóxicos nas células expostas aos dois compostos (EMFCP e Quercetina), sendo benéfico quando comparado com a HU, um indutor da HbF.

A expressão da hemoglobina pode ser regulada a nível epigenético – através de reguladores da cromatina, transcricional – através de fatores de transcrição, ou pós-transcricional – mediada por miRNAs, controlando assim a expressão das diversas globinas ao longo do desenvolvimento humano^{25,60,54,10}. Desta forma, no presente estudo analisaram-se, por um lado os padrões de expressão dos genes referentes às globinas, e por outro, os níveis de expressão dos seus reguladores quando expostos aos compostos indicados.

Através da análise dos resultados, observa-se que todas as concentrações do EMFCP aumentam a transcrição dos genes *HBA*, *HBB* e *HBG2*, tendo um comportamento semelhante ao tratamento com a HU. Por outro lado, o EMFCP aumenta a transcrição do gene *HBG1* apenas na concentração de 0,5 µg/mL e nas restantes concentrações mais altas (50 e 100 µg/mL) parece inibir a expressão deste gene, sendo que apenas a menor concentração apresenta um comportamento semelhante da expressão do gene *HBG1* com a HU. Já os resultados do gene *HBA* demonstraram que a Quercetina a 20 µM inibiu a expressão deste gene, tendo um comportamento contrário à HU. Por outro lado, os resultados obtidos do gene *HBB* demonstram que ambas as concentrações da Quercetina inibem a transcrição deste gene, tendo também um comportamento contrário à HU. Analisando a expressão dos genes *HBG1* e *HBG2* verifica-se que ambas as concentrações de Quercetina aumentam a transcrição destes genes, tendo um comportamento semelhante com a HU.

Em suma, se todas as concentrações do EMFCP ativam o *HBA* e *HBB*, este composto tem potencial para tratar anemias, uma vez que aumenta a transcrição dos níveis de hemoglobina, ao contrário da Quercetina. Além disso, apenas o EMFCP à concentração de 0,5 µg/mL aumenta o *HBG1* e *HBG2*, bem como ambas as concentrações da Quercetina. Tal significa que o EMFCP, para além de ter potencial no tratamento das anemias, tem potencial para tratar as hemoglobinopatias, ao contrário da Quercetina que apenas tem potencial no tratamento das hemoglobinopatias.

Até ao presente, têm sido descobertos diversos fatores de transcrição como potenciais intervenientes na regulação da HbF. Neste processo estão envolvidos inúmeros genes, destacando-se o *MYB*¹³³, o *KLF1*¹³⁴ e o *BCL11A*¹³⁴, sendo estes descritos na literatura como inibidores da HbF, ao contrário do gene não codificante *BGLT3*, descrito como um ativador da expressão da HbF⁵⁰.

Analisando os resultados dos genes silenciadores da HbF constata-se que o EMFCP induz a expressão dos genes *MYB* e *KLF1* em todas as concentrações. Contudo, nos dados do *MYB* o EMFCP tem um comportamento diferente da HU, sendo estes resultados discordantes de um estudo de *Akinsheye* e colaboradores que demonstrou que o aumento da expressão do *MYB* em células K562 inibiu a HbF⁴⁶.

Quanto aos resultados do EMFCP no gene *KLF1*, estes têm um comportamento semelhante quando comparados com a HU, o que não está de acordo com um estudo realizado por *Zhou* e colaboradores, que demonstram que a redução do *KLF1* induz a expressão da HbF, uma vez que se trata de um inibidor da HbF⁴⁵. Este resultado pode explicar-se pelo EMFCP não ter tido tempo suficiente para inibir este gene e induzir a expressão da HbF consequentemente.

Relativamente aos resultados obtidos do gene *BCL11A*, verifica-se a inibição da expressão

deste gene em todas as concentrações do EMFCP, tendo um comportamento semelhante à HU. Estes resultados vão ao encontro com uma revisão de *Yin* e colaboradores em que afirmam que a redução do *BCL11A* provocou um aumento da HbF, dado que estamos perante um inibidor da HbF³⁷.

Analisando os resultados do gene *BGLT3*, verifica-se que apenas a concentração de 0,5 µg/mL do EMFCP aumenta a transcrição deste gene, sendo que as restantes concentrações (50 e 100 µg/mL) provocam a diminuição da expressão. Os resultados da concentração de 0,5 µg/mL do EMFCP são idênticos aos da HU, estando de acordo com um estudo de *Ivaldi* e colaboradores que a inibição do *BGLT3* reduz a expressão da HbF em células K562, tendo em conta que é um ativador da HbF⁵⁰.

Quanto aos dados da Quercetina, verifica-se que esta provoca a diminuição da transcrição dos genes silenciadores da HbF (*MYB*, *KLF1* e *BCL11A*) em ambas as concentrações e provoca o aumento da transcrição do gene ativador da HbF (*BGLT3*). Os resultados deste composto na expressão do *MYB* são idênticos aos da HU, estando de acordo com uma revisão de *Adinew* e colaboradores que afirma que os flavonóides podem modular a função de miRNAs não codificantes¹³⁵, que por sua vez inibem o *MYB*, levando assim ao aumento da HbF¹³⁶. Já os resultados dos genes *KLF1* e *BCL11A* com este composto são diferentes dos resultados obtidos com a HU (controlo positivo). Por outro lado, os resultados obtidos para o gene *BGLT3* com este composto são idênticos aos obtidos com a HU. Estes resultados mostram que o *KLF1* e o *BCL11A* parecem atuar na mesma via de inibição da HbF, estando de acordo com estudos que referem que o *KLF1* é o principal regulador do *BCL11A*, ativando-o⁴³.

Diversos estudos afirmam que a desregulação dos miRNAs aumenta a gravidade clínica da doença das células falciformes, podendo também ser regulados de forma a aumentar a expressão da HbF⁷⁰. Assim, no presente estudo analisaram-se os padrões de expressão dos seguintes miRNAs envolvidos na regulação da HbF: *miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* e *miR-96-5p*.

Os genes alvo dos miRNAs estudados, para além de se encontrarem descritos na literatura, foram também analisados pelo portal de integração de dados miRDIP, tendo-se utilizado uma classe de pontuação de filtragem de consenso de 1-5% (Classe muito alta e alta, respetivamente)¹³⁷.

Relativamente ao *miR-486-3p*, que tem como alvo o gene *BCL11A*⁶², observa-se que todas as concentrações do EMFCP aumentam a expressão deste miRNA, sendo idêntico aos resultados da HU. Comparando a expressão deste miRNA com o seu alvo não se verifica um padrão de expressão oposto, não estando de acordo com um estudo de *Lulli* e colaboradores que demonstram que o aumento da expressão do *miR-486-3p* inibiu a expressão do *BCL11A*⁶². Os resultados obtidos podem ser justificados pelo baixo valor de

predição do *BCL11A* (0,36048357)^{137,138}, apesar de existirem fortes evidências experimentais para a validação deste¹³⁹, ou ainda, pelo facto do tempo de exposição do ensaio não ter sido suficiente.

Quanto aos resultados da Quercetina, observa-se que esta aumenta a expressão do *miR-486-3p* em ambas as concentrações, traduzindo-se numa inibição da expressão do *BCL11A*, quando comparado com o alvo, verificando-se assim um padrão de expressão oposto, confirmando desta vez os resultados no estudo de *Lulli* e colaboradores que demonstram que o aumento da expressão do *miR-486-3p* inibe a expressão do *BCL11A*⁶². A diferença do comportamento da expressão entre o EMFCP e a Quercetina pode dever-se ao facto da Quercetina ser uma molécula isolada com um composto bioativo, ao contrário do EMFCP que é constituído por diversos compostos bioativos, podendo afetar de alguma forma os resultados da expressão.

Em relação ao *miR-34a-5p*, que tem como alvo o *BCL11A*⁶⁷ e o *MYB*¹⁴⁰, observa-se que todas as concentrações do EMFCP inibem este miRNA, à semelhança da HU. Comparando a expressão deste miRNA com a expressão dos seus targets, detetam-se padrões de expressão opostos entre todas as concentrações do EMFCP do *miR-34a-5p* e do *MYB*, sendo que com a redução da expressão do miRNA verifica-se um aumento da expressão do gene *MYB*, o que, por sua vez, se correlaciona com a diminuição da expressão da HbF. Tal está em concordância com um estudo de *Ward* e colaboradores em que foi demonstrado pela primeira vez a capacidade do *miR-34a* aumentar a síntese de HbF em células K562⁶⁷.

Analisando os resultados da Quercetina, observa-se que esta diminui a expressão do *miR-34a-5p* na concentração de 0,2 µM, ao contrário da concentração de 20 µM onde há o aumento da expressão deste miRNA. Comparando com estudos da literatura, ainda não é claro de que forma a quercetina ou os seus metabolitos afetam a expressão dos miRNAs¹⁴¹. A dificuldade de associação dos padrões de expressão pode justificar-se pelos baixos valores de predição dos genes *BCL11A* e *MYB* com os valores 0,441 e 0,565, respetivamente^{137,138}.

Os resultados do *miR-210-5p*, que tem como alvo o *BCL11A*¹⁴², mostram que o EMFCP a 0,5 e 50 µg/mL diminuem a expressão do miRNA, ao contrário da HU. Já o EMFCP a 100 µg/mL aumenta a expressão deste miRNA. Estes resultados estão de acordo com um estudo de *Gasparello* e colaboradores em que os investigadores demonstram que o aumento da expressão do *miR-210* provoca a inibição do *BCL11A*, e consequentemente ao aumento da HbF¹⁴². Analisando os resultados da Quercetina, verifica-se o aumento da expressão do *miR-210-5p* em ambas as concentrações.

Comparando a expressão deste miRNA com a expressão dos seus alvos, detetam-se apenas padrões de expressão opostos entre ambas as concentrações da Quercetina, onde há o aumento da expressão do *miR-210-5p* e a diminuição da expressão do *BCL11A* neste

composto, confirmando os resultados obtidos por *Gasparello* e colaboradores¹⁴². A dificuldade de associação dos padrões de expressão no EMFCP pode justificar-se pela ausência do valor de predição deste alvo, podendo os resultados obtidos para a Quercetina ser meramente correlativos e não funcionais.

Relativamente ao *miR-32-5p*, que tem como alvo o *BCL11A*¹⁴³, verifica-se a redução da expressão deste miRNA em todas as concentrações do EMFCP, sendo idêntico aos resultados obtidos com a HU. Comparando a expressão deste miRNA com o seu alvo apenas não são detetados padrões de exposição opostos neste composto. Os resultados obtidos podem ser justificados pelo baixo valor de predição do *BCL11A* (0,633)^{137,138}.

Relativamente aos resultados da Quercetina, verifica-se que ambas as concentrações aumentam a expressão do *miR-32-5p*. Comparando a expressão deste miRNA com o seu alvo encontra-se padrões de exposição opostos em ambas as concentrações da Quercetina, em que o aumento da expressão do miRNA provoca a diminuição da expressão do *BCL11A*. Os resultados do *miR-96-5p* que tem como alvo a HbF¹⁴⁴ mostram a redução da expressão deste miRNA em todas as concentrações do EMFCP, à semelhança da HU. Comparando a expressão do *miR-96-5p* com os seus alvos (*HBG1* e *HBG2*), verifica-se um padrão de exposição oposto entre o miRNA e o *HBG2* em todas as concentrações do EMFCP. Tal está em concordância com um estudo de *Azzouzi* e colaboradores que demonstra que o aumento da expressão do miR-96 inibe a expressão da HbF¹⁴⁵.

Quanto aos dados da Quercetina, observa-se que ambas as concentrações aumentam a expressão do *miR-96-5p*, ao contrário da HU. Tal está de acordo com um estudo de *Nwaeburu* e colaboradores que afirma que a quercetina regula o *miR-96-5p* positivamente¹⁴⁶. Comparando a expressão do miRNA com os seus alvos não são detetados padrões opostos de expressão.

No presente estudo avaliaram-se assim dois compostos naturais (EMFCP e Quercetina) ao nível da indução da HbF. Na **Tabela 5.1** encontra-se representada a síntese da ação destes compostos ao nível da transcrição de vários genes codificantes e dos seus potenciais efeitos na indução da HbF.

Tabela 5.1 - Síntese dos efeitos do EMFCP e da Quercetina na transcrição de genes codificantes e a sua potencial ação na indução da HbF.

Classe	Gene	Transcrição	Efeito na HbF
Globinas	<i>HBA</i>	EMFCP aumenta	Pode inibir
		Quercetina a 20 µM inibe	Pode induzir
	<i>HBB</i>	EMFCP aumenta	-
		Quercetina inibe	
Genes supressores da HbF	<i>MYB</i>	EMFCP aumenta	Inibe
		Quercetina inibe	Induz
	<i>KLF1</i>	EMFCP transcreve o <i>KLF1</i>	Inibe
		Quercetina inibe o <i>KLF1</i>	
	<i>BCL11A</i>	EMFCP inibe o <i>BCL11A</i>	Induz
		Quercetina inibe o <i>BCL11A</i>	
Gene indutor da HbF	<i>BGLT3</i>	EMFCP a 0,5 µg/mL transcreve o <i>BGLT3</i>	
		Quercetina transcreve o <i>BGLT3</i>	

Na **Tabela 5.2** é possível observar a síntese dos resultados da ação do EMFCP e da Quercetina nos níveis de miRNAs reguladores pós-transcricionais e as suas potenciais consequências na indução da HbF.

Tabela 5.2 - Síntese dos efeitos do EMFCP e da Quercetina na expressão de miRNAs e os seus potenciais efeitos na indução da HbF.

<i>miRNA</i>	Gene(s) alvo(s)	Transcrição	Efeito na HbF
<i>miR-486-3p</i>	<i>BCL11A</i>	EMFCP inibe	Inibe
		Quercetina aumenta	Induz
<i>miR-34a-5p</i>	<i>BCL11A</i>	EMFCP inibe	Inibe
		Quercetina a 0,2 µM inibe	
		Quercetina a 20 µM aumenta	Induz
<i>miR-210-5p</i>	<i>BCL11A</i>	EMFCP a 100 µg/mL aumenta	Induz
		Quercetina aumenta	
<i>miR-32-5p</i>	<i>BCL11A</i>	EMFCP inibe	Inibe
		Quercetina aumenta	Induz
<i>miR-96-5p</i>	<i>HBG1</i> e <i>HBG2</i>	EMFCP inibe	Induz
		Quercetina aumenta	Inibe

Dado que os resultados do tratamento com o EMFCP demonstram ter efeitos semelhantes quando comparados com os da HU, especialmente a concentração de 0,5 µg/mL, coloca-se a hipótese de que estes compostos atuam na mesma via de sinalização.

Por outro lado, sugere-se que a Quercetina atue por diferentes vias de sinalização uma vez que esta aparentou ter diferentes efeitos quando comparada com os efeitos obtidos com o EMFCP e com a HU. Esta hipótese é concordante com a hipótese proposta por *Pabuprapap* e colaboradores que afirmam que a Quercetina pode induzir a HbF ao sinalizá-la através da via NRF2/ARE¹¹⁵. Na região promotora dos genes *HBG1* e *HBG2* existem elementos antioxidantes responsivos (ARE) que respondem ao stress celular interagindo com o *Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2* (NRF2)¹¹⁵. O NRF2 para além de regular a HbF, regula ainda genes antioxidantes (*HMOX1* e *NQO1*) que reduzem o stress oxidativo e diminuem a patofisiologia da doença das células falciformes¹⁴⁷.

A Quercetina, um composto de polifenóis de stress antioxidante, induz a expressão do gene *NQO1* através desta via de sinalização, o que consequentemente induz a HbF.

Assim, a possibilidade do EMFCP e a HU atuarem na mesma via e o facto de que a Quercetina aparente aumentar a transcrição de genes ativadores da HbF e inibir a transcrição de genes inibidores da HbF leva-nos a afirmar que estes compostos têm potencial para o tratamento das β-hemoglobinopatias futuramente.

6.1 Conclusões

No presente estudo analisaram-se os efeitos de dois compostos naturais (EMFCP e Quercetina) na expressão génica das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*), de genes reguladores da HbF (*MYB*, *KLF1*, *BCL11A* e *BGLT3*) e de miRNAs reguladores (*miR-486-3p*, *miR-34a-5p*, *miR-210-5p*, *miR-32-5p* e *miR-96-5p*).

Em suma, obtiveram-se os seguintes resultados:

- A proliferação celular em células expostas a estes compostos apenas é afetada no tratamento com Quercetina a 20 μ M;
- Os compostos estudados não apresentam sinais de citotoxicidade;
- Todas as concentrações do EMFCP afetam a expressão da HbF, porém os resultados obtidos à concentração de 0,5 μ g/mL são os estatisticamente mais significativos;
- Ambas as concentrações da Quercetina utilizadas neste estudo afetam a transcrição da HbF, sendo que a concentração de 20 μ M aparenta ter um maior efeito na expressão da HbF. Contudo, os resultados obtidos na concentração de 0,2 μ M são os estatisticamente mais significativos;

Através deste projeto preliminar é possível ter outra perspetiva sobre o potencial de compostos naturais como potenciais moduladores da HbF. Os resultados obtidos de ambos os compostos no aumento da expressão de genes ativadores da HbF e na inibição dos inibidores deste gene trazem mais possibilidades na terapêutica das hemoglobinopatias, no sentido de ser um futuro método de tratamento mais acessível e eficaz, quando comparado com os métodos existentes.

6.2 Perspetivas futuras

Diversos estudos demonstram o potencial dos miRNAs no tratamento das hemoglobinopatias, uma vez que estes são capazes de se ligarem aos repressores da HbF, inibindo-os¹³. Contudo, são necessários mais estudos concretos que avaliem os mecanismos moleculares da ação dos miRNAs bem como a identificação dos seus alvos.

Num estudo futuro, poderá ser interessante a utilização de outras concentrações dos compostos estudados e de maiores tempos de exposição, de modo a identificar-se potenciais doses seguras e eficazes na indução da HbF.

Poderão também analisar-se quais os componentes em concreto do EMFCP que provocam a transcrição da HbF. O isolamento destes compostos poderia ser realizado através de diferentes técnicas cromatográficas, sendo a cromatografia em coluna a aberta a mais utilizada no isolamento dos componentes de extratos, seguido de testes biológicos¹⁴⁸.

Além disso, poderá também estudar-se quais os componentes em concreto do EMFCP que provocam a transcrição da HbF.

Capítulo 7 - Referências bibliográficas

1. Kumar Verma H, Lakkakula S, V.K.S. Lakkakula B. Retrospection of the effect of hydroxyurea treatment in patients with sickle cell disease. *Acta Haematol Pol.* 2018;49(March):1–8. DOI: 10.2478/ahp-2018-0001
2. Nicolau M. Hemoglobinopatias: Diagnóstico modificador da gravidade clínica da anemia das células falciformes: O exemplo dos acidentes vasculares cerebrais. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz; 2017. Disponível em: [http://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/13995/1/Rua%2C Sara Raquel Carvalho.pdf](http://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/13995/1/Rua%2C%20Sara%20Raquel%20Carvalho.pdf)
3. Gameiro M da S. Caracterização molecular e funcional de variantes alfa de hemoglobina identificadas no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Universidade de Coimbra; 2012.
4. Lavouras L. Hemoglobinopatias: Diagnóstico Laboratorial e a sua importância. Universidade de Lisboa; 2015.
5. Kukreja A, Wadhwa N, Tiwari A. Therapeutic role of natural agents in beta-thalassemia: A review. *J Pharm Res.* 2013;6(9):954–9. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.10.002
6. Iftikhar F, Rahman S, Behroz M, Khan N, Khan K. In Vitro and In Vivo Studies for the Investigation of γ -Globin Gene Induction by *Adhatoda vasica*: A Pre-Clinical Study of HbF Inducers for β -Thalassemia. 2022;13(March):1–16. DOI: 10.3389/fphar.2022.797853
7. Costa SN, Madeira S, Sobral MA. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *Rev Port Med Geral Fam.* 2016;32:416–24.
8. Dreuzy E de, Bhukhai K, Leboulch P, Payen E. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomed J.* 2016;39(1):24–38. DOI: 10.1016/j.bj.2015.10.001
9. Musharraf SG, Iqbal A, Ansari SH, Par S. β -Thalassemia Patients Revealed a Significant Change of Untargeted Metabolites in Comparison to Healthy Individuals. *Nature.* 2017;(June 2016):1–10. DOI: 10.1038/srep42249
10. Starlard-Davenport A, Fitzgerald A, Pace BS. Exploring epigenetic and microRNA approaches for γ -globin gene regulation. *Exp Biol Med.* 2021;246(22):2347–57. DOI: 10.1177/15353702211028195
11. Yat N, Ng H, Ko CH. Natural Remedies for the Treatment of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Anemia — Current Status and Perspectives in Fetal Hemoglobin Reactivation. *Int Sch Res Not.* 2014;2014. DOI: 10.1155/2014/123257

12. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2018;376. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X
13. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):1–14. DOI: 10.1101/cshperspect.a011643
14. Paikari A, Sheehan VA. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2018;180(2):189–200. DOI: 10.1111/bjh.15021
15. Kaddam L, Fdlealmula I, Eisawi OA, Abdelrazig HA, Elnimeiri M, Lang F, et al. Gum Arabic as fetal hemoglobin inducing agent in sickle cell anemia ; in vivo study. *BMC Hematol*. 2015;15–19. DOI: 10.1186/s12878-015-0040-6
16. Imaga NA. Phytomedicines and Nutraceuticals :Alternative Therapeutics for Sickle Cell Anemia. *Sci J*. 2013;2013:12. DOI: 10.1155/2013/269659
17. Sonati M de F, Costa FF. The genetics of blood disorders : hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84:40–51. DOI: 10.2223/JPED.1802x
18. Helman R, Cançado RD, Olivatto C. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme: experiência de um centro em São Paulo. *Einstein (São Paulo)*. 2011;9(2):160–4. DOI: 10.1590/s1679-45082011ao2003
19. Fathallah H, Atweh GF. Induction of Fetal Hemoglobin in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2006;58–62. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.58
20. Khalyfa A, Ahamed A, Akbarpour M, Romana M, Zhang C. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes. *Br J Heamatology*. 2016;176:786–98. DOI: 10.1111/bjh.14104
21. Tanhehco YC. Gene therapy for hemoglobinopathies. *Transfus Apher Sci*. 2021;60(1):103061. DOI: 10.1016/j.transci.2021.103061
22. Statistics NC for H. March of Dimes - Peristats. *March of Dimes*. White Plains, New York; 2013. p. 76. Disponível em: <http://www.marchofdimes.org/peristats/>
23. Goonasekera HW, Paththinige CS, Dissanayake VHW. Population screening for hemoglobinopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018;19:355–80. DOI: 10.1146/annurev-genom-091416-035451
24. Diepstraten ST, Hart AH. Modelling human haemoglobin switching. *Blood Rev*. 2019;33:11–23. DOI: 10.1016/j.blre.2018.06.001
25. Cominal JG. Mutações causadoras de β -talassemia em Ribeirão Preto-SP: identificação e correlação com o fenótipo da doença. *Universidade de São Paulo*; 2015.
26. Joughin BA, Cheung E, Karuturi RKM, Saez-Rodriguez J, Lauffenburger DA, Liu ET. Cellular Regulatory Networks. In: *Systems Biomedicine*. Elsevier Inc.; 2010. p. 57–108. DOI: 10.1016/B978-0-12-372550-9.00004-3

27. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of erythroid Kruppel-like factor in human γ - to β -globin gene switching. *J Biol Chem.* 1995;270(4):1955–9. DOI: 10.1074/jbc.270.4.1955
28. Huang P, Keller CA, Giardine B, Grevet JD, Davies JOJ, Hughes JR, et al. Comparative analysis of three-dimensional chromosomal architecture identifies a novel fetal hemoglobin regulatory element. *Genes Dev.* 2017;31(16):1704–13. DOI: 10.1101/gad.303461.117
29. Wienert B, Martyn GE, Funnell APW, Quinlan KGR, Crossley M. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. *Trends Genet.* 2018;34(12):927–40. DOI: 10.1016/j.tig.2018.09.004
30. Levings PP, Bungert J. The human β -globin locus control region. A center of attraction. *Eur J Biochem.* 2002;269(6):1589–99. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2002.02797.x
31. Eridani S, Avemaria F, Mosca A. Reactivation of fetal hemoglobin in thalassemia and sickle cell disease. *Thalass Reports.* 2014;4(2):55–61. DOI: 10.4081/thal.2014.2196
32. Fan AX, Hossain MA, Stees J, Gavrilova E, Bungert J. Regulation of erythroid cell differentiation by transcription factors, chromatin structure alterations, and noncoding RNA. In: *Epigenetic Gene Expression and Regulation.* Elsevier Inc.; 2015. p. 237–64. DOI: 10.1016/B978-0-12-799958-6.00011-1
33. Vrettou C, Kakourou G, Mamas T, Traeger-Synodinos J. Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(March):74–82. DOI: 10.1111/ijlh.12823
34. Pourfarzad F, Aghajani-refah A, deBoer E, TenHave S, BrynvanDijk T, Kheradmandkia S, et al. Locus-specific proteomics by TChP: Targeted chromatin purification. *Cell Rep.* 2013;4(3):589–600. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.07.004
35. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: New therapeutic opportunities. *Blood.* 2011;117(15):3945–53. DOI: 10.1182/blood-2010-11-316893
36. Zakaria NA, Islam MA, Abdullah WZ, Bahar R, Yusoff AAM, Wahab RA, et al. Epigenetic insights and potential modifiers as therapeutic targets in β -thalassemia. *Biomolecules.* 2021;11(5). DOI: 10.3390/biom11050755
37. De Martino M, Sessa R, Rosaria Storino M, Giuliano M, Trombetti S, Catapano R, et al. Transcriptional Repressors of Fetal Globin Genes as Novel Therapeutic Targets in Beta-Thalassemia. In: *Beta Thalassemia.* 2020. p. 1–13. DOI: 10.5772/intechopen.90762
38. Yin J, Xie X, Ye Y, Wang L, Che F. BCL11A: A potential diagnostic biomarker and therapeutic target in human diseases. *Biosci Rep.* 2019;39(11):1–13. DOI:

10.1042/BSR20190604

39. Kumar R, Yadav R, Mishra S, Singh MPSS, Gwal A, Bharti PK, et al. Krüppel-like factor 1 (KLF1) gene single nucleotide polymorphisms in sickle cell disease and its association with disease-related morbidities. *Ann Hematol.* 2021;100(2):365–73. DOI: 10.1007/s00277-020-04381-z
40. UniProt. UniProtKB - Q13351 (KLF1_HUMAN). Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q13351>
41. PhosphoSitePlus. Krueppel-like factor 1. Disponível em: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=9096&showAllSites=true>
42. Salmon M. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Krüppel-Like Transcription Factors. *Gene Expr Phenotypic Trait.* 2020;2. DOI: 10.5772/intechopen.91652
43. Kumar R, Yadav R, Mishra S, Singh MPSS, Gwal A, Bharti PK, et al. Krüppel-like factor 1 (KLF1) gene single nucleotide polymorphisms in sickle cell disease and its association with disease-related morbidities. *Ann Hematol.* 2021;100(2):365–73. DOI: 10.1007/s00277-020-04381-z
44. Siatecka M, Bieker JJ. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood.* 2011;118(8):2044–54. DOI: 10.1182/blood-2011-03-331371
45. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching. Vol. 42, *Nature Genetics.* Nature Publishing Group; 2010. p. 742–4. DOI: 10.1038/ng.637
46. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood.* 2011;118(1):19–27. DOI: 10.1182/blood-2011-03-325258
47. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11346–51. DOI: 10.1073/pnas.0611393104
48. Wang X, Angelis N, Thein SL. MYB – A regulatory factor in hematopoiesis. *Gene.* 2018;665:6–17. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.065
49. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajani-refah A, Pourfarzad F, Ijcken W Van, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. 2014;124(4). DOI: 10.1172/JCI71520DS1
50. Ivaldi MS, Diaz LF, Chakalova L, Lee J, Dean A. Fetal γ -globin genes are regulated by the BGLT3 long non-coding RNA locus. 2018; DOI: 10.1182/blood-2018-07-862003
51. Jesus Moreira dos Santos RA. Genetic variations in the β -globin cluster: influence on levels of fetal hemoglobin. Universidade do Porto; 2019.
52. Delgado M, Ginete C, Miranda A, Brito M. Genotypic Diversity among Angolan

- Children with Sickle Cell Anemia. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; DOI: 10.3390/ijerph18105417
53. Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions , and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14(1):42–54. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.09.006
 54. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M, Mohammadi-Asl J, et al. MicroRNA expression in β -Thalassemia and sickle cell disease: A role in the induction of fetal hemoglobin. *Cell J*. 2016;17(4):583–92. DOI: 10.22074/cellj.2016.3808
 55. Aguiar B, Francisco C, Nonaka W, Freitas RDA, Souza LB De, Pinto LP. MicroRNAs – Biogênese , funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. *Odontol Clin-Cient*. 2010;9(2):105–9.
 56. Ricarte Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(6):1102–7.
 57. Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA–mRNA Interactome. *Front Genet*. 2019;10. DOI: 10.3389/fgene.2019.00933
 58. Souza Carrocini GC. Elementos de regulação e microRNAs envolvidos na modulação dos níveis de Hemoglobina Fetal em indivíduos portadores de beta-hemoglobinopatias [Internet]. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/127764>
 59. Ha T-Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. *Immune Netw*. 2011;11(6):309. DOI: 10.4110/in.2011.11.6.309
 60. Tayebi B, Abrishami F, Alizadeh S, Minayi N, Mohammadian M, Soleimani M, et al. Modulation of microRNAs expression in hematopoietic stem cells treated with sodium butyrate in inducing fetal hemoglobin expression. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2017;45(1):146–56. DOI: 10.3109/21691401.2016.1138487
 61. Bianchi N, Zuccato C, Finotti A, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Involvement of miRNA in erythroid differentiation. *Epigenomics*. 2012;4(1):51–65. DOI: 10.2217/epi.11.104
 62. Lulli V, Morsilli O, Cianciulli P, Gabbianelli M, Testa U, Giuliani A, et al. MicroRNA-486-3p Regulates α -Globin Expression in Human Erythroid Cells by Directly Modulating BCL11A. 2013;8(4):1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0060436.t002
 63. Penglong T, Saensuwanna A, Kocharoenwat J, Boorintaragot W, Fupongsiriphan S, Srinoun K. MiR-144 Regulates Hemoglobin Expression in Human Erythroid Cell Line. 2019;17(11):1221–9. DOI: 10.48048/wjst.2020.10712

64. Eltaweel NH, Elkamah GY, Khairat R, Abd H, Atia E, Amr KS. Epigenetic effects toward new insights as potential therapeutic target in B- thalassemia. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021. DOI: 10.1186/s43141-021-00138-x
65. Starlard A, Qingqing D, Pace BS. Targeting Genetic Modifiers of HBG Gene Expression in Sickle Cell Disease: The miRNA Option. *Mol Diagn Ther*. 2022;(0123456789). DOI: 10.1007/s40291-022-00589-z
66. Zhang L, Liao Y, Tang L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;5:1–13. DOI: 10.1186/s13046-019-1059-5
67. Ward CM, Li B, Pace BS. Stable expression of miR-34a mediates fetal hemoglobin induction in K562 cells. *Exp Biol Med*. 2016;1–11. DOI: 10.1177/1535370216636725
68. Nam TG, Lee J, Walker JR, Brinker A, Cho CY, Schultz PG. Identification and characterization of small-molecule inducers of fetal hemoglobin. *ChemMedChem*. 2011;6(5):777–80. DOI: 10.1002/cmcd.201000505
69. Rong-quan H, Wei-luan C, Wei-ning C, Jia-yi L, Mei-wei L, Ting-qing G, et al. Clinical Significance of miR-210 and its Prospective Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer: Evidence from Gene Expression Omnibus and the Cancer Genome Atlas Data Mining with 2763 Samples and Validation via Real-Time Quantitative PCR. *Cell Physiol Biochem*. 2018;925–52. DOI: 10.1159/000488823
70. Cyrus C. The role of miRNAs as Therapeutic Tools in Sickle Cell Disease. *Med*. 2021;57(10). DOI: 10.3390/medicina57101106
71. Wang H, Chen M, Xu S, Pan Y, Zhang Y, Huang H, et al. Abnormal regulation of microRNAs and related genes in pediatric β -thalassemia. *Wiley*. 2021;(May):1–13. DOI: 10.1002/jcla.23945
72. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, Piazzini M, Focaccia E, Blalock W, et al. MiRNA-210 : A Current Overview. *Anticancer Res*. 2017;6521:6511–21. DOI: 10.21873/anticancer.12107
73. Sun K, Huang Y, Palanisamy K, Chang S. Reciprocal regulation of γ -globin expression by exo-miRNAs :Relevance to γ -globin silencing in β -thalassemia major. *Sci Rep*. 2017;(February):1–15. DOI: 10.1038/s41598-017-00150-7
74. Yuan P, Tang C, Chen B, Lei P, Song J, Xin G, et al. MiR-32-5p suppresses the proliferation and migration of pancreatic adenocarcinoma cells by targeting TLDC1. *Mol Med Rep*. 2021;24(5):1–9. DOI: 10.3892/MMR.2021.12392
75. hsa-miR-32-5p [Internet]. miRTarBase. Disponível em: https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/search.php?opt=search_box2&sql=SELECT:a.id,a.species_mirna,a.species_target,a.mirna_name,a.gene_symbol,::a.reporter_assay,a.western_blot,a.qpcr,a.microarray,a.ngs,a.psilac,a.othe

r,a.clipseq,a.sum_evidences,a.papers::FROM:miRT_20210826_processed:a,::Entrez.
gene_info:b::WHERE:a.mirna_name:like:~%25miR-32-
5p%25~:AND::a.target_gID=b.gene_id:AND::a.experiment!=~Review~:AND::a.experi
ment:is:not:null:AND::a.mature_acc:is:not:null:AND::a.target_gID:is:not:null:&kw=miR-
32-5p&sort=id&order=asc&page=4

76. RNAcentral. Homo sapiens (human) hsa-miR-96-5p. Disponível em: <https://rnacentral.org/rna/URS000016FF9C/9606>
77. MSD M. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. 2020. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/imunologia-distúrbios-alérgicos/transplante/transplante-de-células-tronco-hematopoiéticas>
78. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sick cell disease. *Lancet*. 2017;390(10091):311–23. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9
79. Ikawa Y, Miccio A, Magrin E, Kwiatkowski JL, Rivella S, Cavazzana M. Gene therapy of hemoglobinopathies: Progress and future challenges. *Hum Mol Genet*. 2019;28(R1):R24–30. DOI: 10.1093/hmg/ddz172
80. Cavazzana M, Mavilio F. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hum Gene Ther*. 2018;29(10):1106–13. DOI: 10.1089/hum.2018.122
81. Alves Pinto PC, Pellegrini Braga JA, Nunes dos Santos AM. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(6):668–73. DOI: 10.1590/s0104-42302011000600014
82. Brendel C, Williams DA. Current and future gene therapies for hemoglobinopathies. *Curr Opin Hematol*. 2020;27(3):149–54. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000581x
83. Kassa T, Wood F, Brad Strader M, Alayash AI. Antisickling drugs targeting β Cys93 reduce iron oxidation and oxidative changes in sickle cell hemoglobin. *Front Physiol*. 2019;10(JUL). DOI: 10.3389/fphys.2019.00931
84. Matte A, Zorzi F, Mazzi F, Federti E, Olivieri O, De Franceschi L. New therapeutic options for the treatment of sickle cell disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1):1–12. DOI: 10.4084/mjhid.2019.002
85. Antwi-Boasiako C, Frimpong E, Ababio GK, Dzudzor B, Ekem I, Gyan B, et al. Sickle Cell Disease: Reappraisal of the Role of Foetal Haemoglobin Levels in the Frequency of Vaso-Occlusive Crisis. *Ghana Med J*. 2015;49(2):102–6. DOI: 10.4314/gmj.v49i2.7
86. Watson J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. Vol. 215, *The American journal of the medical sciences*. 1948. p. 419–23. DOI: 10.1097/00000441-194804000-00008
87. Carrocini GCS, Ondei LS, Zamaro PJA, Bonini-Domingos CR. Evaluation of HPFH and $\delta\beta$ -thalassemia mutations in a Brazilian group with high Hb F levels. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):3213–9. DOI: 10.4238/2011.December.21.3

88. Fetal Hemoglobin Quantitative Trait Locus 1. Omim. 2021. Disponível em: <https://www.omim.org/entry/141749>
89. Shaukat I, Paudel A, Yassin S, Höti N, Mustafa S. Blessing in disguise; a case of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2018;8(6):380–1. DOI: 10.1080/20009666.2018.1536241
90. Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, Rachmilewitz EA. Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica.* 2013;98. DOI: 10.3324/haematol.2012.066845
91. Kapor S, Vladan Č, Santibanez JF. Mechanisms of Hydroxyurea-Induced Cellular Senescence: An Oxidative Stress Connection? *Oxid Med Cell Longev.* 2021. DOI: 10.1155/2021/7753857
92. Drugs.com. Hydroxyurea. Disponível em: <https://www.drugs.com/mtm/hydroxyurea.html>
93. Montalembert M de, Voskaridou E, Oevermann L, Cannas G, Habibi A, Loko G, et al. Real-Life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: Results from the prospective ESCORT-HU cohort study. *Am J Hematol.* 2021;96(10):1223–31. DOI: 10.1002/ajh.26286
94. Musallam KM, Taher AT, Cappellini MD, Sankaran VG. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with β -thalassemia. *Blood.* 2013;121(12):2199–212. DOI:10.1182/blood-2012-10-408021
95. Agrawal RK, Patel RK, Shah V, Nainiwal L, Trivedi B. Hydroxyurea in sickle cell disease: Drug review. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2014;30(2):91–6. DOI: 10.1007/s12288-013-0261-4
96. Chou Y-C, Chen R-L, Lai Z-S, Song J-S, Chao Y-S, Shen C-KJ. Pharmacological Induction of Human Fetal Globin Gene in Hydroxyurea-Resistant Primary Adult Erythroid Cells. *Mol Cell Biol.* 2015;35(14):2541–53. DOI: 10.1128/mcb.00035-15
97. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood.* 2010;115(26):5300–11. DOI: 10.1182/blood-2009-04-146852
98. Okpuzor J, Adebesein O, Ogbunugafor H, Amadi I. The potential of medicinal plants in sickle cell disease control : A review. *Int J Biomed Heal Sci.* 2008;4(2):47–55.
99. Maia MF. Propriedades biológicas das sementes da papaia (*Carica papaya* L.): Valorização de um resíduo alimentar. *Egitania Scientia.* Universidade Fernando Pessoa; 2018.
100. Anuar NS, Zahari SS, Taib IA, Rahman MT. Effect of green and ripe *Carica papaya* epicarp extracts on wound healing and during pregnancy. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(7):2384–9. DOI: 10.1016/j.fct.2008.03.025
101. Vuong Q V., Hirun S, Roach PD, Bowyer MC, Phillips PA, Scarlett CJ. Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica*

- papaya leaf aqueous extracts. *J Herb Med.* 2013;3(3):104–11. DOI:10.1016/j.hermed.2013.04.004
102. Nugroho A, Heryani H, Choi JS, Park HJ. Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017;7(3):208–13. DOI: 10.1016/j.apjtb.2016.12.009
 103. Vij T, Prashar Y. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2015;5(1):1–6. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60617-4
 104. Khaled NR, Gerda F. Anticancer Activity of *Carica papaya* Extracts in vitro and Phytochemical Analysis. *Greener J Pharm Pharmacol.* 2013;1(1):001–5. DOI: 10.15580/gjpp.2013.1.eb08091310
 105. Amzad Hossain M, Hitam S, Hadidja Ibrahim Ahmed S. Pharmacological and toxicological activities of the extracts of papaya leaves used traditionally for the treatment of diarrhea. *J King Saud Univ - Sci.* 2020;32(1):962–9. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.07.006
 106. Singh SP, Kumar S, Mathan S V., Tomar MS, Singh RK, Verma PK, et al. Therapeutic application of *Carica papaya* leaf extract in the management of human diseases. *DARU, J Pharm Sci.* 2020;28(2):735–44. DOI: 10.1007/s40199-020-00348-7
 107. O “fruto dos anjos”. Quatro motivos para comer papaia todos os dias [Internet]. *Lifestyle ao minuto.* Disponível em: <https://www.noticiasominuto.com/lifestyle/1471994/o-fruto-dos-anjos-quatro-motivos-para-comer-papaia-todos-os-dia>
 108. Papaya Tree. Fast Growing Trees. Disponível em: <https://www.fast-growing-trees.com/products/papaya-tree>
<https://www.fast-growing-trees.com/products/papaya-tree>
 109. Naiho A, Okonkwor B, Okoukwu C. Anti-Sickling and Membrane Stabilizing Effects of *Carica papaya* Leaf Extract. *Br J Med Med Res.* 2015;6(5):484–92. DOI: 10.9734/bjmmr/2015/14608
 110. Khawory MH, Subki MFM, Shahudin MA, Sofian NHAS, Latif NH, Salin NH, et al. Physico-Chemicals Characterization of Quercetin from the *Carica papaya* Leaves by Different Extraction Techniques. *Open J Phys Chem.* 2021;11(03):129–43. DOI: 10.4236/ojpc.2021.113007
 111. Ay M, Charli A, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Quercetin. *Nutraceuticals.* 2016;32:447–52. DOI: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00032-2
 112. Quercetin. Disponível em: <https://sc04.alicdn.com/kf/He85bbae550844941a8be1f6db2bf9da8p.png>
 113. Jaffe R, Mani J. Polyphenolics evoke healing responses: Clinical evidence and role of predictive biomarkers - Chapter 29. In: *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human*

- Health and Disease. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2018. p. 403–13. DOI: 10.1016/B978-0-12-813006-3.00029-5
114. Horwitz RJ. The Allergic Patient - Chapter 30. In: Integrative Medicine: Fourth Edition. Fourth Edi. Elsevier Inc.; 2018. p. 300-309.e2. DOI: 10.1016/B978-0-323-35868-2.00030-X
 115. Pabuprapap W, Wassanatip Y, Khetkam P, Chaichompoo W, Kunkaewom S, Senabud P, et al. Quercetin analogs with high fetal hemoglobin-inducing activity. *Med Chem Res.* 2019;28(10):1755–65. DOI: 10.1007/s00044-019-02412-7
 116. Muhammad A, Waziri AD, Forcados GE, Sanusi B, Sani H, Malami I, et al. Antisickling Effects of Quercetin may be Associated with Modulation of Deoxyhaemoglobin, 2, 3-bisphosphoglycerate mutase, Redox Homeostasis and Alteration of Functional Chemistry in Human Sickle Erythrocytes. *Ann Sci Technol.* 2019;4(1):38–47. DOI: 10.2478/ast-2019-0005
 117. What are the benefits of quercetin?. *Medical New Today.* Disponível em: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/324170#side-effects-and-risks>
 118. Rich GT, Buchweitz M, Winterbone MS, Kroon PA, Wilde PJ. Towards an understanding of the low bioavailability of quercetin: A study of its interaction with intestinal lipids. *Nutrients.* 2017;9(2). DOI: 10.3390/nu9020111
 119. Quercetin - Uses, Side Effects, and More [Internet]. WebMD. Disponível em: <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-294/quercetin>
 120. Koeffler HP, Golde DW. Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. *Blood J.* 1980;56(3):344–50. DOI: 10.1182/blood.V56.3.344.344
 121. ATCC. K-562 [Internet]. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-243>
 122. Gambari R. The human erythroleukemia K562 cell culture system for identification of inducers of fetal hemoglobin. *Minerva Biotechnol.* 2003;15(2):123–128.
 123. Adilović A, Mahmutović L, Huseinbegović E, Suljagić M. Characterization of solvents and optimization of stability and solubility of bioactive compounds used in lymphoma cell culture treatments. *Period Eng Nat Sci.* 2020;8(4):2553–63. DOI: 10.21533/pen.v8i4.1746
 124. Quantificação de ácido nucléico [Internet]. Disponível em: https://stringfixer.com/pt/Quantification_of_nucleic_acids
 125. Lopes JR de S, Pinheiro YVF, Magalhães AG, Campos FL. Comparação de protocolos de extração de DNA em Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.)/. *Brazilian J Dev.* 2021;7(8):77786–806. DOI: 10.34117/bjdv7n8-137
 126. Farmacêuticas FDEC, Cobaiashi DM. Avaliação da metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos : aspectos de produção , processamento e amostragem. Universidade de

São Paulo; 2012.

127. Ghazi T, Arumugam T, Foolchand A, Chuturgoon AA. The Impact of Natural Dietary Compounds and Food-Borne Mycotoxins on DNA Methylation and Cancer. *Cells*. 2020;9(9). DOI: 10.3390/cells9092004
128. Pace BS, Qian XH, Sangerman J, Ofori-Acquah SF, Baliga BS, Han J, et al. p38 MAP kinase activation mediates γ -globin gene induction in erythroid progenitors. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1089–96. DOI: 10.1016/S0301-472X(03)00235-2
129. Mukherjee M, Rahaman M, Ray SK, Shukla PC, Dolai TK, Chakravorty N. Revisiting fetal hemoglobin inducers in beta-hemoglobinopathies: a review of natural products, conventional and combinatorial therapies. *Mol Biol Rep*. 2022;49(3):2359–73. DOI: 10.1007/s11033-021-06977-8
130. Ismail Z, Halim SZ, Abdullah NR, Afzan A, Abdul Rashid BA, Jantan I. Safety Evaluation of Oral Toxicity of *Carica papaya* Linn. Leaves: A Subchronic Toxicity Study in Sprague Dawley Rats. *Hindawi Publ Corp*. 2014;2014:1–10. DOI: 10.1155/2014/741470
131. Torello CO, Alvarez MC, Olalla Saad ST. Polyphenolic flavonoid compound quercetin effects in the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Molecules*. 2021;26(19). DOI: 10.3390/molecules26195781
132. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, et al. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci Rep*. 2016;6(April 2015):1–13. DOI: 10.1038/srep24049
133. Cyrus C, Vatte C, Borgio JF, Al-Rubaish A, Chathoth S, Nasserullah ZA, et al. Existence of HbF Enhancer Haplotypes at HBS1L-MYB Intergenic Region in Transfusion-Dependent Saudi β -Thalassemia Patients. *Biomed Res Int*. 2017;2017. DOI: 10.1155/2017/1972429
134. Zhu X, Li B, Pace BS. NRF2 mediates γ -globin gene regulation and fetal hemoglobin induction in human erythroid progenitors. *Haematologica*. 2017;102(8):e285–8. DOI: 10.3324/haematol.2016.160788
135. Adinew GM, Taka E, Mendonca P, Messeha SS, Soliman KFA. The anticancer effects of flavonoids through miRNAs modulations in triple-negative breast cancer. *Nutrients*. 2021;13(4). DOI: 10.3390/nu13041212
136. Habara AH, Shaikho EM, Steinberg MH. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: The Arab-Indian Haplotype and New Therapeutic Agents. *Am J Hematol*. 2017;92(11):1233–42. DOI: 10.1002/ajh.24872
137. mirDIP: microRNA Data Integration Portal [Internet]. Disponível em: <https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>

138. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay M, et al. MirDIP 4.1 - Integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D360–70. DOI: 10.1093/nar/gkx1144
139. miRtar Base [Internet]. Disponível em: https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/search.php
140. Navarro F, Gutman D, Meire E, Cáceres M, Rigoutsos I, Bentwich Z, et al. miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood.* 2009;114(10):2181–92. DOI: 10.1182/blood-2009-02-205062
141. Akbari Kordkheyli V, Khonakdar Tarsi A, Mishan MA, Tafazoli A, Bardania H, Zarpou S, et al. Effects of quercetin on microRNAs: A mechanistic review. *J Cell Biochem.* 2019;120(8):12141–55. DOI: 10.1002/jcb.28663
142. Gasparello J, Fabbri E, Bianchi N, Breveglieri G, Zuccato C, Borgatti M, et al. BCL11A mRNA targeting by miR-210: A possible network regulating γ -globin gene expression. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12). DOI: 10.3390/ijms18122530
143. miRTarBase - #MIRT028335 [Internet]. Disponível em: https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/detail.php?mirtid=MIRT028335
144. Human | miR-96-5p/1271-5p [Internet]. Disponível em: https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_80/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-96-5p
145. Azzouzi I, Moest H, Winkler J, Fauchère JC, Gerber AP, Wollscheid B, et al. MicroRNA-96 directly inhibits γ -Globin expression in human erythropoiesis. *PLoS One.* 2011;6(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0022838
146. Nwaeburu CC, Abukiwan A, Zhao Z, Herr I. Quercetin-induced miR-200b-3p regulates the mode of self-renewing divisions in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2017;16(1):1–10. DOI: 10.1186/s12943-017-0589-8
147. Zhu X, Oseghale AR, Nicole LH, Li B, Pace BS. Mechanisms of NRF2 activation to mediate fetal hemoglobin induction and protection against oxidative stress in sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 2019;244(2):171–182. DOI: 10.1177/1535370219825859
148. Filho VC, Yunes RA. Estrategias for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. *Quim Nova.* 1998;21(1):99–105. DOI: 10.1590/s0100-40421998000100015

Anexo 1: Descongelamento celular

Procedimento

1. Aquecer o meio de cultura a 37°C na estufa, enquanto se ligam os raios UV na câmara de biossegurança (durante 15 a 25 minutos);
2. Descongelar as células na estufa a 37°C (não usar banho-maria para se evitar contaminações);
3. Passar as células do criotubo para um Falcon de 15 mL com uma pipeta P1000;
4. Colocar lentamente (gota a gota) 10 mL de meio no Falcon;
5. Centrifugar o Falcon durante 5 minutos a 1500 rpm;
6. Descartar o sobrenadante (manter o pellet celular) e colocar 5 mL de meio no Falcon de 15 mL, fazendo *up and down* lentamente;
7. Colocar num frasco de 75 cm² (T-75) - 10 mL de meio e 5 mL de células do Falcon de 15 mL previamente preparado;
8. Após homogeneização para distribuição uniforme das células, colocar o frasco de 75 cm² (T-75) na estufa a 37°C e com 5% de CO₂;
9. Após 24 a 48 horas, verificar a confluência celular e realizar a mudança do meio.

Anexo 2: Passagem de células em suspensão

Procedimento

1. Observar ao microscópio invertido a confluência das células;
2. Resuspender células no meio e transferir para um Falcon de 15 mL;
3. Centrifugar tubo a 1500 rpm durante 5 min.;
4. Descartar sobrenadante e colocar cerca de 10 mL de PBS;
5. Centrifugar tubo a 1500 rpm durante 5 min.;
6. Descartar PBS e colocar cerca de 2-3 mL de meio no Falcon;
7. Num frasco de 75 cm² (T-75) colocar 10 mL de meio novo;
8. Retirar do Falcon 100 µL para um *eppendorf* para proceder-se à contagem de células;
9. Colocar o resto do conteúdo do Falcon para o novo frasco, agitar ligeiramente, visualizar no microscópio e por fim colocar as células na estufa.

Anexo 3: Contagem de células com azul de tripano

Procedimento

1. Remover 100 µL da suspensão celular para um *eppendorf*;
2. Adicionar igual volume da solução de azul tripano a 0,4% (fator de diluição = 2) e homogeneizar através da pipetagem;
3. Bafejar a lamela para a hidratar, colocando-a sobre a câmara de Neubauer, em movimentos suaves e com ligeira pressão, para que ocorra adesão;
4. Pipetar a solução preparada entre a lamela e a câmara (cerca de 5 a 10 µL), visualizando a câmara no microscópio invertido com ampliação de 20x;
5. Contar o número de células viáveis (vistas como células brilhantes, sem tonalidade e com membrana intacta) e de células não viáveis (tom azulado), anotando o número do quadrante no qual se contam;
6. Calcular a taxa de proliferação e percentagem de viabilidade celular através das seguintes equações:

10^4

- Contagem de células viáveis (células/mL) =
$$= \frac{\text{Número de células viáveis em cada quadrante}}{\text{Número de quadrantes onde se contaram as células viáveis}} \times \text{Fator diluição (2)} \times 10^4$$

*Sabendo que a câmara de Neubauer está dividida em 9 quadrados principais, cada um com $0,1\text{mm}^2$ de área e que a profundidade desta é de $0,1\text{mm}$, cada um dos quadrados onde se contam as células terá $0,1\text{mm}^3$ pelo que o fator de conversão para mL é de 10000 (ou 10^4).

- Taxa de proliferação = $\frac{\text{Contagem de células viáveis}}{\text{Número inicial de células em cada poço } (1 \times 10^5)}$
- Percentagem de viabilidade (%) = $\frac{\text{Número total de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$

Anexo 4: Extração de RNA

Procedimento

1. Descongelar as amostras celulares e centrifugar 5 minutos a 2000 rpm. Remover cuidadosamente o sobrenadante.
2. Adicionar **700 µL** de **QIAzol Lysis Reagent**. Vortexar ou pipetar para cima e para baixo várias vezes.
3. Homogeneizar num vortex durante 1 minuto.
4. Incubar o tubo contendo o homogeneizado à Ta (15-25°C) durante 5 minutos.
5. Adicionar **140 µL** de **clorofórmio** ao tubo contendo o homogeneizado e fechar bem a tampa. Agitar o tubo vigorosamente durante 15 segundos.
6. Incubar o tubo contendo o homogeneizado a Ta durante 2-3 minutos.
7. Centrifugar a 12.300 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Transferir a fase aquosa para um novo tubo coletor. Adicionar **525 µL** de **etanol 100%** e misturar bem pipetando para cima e para baixo várias vezes. Não centrifugar.
9. Pipetar até 700 µL da amostra, incluindo qualquer precipitado que se tenha formado, para uma “*RNeasy Mini spin column*” acoplada a um tubo coletor de 2 mL. Fechar a tampa suavemente e centrifugar a $\geq 10,000$ rpm durante 1 minuto à Ta. Descartar o filtrado. Reutilizar o tubo coletor para o passo 10.
10. Repetir o passo anterior com a amostra restante. Reutilizar o tubo coletor para o passo 11.
11. Adicionar **700 µL** de **Buffer RWT** à “*RNeasy Mini spin column*”. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante 1 minuto a $\geq 10,000$ rpm. Descartar o filtrado. Reutilizar o tubo coletor para o passo 12.
12. Pipetar **500 µL** de **Buffer RPE** na “*RNeasy Mini spin column*”. Fechar a tampa cuidadosamente e centrifugar durante 1 minuto a $\geq 10,000$ rpm para lavar a coluna. Descartar o filtrado. Reutilizar o tubo coletor para o passo 13.
13. Repetir a lavagem com **500 µL** de **Buffer RPE** à “*RNeasy Mini spin column*”. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante 2 minutos a $\geq 10,000$ rpm para secar a membrana da “*RNeasy Mini spin column*”. Descartar o filtrado.
14. Centrifugar à velocidade máxima durante 1 minuto para remover restos de tampão.
15. Transferir a “*RNeasy Mini spin column*” para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Adicionar **40 µL** de **RNase-free water** diretamente na membrana da “*RNeasy Mini spin column*”. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante 1 minuto a $\geq 10,000$ rpm para eluir o RNA.
16. Guardar o RNA a -80°C.

Procedimento adaptado de:

GmbH, Q. (2020). miRNeasy Mini Handbook. *Qiagen*, (January), 1–50. Retrieved from <http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/microna/mirneasyminikit.aspx%5Cnpapers3://publication/uuid/90E2FFEA-954B-4D77-AD8C-F45C2A2DC324>

Anexo 5: Reação síntese de cDNA (estudo dos miRNA)

Procedimento

1. Manter os reagentes e reações no gelo (4°C).
2. Ajustar cada uma das amostras de RNA do template para uma concentração de 5 ng/μl utilizando nuclease free water.
3. Preparar os reagentes
4. Configuração da reação de transcriptase reversa (2 μl de amostra + 8 μl de master mix):

Tabela 8.1 – Volumes dos reagentes utilizados na reação síntese de cDNA.

Reagentes	Volume (μl)
5x Reaction buffer	2
Nuclease free water	4,5
Enzyme mix	1
UniSp6 Spike-in	0,5*
RNA total do template (10 ng/ μl)	2

*no kit recomenda-se adicionar 1 μl de spike-in sintético (10⁸ cópias/μl) a 20 ng de RNA

5. Vortexar ou pipetar *up and down*.
6. Incubar durante 60 min a 42°C. Inativar o calor da transcrição reversa durante 5 min a 95°C. Arrefecer imediatamente a 4°C.
7. Armazenar a 4°C ou congelar.

Apêndice I: Quantificação de RNA

Tabela 9.1 - Resultados da quantificação do RNA presente nas amostras celulares.

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
E 0,5 A	530,53	1,987	2,118
E 0,5 B	492,808	2,08	2,051
E 0,5 C	427,749	2,065	2,137
E 50 A	472,072	2,069	1,905
E 50 B	309,89	2,042	2,063
E 50 C	319,472	2,043	1,201
E 100 A	341,811	2,048	2,002
E 100 B	293,286	2,027	1,777
E 100 C	318,298	2,022	1,65
C- A	412,486	2,038	1,752
C- B	397,621	2,043	1,872
C- C	461,224	2,079	1,792
Q 0,2 A	397,149	2,037	1,656
Q 0,2 B	461,622	1,986	1,856
Q 0,2 C	411,457	1,984	1,561
Q 20 A	417,564	1,991	1,646
Q 20 B	310,022	1,962	1,596
Q 20 C	433,205	2,018	1,762
HU A	421,517	2,017	0,952
HU B	297,683	2,057	2,129
HU C	389,352	2,052	0,821
V A	496,418	1,960	1,844
V B	337,341	1,912	1,309
V C	584,308	1,960	1,58

Apêndice II: Reação síntese de cDNA (estudos dos genes codificantes)

Preparação da reação

1. Em tubos de PCR de 0,5 mL adicionou-se um por um todos os reagentes conforme descrito na **Tabela 9.2**.

Tabela 9.2 - Volumes dos reagentes utilizados na reação.

Reagentes	Volume (µL)
50 ng/µl random hexamers	1
10 mM dNTP mix (10 mM cada)	1
Template RNA	Até 11
DEPC-treated water	Até 13

2. Sujeitou-se os tubos a uma breve centrifugação, de forma a homogeneizar todos os constituintes, e de seguida colocou-se no termociclador *Bio-Rad iCycler®* durante 5 minutos a 65°C. Após este processo incubou-se os tubos em gelo durante pelo menos 1 minuto.

3. Preparou-se a mistura de reação conforme descrito na **Tabela 9.3**.

Tabela 9.3 - Volumes dos reagentes utilizados na mistura de reação.

Reagentes	Volume (µL)
5x SSIV Buffer	4
100 mM DTT	1
Ribonuclease Inhibitor	1
SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (200 U/µL)	1

4. Após adicionar-se o volume correspondente da mistura de reação em cada strip, estes foram colocados no equipamento CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) programado com as condições apresentadas na **Tabela 9.4**.

Tabela 9.4 - Temperaturas e tempos utilizados na reação de síntese de cDNA.

Temperatura	Tempos
23°C	10 minutos
50°C	10 minutos
80°C	10 minutos

Apêndice III: Princípio da técnica de PCR quantitativo em tempo real e respectivo procedimento

A técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) inventada por Kary Mullis em 1983, permite a síntese de fragmentos específicos de DNA através da utilização da enzima DNA-polimerase, que participa na replicação do material genético celular^{124,125}. Além disso, estão envolvidos outros componentes, nomeadamente Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs), primers específicos (forward e reverse), para além dos fragmentos de DNA ou cDNA que se pretendem amplificar¹²⁴.

Os tubos que contêm esta reação de mistura são então submetidos a ciclos de temperatura repetitivos e este processo é dividido em três fases que ocorrem a diferentes temperaturas: fase de desnaturação (separação das cadeias), *annealing* (união dos primers) e extensão (síntese de novas cadeias), obtendo-se uma amplificação exponencial¹²⁴.

A descoberta do PCR permitiu inúmeros desenvolvimentos científicos, nomeadamente a sequenciação do genoma, a determinação da paternidade e o diagnóstico de doenças infecciosas¹²⁵.

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) gera resultados quantitativos e permite acompanhar a reação e os resultados com maior precisão e menos tempo, comparativamente com o PCR convencional¹²⁵. Além disso, permite um melhor controlo de qualidade e o risco de contaminação é menor¹²⁵.

O qPCR é definido como uma técnica que permite a quantificação da expressão de genes de interesse em tempo real, podendo ser aplicado a culturas celulares¹²⁶. Para tal, é necessário extrair o RNA e convertê-lo em cDNA através da transcrição reversa, para ser utilizado como molde na reação de Qpcr¹²⁶.

O qPCR pode ser dividido em 4 etapas: fase inicial, fase exponencial, fase linear e a fase plateau¹²⁷ (**Figura 9.1**).

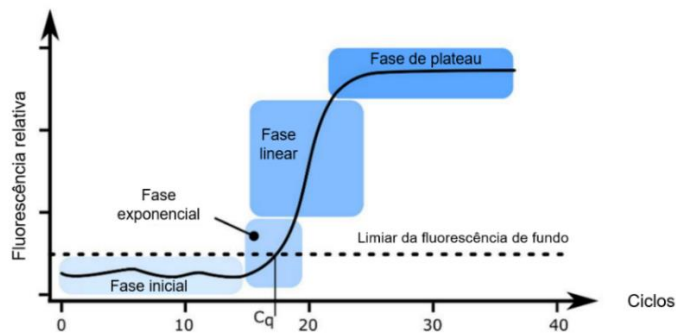


Figura 9.1 - Fases da curva de amplificação do qPCR (inicial, exponencial, linear e plateau) da quantidade relativa de fluorescência emitida em função do número de ciclos. O ciclo de quantificação (Cq) representa o número de ciclos necessários para que o final fluorescente seja superior à fluorescência de fundo, sendo inversamente proporcional à quantidade de amostra inicial. Adaptado de [127].

A intensidade da fluorescência emitida aquando da ligação do corante e da cadeia dupla de DNA aumenta proporcionalmente à quantidade do produto de PCR no interior dos tubos¹²⁸. Os valores da fluorescência de cada ciclo são registados e representam a quantidade de DNA amplificado¹²⁵. Para tal, é necessário um sistema com um corante fluorescente e um termociclador que detete a fluorescência, de modo a detetar e quantificar o DNA de interesse¹²⁸.

De forma a normalizar os resultados obtidos pode-se utilizar a quantificação absoluta e quantificação relativa, sendo que a primeira determina dos níveis de expressão em amostras desconhecidas, enquanto através da relativa é possível determinar a diferença relativa entre a expressão do gene de referência e a expressão do gene de interesse^{129,130}.

Preparação da mistura de reação (estudo dos genes)

1. Preparou-se a mistura conforme descrito na **Tabela 9.5**. Para a amplificação de cada gene colocaram-se todos os componentes, à exceção do cDNA na mistura de reação. Como controlo positivo utilizou-se água (NTC – *No Template Control*) de modo a validar os resultados.

Tabela 9.5 - Reagentes utilizados na reação de qPCR (mRNA).

Reagentes	Volume (µL)
iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)	10
Primer Forward (200/300 nM)	0,6
Primer Reverse (200/300 nM)	0,6
H ₂ O	8,3
cDNA	0,5

Volume final	20
---------------------	----

Nota: O reagente *iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)* é um reagente comercial para ensaios de qPCR, contendo um corante fluorescente (SYBR Green), a enzima *iTaq DNA polymerase*, dNTPs e MgCl₂. A este reagente é necessário adicionar a cadeia molde de cDNA a amplificar e os primers (*forward* e *reverse*) específicos do gene de interesse.

2. Após a adição do volume correspondente da mistura de reação em cada strip, adicionou-se o cDNA nos tubos de PCR correspondentes.
3. Dividiu-se o volume de cada tubo de PCR por 3 poços (triplicados) de uma placa de 96 poços. Após o seu preenchimento de acordo com o esquema da experiência, esta foi centrifugada e posteriormente colocada no equipamento *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad) programado com as condições apresentadas na **Tabela 9.6**.

Tabela 9.6 - Condições de amplificação da reação de qPCR (mRNA).

Ciclos	Fase	Temperaturas (°C)	Tempos
1	Desnaturação	95	2 minutos
40	Desnaturação	95	30 segundos
	<i>Annealing</i>	55	30 segundos
	Alongamento	72	40 segundos
1	Alongamento	72	5 minutos

Preparação da mistura de reação (miRNAs)

1. Diluíram-se as amostras de cDNA (1:40) em *nuclease free water* e centrifugaram-se os tubos;
2. Preparou-se a mistura conforme descrito na **Tabela 9.7**. Para a amplificação de cada miRNA colocaram-se todos os componentes, à exceção do cDNA na mistura de reação;

Tabela 9.7 – Reagentes utilizados na reação de qPCR (miRNAs).

Reagentes	Volume (µL)
iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)	5
PCR primer mix	1
Template de cDNA diluído	4
Volume final	10

3. Dividiu-se o volume de cada tubo de PCR por 3 poços (triplicados) de uma placa de 96 poços. Após o seu preenchimento de acordo com o esquema da experiência, esta foi centrifugada e posteriormente colocada no equipamento *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad) programado com as condições apresentadas na **Tabela 9.8**.

Tabela 9.8 – Condições de amplificação da reação de qPCR (miRNAs).

Ciclos	Fase	Temperaturas (°C)	Tempos
1	Desnaturação	95	10 minutos
50	Amplificação	95	10 segundos
		60	1 minuto